



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Εφαρμογή τεχνικών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι
αρμοϊών σε πληθυσμό της Θεσσαλίας**

Διπλωματική Εργασία
ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ

Υπεύθυνη Καθηγήτρια: Πετεινάκη Έφη
Τμήμα Ιατρικής-Ορολογικό Εργαστήριο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• Εισαγωγή - Δομή των ιών	Σελ.3
○ Ταξινόμηση	Σελ.3
○ Δομή του σωματιδίου του ιού	Σελ.3-4
○ Ιοί με καψίδιο	Σελ.4-5
○ Ιοί με περίβλημα	Σελ.5-6
• Αναπαραγωγή του ιού	Σελ.7
○ Αναγνώριση και προσκόλληση στο κύτταρο στόχο	Σελ.7-8
○ Διείσδυση	Σελ.8
○ Έκδυση	Σελ.8-9
○ Συνθεση μακρομορίων	Σελ.9-10
○ Ιοί από DNA	Σελ.10-12
○ Ιοί από RNA	Σελ.12-13
○ Σύνθεση ιικών πρωτεϊνών	Σελ.13-15
○ Συναρμολόγηση	Σελ.15-16
○ Απελευθέρωση	Σελ.16-17
○ Επανάραξη του κύκλου αναπαραγωγής	Σελ.17
• Γενετική των ιών	Σελ.18
○ Θεραπείες με φορείς ιούς	Σελ.20
• Τρόποι διάγνωσης ιογενών λοιμώξεων	Σελ.21
○ Ηλεκτρονική μικροσκόπηση	Σελ.22
○ Κυτταροκαλλιέργειες	Σελ.22-23
○ Ιική εντόπιση	Σελ.23-24
○ Επεξεργασία των αποτελεσμάτων των καλλιιεργειών	Σελ.24
○ Εντοπισμός ιικών πρωτεϊνών	Σελ.24-25
○ Εντοπισμός του ιικού γενετικού υλικού	Σελ.25-26
○ Ορολογικές μέθοδοι	Σελ.27
○ Μέθοδοι ορολογικών εξετάσεων	Σελ.27-28
○ Περιορισμοί ορολογικών μεθόδων	Σελ.28
• Λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος	Σελ.29
○ Ιογενείς λοιμώξεις του ΚΝΣ	Σελ.30-31
• Αρμποϊοί – Γενικά χαρακτηριστικά	Σελ.32
○ Περιγραφή των ιών και η σημασία τους	Σελ.32-35
○ Εργαστηριακή Διάγνωση	Σελ.35
○ Η γεωγραφική εξάπλωση των αρμποϊών ως αποτέλεσμα σημαντικών επιδημιολογικών αλλαγών	Σελ.35-36
○ Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση αρμποϊών	Σελ.36-37
• Εισαγωγή στον Ιό του Δυτικού Νείλου	Σελ.38
○ Ταξινόμηση	Σελ.38-39
○ Γεωγραφική εξάπλωση	Σελ.39-40
○ Ιική εξέλιξη και προσαρμογή	Σελ.40-41

○	Δομή του ιού	Σελ.41-42
○	Κύκλος ζωής του ιού	Σελ.42-44
○	Ανοσοαπαντήσεις στον WNV	Σελ.44
○	Φυσική Ανοσία	Σελ.44-46
○	Χυμική Απόκριση	Σελ.46-47
○	Κυτταρική Απόκριση	Σελ.47-48
○	Αναστολή της Φυσικής Ανοσίας από Μηχανισμούς του WNV	Σελ.48-49
•	Εργαστηριακή διάγνωση ύποπτων περιστατικών του Ιού του Δυτικού Νείλου	Σελ.50
○	Ορολογική μέθοδος	Σελ.50
○	Μοριακές μέθοδοι	Σελ.50
•	Σκοπός της μελέτης	Σελ.51
•	Υλικά και μέθοδοι	Σελ.52
○	Ανοσοενζυμικές μέθοδοι	Σελ.52
○	Γενικές αρχές	Σελ.52-53
○	Τεχνικές	Σελ.53
○	Εφαρμογές	Σελ.54
○	Αρχή της ELISA	Σελ.54-55
○	Δείγμα	Σελ.55
○	Μεθοδολογία	Σελ.55
○	Αντιδραστήρια απαραίτητα για την αρχή της μεθόδου	Σελ.55-56
○	Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	Σελ.56
•	Αποτελέσματα	Σελ.57
•	Συζήτηση	Σελ.58
•	Βιβλιογραφία	Σελ.59-61

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι ιοί ποικίλλουν από τους δομικά απλούς και μικρούς παρβοϊούς και πικορναϊούς έως τους μεγάλους και σύνθετους ιούς της ευλογιάς και του έρπητα. Η ονομασία τους μπορεί να δείχνει χαρακτηριστικά των ιών, τις ασθένειες με τις οποίες συνδέονται ή ακόμα τον ιστό ή την γεωγραφική περιοχή στην οποία βρέθηκαν για πρώτη φορά. Ονόματα όπως ο ιός *Picornia* (*pico*= "μικρός" *rna*= "ριβονουκλεϊκό οξύ") ή ο ιός *Toga* (*toga*= λατιν. "μανδύας," λόγω της μεμβράνης που περιβάλλει τον ιό) περιγράφουν τη δομή του ιού, ενώ το όνομα ιός *Parvona* περιγράφει τα μέλη της οικογένειας του (*papilloma, polyoma, vacuolating viruses*). Η ονομασία *ρετροϊός* (*retro*= "αντίστροφος") αναφέρεται στην κατευθυνόμενη από τον ιό σύνθεση DNA από μήτρα RNA, ενώ η ονομασία *ιοί της ευλογιάς* οφείλεται στη νόσο ευλογιά που προκαλεί ένα από τα μέλη τους. Οι *αδενοϊοί* (αδενοειδείς εκβλαστήσεις) και οι *ρεοϊοί* (*respiratory, enteric, orphan*) ονομάστηκαν από την περιοχή του σώματος στην οποία βρέθηκαν για πρώτη φορά. Ο ρεοϊός ανακαλύφθηκε πριν συσχετιστεί με συγκεκριμένη νόσο και γι'αυτό χαρακτηρίστηκε "ορφανός" ιός. Ο ιός Norwalk πήρε το όνομα από το Norwalk, Ohio· ο ιός coxsackie από το Coxsackie, N.Y, ενώ πολλοί από τους ιούς Toga, Arena και ιούς Bunya έχουν αφρικανικά τοπωνύμια από την περιοχή που πρωτοβρέθηκαν.

Οι ιοί είναι δυνατόν να ταξινομηθούν βάσει χαρακτηριστικών όπως η νόσος που προκαλούν (π.χ. ηπατίτιδα), ο ιστός που προσβάλλουν, η οδός μετάδοσης (π.χ. εντερική, αναπνευστική) ή ο φορέας τους [π.χ., αρμοϊοί= arthropod borne (μεταφερόμενοι από αρθρόποδα)]. Η πιο συνεπής και σύγχρονη μέθοδος ταξινόμησης είναι με βάση τα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος, η μορφολογία (π.χ., παρουσία ή απουσία μεμβρανώδους περιβλήματος), ο τύπος του γονιδιώματος και ο τρόπος αντιγραφής. Οι ιοί από DNA που σχετίζονται με ασθένειες του ανθρώπου διαιρούνται σε επτά οικογένειες. Οι ιοί από RNA είναι δυνατόν να διαιρεθούν σε 14 τουλάχιστον οικογένειες.

Δομή του σωματιδίου του ιού

Το μέγεθος του σωματιδίου του ιού (*virion*) μετριέται σε δισεκατομμυριοστά του μέτρου (nm). Οι κλινικά σημαντικοί ιοί κυμαίνονται από 18 nm (παρβοϊοί) έως 300nm (ιοί ευλογιάς). Οι τελευταίοι είναι σχεδόν ορατοί με το κοινό μικροσκόπιο και έχουν το ένα τέταρτο του μεγέθους του *Σταφυλόκοκκου*. Τα μεγαλύτερα σωματίδια των ιών μπορούν να συγκρατήσουν μεγαλύτερο γονιδίωμα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να κωδικογραφήσει περισσότερες πρωτεΐνες, και γενικά είναι περισσότερο περίπλοκα. Το σωματίδιο του ιού αποτελείται από γονιδίωμα εκ νουκλεϊκού οξέος κλεισμένο μέσα σε πρωτεϊνική κάψα (καψίδιο) ή σε μεμβράνη (περίβλημα) και μπορεί ακόμα να περιέχει ορισμένα ουσιώδη ή επικουρικά ένζυμα ή άλλες πρωτεΐνες. Με το γονιδίωμα μπορεί να συνδεθεί το καψίδιο ή διάφορες πρωτεΐνες συνδεδεμένες με νουκλεϊκό οξύ και να σχηματιστεί το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο μπορεί να είναι το ίδιο το σωματίδιο του ιού ή να περικλείεται σε περίβλημα. Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται είτε από DNA είτε από RNA. Το DNA μπορεί να είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο, γραμμικό ή κυκλικό. Το RNA μπορεί να

είναι είτε θετικής πολικότητας (+) [σαν το αγγελιοφόρο RNA (mRNA)] ή αρνητικής πολικότητας (-) (κατά αναλογία με το αρνητικό μιας φωτογραφίας), δίκλωνο (+/-) ή αμφιπολικό (ambisense) (περιέχει + και - περιοχές του RNA συνδεδεμένες άκρο προς άκρο). Το γονιδίωμα από RNA μπορεί επίσης να είναι κατατετμημένο και σε κάθε τμήμα να κωδικογραφείται ένα γονίδιο. Όπως ακριβώς υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι μνήμης στους ηλεκτρονικούς υπολογιστές, όλες αυτές οι μορφές των πυρηνικών οξέων μπορούν να διατηρούν και να μεταβιβάζουν τις γενετικές πληροφορίες του ιού. Ομοίως, όσο μεγαλύτερο το γονιδίωμα τόσο περισσότερες πληροφορίες (γονίδια) μπορεί να μεταφέρει και τόσο μεγαλύτερο πρέπει να είναι το καψίδιο ή το περίβλημα που θα περιβάλλει το γονιδίωμα.

Η εξώτατη στιβάδα του σωματιδίου του ιού είναι το καψίδιο (capsid) ή το περίβλημα (πέπλος). Αυτές οι δομές είναι το μέσον συσκευασίας, προστασίας και μεταφοράς για τη μετάδοση του ιού από ξενιστή σε ξενιστή και για την εξάπλωση εντός του ξενιστή στα κύτταρα στόχους. Τα επιφανειακά στοιχεία του καψιδίου και του περιβλήματος διαμεσολαβούν στην αλληλεπίδραση του ιού με το κύτταρο στόχο. Η αφαίρεση ή διάρρηξη της εξωτερικής συσκευασίας αδρανοποιεί τον ιό. Τα αντισώματα που παράγονται κατά συστατικών αυτών των δομών εμποδίζουν τη μόλυνση από τον ιό.

Το καψίδιο είναι άκαμπτη δομή ικανή να ανθίσταται στις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι ιοί με γυμνά καψίδια είναι γενικά ανθεκτικοί στην ξηρασία, στα οξέα και στα απορρυπαντικά, συμπεριλαμβανομένων των οξέων και της χολής της εντερικής οδού. Πολλοί από αυτούς μεταδίδονται δια της κοπρανοστοματικής οδού και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και μέσα σε βοθρολύματα.

Το περίβλημα ή πέπλος είναι μεμβράνη αποτελούμενη από λιπίδια, πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες. Η μεμβρανώδης δομή του διατηρείται μόνο μέσα σε υδατικά διαλύματα. Καταστρέφεται αμέσως από ξηρασία, όξινο pH, απορρυπαντικά και διαλυτικά σαν τον αιθέρα, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ιού. Συνεπώς, οι ιοί που φέρουν περίβλημα πρέπει να παραμένουν υγροί και γενικά μεταδίδονται μέσα σε υγρά με σταγονίδια της αναπνοής, αίμα και ιστούς. Οι περισσότεροι δεν επιβιώνουν στο δυσμενές περιβάλλον της γαστρεντερικής οδού.

Ιοί με καψίδιο

Το ιικό καψίδιο συναρμολογείται από μεμονωμένες πρωτεΐνες συνδεδεμένες σε προοδευτικά αυξανόμενες μονάδες. Όλα τα συστατικά του καψιδίου έχουν χημικούς χαρακτήρες που επιτρέπουν τη συνένωσή τους σε μεγαλύτερη μονάδα. Οι μεμονωμένες δομικές πρωτεΐνες συνδέονται σε υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται σε πρωτομερίδια, καψομερίδια (διακρίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) και, τελικά, σε χαρακτηριστικό προκαψίδιο ή καψίδιο. Το προκαψίδιο χρειάζεται περαιτέρω επεξεργασία, έως το τελικό, μεταδιδόμενο καψίδιο. Σε μερικούς ιούς, το καψίδιο σχηματίζεται γύρω από το γονιδίωμα σε άλλους, το καψίδιο σχηματίζεται ως άδειο κέλυφος (προκαψίδιο) το οποίο γεμίζει με το γονιδίωμα. Οι απλούστερες ιικές δομές που είναι δυνατόν να κατασκευαστούν σε διαδοχικά στάδια είναι συμμετρικές και περιλαμβάνουν ελικοειδείς και εικοσαεδρικές δομές. Οι ελικοειδείς δομές έχουν την εμφάνιση ραβδίων, ενώ τα εικοσαέδρα είναι σαν σφαίρα συναρμολογούμενη από συμμετρικές υπομονάδες. Τα ασύμμετρα καψίδια έχουν περίπλοκες μορφές και σχετίζονται με ορισμένους ιούς βακτηρίων (φάγους).

Κλασικό παράδειγμα ιού με ελικοειδή συμμετρία είναι ο φυτικός ιός της μωσαϊκής νόσου του καπνού. Τα καψομερίδια τους συναρμολογούνται μόνο τους επάνω στο γονιδίωμα από RNA και σχηματίζουν ραβδία που επιμηκύνουν το γονιδίωμα. Τα καψομερίδια καλύπτουν και προστατεύουν το RNA. Ελικοειδή νουκλεοκαψίδια παρατηρούνται μέσα στο περίβλημα πολλών ιών με αρνητικής πολικότητας RNA.

Απλά εικοσάεδρα χρησιμοποιούν οι μικροί, απλοί ιοί, όπως οι πικορναϊοί και οι παρβοϊοί. Το εικοσάεδρο σχηματίζεται από 12 καψομερίδια, καθένα των οποίων έχει πενταπλή συμμετρία [πενταμερίδια ή πεντόνια (pentons)]. Στους πικορναϊούς, κάθε πενταμερίδιο κατασκευάζεται από πέντε πρωτομερίδια, έκαστο των οποίων αποτελείται από τρεις υπομονάδες εκ τεσσάρων ξεχωριστών πρωτεϊνών. Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X και η ανάλυση της απεικόνισης με κρυσταλλογραφικό μικροσκόπιο αποκάλυψε τη δομή του καψιδίου των ιών Picorna έως το μοριακό επίπεδο. Αυτές οι μελέτες έδειξαν μια σχισμή σαν φαράγγι, η οποία αποτελεί "θέση πρόσδεσης" για σύνδεση με υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου.

Σωματίδια ιών με μεγαλύτερα καψίδια κατασκευάζονται με την εισαγωγή δομικά ξεχωριστών καψομεριδίων στις κορυφές μεταξύ των πενταμεριδίων. Τα καψομερίδια αυτά έχουν έξι πλησιέστερους γείτονες [εξακαψομερίδιο (hexon)]. Έτσι επεκτείνεται το εικοσάεδρο και προκύπτει το εικοσαεδελτάεδρο, το μέγεθος του οποίου καθορίζεται από τον αριθμό των εισαγόμενων εξακαψομεριδίων κατά μήκος των ακμών και εντός των επιφανειών μεταξύ των πενταμεριδίων. Για παράδειγμα το νουκλεοκαψίδιο του ερπητοϊού έχει 12 πενταμερίδια, 150 εξακαψομερίδια και περικλείεται επίσης σε περίβλημα. Το καψίδιο του αδενοϊού απαρτίζεται από 252 καψομερίδια, με 12 πενταμερίδια και 240 εξακαψομερίδια. Σε κάθε πενταμερίδιο του αδενοϊού είναι προσκολλημένο ένα μακρύ ινίδιο που χρησιμεύει ως ιική προσκολλητική πρωτεΐνη (VAP, viral attachment protein) για να προσδένεται στα κύτταρα στόχους και περιέχει επίσης το αντιγόνο που χαρακτηρίζει τον τύπο του ιού. Οι ρεοϊοί έχουν εικοσαεδρικό διπλό καψίδιο με ινώδεις πρωτεΐνες μερικώς εκτεινόμενες από κάθε κορυφή. Το εξωτερικό καψίδιο προφυλάσσει τον ιό και διευκολύνει την πρόσληψη του κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού και εντός των κυττάρων στόχων, ενώ το εσωτερικό καψίδιο περιέχει ένζυμα για τη σύνθεση RNA.

Ιοί με περίβλημα

Το περίβλημα του σωματιδίου του ιού αποτελείται από λιπίδια, πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες. Έχει δομή μεμβράνης ανάλογης με την κυτταρική μεμβράνη. Κυτταρικές πρωτεΐνες σπανίως ανευρίσκονται στο ιικό περίβλημα, ακόμα κι όταν αυτό αποκτάται από κυτταρικές μεμβράνες. Οι περισσότεροι ιοί με περίβλημα είναι στρογγυλοί ή πολύμορφοι. Δύο εξαιρέσεις αποτελούν ο ευλογιοϊός, ο οποίος έχει πολύπλοκη εσωτερική και σαν από οπτόπλινθους εξωτερική δομή, και ο ραβδοϊός, ο οποίος έχει σχήμα βλήματος.

Οι περισσότερες ιικές γλυκοπρωτεΐνες έχουν υδατάνθρακα συνδεδεμένο με ασπαραγίνη (συνδεδεμένο με άζωτο) και προεκτείνονται μέσω του περιβλήματος και μακριά από την επιφάνεια του σωματιδίου του ιού. Σε πολλούς ιούς αυτές έχουν τη μορφή ακανθών. Οι περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες δρουν ως VAP, ικανές να προσδένονται σε δομές των κυτταρικών στόχων. Οι VAP που έχουν την ικανότητα να συνδέονται επίσης με ερυθρά αιμοσφαίρια αποκαλούνται

αιμοσυγκολλητίνες (HAs). Μερικές γλυκοπρωτεΐνες έχουν άλλες λειτουργίες, όπως η νευραμινιδάση των ορθομυξοϊών (γρίπη) και οι υποδοχείς Fc και C3b που σχετίζονται με τις γλυκοπρωτεΐνες του ιού του απλού έρπητα ή τις γλυκοπρωτεΐνες σύντηξης των παραμυξοϊών. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι επίσης μείζονα αντιγόνα που προκαλούν τη δημιουργία προστατευτικής ανοσίας.

Το περίβλημα των ιών Toga περιβάλλει ένα εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο που περιέχει γονιδίωμα από RNA θετικής πολικότητας. Το περίβλημα διαθέτει άκανθες αποτελούμενες από δύο ή τρεις γλυκοπρωτεϊνικές υπομονάδες αγκυρωμένες στο εικοσαεδρικό καψίδιο του ισοωματίου. Αυτό επιτρέπει στο περίβλημα να προσκολλάται σταθερά και να διατηρεί την ευδιάκριτη στο κρυοηλεκτρονικό μικροσκόπιο εικοσαεδρική δομή του.

Όλοι οι ιοί με RNA αρνητικής πολικότητας διαθέτουν περίβλημα. Συστατικά της εξαρτώμενης από RNA ιικής πολυμεράσης RNA συνάπτονται με το γονιδίωμα από (-) RNA των ορθομυξοϊών, παραμυξοϊών και ραβδοϊών για να σχηματίσουν ελικοειδή νουκλεοκαψίδια. Τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για να αρχίσει η αντιγραφή του ιού και η σύνδεση τους με το γονιδίωμα εξασφαλίζει την είσοδό τους στο κύτταρο. Πρωτεϊνικό υπόστρωμα που επενδύει το εσωτερικό του περιβλήματος διευκολύνει τη συναρμολόγηση του νουκλεοκαψιδίου μέσα στο ισομάτιο. Ο ιός της γρίπης Α (ορθομυξοϊός) αποτελεί παράδειγμα ιού με (-) RNA και κατατετμημένο γονιδίωμα. Το περίβλημα του επενδύεται από πρωτεϊνικό στρώμα και έχει δύο γλυκοπρωτεΐνες: την αιμοσυγκολλητίνη, η οποία είναι η VAP, και μία νευραμινιδάση (NA). Οι ιοί bunya δεν έχουν πρωτεϊνικό στρώμα.

Το περίβλημα των ερπητοϊών είναι σαν σάκος που περικλείει το εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο. Ανάλογα με τον τύπο του ερπητοϊού, το περίβλημα μπορεί να περιέχει έως και 11 γλυκοπρωτεΐνες. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ του νουκλεοκαψιδίου και του περιβλήματος αποκαλείται υμένας (tegument) και περιέχει ένζυμα, άλλες πρωτεΐνες, ακόμη και mRNA που διευκολύνει τη μόλυνση από τον ιό.

Οι ιοί της ευλογιάς έχουν περίβλημα με μεγάλα, σύνθετα σχήματα οπτόπλινθου, το οποίο περικλείει πυρηνοειδές από DNA, πλάγια σωμάτια, ινίδια και πολλά ένζυμα και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των αναγκαίων ενζύμων και παραγόντων μεταγραφής για τη σύνθεση mRNA.

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Τα βασικά βήματα της αναπαραγωγής είναι ίδια σε όλους τους ιούς. Το κύτταρο λειτουργεί σαν εργοστάσιο, παρέχοντας υποστρώματα, ενέργεια και μηχανισμούς αναγκαίους για τη σύνθεση ιικών πρωτεϊνών και την αντιγραφή του γονιδιώματος. Οι λειτουργίες που δεν προσφέρονται από το κύτταρο πρέπει να κωδικογραφούνται στο γονιδίωμα του ιού. Ο τρόπος με τον οποίο κάθε ιός επιτυγχάνει αυτό το σκοπό και ξεπερνά τους βιοχημικούς περιορισμούς του κάθε κυττάρου καθορίζεται από τη δομή του γονιδιώματος και από το ιοσωμάτιο (εάν υπάρχει περίβλημα ή γυμνό καψίδιο).

Ένας κύκλος ιικής αντιγραφής μπορεί να διαιρεθεί σε πολλές φάσεις. Κατά την πρώιμη φάση της μόλυνσης, ο ιός πρέπει να αναγνωρίσει το κατάλληλο κύτταρο στόχο, να προσκολληθεί σε αυτό, να περάσει από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να προσληφθεί από το κύτταρο, να απελευθερώσει (έκδυση) το γονιδίωμα του μέσα στο κυτταρόπλασμα και, εάν χρειαστεί, να μεταφέρει το γονιδίωμα του στον πυρήνα. Η όψιμη φάση αρχίζει με την έναρξη της αντιγραφής του γονιδιώματος και τη σύνθεση ιικών μακρομορίων και συνεχίζεται με την συναρμολόγηση του ιού και την απελευθέρωσή του. Η απαλλαγή του γονιδιώματος από το καψίδιο ή το περίβλημα στην πρώιμη φάση εξαφανίζει τη μολυσματικότητα του ιού και τις αναγνωρίσιμες δομές, σηματοδοτώντας έτσι την περίοδο της έκλειψης. Η περίοδος της έκλειψης τερματίζεται με την εμφάνιση νέων σωματιδίων μετά τη συναρμολόγηση του ιού. Η περίοδος της λανθάνουσας κατάστασης, κατά την οποία δεν ανιχνεύεται εξωκυττάριος μολυσματικός ιός, περιλαμβάνει την περίοδο της έκλειψης και τελειώνει με την απελευθέρωση νέων ιών. Κάθε μολυσμένο κύτταρο μπορεί να παραγάγει έως και 100.000 σωματίδια, αλλά μόλις το 1-10% αυτών μπορεί να είναι μολυσματικό. Τα μη μολυσματικά σωματίδια (ελλειμματικά σωματίδια) προέρχονται από μεταλλάξεις και λάθη κατά την κατασκευή και συναρμολόγηση των σωματιδίων. Η παραγωγή μολυσματικών ιών ανά κύτταρο, η αφθονία ιών, και ο απαιτούμενος χρόνος για έναν κύκλο αναπαραγωγής καθορίζονται από τις ιδιότητες του ιού και του κυττάρου στόχου.

Αναγνώριση και προσκόλληση στο κύτταρο στόχο

Η σύνδεση των VAP ή επιφανειακών δομών του καψιδίου με υποδοχείς του κυττάρου αρχικά προσδιορίζει ποιά κύτταρα είναι δυνατόν να μολυνθούν από τον ιό. Οι υποδοχείς του κυττάρου για τον ιό μπορεί να είναι πρωτεΐνες ή υδατάνθρακες επάνω σε γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια. Οι ιοί που συνδέονται σε υποδοχείς συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου μπορεί να περιορίζονται σε ορισμένα ζωικά είδη (εύρος ξενιστών) (π.χ. άνθρωπος, ποντικός) ή ορισμένες κατηγορίες κυττάρων. Το ευπαθές κύτταρο στόχος καθορίζει τον ιστικό τροπισμό (π.χ. νευροτροπισμός, λεμφοτροπισμός). Ο ιός Epstein-Barr ανήκει στους ερπητοϊούς και έχει πολύ περιορισμένο εύρος ξενιστών και τροπισμού επειδή συνδέεται στον υποδοχέα C3d (CR2) που εκφράζουν τα β κύτταρα του ανθρώπου. Ο παρβοϊός B19 συνδέεται με εγκεφαλοσίδες (globosides) (αντιγόνα P της ομάδας αίματος) που εκφράζονται σε πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα.

Η ιική δομή με την οποία το καψίδιο προσκολλάται μπορεί να είναι είτε μέρος του καψιδίου είτε πρωτεΐνη εκτεινόμενη από το καψίδιο. Μια σχισμή στην

επιφάνεια των ιών Picorna, όπως στον ρινοϊό 14, χρησιμεύει σαν “κλειδαρότρυπα” για την εισαγωγή τμήματος του διακυττάρου προσκολλητικού μορίου (ICAM-1, intercellular adhesion molecule) από την κυτταρική επιφάνεια. Τα ινίδια των αδενοϊών και οι σ-1 πρωτεΐνες των ρεοϊών στις κορυφές του καψιδίου αλληλεπιδρούν με υποδοχείς που εκφράζονται σε συγκεκριμένα κύτταρα στόχους.

Οι VAP είναι ειδικές γλυκοπρωτεΐνες των ιών με περίβλημα. Η HA του ιού της γρίπης Α συνδέεται με σιαλικό οξύ που εκφράζουν πολλά διαφορετικά κύτταρα και διαθέτει ευρύ φάσμα ξενιστών και ιστικού τροπισμού. Ομοίως οι ιοί Tog-a και οι φλαβοϊοί εκφράζουν κύτταρα πολλών ζωικών ειδών, όπως αρθροπόδων, ερπετών, αμφιβίων, πτηνών και θηλαστικών. Αυτό τους επιτρέπει να προσβάλλουν ζώα, κουνούπια και άλλα έντομα και να διαδίδονται μέσω αυτών.

Διείσδυση

Πολλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των VAP και των κυτταρικών υποδοχέων υποβοηθούν την εσωτερίκευση του ιού στο κύτταρο. Ο μηχανισμός της εσωτερίκευσης εξαρτάται από τη δομή του σωματιδίου και τον τύπο του κυττάρου. Οι περισσότεροι ιοί χωρίς περίβλημα εισέρχονται στο κύτταρο με διαμεσολαβούμενη από υποδοχέα ενδοκύττωση ή με ιοπηξία. Η ενδοκύττωση είναι μια φυσιολογική διεργασία που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για την πρόσληψη μορίων (π.χ. ορμονών, λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τρανσφερίνης) συνδεδεμένων με υποδοχέα. Οι ιοί Picorna και Papova μπορεί να εισέλθουν με ιοπηξία. Υδρόφοβες δομές των καψιδικών πρωτεϊνών εκτίθενται μετά τη σύνδεση του ιού με το κύτταρο και βοηθούν τον ιό ή το ιικό γονιδίωμα να ολισθήσει διαμέσου της μεμβράνης.

Οι ιοί που έχουν περίβλημα συντήκουν τις μεμβράνες τους με τις κυτταρικές μεμβράνες για να μεταφέρουν το νουκλεοκαψίδιο ή το γονιδίωμα απευθείας μέσα στο κυτταρόπλασμα. Το άριστο pH της σύντηξης καθορίζει εάν η διείσδυση θα λάβει χώρα στην επιφάνεια του κυττάρου σε ουδέτερο pH ή ο ιός πρέπει να εσωτερικευθεί με ενδοκύττωση και η σύντηξη να λάβει χώρα σε ενδοσωμάτιο σε όξινο pH. Η σύντηξη πραγματοποιείται με VAP ή άλλη πρωτεΐνη. Η αιμοσυγκολλητίνη (HA) του ιού της γρίπης Α συνδέεται με υποδοχείς του σιαλικού οξέος στο κύτταρο στόχο. Στο ελαφρώς όξινο περιβάλλον του ενδοσωματίου, η HA υφίσταται ριζική αλλαγή διαμόρφωσης ώστε να εκθέσει υδρόφοβα τμήματα ικανά να προάγουν τη σύντηξη της μεμβράνης. Οι παραμυξοϊοί διαθέτουν μια πρωτεΐνη σύντηξης ενεργό σε ουδέτερο pH για να υποβοηθήσει τη σύντηξη μεταξύ ιού και κυττάρου. Οι παραμυξοϊοί είναι επίσης ικανοί να προκαλέσουν σύντηξη μεταξύ κυττάρων για να σχηματιστούν πολυπύρνα γιγαντοκύτταρα (συγκύττα). Μερικοί ερπητοϊοί και ρετροϊοί συντήκονται με κύτταρα σε ουδέτερο pH και δημιουργούν συγκύττα μετά την αναπαραγωγή τους.

Έκδυση

Μόλις εσωτερικευθεί, το νουκλεοκαψίδιο πρέπει να μεταφερθεί στη θέση της αναπαραγωγής του μέσα στο κύτταρο και να αποβάλει το καψίδιο ή περίβλημα. Το γονιδίωμα των ιών από DNA, πλην των ιών της ευλογιάς, πρέπει να μεταφερθεί στον πυρήνα, ενώ οι περισσότεροι ιοί από RNA παραμένουν στο κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία της έκδυσης μπορεί να τεθεί σε ενέργεια από την προσκόλληση στον υποδοχέα ή να προκληθεί από το όξινο περιβάλλον ή τις πρωτεάσες που

βρίσκονται σε ενδοσωμάτιο ή λυσοσωμάτιο. Το καψίδιο του ιού Picorna αδυνατίζει λόγω απελευθέρωσης της καψιδικής πρωτεΐνης VP4 για να καταστεί δυνατή η έκδυση. Η VP4 απελευθερώνεται με εισαγωγή του υποδοχέα στη σχισμή σαν κλειδαρότρυπα η οποία αποτελεί τη θέση προσκόλλησης του καψιδίου. Οι έχοντες περίβλημα ιοί το αποβάλλουν κατά τη σύντηξη με τις κυτταρικές μεμβράνες. Η σύντηξη του περιβλήματος του ερπητοϊού με την κυτταροπλασματική μεμβράνη απελευθερώνει το νουκλεοκαψίδιο του, το οποίο κατόπιν "αράζει" στην πυρηνική μεμβράνη για να παραδώσει το γονιδίωμα του από DNA απευθείας στη θέση αντιγραφής. Η απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου του ιού της γρίπης από το πρωτεϊνικό στρώμα και το περίβλημα διευκολύνεται από τη δίοδο πρωτονίων, εκ του εσωτερικού του ενδοσωματίου, μέσω του ιοντικού πόρου που σχημάτισε η στρωματική πρωτεΐνη M2 της γρίπης, για να γίνει το περιβάλλον πιο όξινο.

Ο ρεοϊός και ο ευλογοϊός εκδύονται μόνο μερικώς κατά την είσοδο. Το εξωτερικό καψίδιο του ρεοϊού αποβάλλεται, αλλά το γονιδίωμα παραμένει έγκλειστο σε εσωτερικό καψίδιο, το οποίο περιέχει την αναγκαία πολυμεράση για τη σύνθεση RNA. Η αρχική έκδυση του ευλογοϊού εκθέτει στο κυτταρόπλασμα ένα υποϊικό σωματίδιο, επιτρέποντας τη σύνθεση mRNA από ένζυμο του ιοσωματίου. Κατόπιν συντίθεται ένα εκδυτικό ένζυμο για να απελευθερωθεί ο περιέχων DNA πυρήνας μέσα στο κυτταρόπλασμα.

Σύνθεση μακρομορίων

Μόλις το γονιδίωμα βρεθεί μέσα στο κύτταρο πρέπει να κατευθύνει τη σύνθεση ιικού mRNA και πρωτεΐνης και να δημιουργήσει πανομοιότυπα αντίγραφα του εαυτού του. Η μεταγραφή, η μετάφραση και η αναπαραγωγή του γονιδιώματος είναι πιθανώς τα σημαντικότερα βήματα του πολλαπλασιασμού του ιού. Το γονιδίωμα είναι άχρηστο εάν δεν μεταγραφεί σε λειτουργικά mRNA ικανά να συνδεθούν με ριβοσωμάτια και να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Ο τρόπος με τον οποίο κάθε ιός πραγματοποιεί αυτά τα βήματα εξαρτάται από τη δομή του γονιδιώματος και τη θέση της αναπαραγωγής.

Ο κυτταρικός μηχανισμός για τη μεταγραφή και την επεξεργασία του mRNA βρίσκεται στον πυρήνα. Οι περισσότεροι DNA ιοί χρησιμοποιούν την εξαρτώμενη από DNA RNA πολυμεράση II και άλλα ένζυμα για να συνθέσουν mRNA. Για παράδειγμα τα mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων αποκτούν μία 3' πολυαδενυλιωμένη (poly A) ουρά και μία 5' μεθυλιωμένη καλύπτρα (για να συνδεθούν με το ριβοσωμάτιο) και υφίστανται επεξεργασία για να αφαιρούν ιντρόνια (introns) πριν μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα. Οι ιοί που αναπαράγονται μέσα στο κυτταρόπλασμα πρέπει να διαθέτουν αυτές τις λειτουργίες ή ανάλογες. Οι ιοί της ευλογιάς, μολονότι είναι από DNA, αναπαράγονται μέσα στο κυτταρόπλασμα και γι'αυτό πρέπει να κωδικογραφούν ένζυμα για όλες αυτές τις λειτουργίες. Οι περισσότεροι RNA ιοί αναπαράγονται και παράγουν mRNA μέσα στο κυτταρόπλασμα, πλην των ορθομυξοϊών και των ρετροϊών. Οι RNA ιοί πρέπει να κωδικογραφούν τα αναγκαία ένζυμα για τη μεταγραφή και την αναπαραγωγή τους επειδή το κύτταρο δεν έχει τα μέσα να αναπαραγάγει RNA. Τα mRNA των RNA ιών μερικές φορές αποκτούν 5' καλύπτρα ή poly-A ουρά.

Το γυμνό γονιδίωμα των DNA ιών (πλην των ευλογοϊών) και οι θετικής πολικότητας RNA ιοί (πλην των ρετροϊών) αποκαλούνται μερικές φορές λοιμώδη

νουκλειικά οξέα, επειδή είναι ικανοί να αναπαραχθούν μόλις εισέλθουν σε κύτταρο. Τα εν λόγω γονιδιώματα μπορούν να αλληλεπιδράσουν άμεσα με μηχανισμούς του ξενιστή για να παραχθεί mRNA ή να συντεθούν πρωτεΐνες ή για αμφότερα.

Γενικά, το mRNA για τις μη δομικές πρωτεΐνες μεταγράφεται πρώτο. Τα πρώιμα γονιδιακά προϊόντα (μη δομικές πρωτεΐνες) είναι συχνά πρωτεΐνες που συνδέονται με DNA και ένζυμα, μεταξύ των οποίων πολυμεράσες κωδικογραφημένες στον ιό. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι καταλυτικές και μόνο λίγες είναι αναγκαίες. Η αναπαραγωγή του γονιδιώματος συνήθως σηματοδοτεί την έναρξη της μεταγραφής των όψιμων γονιδιακών προϊόντων. Τα όψιμα ιικά γονίδια κωδικογραφούν δομικές πρωτεΐνες, πολλά αντίγραφα των οποίων απαιτούνται για τη συσκευασία του ιού αλλά γενικά δεν χρειάζονται πριν αναπαραχθεί το γονιδίωμα. Τα μόλις αντιγραφέντα γονιδιώματα διαθέτουν επίσης νέες μήτρες για τη σύνθεση mRNA οψιμότερων γονιδίων. Οι διάφοροι DNA και RNA ιοί ρυθμίζουν τον χρόνο και την ποσότητα των παραγόμενων ιικών γονιδίων και πρωτεϊνών με διαφορετικούς τρόπους.

Ιοί από DNA

Η αναπαραγωγή του DNA του γονιδιώματος χρειάζεται μία εξαρτώμενη από το DNA-DNA πολυμεράση, άλλα ένζυμα και τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ειδικά θυμιδίνη. Η μεταγραφή του γονιδιώματος του DNA ιού (πλην των ευλογιοϊών) λαμβάνει χώρα στον πυρήνα. Χρησιμοποιώντας πολυμεράσες και άλλα ένζυμα του κυττάρου ξενιστή για τη σύνθεση ιικού mRNA. Η μεταγραφή των ιικών γονιδίων ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση ειδικών συνδεδεμένων στο DNA πρωτεϊνών με υποκινητές και ενισχυτές στο ιικό γονιδίωμα. Οι ιικοί υποκινητές και ενισχυτές έχουν ακολουθίες όμοιες με αντίστοιχα μόρια στο κύτταρο ξενιστή για να επιτευχθεί η σύνδεση των κυτταρικών παραγόντων ενεργοποίησης της μεταγραφής και της DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης. Τα κύτταρα μερικών ιστών δεν διαθέτουν τις συνδεδεμένες με DNA πρωτεΐνες που είναι αναγκαίες για την ενεργοποίηση της μεταγραφής ιικών γονιδίων, έτσι η αναπαραγωγή του ιού σε τέτοιο κύτταρο είναι αδύνατη ή περιορισμένη. Για παράδειγμα, οι νευρώνες μεταγράφουν ένα μόνο γονίδιο του ιού του απλού έρπητα, εκτός εάν ενεργοποιηθούν από στρες, με αποτέλεσμα ο ιός να βρίσκεται μέσα στο κύτταρο σε λανθάνουσα κατάσταση. Επομένως, η μεταγραφή είναι καθοριστικός παράγοντας για τον ιστικό τροπισμό και το εύρος των ξενιστών ενός ιού.

Οι διάφοροι DNA ιοί ρυθμίζουν τη διάρκεια, τον χρόνο έναρξης και την ποσότητα της σύνθεσης ιικών γονιδίων και πρωτεϊνών με διάφορους τρόπους. Οι πιο σύνθετοι ιοί κωδικογραφούν τους δικούς τους ενεργοποιητές μεταγραφής, οι οποίοι ενισχύουν ή ελέγχουν την έκφραση των ιικών γονιδίων. Για παράδειγμα, ο ιός του απλού έρπητα κωδικογραφεί πολλές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κινητική της γονιδιακής έκφρασης, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται η VMW 65 (πρωτεΐνη α -TIF, NP16). Η VMW65 φέρεται από το σωματίδιο του ιού, συνδέεται στο κύτταρο ξενιστή με το σύμπλοκο ενεργοποίησης της μεταγραφής (Oct-1) και ενισχύει την ικανότητα του να εκκινεί τη μεταγραφή των πολύ πρώιμων γονιδίων του ιού.

Τα γονίδια μεταγράφονται από οποιαδήποτε έλικα του DNA και κατ' αντίθετες κατευθύνσεις. Για παράδειγμα, τα πρώιμα και όψιμα γονίδια του ιού παπόβα SV40 βρίσκονται σε αντίθετες, μη επικαλυπτόμενες έλικες DNA. Τα ιικά γονίδια μπορεί

να έχουν ιντρόνια που χρειάζονται μεταμεταγραφική επεξεργασία του mRNA από τον πυρηνικό μηχανισμό του κυττάρου [κοπτοσύνδεση (splicing)]. Τα όψιμα γονίδια των ιών παπόβα και αδενοϊών μεταγράφονται αρχικά ως ένα μεγάλο RNA από έναν μόνο υποκινητή και κατόπιν υφίστανται επεξεργασία για να παραχθούν πολλά διάφορα mRNA μετά την αφαίρεση των διάφορων παρεμβαλλόμενων ακολουθιών (ιντρονίων).

Η αντιγραφή του ιικού DNA ακολουθεί τους ίδιους βιοχημικούς κανόνες με το κυτταρικό DNA. Η αντιγραφή αρχίζει από τη χαρακτηριστική ακολουθία του DNA, αποκαλούμενη αφετηρία (ori), η οποία αναγνωρίζεται από κυτταρικούς ή ιικούς πυρηνικούς παράγοντες και από την εξαρτώμενη από DNA DNA πολυμεράση. Η σύνθεση του ιικού DNA είναι ημισυντηρητική και τόσο η ιική όσο και η κυτταρική DNA πολυμεράση χρειάζονται ένα έναυσμα (primer) για να αρχίσουν τη σύνθεση αλυσίδας του DNA. Οι παρβοϊοί έχουν ακολουθίες DNA ανεστραμμένες και επαναλαμβανόμενες για να μπορεί το DNA να αναδιπλώνεται και υβριδίζεται με τον εαυτό του παρέχοντας ένα έναυσμα. Η αντιγραφή του γονιδιώματος των αδενοϊών προμηδοτείται από μονοφωσφορική δεοξυκυτιδίνη προσκολλημένη σε τερματική πρωτεΐνη. Ένα κυτταρικό ένζυμο (πριμάση) συνθέτει ένα έναυσμα από RNA για να αρχίσει η αναπαραγωγή του γονιδιώματος του παποβαϊού, ενώ οι ερπητοϊοί κωδικογραφούν την πριμάση.

Η αναπαραγωγή του γονιδιώματος των απλών DNA ιών (π.χ. παρβοϊών, παποβαϊών) χρησιμοποιεί την DNA πολυμεράση του ξενιστή, ενώ οι μεγάλοι, πιο σύνθετοι ιοί (π.χ., αδενοϊοί, ερπητοϊοί, ευλογιοϊοί) κωδικογραφούν τις δικές τους πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες είναι συνήθως πιο γρήγορες αλλά λιγότερο ακριβείς από τις πολυμεράσες του κυττάρου ξενιστή, αυξάνοντας τη συχνότητα των μεταλλάξεων στους ιούς και αποτελώντας στόχο των νουκλεοτιδικών αναλόγων ως αντι-ιικών φαρμάκων.

Η αναπαραγωγή των DNA ιών της ηπατίτιδας είναι χαρακτηριστική επειδή στην αρχή συντίθεται ένα κυκλικό, ενδιάμεσο RNA θετικής πολικότητας από την εξαρτώμενη από DNA κυτταρική RNA πολυμεράση. Ιικές πρωτεΐνες περιβάλλουν το RNA, μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση (αντίστροφη μεταγραφή) στον πυρήνα του ισωματίου κατασκευάζει DNA αρνητικής πολικότητας και κατόπιν το RNA αποδομείται. Αρχίζει η σύνθεση DNA θετικής πολικότητας, αλλά διακόπτεται μόλις το γονιδίωμα και ο πυρήνας εγκλειστούν σε περίβλημα, δημιουργώντας ένα μερικώς δίκλωνο κυκλικό γονιδίωμα από DNA.

Οι κυριότεροι περιορισμοί για την αναπαραγωγή ιών από DNA περιλαμβάνουν την ύπαρξη επαρκούς DNA πολυμεράσης και δεοξυριβονουκλεοτιδικών υποστρωμάτων. Τα περισσότερα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας δεν εκτελούν σύνθεση DNA επειδή λείπουν τα αναγκαία ένζυμα και τα αποθέματα δεοξυθυμιδίνης είναι περιορισμένα. Όσο μικρότερος ο DNA ιός τόσο περισσότερο εξαρτάται από το κύτταρο ξενιστή για τις εν λόγω λειτουργίες. Οι παρβοϊοί είναι οι μικρότεροι DNA ιοί και αναπαράγονται μόνο σε αναπτυσσόμενα κύτταρα, όπως τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς και ο εμβρυϊκός ιστός. Η επιτάχυνση της ανάπτυξης του κυττάρου μπορεί να ενισχύσει τη σύνθεση ιικού DNA και mRNA. Το αντιγόνο T του SV30, οι πρωτεΐνες E6 και E7 του θηλωματοϊού και η E1 του αδενοϊού συνδέονται με την πρωτεΐνη αναστολέα της ανάπτυξης (p53 και το γονιδιακό προϊόν του ρετινοβλαστώματος) και εμποδίζουν τη λειτουργία της, πράγμα που επίσης προάγει την αναπαραγωγή του ιού. Οι μεγαλύτεροι DNA ιοί

μπορεί να κωδικογραφούν DNA πολυμεράση και άλλες πρωτεΐνες για να διευκολύνεται η σύνθεση DNA και είναι πιο ανεξάρτητοι. Ο ιός του απλού έρπητα κωδικογραφεί μια DNA πολυμεράση και περισυλλεκτικά ένζυμα (π.χ. δεοξυριβονουκλεάση, ριβονουκλεοτιδική αναγωγή και θυμιδική κινάση) για να δημιουργηθούν τα αναγκαία δεοξυριβονουκλεοτιδικά υποστρώματα για την αναπαραγωγή του γονιδιώματος.

Ιοί από RNA

Η αναπαραγωγή και η μεταγραφή των RNA ιών είναι όμοιες διεργασίες επειδή τα ιικά γονιδιώματα είναι συνήθως είτε mRNA (θετικής πολικότητας RNA) είτε μήτρα για mRNA (αρνητικής πολικότητας RNA). Κατά την αναπαραγωγή και τη μεταγραφή σχηματίζεται ένα δίκλωνο αντιγραφικό ενδιάμεσο RNA, μια δομή που κανονικά δεν απαντάται στα απρόσβλητα κύτταρα.

Το γονιδίωμα του RNA ιού πρέπει να κωδικογραφεί τις RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (αντιγραφάσες και μεταγραφάσες) επειδή το κύτταρο δεν διαθέτει μέσα για την αντιγραφή RNA. Επειδή το RNA αποδομείται σχετικά γρήγορα, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση πρέπει να παρέχεται ή να συντίθεται λίγο μετά την έκδυση, για να παραχθεί περισσότερο ιικό RNA, αλλιώς η μόλυνση θα τερματιστεί. Οι περισσότερες ιικές RNA πολυμεράσες ενεργούν με ταχύ ρυθμό αλλά είναι και επιρρεπείς στα λάθη, προκαλώντας μεταλλάξεις. Η αναπαραγωγή του γονιδιώματος δημιουργεί νέες μήτρες για την παραγωγή περισσότερου mRNA, το οποίο ενισχύει και επιταχύνει την αναπαραγωγή του ιού.

Τα ιικά γονιδιώματα από RNA θετικής πολικότητας των ιών Picorna, ιών Noro, ιών Corona, ιών Flavi και ιών Toga λειτουργούν ως mRNA, συνδέονται με ριβοσώματα και κατευθύνουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Το ιικό γυμνό, θετικής πολικότητας, RNA γονιδίωμα είναι ικανό να αρχίσει τη μόλυνση μόνο του. Μετά την παραγωγή της κωδικογραφημένης στον ιό RNA-εξαρτώμενης πολυμεράσης του RNA, συντίθεται μία μήτρα για αρνητικής πολικότητας RNA. Η μήτρα, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή περισσότερου mRNA και την αναπαραγωγή του γονιδιώματος. Στους ιούς Toga και ιούς Noro, η μήτρα του αρνητικής πολικότητας RNA χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή μικρότερου RNA για τις δομικές πρωτεΐνες (όψιμα γονίδια). Το mRNA για τους ιούς αυτούς δεν φέρει καλύπτρα στο 5' άκρο, αλλά το γονιδίωμα κωδικογραφεί μια βραχεία ακολουθία poly-A. Η μεταγραφή και αναπαραγωγή των ιών Corona έχει πολλά κοινά με τα παραπάνω, αλλά είναι περισσότερο σύνθετες.

Τα ιικά γονιδιώματα από αρνητικής πολικότητας RNA των ραβδοϊών, ορθομυξοϊών παραμυξοϊών, φιλοϊών και ιών bunya είναι οι μήτρες για την παραγωγή mRNA. Το γονιδίωμα από RNA αρνητικής πολικότητας δεν είναι λοιμογόνο αφ'εαυτού, ενώ πρέπει να μεταφερθεί μια πολυμεράση μέσα στο κύτταρο από το γονιδίωμα (συνδεδεμένη με αυτό ως μέρος του νουκλεοκαψιδίου) προκειμένου να κατασκευαστούν χωριστά mRNA για τις διάφορες ιικές πρωτεΐνες. Συνεπώς, πρέπει επίσης να παραχθεί από την ιική πολυμεράση ένα πλήρους μήκους και θετικής πολικότητας RNA για να χρησιμεύσει ως μήτρα παραγωγής περισσότερων αντιγράφων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το γονιδίωμα από (-) RNA είναι σαν τα αρνητικά καρέ σε ένα ρολό φωτογραφικού φιλμ: κάθε καρέ κωδικογραφεί μια φωτογραφία/mRNA, αλλά απαιτείται ένα πλήρους μήκους θετικό για να αντιγραφεί ολόκληρο το ρολό. Πλην των ιών της γρίπης, η μεταγραφή και η

αναπαραγωγή των ιών από RNA αρνητικής πολικότητας λαμβάνουν χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα. Η μεταγραφάση της γρίπης χρειάζεται ένα έναυσμα για να παραγάγει mRNA. Χρησιμοποιεί τα 5' άκρα του κυτταρικού mRNA στον πυρήνα ως έναυσματα για την πολυμεράση της και, στην πορεία, κλέβει την 5' καλύπτρα από το κυτταρικό mRNA. Το γονιδίωμα του ιού της γρίπης αναπαράγεται επίσης στον πυρήνα.

Οι ρεοϊοί έχουν κατατετμημένο γονιδίωμα από δίκλωνο RNA και η αναπαραγωγή και μεταγραφή τους είναι πιο σύνθετη. Η ιική RNA πολυμεράση είναι μέρος του πυρήνα του εσωτερικού καψιδίου. Οι μονάδες του mRNA μεταγράφονται από καθένα από τα 10 ή περισσότερα τμήματα του γονιδιώματος ενόσω βρίσκονται ακόμα στον πυρήνα. Τα αρνητικής πολικότητας τμήματα του γονιδιώματος χρησιμοποιούνται ως μήτρες για mRNA κατά τρόπο ανάλογο εκείνου των ιών με RNA αρνητικής πολικότητας. Τα ένζυμα που κωδικογραφεί ο ιός Reo και περιέχονται στον πυρήνα του εσωτερικού καψιδίου προσθέτουν την 5' καλύπτρα στο ιικό mRNA. Το mRNA δεν έχει poly-A. Τα mRNA απελευθερώνονται μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπου καθοδηγούν την πρωτεϊνσύνθεση ή συγκεντρώνονται σε νέους πυρήνες. Το θετικής πολικότητας RNA στους νέους πυρήνες λειτουργεί ως μήτρα για RNA αρνητικής πολικότητας, ενώ η πολυμεράση του πυρήνα παράγει αντίγραφα δίκλωνου RNA.

Οι ιοί Arena έχουν αμφιπολικό κυκλικό γονιδίωμα με (+) ακολουθίες δίπλα σε (-) ακολουθίες. Τα πρώιμα γονίδια του ιού μεταγράφονται από το αρνητικής πολικότητας τμήμα του γονιδιώματος, ενώ τα όψιμα γονίδια μεταγράφονται από το πλήρους μεγέθους διάμεσο αντίγραφο.

Μολονότι οι ρετροϊοί έχουν γονιδίωμα από RNA θετικής πολικότητας, ο ιός δεν διαθέτει τα μέσα για την αναπαραγωγή του RNA στο κυτταρόπλασμα. Σε αντιστάθμισμα, οι ρετροϊοί φέρουν δύο αντίγραφα του γονιδιώματος, δύο μόρια μεταφορικού RNA (tRNA) και μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση (αντίστροφη μεταγραφάση) στο σωματίδιο του ιού. Το tRNA χρησιμεύει ως έναυσμα για τη σύνθεση ενός αντιγράφου κυκλικού συμπληρωματικού DNA (cDNA) του γονιδιώματος. Το cDNA συντίθεται στο κυτταρόπλασμα, μετακινείται στον πυρήνα και κατόπιν ενσωματώνεται στη χρωματίνη του ξενιστή. Το γονιδίωμα του ιού γίνεται γονίδιο του κυττάρου. Στο άκρο του ενσωματωμένου ιικού γονιδιώματος υπάρχουν υποκινητές που ενισχύουν τη μεταγραφή των ακολουθιών του ιικού DNA από το κύτταρο. Πλήρους μήκους μετάγραφα RNA χρησιμοποιούνται ως νέα γονιδιώματα και παράγονται χωριστά mRNA με διαφορεική κοπτοσύνδεση αυτού του RNA.

Ο πιο ασυνήθιστος τρόπος αναπαραγωγής παρατηρείται στον ιό δέλτα, ο οποίος μοιάζει με ιοειδές (viroid). Το γονιδίωμα του είναι κυκλικό, μονόκλωνο RNA σε σχήμα ράβδου, το οποίο υβριδίζεται εκτεταμένα με τον εαυτό του. Κατ' εξαίρεση, το RNA γονιδίωμα του δελταϊού αναπαράγεται από την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση II του πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Τμήμα του γονιδιώματος σχηματίζει μια δομή από RNA αποκαλούμενο ριβοένζυμο (ribozyme), το οποίο κόβει το κυκλικό RNA για να παραχθεί mRNA.

Σύνθεση ιικών πρωτεϊνών

Όλοι οι ιοί βασίζονται στα ριβοσώματα, το tRNA και τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή για τη μεταγραφική παραγωγή των πρωτεϊνών τους. Η σύνδεση

του mRNA με το ριβόσωμα επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της 5' καλύπτρας της μεθυλιωμένης γουανοσίνης ή ενός ειδικού βρόγχου από RNA [εσωτερική ριβοσωματική ακολουθία εισόδου (IRES, internal ribosome entry sequence)], που συνδέεται εντός του ριβοσώματος για να εκκινήσει η πρωτεϊνοσύνθεση. Η καλύπτρα, εάν χρησιμοποιηθεί, προσκολλάται στο mRNA κατά διάφορο τρόπο από τους διάφορους ιούς. Η IRES παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στο γονιδίωμα ιών Picorna και κατόπιν σε ορισμένα κυτταρικά mRNA. Τα περισσότερα ιικά mRNA, αλλά όχι όλα, έχουν μία ουρά από πολυαδενοσίνη (poly-A), σαν τα mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Σε αντίθεση με τα μικροβιακά ριβοσώματα, τα οποία μπορούν να συνθέσουν ένα πολυκιστρονικό mRNA και να μεταφράσουν πολλές γονιδιακές ακολουθίες σε ξεχωριστές πρωτεΐνες, το ευκαρυωτικό ριβόσωμα συνδέεται με mRNA και μπορεί να φτιάξει μόνο μια συνεχή πρωτεΐνη και κατόπιν απορρίπτει το mRNA. Κάθε ιός αντιμετωπίζει διαφορετικά αυτόν τον περιορισμό, ανάλογα με τη δομή του γονιδιώματος. Για παράδειγμα, ολόκληρο το γονιδίωμα ενός ιού με θετικής πολικότητας RNA διαβάζεται από το ριβόσωμα και μεταφράζεται σε μία γιγαντιαία πολυπρωτεΐνη, η οποία, στη συνέχεια, αποκόπτεται από κυτταρικές και ιικές πρωτεάσες σε λειτουργικές πρωτεΐνες. Οι DNA ιοί, οι ρετροϊοί και οι περισσότεροι ιοί με γονιδίωμα αρνητικής πολικότητας μεταγράφουν ξεχωριστά mRNA για μικρότερες πολυπρωτεΐνες ή μεμονωμένες πρωτεΐνες.

Οι ιοί μετέρχονται διαφορετικές τακτικές για να προαγάγουν την προνομιακή μεταγραφή του δικού τους ιικού mRNA αντί του κυτταρικού mRNA. Σε πολλές περιπτώσεις η συγκέντρωση του ιικού mRNA μέσα στο κύτταρο είναι τόσο μεγάλη ώστε καταλαμβάνει τα περισσότερα ριβοσώματα, αποτρέποντας τη μετάφραση του κυτταρικού mRNA. Η μόλυνση από αδενοϊό αποκλείει την έξοδο κυτταρικού mRNA από τον πυρήνα. Ο ιός του απλού έρπητα και άλλοι ιοί εμποδίζουν τη σύνθεση κυτταρικών μακρομορίων και προκαλούν αποδόμηση του DNA και του mRNA του κυττάρου. Για να προαγάγει την εκλεκτική μετάφραση του δικού του mRNA, ο ιός της πολιομυελίτιδας (ιός Polio) χρησιμοποιεί μία κωδικογραφημένη από τον ίδιο πρωτεάση για να αδρανοποιήσει την συνδεδεμένη με την καλύπτρα πρωτεΐνη (μοριακής μάζας 200kDa) του ριβοσώματος, για να αποτρέψει τη σύνδεση και μετάφραση του mRNA που φέρει 5' καλύπτρα. Οι ιοί Toga και πολλοί άλλοι ιοί αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι ελαττώνεται η συγγένεια του ριβοσώματος για τα περισσότερα κυτταρικά mRNA. Όλες αυτές οι ενέργειες συμβάλλουν επίσης στην κυτταροπαθogenία της ιικής μόλυνσης.

Μερικές ιικές πρωτεΐνες χρειάζονται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως π.χ., φωσφορυλίωση γλυκοζυλίωση, ακυλίωση ή θειίκωση. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με κυτταρικές ή ιικές πρωτεϊνικές κινάσες και είναι ένα μέσον διαμόρφωσης, ενεργοποίησης ή αδρανοποίησης πρωτεϊνών. Πολλοί ερπητοϊοί και άλλοι ιοί κωδικογραφούν τη δική τους πρωτεϊνική κινάση. Οι ιικές γλυκοπρωτεΐνες συντίθενται σε συνδεδεμένα με τη μεμβράνη ριβοσώματα και διαθέτουν τις ακολουθίες αμινοξέων που θα επιτρέψουν την είσοδο στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και τη γλυκοζυλίωση στο αζωτούχο άκρο. Η περιέχουσα μεγάλη ποσότητα μαννόζης πρόδρομη μορφή των γλυκοπρωτεϊνών μετακινείται από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του συστήματος των μεταφορικών κυστιδίων και υποβάλλεται σε επεξεργασία στη συσκευή Golgi. Η ώριμη γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει σιαλικό οξύ εκφράζεται στην πλασματοκυτταρική μεμβράνη, εκτός εάν η γλυκοπρωτεΐνη διαθέτει πρωτεϊνικές ακολουθίες που κατακρατούνται σε

ενδοκυττάριο οργανίδιο. Η παρουσία γλυκοπρωτεϊνών είναι καθοριστική για τη συναρμολόγηση του σωματιδίου του ιού. Κατά την επεξεργασία στη συσκευή Golgi μπορεί επίσης να λάβουν χώρα άλλες τροποποιήσεις, όπως Ο-γλυκοζυλίωση, ακυλίωση και θειίκωση.

Συναρμολόγηση

Το σωματίδιο του ιού απαρτίζεται από μικρά, εύκολα κατασκευαζόμενα τμήματα που περικλείουν το γονιδίωμα σε μία λειτουργική συσκευασία. Κάθε τμήμα του σωματιδίου διαθέτει αναγνωριστικές περιοχές που του επιτρέπουν να δημιουργεί τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-πυρηνικού οξέος και (στους ιούς με περίβλημα) πρωτεΐνης-μεμβράνης, οι οποίες απαιτούνται για να συναρμολογηθεί η τελική δομή. Η διαδικασία της συναρμολόγησης αρχίζει όταν συντεθούν τα αναγκαία κομμάτια και η συγκέντρωση των δομικών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο είναι αρκετή για να συντηρήσει θερμοδυναμικά τη διεργασία, περίπου όπως συμβαίνει σε μία αντίδραση κρυστάλλωσης. Η διαδικασία της συναρμολόγησης διευκολύνεται με την κατασκευή ικριωμάτων από πρωτεΐνες ή από άλλες πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται ή που αποδίδουν ενέργεια με πρωτεόλυση. Για παράδειγμα, η διάσπαση της πρωτεΐνης VP0 του πολιοϊού απελευθερώνει το πεπτίδιο VP4, το οποίο στερεοποιεί το καψίδιο.

Η περιοχή και ο μηχανισμός συναρμολόγησης του σωματιδίου του ιού μέσα στο κύτταρο εξαρτώνται από το πού λαμβάνει χώρα η αναπαραγωγή του γονιδιώματος και από το εάν η τελική μορφή είναι γυμνό καψίδιο ή ιός με περίβλημα. Η συναρμολόγηση των DNA ιών, πλην των ιών της ευλογιάς, συμβαίνει στον πυρήνα και προϋποθέτει τη μεταφορά των πρωτεϊνών του σωματιδίου του ιού μέσα στον πυρήνα. Η συναρμολόγηση των RNA ιών και των ιών της ευλογιάς λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα.

Οι ιοί με καψίδιο μπορεί να συναρμολογηθούν ως κενές δομές (προκαψίδια) που γεμίζουν με το γονιδίωμα (π.χ., ιοί Picorna) ή να συναρμολογηθούν γύρω από το γονιδίωμα. Τα νουκλεοκαψίδια των ρετροϊών, ιών Toga και των αρνητικής πολικότητας RNA ιών συναρμολογούνται γύρω από το γονιδίωμα και στη συνέχεια περικλείονται μέσα σε περίβλημα. Το ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο των αρνητικής πολικότητας RNA ιών περιέχει την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση που είναι αναγκαία για τη σύνθεση mRNA στο κύτταρο στόχο.

Στους ιούς που έχουν περίβλημα, οι μόλις συντεθείσες και επεξεργασθείσες ιικές γλυκοπρωτεΐνες μεταφέρονται στις κυτταρικές μεμβράνες με μεταφορικά κυστίδια. Η απόκτηση περιβλήματος συμβαίνει μετά τη σύνδεση του νουκλεοκαψιδίου με τις περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης που περιέχουν γλυκοπρωτεΐνες· η διεργασία αυτή ονομάζεται εκβλάστηση (budding). Οι θεμέλιες πρωτεΐνες των αρνητικής πολικότητας RNA ιών επενδύουν τα νουκλεοκαψίδια και προάγουν την προσκόλλησή τους στις τροποποιημένες από γλυκοπρωτεΐνες μεμβράνες. Καθώς οι αλληλεπιδράσεις αυξάνονται, η μεμβράνη περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο και ο ιός εκβλαστώνει από τη μεμβράνη.

Ο τύπος του γονιδιώματος και η πρωτεϊνική ακολουθία των γλυκοπρωτεϊνών καθορίζουν τη θέση εκβλάστησης. Οι περισσότεροι RNA ιοί εκβλαστώνουν από την κυτταρική μεμβράνη και ταυτόχρονα ο ιός απελευθερώνεται από το κύτταρο. Οι Flavi, Corona και bunya αποκτούν το περίβλημα τους με εκβλάστηση εντός του ενδοπλασματικού δικτύου και των μεμβρανών Golgi και μπορεί να παραμείνουν

εντός του κυττάρου προσκολλημένοι σ'αυτά τα οργανίδια. Το νουκλεοκαψίδιο του ιού του απλού έρπητα συναρμολογείται στον πυρήνα και εκβλαστάνει πρώτα μέσα και μετά έξω από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Το νουκλεοκαψίδιο αποβάλλεται στο κυτταρόπλασμα, ιικές πρωτεΐνες συνδέονται με το καψίδιο και κατόπιν αποκτάται το περίβλημα με εκβλάστηση σε μεμβράνη Golgi διακοσμημένο με τις 10 ιικές γλυκοπρωτεΐνες. Το σωματίδιο του ιού μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου και απελευθερώνεται με εξωκυττάρωση ή με λύση του κυττάρου ή μεταδίδεται μέσω γεφυρών από κύτταρο σε κύτταρο.

Οι ιοί χρησιμοποιούν διάφορα τεχνάσματα για να εξασφαλίσουν ότι όλα τα τμήματα του ιού θα συναρμολογηθούν σε πλήρη σωματίδια. Η RNA πολυμεράση που απαιτείται για τη μόλυνση από αρνητικής πολικότητας RNA ιούς μεταφέρεται στο γονιδίωμα ως ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο. Τα γονιδιώματα του ιού της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας και άλλων ρετροϊών συσκευάζονται μέσα σε προκαψίδιο αποτελούμενο από πολυπρωτεΐνη περιέχουσα πρωτεάση, πολυμεράση, ιντεγκράση και δομικές πρωτεΐνες. Το εν λόγω προκαψίδιο συνδέεται με μεμβράνες τροποποιημένες από ιική γλυκοπρωτεΐνη και το σωματίδιο εκβλαστάνει από τη μεμβράνη. Η κωδικογραφημένη στον ιό πρωτεάση ενεργοποιείται μέσα στο σωματίδιο και διασπά την πολυπρωτεΐνη για να παραχθεί το τελικό, μολυσματικό νουκλεοκαψίδιο και οι αναγκαίες πρωτεΐνες μέσα στο περίβλημα.

Η συναρμολόγηση ενός πλήρους και λειτουργικού σωματιδίου του ιού της γρίπης ή ρεοϊού απαιτεί τη συγκέντρωση ενός τουλάχιστον αντιγράφου από κάθε τμηματικό γονίδιο. Παρόλο που το γονιδίωμα του ιού της γρίπης αποτελείται από οκτώ μοναδικά τμήματα, τα σωματίδια μπορούν να συσκευάσουν τυχαία 10-11 τμήματα. Στατιστικά, αυτό αποδίδει περίπου ένα πλήρες και λειτουργικό γονιδίωμα ανά 20 ελαττωματικούς ιούς. Τα γονιδιώματα των ρεοϊών είναι πιθανόν να συναρμολογούνται κατά παρόμοιο τρόπο.

Κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης του ιού συμβαίνουν λάθη. Παράγονται κενά σωματίδια του ιού και σωματίδια με ελαττωματικά γονίδια. Επομένως, ο λόγος των σωματιδίων προς τους μολυσματικούς ιούς, αποκαλούμενος επίσης λόγος σωματιδίων προς μονάδες σχηματίζουσες πλάκα, είναι υψηλός, συνήθως άνω του 10, και σε περιόδους ταχείας αναπαραγωγής του ιού μπορεί να φτάσει το 104. Οι ελαττωματικοί ιοί καταλαμβάνουν τους μηχανισμούς που απαιτούνται για την αναπαραγωγή κανονικών ιών και εμποδίζουν την παραγωγή ιών (ελαττωματικά παρεμβαίνουντα σωματίδια).

Απελευθέρωση

Οι ιοί απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση του κυττάρου, με εξωκυττάρωση ή με εκβλάστηση από την κυτταρική μεμβράνη. Οι ιοί με γυμνά καψίδια απελευθερώνονται με λύση του κυττάρου. Με εκβλάστηση από την κυτταρική μεμβράνη, χωρίς να θανατωθεί το κύτταρο, απελευθερώνονται πολλοί ιοί με περίβλημα. Η λύση και η εκβλάστηση από μεμβράνες είναι αποτελεσματικοί τρόποι απελευθέρωσης. Οι ιοί που εκβλαστάνουν ή αποκτούν τις μεμβράνες τους μέσα στο κυτταρόπλασμα (π.χ., ιοί Flavi και Ευλογιάς) παραμένουν δέσμιοι του κυττάρου και απελευθερώνονται με εξωκυττάρωση ή λύση του κυττάρου. Οι ιοί που συνδέονται σε υποδοχείς σιαλικού οξέος (π.χ., ορθομυξοϊοί, ορισμένοι παραμυξοϊοί) μπορεί να διαθέτουν και νευραμινιδάση, η οποία αφαιρεί δυνητικούς υποδοχείς σιαλικού οξέος από τις γλυκοπρωτεΐνες του σωματιδίου του ιού και από

το κύτταρο ξενιστή για να προληφθεί η συσσώματωση και να διευκολυνθεί η απελευθέρωση.

Επανάραξη του κύκλου αναπαραγωγής

Ο ιός που απελευθερώνεται στον μεσοκυττάριο χώρο συνήθως είναι υπαίτιος για την έναρξη νέας μόλυνσης, αλλά η μόλυνση μπορεί να επεκταθεί επίσης με διακυττάρια γέφυρες, σύντηξη κυττάρων ή κάθετη μετάδοση του γονιδιώματος σε θυγατρικά κύτταρα. Με τον τελευταίο τρόπο, ο ιός αποφεύγει την αναγνώριση του από αντίσωμα. Μερικοί ιοί έρπητα, ρετροϊοί και παραμυξοϊοί μπορούν να προκαλέσουν σύντηξη κυττάρων και δημιουργία πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων (συγκύτια), τα οποία γίνονται τεράστια εργοστάσια παραγωγής ιών. Οι ρετροϊοί και μερικοί DNA ιοί μπορούν να μεταδώσουν τα ολοκληρωμένα αντίγραφα των γονιδιωμάτων τους καθέτως σε θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση^[40].

ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Στο ιικό γονιδίωμα γίνονται μεταλλάξεις αυτόματα και εύκολα, δημιουργώντας νέα ιικά στελέχη με ιδιότητες διαφορετικές από τον γονικό, η φυσικό (wild-type), ιό. Αυτές οι παραλλαγές είναι δυνατόν να αναγνωριστούν από νουκλεοτιδικές ακολουθίες, αντιγονικές διαφορές (ορότυποι) ή διαφορές στις λειτουργικές ή δομικές πρωτεΐνες. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι άνευ αποτελέσματος ή καταστροφικές για τον ιό. Οι μεταλλάξεις σε ουσιώδη γονίδια αδρανοποιούν τον ιό, αλλά οι μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια μπορούν να δημιουργήσουν αντίσταση σε αντι-ιικά φάρμακα ή να αλλάξουν την αντιγονικότητα ή παθογονικότητα του ιού.

Τα σφάλματα κατά την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος στην αναπαραγωγή του ιού δημιουργούν πολλές μεταλλάξεις. Αυτό είναι αποτέλεσμα της περιορισμένης ακρίβειας της ιικής πολυμεράσης και της ταχύρρυθμης ιικής αναπαραγωγής. Επιπλέον, οι RNA ιοί εν διαθέτουν γενετικό μηχανισμό ελέγχου των σφαλμάτων. Συνεπώς, η συχνότητα των μεταλλάξεων είναι συνήθως μεγαλύτερη στους RNA από τους DNA ιούς.

Οι μεταλλάξεις σε βασικά γονίδια ονομάζονται θανατηφόρες μεταλλάξεις (lethal mutations). Αυτά τα μεταλλάγματα (mutants) δύσκολα απομονώνονται επειδή ο ιός εν μπορεί να αναπαραχθεί. Οι μεταλλάξεις λόγω απάλειψης (deletion mutation) οφείλονται στην απώλεια ή στην επιλεκτική αφαίρεση τμήματος του γονιδιώματος και της λειτουργίας που αυτό κωδικογραφεί. Άλλες μεταλλάξεις μπορεί να δημιουργήσουν μολυσματικό μεταλλαγμένο στέλεχος ιού (plaque mutant), ο οποίος διαφέρει από τον φυσικό ιό στο μέγεθος ή την εμφάνιση των μολυσμένων κυττάρων μεταλλαγμένο στέλεχος ιού ως προς το εύρος των ξενιστών (host range mutant), ο οποίος διαφέρει στον τύπο του ιστού ή τα είδη των κυττάρων που μπορεί να μολύνει ή εξασθενημένο μολυσματικό μεταλλαγμένο στέλεχος (attenuated mutant), παραλλαγή που μπορεί να προκαλέσει λιγότερο σοβαρή νόσο σε ζώα ή ανθρώπους. Τα εξαρτημένα μεταλλαγμένα στελέχη ιών (conditional mutants), όπως τα ευαίσθητα στη θερμοκρασία (ts) ή τα ευαίσθητα στο ψύχος μεταλλαγμένα στελέχη ιών, εμφανίζουν μετάλλαξη σε γονίδιο βασικής πρωτεΐνης, η οποία επιτρέπει την παραγωγή ιών μόνο σε ορισμένες θερμοκρασίες. Τα μεταλλαγμένα στελέχη ιών (ts) αναπτύσσονται καλά ή σχετικά καλύτερα στους 30-35°C, ενώ η κωδικογραφημένη πρωτεΐνη είναι αδρανής σε υψηλότερες (38-40°C) θερμοκρασίες και δεν επιτρέπει την παραγωγή ιών.

Νέα ιικά στελέχη είναι επίσης δυνατόν να προέλθουν από γενετικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιών ή μεταξύ ιών και κυττάρων. Η διαμοριακή ανταλλαγή γενετικών πληροφοριών μεταξύ ιών ή μεταξύ ιού και ξενιστή αποκαλείται ανασυνδυασμός (recombination). Ο ανασυνδυασμός γίνεται εύκολα μεταξύ δύο συγγενών DNA ιών. Για παράδειγμα, η ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου από δύο πολύ συγγενείς ιούς έρπητα (ιοί απλού έρπητα τύπου 1 και 2) δημιουργεί στελέχη δι' ανασυνδυασμού των τύπων. Τα νέα υβριδικά στελέχη έχουν γονίδια αμφότερων των τύπων. Η ενσωμάτωση ρετροϊών στη χρωματίνη του κυττάρου ξενιστή είναι μια μορφή ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός δύο συγγενών RNA ιών, του ιού Sindbis και του ιού της ανατολικής ήπιας εγκεφαλίτιδας, δημιούργησε ένα νέο τογκαϊό, τον ιό της δυτικής ήπιας εγκεφαλίτιδας. Οι ιοί με κατατετμημένο γονιδίωμα (π.χ., ιοί της γρίπης και ιοί Reo) σχηματίζουν υβριδικά στελέχη όταν ένα

κύτταρο μολύνεται από περισσότερα του ενός ιικά στελέχη. Αυτή η διεργασία αποκαλείται αναδιάταξη (reassortment) και είναι ανάλογη με την επιλογή 10 βόλων από ένα κουτί που περιέχει 10 μαύρους και 10 λευκούς βόλους. Νέα στελέχη του ιού της γρίπης Α δημιουργούνται από τη συλλοίμωξη με ιό διαφορετικού είδους.

Μερικές φορές, ένα ελαττωματικό ιικό στέλεχος μπορεί να διασωθεί μέσω της αναπαραγωγής άλλου μεταλλαγμένου στελέχους ιού, μέσω του φυσικού ιού ή μέσω κυτταρικής γραμμής που περιέχει ανταλλακτικό ιικό γονίδιο. Η αναπαραγωγή του άλλου ιού ή η έκφραση του γονιδίου στο κύτταρο προσφέρει την απούσα λειτουργία που χρειάζεται το μεταλλαγμένο στέλεχος [συμπληρωματικότητα (complementation)] και επιτρέπει την αναπαραγωγή του. Από ιό του απλού έρπητα που στερείται ένα βασικό γονίδιο και αναπτύσσεται σε κυτταρική σειρά που εκφράζει το προϊόν αυτού του γονιδίου προκειμένου να "συμπληρωθεί" ο ιός, παρασκευάστηκε το εμβόλιο DISC (disabled infectious single cycle). Ο ιός που προήλθε μπορεί να μολύνει τα κανονικά κύτταρα του εμβολιασμένου ατόμου, αλλά τα ιικά σωματίδια που παράγονται δεν μπορούν να αναπαραχθούν. Η διάσωση ενός θανατηφόρου ή εξαρτημένου θανατηφόρου μεταλλαγμένου στελέχους με συγκεκριμένη γενετική ακολουθία, όπως ένα κομμάτι DNA από ενδονουκλεάση περιορισμού, αποκαλείται διάσωση δείκτη (marker rescue) και χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων ιών, όπως του ιού του απλού έρπητα. Οι ιοί που παράγονται από κύτταρα μολυσμένα από διαφορετικά ιικά στελέχη μπορεί να είναι φαινοτυπικώς μικτοί και να έχουν τις πρωτεΐνες του ενός στελέχους και το γονιδίωμα ενός άλλου [διακαψιδίωση (transcapsidation)]. Οι ψευδοτύποι (pseudotypes) δημιουργούνται όταν συμβαίνει διακαψιδίωση μεταξύ ιών διαφορετικών τύπων, αλλά αυτό είναι σπάνιο.

Τα μεμονωμένα στελέχη ή το μεταλλαγμένο στέλεχος επιλέγονται βάσει της ικανότητας τους να χρησιμοποιούν τον μηχανισμό του κυττάρου ξενιστή και να αντέχουν στις συνθήκες του σώματος και του περιβάλλοντος. Οι ιδιότητες του κυττάρου ξενιστή που μπορεί να ενεργήσουν ως παράγοντες επιλογής περιλαμβάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης του κυττάρου και την ειδική κατά ιστού έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών απαραίτητων στον ιό (π.χ. ένζυμα, γλυκοπρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες). Οι συνθήκες που επικρατούν στο σώμα, η αυξημένη θερμοκρασία του, οι φυσικές και ανοσιακές άμυνες και η δομή των ιστών αποτελούν επίσης παράγοντες επιλογής των ιών. Οι ιοί που δεν μπορούν να αντέξουν σ'αυτές τις συνθήκες ή να αποφύγουν τις άμυνες του ξενιστή εξολοθρεύονται. Ένα μικρό πλεονέκτημα επιλογής σε μεταλλαγμένο ιό μπορεί εύκολα να τον καταστήσει κυρίαρχο στέλεχος. Η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στον ιό της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας επιφέρει αλλαγή του ιστοικού τροπισμού μετατοπίζοντας τον στόχο από τα μακροφάγα στα Τ λεμφοκύτταρα, ανάπτυξη στελεχών ανθεκτικών στα αντι-ιικά φάρμακα μετά τη θεραπεία και δημιουργία αντιγονικών παραλλαγών στην πορεία της λοίμωξης του ασθενούς.

Η ανάπτυξη του ιού σε ηπιότερες εργαστηριακές συνθήκες επιτρέπει την επιβίωση ασθενέστερων στελεχών επειδή απουσιάζουν οι παράγοντες επιλογής του σώματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την παραγωγή εμβολίων με εξασθενημένα ιικά στελέχη.

Θεραπείες με φορείς ιούς

Οι γενετικά τροποποιημένοι ιοί μπορεί να γίνουν εξαιρετικά συστήματα μεταφοράς ξένων γονιδίων. Οι ιοί μπορούν να συμβάλλουν σε γονιδιακές θεραπείες, να χρησιμοποιηθούν σε εμβόλια για να προάγουν την ανοσία έναντι άλλων μικροοργανισμών ή όγκων και να αποτελέσουν κατευθυνόμενους φονείς όγκων. Το πλεονέκτημα των ιών είναι ότι εύκολα αναπαράγονται στα κατάλληλα κύτταρα και προσβάλλουν συγκεκριμένους ιστούς μεταφέροντας το DNA ή RNA τους μέσα στο κύτταρο. Οι ιοί που μελετώνται ως φορείς περιλαμβάνουν τους ρετροϊούς, αδενοϊούς, ιούς του απλού έρπητα αδενοτρόπους ιούς (παρβοϊός), ιούς ευλογιάς (π.χ. δαμαλίτιδας και ευλογιάς των καναρινιών), ακόμη και μερικούς τόγκα ιούς. Οι φορείς ιοί είναι συνήθως ελαττωματικοί ή εξασθενημένοι ιοί, στους οποίους ξένο DNA έχει αντικαταστήσει ένα γονίδιο λοιμοτοξικότητας ή ένα μη απαραίτητο γονίδιο. Το ξένο γονίδιο μπορεί να βρίσκεται υπό τον έλεγχο ιικού υποκινητή ή και υποκινητή για συγκεκριμένο ιστό. Οι ελαττωματικοί φορείς ιοί αναπτύσσονται σε κυτταρικές γραμμές που εκφράζουν τις απούσες ιικές λειτουργίες, "συμπληρώνοντας" τον ιό. Οι απόγονοι τους μπορούν να μεταδώσουν το νουκλεϊκό τους οξύ αλλά δεν παράγουν λοιμογόνους ιούς. Οι ρετροϊοί και οι αδενοτρόποι ιοί μπορούν να ενσωματωθούν σε κύτταρα και να εισαγάγουν μόνιμως ένα γονίδιο στο κυτταρικό χρωμόσωμα. Ο αδενοϊός και ο ιός του απλού έρπητα προάγουν την κατευθυνόμενη μεταφορά του ξένου γονιδίου στα φέροντα υποδοχέα κύτταρα. Έχουν αναπτυχθεί γενετικά εξασθενημένοι ιοί του απλού έρπητα που φονεύουν επιλεκτικά τα αναπτυσσόμενα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος αγνοώντας τους παρακείμενους νευρώνες. Ιός της δαμαλίτιδας με γονίδιο για τη γλυκοπρωτεΐνη της λύσσας ήδη χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ανοσοποίηση διαφόρων άγριων ζώων. Κάποια μέρα θα αποτελεί ρουτίνα η χρησιμοποίηση φορέων ιών για τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης, της μυϊκής δυστροφίας Duchene, των διαταραχών της αποθήκευσης στα λυσοσώματα και των ανοσολογικών διαταραχών^[40].

ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Υπάρχουν πάρα πολλές καινούργιες εξελίξεις στην εργαστηριακή διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων, που είναι πιο ευαίσθητες και προσφέρουν ταχεία ιολογική αναγνώριση από τα κλινικά δείγματα. Αυτές περιλαμβάνουν καλύτερα αντιδραστήρια ανίχνευσης ιικών αντισωμάτων για άμεση εξέταση των δειγμάτων, καθώς και τεχνικές μοριακής γενετικής για άμεση αναγνώριση των ιικών γενωμάτων. Συχνά, η απομόνωση του ιού, εν είναι απαραίτητη και αποφεύγεται, ούτως ώστε να ελαχιστοποιείται έτσι ο κίνδυνος μετάδοσης στο εργαστήριο. Ο ταχύτερος χρόνος της εργαστηριακής διάγνωσης, προσφέρει μια καλύτερη και πιο γρήγορη επιλογή της κατάλληλης αντι-ιικής θεραπείας.

Το ιστορικό του ασθενούς και η συμπτωματολογία, προσφέρουν τις πρώτες ενδείξεις για τη διάγνωση μιας ιογενούς λοίμωξης, συχνά αποκλείοντας έτσι άλλους τύπους λοίμωξης (π.χ. βακτηριακή, μυκητιασική). Ιολογικές εργαστηριακές εξετάσεις πραγματοποιούνται (1) για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση μέσω της αναγνώρισης του ιικού παράγοντα της λοίμωξης, (2) για να καθοριστεί η κατάλληλη αντι-ιική θεραπεία, (3) για να προσδιοριστεί η πορεία της νόσου και (4) για να ελεγχθεί η πορεία της νόσου σε επιδημιολογική βάση.

Οι εργαστηριακές μέθοδοι επιτυγχάνουν τα κάτωθι αποτελέσματα :

1. Περιγραφή των ιικά επαγόμενων κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων (CPEs) στα κύτταρα.
2. Ηλεκτρονικά Μικροσκοπικός εντοπισμός των ιικών σωματιδίων.
3. Απομόνωση και τυποποίηση του ιού.
4. Ανίχνευση των ιικών συστατικών (π.χ. πρωτεΐνες, ένζυμα γένωμα)
5. Εκτίμηση της ανοσιακής απάντησης του ασθενούς στον ιό με την ανεύρεση ειδικών αντισωμάτων

Τα συμπτώματα του ασθενούς και το ταξιδιωτικό ιστορικό, η εποχή του χρόνου, ο τόπος κατοικίας, το επάγγελμα καθώς και μια υποτιθέμενη διάγνωση βοηθούν στον καθορισμό των απαραίτητων διενεργειών για τη σωστή αναγνώριση ενός ιικού παράγοντα. Για παράδειγμα, τα δείγματα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και των ούρων είναι κατάλληλα σε έναν ασθενή με συμπτωματολογία από το ΚΝΣ, μετά από παρωτίτιδα, διότι ο ιός της ιλαράς που προκαλεί τη συγκεκριμένη πάθηση, μπορεί να απομονωθεί από αυτά τα δείγματα.

Μία εστιακή εγκεφαλίτιδα, με εντόπιση στο βρεγματικό λοβό συνοδευόμενη από κεφαλαλγίες και διαταραχή του προσανατολισμού, υποδηλώνει μια λοίμωξη από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), για την οποία γίνεται εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, προς ανεύρεση DNA αλληλουχιών μέσω PCR. Η ανάπτυξη μηνιγγιτικής συμπτωματολογίας κατά τη διάρκεια του θέρους, υποδηλώνει σαν αιτιολογία την ύπαρξη εντεροϊού, για τον οποίο δείγματα από το ΕΝΥ, φαρυγγικό επίχρισμα και κόπρανα πρέπει να σταλούν στο εργαστήριο για PCR εξέταση και πιθανή απομόνωση του ιού.

Η επιλογή του κατάλληλου δείγματος για την απομόνωση του ιού αποβαίνει συχνά δύσκολη, διότι πολλοί ιοί προκαλούν την ίδια κλινική πάθηση. Για παράδειγμα, πολλοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν άσηπτη μηνιγγίτιδα και

για αυτό το λόγο η λήψη πολλαπλών δειγμάτων είναι απαραίτητη για την αναγνώριση του ιού που προκαλεί τη νόσο.

Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται πρώιμα με την έναρξη της νόσου και κατά την οξεία φάση της νόσου πριν ακόμα σταματήσει η αναπαραγωγή του ιού και ως εκ τούτου η διασπορά του στα διάφορα σημεία του σώματος. Επιπλέον τα ειδικά αντισώματα που παράγονται σαν απάντηση στη λοίμωξη μπορεί να παρεμποδίσουν την ανίχνευση του ιού.

Όσο βραχύτερο είναι το μεσοδιάστημα μεταξύ της συλλογής του δείγματος και της μεταφοράς του στο εργαστήριο, τόσο μεγαλύτερη είναι και η δυνατότητα απομόνωσης του ιού. Οι λόγοι είναι ότι πολλοί ιοί είναι ευμετάβλητοι και δεύτερον ότι τα δείγματα υπόκεινται σε δευτερογενή ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων. Οι ιοί μεταφέρονται και φυλάσσονται πιο αποτελεσματικά σε πάγο και ειδικά μέσα που περιέχουν αντιβιοτικά και πρωτεΐνες, όπως η λευκωματίνη του ορού ή η ζελατίνη. Σημαντικές απώλειες σε λοιμογόνους τίτλους λαμβάνουν χώρα στην περίπτωση ελυτροφόρων ιών (π.χ. HSV, VZV, ιός της γρίπης) όταν αυτοί φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους -20oC. Αυτό εν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τους μη ελυτροφόρους ιούς (π.χ. Αδενοϊοί, Εντεροϊοί).

Ηλεκτρονική μικροσκόπηση

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό και την αναγνώριση ορισμένων ιών, εφόσον υπάρχουν επαρκή ιικά σωματίδια. Η πρόσθεση ενός ειδικού ως προς τον ιό αντισώματος σε ένα δείγμα μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση σωματιδίων, διευκολύνοντας κατά αυτό τον τρόπο την εντόπιση και την αυτόματη αναγνώριση του ιού (Ανοσοηλεκτρομικροσκόπηση). Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον εντοπισμό των Εντερικών ιών όπως ο Ροταϊός που παράγονται σε αφθονία και διαθέτουν χαρακτηριστική μορφολογία. Κατάλληλα επεξεργασμένος ιστός από βιοψία ή κλινικό δείγμα, μπορεί να εξεταστεί για την ανεύρεση ιικών δομών.

Κυτταροκαλλιέργειες

Ορισμένοι τύποι κυττάρων ιστικής καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη ιών. Πρωτογενείς κυτταρικές καλλιέργειες απαιτούνται μετά τη διάσπαση συγκεκριμένων ζωικών οργάνων με τη χρήση της τρυψίνης ή της κολλαγένεσης. Αυτά τα κύτταρα που λαμβάνονται μέσω αυτής της μεθόδου, κατόπιν αναπτύσσονται είτε σαν μονήρεις στιβάδες (ινοβλάστες ή επιθήλιο) ή σε εναιώρημα (λεμφοκύτταρο) με τεχνητά μέσα που συμπληρώνονται είτε με βόειο ορό ή από κάποια άλλη πηγή ανάπτυξης. Τα πρωτογενή κύτταρα μπορούν να διαχωριστούν με τρυψίνη, κατόπιν αραιώνονται και αφήνονται να αναπτυχθούν σε καινούργιες μονήρεις στιβάδες και δημιουργούνται έτσι δευτερογενείς καλλιέργειες κυττάρων. Οι διπλοειδείς γραμμές κυττάρων αποτελούν καλλιέργειες ενός μονού κυτταρικού τύπου , οι οποίες μπορούν να περάσουν ένα μεγάλο, αλλά περιορισμένο αριθμό φορών πριν γεράσουν ή πριν αποκτήσουν σημαντικές αλλαγές των χαρακτηριστικών τους. Οι γραμμές των ογκογόνων κυττάρων καθώς και οι αφθαρτοποιημένες σειρές κυττάρων, οι οποίες προέρχονται από νεοπλασίες ασθενών, περιέχουν μονήρεις κυτταρικούς τύπους οι οποίοι μπορούν να μεταβιβαστούν συνεχόμενα χωρίς γηρασμό.

Τα πρωτογενή νεφρικά κύτταρα πιθήκου, είναι εξαιρετικά χρήσιμα για την απομόνωση των ιών της γρίπης, των Παραμυξοϊών, πολλών εντεροϊών και ορισμένων Αδενοϊών. Τα ανθρώπινα εμβρυικά διπλοειδή κύτταρα, που είναι γενικότερα ινοβλαστικά κύτταρα, χρησιμοποιούνται για την απομόνωση ενός μεγάλου εύρους ιών (π.χ. HSV, VZV, CMV, αδενοϊών, Πικορναϊών). Τα κύτταρα HEP-2, μια συνεχή σειρά επιθηλιακών κυττάρων προερχόμενη από ανθρώπινο καρκίνο, είναι εξαιρετικό μέσο για την απομόνωση του ιού του αναπνευστικού συγκύτιο, των Αδενοϊών και του HSV. Πολλοί κλινικά σημαντικοί ιοί μπορούν να απομονωθούν τουλάχιστον σε μια από αυτές τις κυτταρικές σειρές.

Ιική εντόπιση

Ένας ιός μπορεί να εντοπιστεί και αρχικά να αναγνωριστεί μέσω της παρατήρησης των ιικά-επαγόμενων CPE στην κυτταρική μονοστιβάδα ή με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού ή και της ανάλυσης του γενώματος από τη μολυσμένη κυτταρική καλλιέργεια. Για παράδειγμα, ένας μονήρης ιός μολύνει, διασπείρεται και θανατώνει τα περιστοιχιζόμενα κύτταρα (Πλάκα). Ο τύπος της κυτταρικής καλλιέργειας, τα χαρακτηριστικά των CPE και η ταχύτητα ιικής ανάπτυξης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχικά για την αναγνώριση πολλών κλινικών σημαντικών ιών. Αυτή η προσέγγιση στην αναγνώριση των ιών είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των βακτηρίων και βασίζεται στην ανάπτυξη και στη μορφολογία των αποικιών σε διάφορα επιλεκτικά μέσα.

Ορισμένοι ιοί αναπτύσσονται βραδέως ή καθόλου ή εν προκαλούν CPE σε κυτταρική σειρά, όπου συνηθέστερα χρησιμοποιούνται σε κλινικά ιολογικά εργαστήρια. Ορισμένοι ιοί μπορούν να προκαλέσουν παθήσεις ιδιαίτερα επικίνδυνες για το προσωπικό. Αυτοί οι ιοί συνηθέστερα διαγιγνώσκονται μέσω των ορολογικών ευρημάτων ή μέσω της εντόπισης ιικών γενωμάτων ή αντιγόνων.

Οι χαρακτηριστικές ιικές ιδιότητες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση ιών που δεν διαθέτουν κλασικά CPE ευρήματα. Για παράδειγμα ο ιός της ερυθράς μπορεί να μην προκαλέσει CPE αλλά αποτρέπει την αναπαραγωγή Πικορναϊών με μια διαδικασία που είναι γνωστή σαν "Ετερόλογη Παρεμβολή" και η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση του ιού της Ερυθράς. Τα κύτταρα που μολύνονται από τον ιό της γρίπης, τον ιό της παραγρίπης, τον ιό της παρωτίτιδας και τον Τογκαϊό εκφράζουν μια ιική γλυκοπρωτεΐνη (Αιμοσυγκολλητίνη) η οποία συνδέεται με τα ερυθροκύτταρα σε συγκεκριμένα ζωικά είδη στη μολυσμένη κυτταρική επιφάνεια (αιμοπροσρόφηση). Όταν απελευθερωθούν σε μέσο κυτταρικής καλλιέργειας τέτοιοι ιοί μπορούν να ανιχνευθούν από την συγκόλληση των ερυθροκυττάρων, μια διαδικασία που είναι γνωστή σαν «Αιμοσυγκόλληση». Το στέλεχος του ιού εν συνεχεία, μπορεί να αναγνωριστεί από το ειδικό αντίσωμα που παρεμποδίζει την αιμοσυγκόλληση, μια διαδικασία γνωστή σαν αναστολή της αιμοσυγκόλλησης. Μια καινοτόμος προσέγγιση στην εντόπιση της λοίμωξης από τον ιό του απλού έρπητα χρησιμοποιεί γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές καλλιέργειες όπου εκφράζουν το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης και βάφονται κυανές όταν μολυνθούν από τον HSV (ενζυμικά συνδεδεμένο-επαγόμενο σύστημα).

Η «ποσοτικοποίηση» ενός ιού επιτυγχάνεται μέσω του καθορισμού της μεγαλύτερης αραιώσης που διατηρεί τις ακόλουθες ιδιότητες (Τίτλοι)

1. Δόση Ιστικής Καλλιέργειας (TC50): Τίτλος του ιού που προκαλεί κυτταροπαθολογικές επιπτώσεις σε μισά από τα κύτταρα της ιστικής καλλιέργειας.
2. Θανατηφόρα Δόση (LD50): Τίτλος του ιού που θανατώνει το 50% των εξεταζόμενων ζώων
3. Λοιμογόνος δόση (1D50): Τίτλος του ιού που ξεκινά ένα εντοπίσιμο σύμπτωμα, αντίσωμα ή και άλλη απάντηση στο 50% των εξεταζόμενων ζώων.

Ο αριθμός των λοιμογόνων ιών μπορεί επίσης να εκτιμηθεί μέσω της μέτρησης των «πλακών» που παράγονται από δεκαπλάσιες αραιώσεις ενός δείγματος (μονάδες που σχηματίζουν πλάκες). Η αναλογία των ιικών σωματιδίων (από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο) σε σχέση με τις σχηματιζόμενες μονάδες πλακών είναι πάντα μεγαλύτερη από ένα, διότι πολυάριθμα προβληματικά ιικά σωματίδια παράγονται κατά τη διάρκεια της ιικής αναπαραγωγής.

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων των καλλιιεργειών

Γενικότερα η εντόπιση ενός οποιουδήποτε ιού σε ιστούς του ξενιστή, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, στο αίμα ή σε φυσαλιδώδες υγρό μπορεί να θεωρηθεί ένα υψηλά σημαντικό εύρημα. Παρόλα αυτά η ιική διασπορά μπορεί επίσης να αυξηθεί από μια άλλη προϋπάρχουσα κατάσταση (μια άλλη λοίμωξη, ανοσοκαταστολή, στρες) και τοιουτοτρόπως μπορεί να μην συσχετίζεται με τα συμπτώματα της πάθησης. Συγκεκριμένοι ιοί μπορούν να διασπαρθούν διακεκομμένα χωρίς να προκαλούν συμπτωματολογία στο επηρεασμένο άτομο, με περιόδους που ξεκινούν από εβδομάδες (Εντεροϊοί στα κόπρανα) σε πολλούς μήνες ή και χρόνια (HSV ή CMV στον οροφάρυγγα και στον κόλπο; Αδενοϊοί στον οροφάρυγγα και στο γαστρεντερικό σύστημα). Επιπλέον, οι ιοί μπορεί να μην απομονώνονται από ένα δείγμα, εάν το δείγμα δεν χειριστεί σωστά, εάν περιέχει εξουδετερωτικό αντίσωμα ή εάν αποκτηθεί προτού ή μετά την ιική διασπορά.

Εντοπισμός ιικών πρωτεϊνών

Ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες παράγονται κατά τη διάρκεια της ιικής αναπαραγωγής και μπορούν να εντοπιστούν είτε με βιοχημικές, είτε με ανοσολογικές μεθόδους ή και με μεθόδους μοριακής βιολογίας. Οι ιικές πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν είτε με την ηλεκτροφόρηση και τα «μοτίβα» τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αναγνώριση και στη διάκριση διαφορετικών ιών. Για παράδειγμα, οι διαχωρισμένες με ηλεκτροφόρηση HSV-λοιμογόνες κυτταρικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες του «βιρίου» εκδηλώνουν διαφορετικά «μοτίβα» για διαφορετικούς τύπους και στελέχη του HSV-1 και HSV-2 ιού.

Η εντόπιση και η εξέταση των χαρακτηριστικών ενζύμων ή δραστηριοτήτων μπορούν να συμβάλλουν στην αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση ορισμένων ιών. Για παράδειγμα, η παρουσία της ανάστροφης μεταγραφάσης στον ορό ή στην κυτταρική καλλιέργεια υποδηλώνει την παρουσία ενός ρετροϊού. Παρομοίως, η αιμοσυγκόλληση ή η αιμοπροσρόφηση μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν για την ανεύρεση της αιμοσυγκολλητίνης που παράγεται από τον ιό της γρίπης.

Τα αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ευαίσθητα και ειδικά εργαλεία στην ανίχνευση, στην αναγνώριση και ποσοτικοποίηση του ιού και του ιικού αντιγόνου σε κλινικά δείγματα ή κυτταρικές καλλιέργειες (ανοσοϊστοχημεία).

Ειδικότερα, τα μονοκλωνικά ή τα μονοειδικά αντισώματα είναι χρήσιμα για την διάκριση ιικών στελεχών και μεταλλαγμένων ιών. Τα ιικά αντιγόνα στην κυτταρική

επιφάνεια ή εντός του κυττάρου μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και της ανοσοενζυμικής μεθόδου (EIA). Ο ιός ή το αντιγόνο που απελευθερώνεται από μολυσμένα κύτταρα μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της ELISA , της RIA (ραδιοανοσομέθοδος) καθώς και της LA.

Η εντόπιση του CMV καθώς και άλλων ιών μπορεί να διευκολυνθεί μέσω της συνδυαστικής χρήσης της κυτταρικής καλλιέργειας και των ανοσολογικών μέσων. Σε αυτή τη μέθοδο το κλινικό δείγμα φυγοκεντρείται πάνω σε κύτταρα αναπτυγμένα σε ένα πολύ λεπτό κάλυμμα πάνω από το προς εξέταση δείγμα στο βάθος του τοιχώματος της φιάλης (γυάλινο σωληνάριο). Αυτό, αυξάνει την αποτελεσματικότητα και επιτυγχάνει την πρόοδο της λοίμωξης των κυττάρων στο πολύ λεπτό κάλυμμα. Τα κύτταρα εν συνεχεία μπορούν να εξεταστούν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού (Άμεσος ανοσοφθορισμός) ή μέσω της ELA για την ανίχνευση πρόωρων ιικών αντιγόνων, τα οποία είναι ανιχνεύσιμα μέσα σε 24 ώρες αντι των 7-14 ημερών που χρειαζόταν για την ανάπτυξη κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Εντοπισμός του ιικού γενετικού υλικού

Η δομή του γενώματος και η γενετική αλληλουχία αποτελούν μείζονα διαχωριστικά της οικογένειας, του τύπου και του στελέχους του ιού.

Τα ηλεκτροφορητικά «μοτίβα» του ριβονουκλεϊκού οξέος (γρίπη, ρετροϊός) ή ο περιορισμός του μήκους των τμημάτων της ενδονουκλεάσης από DNA ιικά γενώματα παρομοιάζουν με γενετικά δακτυλικά αποτυπώματα αυτών των ιών. Διαφορετικά στελέχη του ιού του HSV-1 και του HSV-2 μπορούν να διακριθούν έτσι, μέσω του πολυμορφισμού του μήκους περιορισμού τμημάτων. Νεότερες μέθοδοι για την ανίχνευση του ιικού γενώματος χρησιμοποιούν ως προς την αλληλουχία ειδικούς ενετικούς ιχνηθέτες και PCR- τύπου διερευνητικές προσεγγίσεις, οι οποίες προσφέρουν ταχύτερη ανάλυση με ελάχιστο κίνδυνο από το λοιμογόνο ιό.

Οι DNA ιχνηθέτες με αλληλουχίες συμπληρωματικές σε ειδικά τμήματα του ιικού γενώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αντισώματα, με την ίδια ευαισθησία και ειδικότητα ως προς την ανίχνευση του ιού. Αυτοί οι ιχνηθέτες μπορούν να εντοπίσουν τον ιό ακόμη και στην απουσία ιικής αναπαραγωγής. Η ανάλυση του DNA ιχνηθέτη είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον εντοπισμό βραδέως αναπαραγόμενων ή μη αναπαραγόμενων ιών, όπως ο CMV και ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος για τους οποίους δεν υπάρχουν CPE ή το ιικό αντιγόνο δεν μπορεί να εντοπιστεί χρησιμοποιώντας ανοσολογικές μεθόδους. Ειδικές ιικές γενετικές αλληλουχίες σε μονιμοποιημένα δείγματα ιστικής βιοψίας μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της χρήσης του In Situ υβριδισμού.

Τα ιικά γενώματα μπορούν επίσης να εντοπισθούν σε κλινικά δείγματα με τη χρήση του dot blot ή της Southern Blot ανάλυσης. Για την τελευταία μέθοδο, το ιικό γένωμα ή ηλεκτροφορητικά διαχωριζόμενα διαχωριστικά τμήματα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης του γενώματος αποτυπώνονται σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης και κατόπιν ανιχνεύονται στο φίλτρο μέσω υβριδισμού των DNA ιχνηθετών. Ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένο DNA (Northern blot –RNA : DNA ιχνηθέτης υβριδισμού) αποτυπώνεται σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και ανιχνεύεται με παρόμοιο τρόπο. Οι ιοί DNA ιχνηθέτες εντοπίζονται μέσω της αυτοραδιογραφίας

ή μέσω της φθοριομετρίας ή των ανοσοενζυμικών μεθόδων. Πολλοί ιικοί ιχνηθέτες και «κιτ» για τον εντοπισμό πολλών ιών είναι εμπορικά διαθέσιμοι.

Ο εντοπισμός των γενωμάτων μέσω της PCR, της RT-PCR και άλλων σχετικών εξετάσεων έχουν αρχίσει να αποτελούν τα πρωταρχικά εργαλεία για την εντόπιση και την αναγνώριση ποικίλων ιών σε πολλά εργαστήρια. Η χρήση των κατάλληλων εκκινητών για την PCR μπορεί να προάγει μια εκατομμυριοστή ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου μέσα σε λίγες ώρες. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για τον εντοπισμό αλληλουχιών από λανθάνοντες και «ακεραιποιημένους ιούς» όπως οι Ρετροϊοί, οι Ερπητοϊοί, οι ιοί των θηλωμάτων και άλλοι Παποβαϊοί, όπως επίσης η απόδειξη της παρουσίας ιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις και ιών που είναι δύσκολο ή πολύ επικίνδυνο να απομονωθούν σε κυτταρική καλλιέργεια.

Η RT-PCR χρησιμοποιεί τη Ρετροϊκή ανάστροφη μεταγραφάση, ώστε να μετατρέψει το ιικό RNA σε DNA και να επιτρέψει την PCR ενίσχυση των αλληλουχιών του ιικού νουκλεϊκού οξέως. Αυτή η προσέγγιση ήταν πολύ χρήσιμη για την αναγνώριση και την διάκριση των Hantaiών που προκάλεσαν κρούσμα στο Νέο Μεξικό το 1993. Η ποσοτικοποίηση της ποσότητας του ιού του HIV σε έναν ασθενή μπορεί να καθοριστεί από την PCR σε πραγματικό χρόνο. Η συγκέντρωση του ιού του HIV γενώματος σε ένα δείγμα αίματος διαφαίνεται αναλογικά με τη συχνότητα της PCR ενίσχυσης του γενώματος του DNA.

Η PCR αποτέλεσε την πρωτότυπη μέθοδο για ποικίλες άλλες μεθόδους ενίσχυσης του γενώματος. Η ενίσχυση βασισμένη στη μεταγραφή χρησιμοποιεί την ανάστροφη μεταγραφάση και ειδικούς ως προς την αλληλουχία εκκινητές, ώστε να δημιουργήσει ένα συμπληρωματικό DNA (cDNA) που επίσης διαθέτει μια αλληλουχία αναγνωρίσιμη από την DNA-εξαρτημένη RNA πολυμεράση από τον T7 βακτηριοφάγο. Μια RNAαση Η πέμπει το RNA και το DNA μεταγράφεται σε RNA από την T7 RNA πολυμεράση. Οι νέες RNA αλληλουχίες κυκλώνονται προς τα πίσω στην αντίδραση, ώστε να ενισχύσουν την σχετική αλληλουχία. Σε αντίθεση με την PCR αυτές οι αντιδράσεις δεν προαπαιτούν ειδικό εξοπλισμό.

Ορισμένες άλλες προσεγγίσεις ως προς την ενίσχυση του γενώματος και την εντόπιση είναι παρόμοιες στο σκεπτικό με την ELISA. Αυτές οι προσεγγίσεις χρησιμοποιούν «ακίνητοποιημένες» DNA αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς την σχετική ιική αλληλουχία του γενώματος ώστε να αποκτήσουν το ιικό γένωμα. Εν συνέχεια, γίνεται δέσμευση από μια άλλη συμπληρωματική αλληλουχία, η οποία περιέχει το σύστημα εντοπισμού. Η αλληλουχία cDNA μπορεί να είναι προσδεμένη σε μια εκτεταμένη διακλαδιζόμενη αλυσίδα του DNA όπου κάθε κλάδος επιφέρει μια αντίδραση που ενισχύει το σήμα σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Μια άλλη ποικιλία του θέματος χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει τα DNA-RNA συμπλέγματα και προσλαμβάνει ιικούς υβριδικούς DNA-RNA ιχνηθέτες στο πηγάδια μιας πλάκας και ακλουθώντας ένα σημασμένο - αντίσωμα και εν συνέχεια μέθοδοι ELISA χρησιμοποιούνται για την εντόπιση της παρουσίας του γενώματος. Παρομοίως με την ELISA αυτή οι μέθοδοι μπορούν να αυτοματοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν για την εντόπιση διαφόρων ιών.

Ορολογικές μέθοδοι

Η χυμική ανοσιακή ανταπόκριση προσφέρει ένα ιστορικό των λοιμώξεων του ασθενούς. Ορολογικές μελέτες χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση ιών που είναι δύσκολο να απομονωθούν και να αναπτυχθούν σε κυτταρική καλλιέργεια, καθώς επίσης και ιών που προκαλούν χρόνιες παθήσεις. Η ορολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση ενός ιού, του στελέχους του ή του οροτύπου του. Επίσης η ανεύρεση ειδικών έναντι του ιού αντισωμάτων με ορολογικές μεθόδους δείχνει αν πρόκειται για οξεία ή χρόνια λοίμωξη και καθορίζεται έτσι εάν πρόκειται για πρωτοπαθή λοίμωξη ή επαναλοίμωξη. Ο τύπος του αντισώματος, ο τίτλος και η φύση των αντιγονικών στόχων προσφέρουν ορολογικά δεδομένα για μια ιογενή λοίμωξη. Η ανεύρεση μιας ειδικής ως προς τον ιό ανοσοσφαιρίνης (IgM), η οποία είναι παρούσα στις πρώτες δύο ή τρεις εβδομάδες της πρωτοπαθούς λοίμωξης, γενικότερα υποδηλώνει μια πρόσφατη πρωτοπαθή λοίμωξη.

Η αναστροφή υποδηλώνεται τουλάχιστον από μια τετραπλή αύξηση στον τίτλο των ειδικών IgG αντισωμάτων μεταξύ του ορού που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου και αυτού που λαμβάνεται τουλάχιστον από δύο έως τρεις εβδομάδες αργότερα, κατά τη διάρκεια της αναρρωτικής φάσης. Η επαναλοίμωξη ή η υποτροπή προκαλεί μια αναμνηστική ανταπόκριση (δευτεροπαθής). Οι τίτλοι των αντισωμάτων μπορεί να παραμένουν υψηλοί σε ασθενείς που πάσχουν από συχνές υποτροπές της νόσου (π.χ. ερπητοϊοί). Επειδή υπάρχει εγγενής ανακρίβεια των ορολογικών εξετάσεων που βασίζονται στις διπλάσιες αραιώσεις, μια τετραπλή αύξηση στον τίτλο αντισωμάτων μεταξύ της οξείας και αναρρωτικής φάσης των ορών, απαιτείται για να υποδηλώσει οροαναστροφή.

Η πορεία μιας χρόνιας λοίμωξης μπορεί επίσης να καθοριστεί από το ορολογικό προφίλ. Ειδικότερα, η παρουσία των αντισωμάτων σε ποικίλα «ειδικά» ιικά αντιγόνα και οι τίτλοι αυτών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αναγνώριση του σταδίου της νόσου προκαλούμενης από συγκεκριμένους ιούς. Αυτή η προσέγγιση αποβαίνει ιδιαίτερη χρήσιμη για τη διάγνωση ιογενών παθήσεων με βραδείες πορείες (Ηπατίτιδα Β, λοιμώδη μονοκυρήνωση). Γενικότερα, τα πρώτα αντισώματα που εμφανίζονται κατευθύνονται στα αντιγόνα που είναι περισσότερο διαθέσιμα από το ανοσιακό σύστημα (π.χ. έχουν εκφραστεί στο βίριο ή στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων). Όψιμα στη λοίμωξη, όταν ο λοιμογόνος ιός ή η κυτταρική ανοσιακή ανταπόκριση έχουν λύσει τα κύτταρα, τα αντισώματα κατευθύνονται στις ενδοκυττάριας ιικές πρωτεΐνες και στα ένζυμα. Για παράδειγμα, τα πρώτα αντισώματα έναντι του ιού Epstein Barr είναι τα αντισώματα IgG ή IgM έναντι του καψιδίου του ιού (VCA). Μετά, κατά τη διάρκεια της ανάρρωσης, ανιχνεύονται αντισώματα έναντι των πυρηνικών αντιγόνων του ιού.

Μέθοδοι ορολογικών εξετάσεων

Η εξουδετέρωση και οι διαδικασίες αναστολής της αιμοσυγκόλλησης εξετάζουν το αντίσωμα στη βάση της αναγνώρισης και της δέσμευσης του με τον ιό. Το κάλλυμα του αντισώματος του ιού παρεμποδίζει τη δέσμευση του στα υποδηλούμενα κύτταρα. Η εξουδετεροποίηση περιλαμβάνει την αναστολή από το αντίσωμα της λοίμωξης και τα κυτταροπαθολογικά ευρήματα του ιού σε κυτταρικές καλλιέργειες. Μια εξουδετεροποιητική αντισωματική ανταπόκριση, είναι ειδική ως προς τον ιό και το στέλεχος. Η αντίδραση συχνά είναι θετική με την έναρξη των συμπτωμάτων και εμμένει για μακρές περιόδους. Η HI χρησιμοποιείται για την αναγνώριση ιών που

μπορούν επιλεκτικά να συγκολλήσουν ερυθροκύτταρα ποικίλων ζωικών ειδών. Το αντίσωμα στον ορό αποτρέπει μια καθορισμένη ποσότητα του ιού να δεσμευτεί και να συγκολλήσει τα ερυθροκύτταρα. Η εξέταση του έμμεσου ανοσοφθορισμού του αντισώματος και οι σταθερής φάσης ανοσολογικές εξετάσεις, όπως η LA, ELISA και RIA χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση του ιικού αντιγόνου και του αντι-ιικού αντισώματος. Η εξέταση ELISA εκτός από τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων χρησιμοποιείται και για την προφύλαξη της αιματογενούς μετάδοσης, ώστε να αποκλείσει άτομα οροθετικά για την Ηπατίτιδα Β, C και HIV. Η ικανότητα του αντισώματος του ασθενούς να αναγνωρίζει ειδικές ιικές πρωτεΐνες διαχωριζόμενες μέσω της ηλεκτροφόρησης, μεταφέρεται (αποτυπώνεται) πάνω σε ένα φίλτρο (νιτροκυταρίνης, nylon) και γίνεται ορατή με ένα ένζυμο-δεσμευτικό αντιανθρώπινο αντίσωμα. Αυτό το γεγονός, επιβεβαιώνει την διαγνωσμένη με τη μέθοδο ELISA HIV λοίμωξη.

Περιορισμοί ορολογικών μεθόδων

Η παρουσία ενός αντι-ιικού αντισώματος υποδηλώνει παλαιά λοίμωξη αλλά δεν είναι επαρκής, ώστε να υποδείξει πότε έλαβε χώρα η λοίμωξη. Το εύρημα της ειδικής ως προς τον ιό IgM ανοσοσφαιρίνης και η τετραπλάσια αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων μεταξύ δειγμάτων οξείας φάσης και ανάρρωσης ή τα ειδικά προφίλ ως προς τα αντισώματα είναι ενδεικτικά πρόσφατης λοίμωξης. Ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα εξετάσεων μπορούν να περιπλέξουν τη διάγνωση. Επιπρόσθετα, το αντίσωμα του ασθενούς μπορεί να είναι συνδεδεμένο με το ιικό αντιγόνο (π.χ. στην Ηπατίτιδα Β) σε ανοσοσυμπλέγματα και έτσι αποτρέπει η εντόπιση του αντισώματος. Οι διασταυρούμενες-ορολογικές αντιδράσεις μεταξύ διαφορετικών ιών μπορούν επίσης να μπερδέψουν την ταυτότητα του λοιμογόνου παράγοντα (π.χ. ιός της παρωτίτιδας, παραϊνφλουένζας) Αντίστροφα, το αντίσωμα που χρησιμοποιείται στην εξέταση μπορεί να είναι πολύ ειδικό (πολλά μονοκλωνικά αντισώματα) και μπορεί να μην αναγνωρίζει άλλους ιούς από την ίδια οικογένεια, δίδοντας έτσι ένα ψευδώς-αρνητικό αποτέλεσμα (π.χ. Ρινοϊός). Η καλή εκτίμηση των κλινικών συμπτωμάτων και η γνώση των περιορισμών και των εν δυνάμει προβλημάτων με τις ορολογικές εξετάσεις βοηθούν στη διάγνωση.

ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι ευτυχώς σπάνιες αλλά ιδιαίτερα σοβαρές. Ο εγκεφαλικός φλοιός και ο νωτιαίος μυελός περιορίζονται εντός ορισμένων ορίων του κρανίου και του οστέινου σπονδυλικού σωλήνα. Σαν αποτέλεσμα η φλεγμονή και το οίδημα έχουν καταστροφικές συνέπειες, συχνά οδηγώντας σε έμφρακτο των ιστών που στη συνέχεια καταλήγει σε μόνιμες νευρολογικές βλάβες ή θάνατο.

Ο εγκεφαλικός φλοιός και ο νωτιαίος μυελός αιωρούνται μέσα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), το οποίο παράγεται μέσω του χοριοειδούς πλέγματος που κείται στα τοιχώματα των εγκεφαλικών κοιλιών από τις οποίες και απορροφάται. Οι αραχνοειδείς λάχνες παροχετεύουν εντός μιας μεγάλης μέσης φλέβας, τον ανώτερο οβελιαίο κόλπο. Ο φλοιός και ο νωτιαίος μυελός περιστοιχίζονται από τρία ιστικά στρώματα που ονομάζονται μήνιγγες. Τα δύο στρώματα που είναι πιο κοντά στο φλοιό ονομάζονται χοριοειδής μήνιγγα (άμεσα καλύπτει τον εγκεφαλικό φλοιό) και αραχνοειδής. Αυτά τα στρώματα φτιάχνουν τις λεπτομήνιγγες. Το τρίτο στρώμα, η σκληρά (παχυμήνιγγα) αποτελεί το εξωτερικό στρώμα. Το ENY ρέει μεταξύ της χοριοειδούς μήνιγγας και της αραχνοειδούς στον υπαραχνοειδή χώρο.

Οι λοιμώξεις του ΚΝΣ ταξινομούνται με βάση τη θέση της λοίμωξης. Η λοίμωξη του εγκεφαλικού φλοιού ονομάζεται εγκεφαλίτιδα και η λοίμωξη των μηνιγγων ονομάζεται μηνιγγίτιδα. Τα αποστήματα συνήθως δημιουργούνται σε τρεις τοποθεσίες εντός του ΚΝΣ: τον εγκεφαλικό φλοιό, όπου ονομάζονται εγκεφαλικά αποστήματα, μεταξύ της σκληράς και της αραχνοειδούς όπου ονομάζονται υποσκληρίδια αποστήματα ή αμέσως έξω από τη σκληρά όπου ονομάζονται επισκληρίδια αποστήματα.

Οι μικροβιακής αιτιολογίας λοιμώξεις του ΚΝΣ διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες: στην βακτηριακή μηνιγγίτιδα και στην άσηπτη μηνιγγίτιδα. Τα αίτια της βακτηριακής μηνιγγίτιδας ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία και την ανοσιακή κατάσταση του ασθενούς. Ανάμεσα στους συχνότερους μικροοργανισμούς που ευθύνονται για βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι ο αιμόφιλος, πνευμονιόκοκκος και ο μηνιγγιτιδόκοκκος. Η κυριότερη εργαστηριακή προσέγγιση για τη διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας παραμένει το προφίλ του ENY και η καλλιέργεια του ENY (Πίνακας 1).

Από την άλλη μεριά ως άσηπτη μηνιγγίτιδα, σύμφωνα με τον ορισμό του CDC, ορίζεται η μηνιγγίτιδα στην οποία η Gram χρώση και η καλλιέργεια για κοινά βακτήρια είναι αρνητική, παρά την κλινική συνδρομή και τα εργαστηριακά ευρήματα του ENY (αριθμός λευκοκυττάρων, λόγος του σακχάρου του ENY/σακχάρου αίματος, ποσό λευκώματος στο ENY). Η άσηπτη μηνιγγίτιδα προκαλεί τη φλεγμονή και εξοίδηση των μηνιγγων που περικλείουν τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ως απάντηση στη λοίμωξη από εντεροϊούς (ειδικά στους ιούς echo και Coxsackie), HSV-2, ιό της παρωτίτιδας ή ιό της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας. Η νόσος συνήθως είναι αυτοπεριοριζόμενη και σε αντίθεση με τη βακτηριακή μηνιγγίτιδα, υφίσταται χωρίς κατάλοιπα, εκτός εάν ο ιός προσβάλλει νευρώνες ή τον εγκέφαλο. Ο ιός φθάνει στις μήνιγγες μέσω αιμίας.

Λοιμώδη**Ιοί****Βακτήρια***(B.burgdorferi, Treponema, Mycobacterium, Brucella)***Μύκητες***(Cryptococcus, Candida, Histoplasma, Coccidioides)***Παράσιτα***(Toxoplasma, Neurocysticercosis)***Μη λοιμώδη****Μετά από εμβολιασμό MMR****Φάρμακα***(CO-trimoxazole, ampicillin, isoniazid, intrathecal methotrexate, allopurinol)***Συστηματικές νόσοι***(κολλαγόνο, σαρκοείδωση, νόσος Bechet)***Νεοπλασματικές νόσοι***(λευκαμία, κερκινωματώδες μηνιγγίτις)***ΙΟΓΕΝΕΙΣ ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΚΝΣ**

Οι ιογενείς λοιμώξεις του ΚΝΣ διακρίνονται σε ιογενείς μηνιγγίτιδες και ιογενείς εγκεφαλίτιδες.

Ιογενής μηνιγγίτιδα

Η ιογενής μηνιγγίτιδα είναι ο πιο συχνός τύπος μηνιγγίτιδας, Προκαλείται συνήθως από non-polio εντεροϊούς, Echo και Coxsackie ιούς. Σε θερμά κλίματα, οι λοιμώξεις συμβαίνουν κυρίως τους θερινούς μήνες του έτους, συνήθως το καλοκαίρι και νωρίς το φθινόπωρο. Στα τροπικά κλίματα, η λοίμωξη συμβαίνει κατά τη διάρκεια όλου του έτους. Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της κοπρανοστοματικής οδού και μικρές επιδημίες αναφέρονται συχνά. Ο ιός Herpes simplex τύπου 2 είναι ο δεύτερος σε συχνότητα υπεύθυνος τύπος της ιογενούς μηνιγγίτιδας και συνοδεύεται από φυσαλιδώδεις δερματικές βλάβες στη γεννητική χώρα. Αυτός ο ιός είναι επίσης το πιο συχνό αίτιο της υποτροπιάζουσας άσηπτης μηνιγγίτιδας. Ο ιός της ανεμοβλογιάς είναι το τρίτο πιο συχνό αίτιο και η συγκεκριμένη άσηπτη μηνιγγίτιδα συνήθως δεν συνοδεύεται από δερματικές βλάβες. Επιπλέον ο ιός της παρωτίτιδας, ο ιός του απλού έρπητα τύπου 1, ο ιός της λοιμώδους μονοκυρήνωσης και ο κυτταρομεγαλοϊός μπορεί να ενοχοποιηθούν για ιογενή μηνιγγίτιδα.

Ιογενής εγκεφαλίτιδα

Οι ιογενείς μηνιγγίτιδες μπορεί να μεταδοθούν από άνθρωπο σε άνθρωπο ή μετά από δάγμα από μολυσμένο αρθρόποδο.

Το πλέον συχνό αίτιο της θανατηφόρου μη επιδημικής ιογενούς εγκεφαλίτιδας είναι ο ιός του απλού έρπητα. Η κλινική της εικόνα είναι συχνά οξεία, με διαταραχές του επιπέδου συνείδησης, εστιακά νευρολογικά σημεία και σπασμούς. Για τη διάγνωση μπορεί να απαιτηθεί βιοψία εγκεφάλου, στην οποία ανευρίσκονται παθολογικά ευρήματα ενδεικτικά της ιογενούς λοίμωξης. Η πρώιμη θεραπεία με ακυκλοβίρη μπορεί να επιτύχει την ίαση ή τουλάχιστον να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνητότητα. Από την άλλη πλευρά, οι επιδημικές μορφές της ιογενούς μηνιγγίτιδας οφείλονται συνήθως σε ιούς που μεταδίδονται με αρθρόποδα. Αυτές

οι λοιμώξεις εμφανίζονται το καλοκαίρι, μεταδίδονται με κώνωπες και έχουν συγκεκριμένες γεωγραφικές κατανομές. Τα ευρήματα είναι συνήθως μη ειδικά, όπως απώλεια της συνείδησης, σπασμοί και πυρετός. Η διάγνωση μπορεί να γίνει με ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό ή στο ΕΝΥ ή με απομόνωση του ιού. Δυστυχώς δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για αυτή την ομάδα των αρμοϊών. Στον πίνακα περιγράφονται οι αρμοϊοί οι οποίοι ενοχοποιούνται για εγκεφαλίτιδα.

Οι ΗSV και VZV είναι πανταχού παρόντες και συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές, λανθάνουσες λοιμώξεις του ΚΝΣ αλλά μπορούν επίσης να προκαλέσουν εγκεφαλίτιδα. Οι περισσότερες λοιμώξεις από αρμοϊούς εγκεφαλίτιδας προκαλούν μάλλον συμπτώματα σαν της γρίπης παρά εγκεφαλίτιδα. Η εγκεφαλίτιδα και η υποξεία σκληρυντική πανεγκεφαλίτιδα ήταν σπάνια παρεπόμενα της ιλαράς την εποχή που δεν υπήρχαν εμβόλια.

Οι περισσότερες πάντως λοιμώξεις από αρμοϊούς δεν καταλήγουν σε νόσο, επειδή ο ιός δεν φθάνει στον εγκέφαλο ή δεν προκαλεί βλάβες ικανές να δημιουργήσουν συμπτώματα.

Άλλα ιογενή νευρολογικά σύνδρομα είναι η άνοια από HIV, η τροπική σπαστική παραπάρεση από τον ιό τύπου 1 της Τ κυτταρικής λευχαιμίας (HTLV-1), η προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια από τον παποβαϊό JC σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (kuru, Creutzfeldt-Jakob) από prion. Η προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια και οι σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες έχουν μακροχρόνιες περιόδους επώασης (συμβατικοί και ιδιόμορφοι βραδείς ιοί).

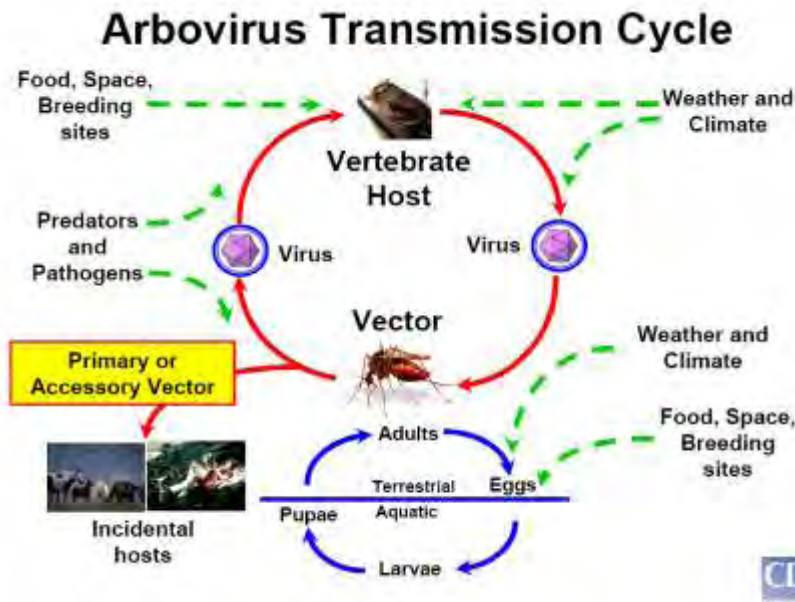
Η ανίχνευση με ορολογικές μεθόδους συγκεκριμένου αντιγόνου του ιού, η ανίχνευση με PCR ιικού γονιδιώματος ή αγγελιαφόρου RNA ή η απομόνωση του ιού από ΕΝΥ ή από άλλο βιολογικό υγρό επιβεβαιώνει τη διάγνωση της ιογενούς εγκεφαλίτιδας και προσδιορίζει την ταυτότητα του ιού. Η εποχή του έτους διευκολύνει επίσης τη διάγνωση, επειδή οι λοιμώξεις από εντεροϊούς και αρμοϊούς λαμβάνουν χώρα γενικά το καλοκαίρι, ενώ η εγκεφαλίτιδα από ΗSV και άλλα ιικά σύνδρομα εμφανίζονται καθ'όλο το έτος.

ΑΡΜΠΟΙΟΙ – ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι αρμποϊοί (**Ar**thropod-**bo**rne viruses= **arbo**viruses) είναι ιοί που μεταδίδονται μέσω αιματοφάγων αρthropοδών (κουνούπια, σκνίπες, κρότωνες κλπ) σε άλλα ευάλωτα σπονδυλωτά. Η μόλυνση των σπονδυλωτών γίνεται κατά τη διάρκεια του γεύματος αίματος από το αρthropοδο. Συνήθως οι ιοί αυτοί δεν προκαλούν σοβαρά συμπτώματα στους ανθρώπους. Τα περισσότερα περιστατικά περιορίζονται σε πυρετό, πονοκεφάλους και εξανθήματα. Ορισμένοι από τους ιούς αυτούς, όμως, μπορούν να προκαλέσουν επιδημίες με σημαντικές λοιμώξεις (όπως μηνιγγίτιδα, εγκεφαλοπάθεια και αιμορραγικό πυρετό) που μπορεί να είναι θανατηφόρες. Πολυάριθμες επιδημίες αρμποϊών την τελευταία δεκαετία κατέδειξαν ότι οι αρμποϊοί μπορεί να καταστούν σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Οι επιδημίες αυτές έχουν συμβεί σε πολλές διαφορετικές περιοχές του πλανήτη και δεν έχουν περιοριστεί σε τροπικές ή λιγότερο αναπτυγμένες περιοχές. Ευτυχώς, η επιστημονική έρευνα που παρέχει νέες μοριακές τεχνικές ταχείας διάγνωσης, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα αρthropοδα, μπορεί να συνεισφέρει στον περιορισμό της εξάπλωσής τους και στην πρόληψη επιδημικών καταστάσεων.

Περιγραφή των ιών και η σημασία τους

Όλες οι αρμπο-ιογενείς εγκεφαλιτίδες είναι ζωονοτικές, με σύνθετους κύκλους ζωής, εμπλέκοντας ένα πρωτογενή μη-ανθρώπινο σπονδυλωτό ξενιστή και ένα πρωτογενή φορέα αρthropοδο (Εικόνα 1).



Οι άνθρωποι και τα οικιακά ζώα μπορεί να αναπτύξουν κλινικά συμπτώματα, αλλά συνήθως είναι αδιέξοδοι ξενιστές γιατί δεν αναπτύσσουν αρκετά υψηλά επίπεδα ιικού φορτίου στο αίμα τους και έτσι δεν προσφέρουν στον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η ανάγκη της ανάπτυξης των ιών σε δύο διαφορετικά συστήματα ξενιστών επηρεάζει όχι μόνο τις ιδιότητες και την εξέλιξή τους, αλλά επίσης τις επιστημονικές προσπάθειες να ελεγχθεί η εξάπλωσή τους, αφού είναι απαραίτητο ο έλεγχός τους να γίνεται τόσο στον ανθρώπινο πληθυσμό

όσο και στους πληθυσμούς των αρθροπόδων και των ενδιάμεσων σπονδυλωτών ξενιστών.

Οι αρμποϊοί με δημοσιοϋγειονομική σημασία φαίνονται στον Πίνακα 1 .

Πίνακας 1 . Ποικιλομορφία αρμποϊών.

Οικογένεια	Γένος	Μέλη ιατρική σημασία	με Γεωγραφική Εξάπλωση	Φορέας αρθροπόδου
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Nairovirus</i>	Crimean–Congo hemorrhagic fever virus	Africa and Asia	Culicoides and ticks
	<i>Orthobunyavirus</i>	LaCrosse virus and oropouche virus	North America, Central America, South America, Africa and Asia	Mosquitoes, culicoides and ticks
	<i>Phlebovirus</i>	Rift Valley fever virus	Africa and Middle East	Sandflies, mosquitoes and ticks
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Yellow fever virus, dengue viruses 1–4, tick-borne encephalitis virus, Japanese encephalitis virus and West Nile virus	North America, Central America, South America, Caribbean, Africa, Asia, Australia, Oceania and Europe	Ticks and mosquitoes
<i>Reoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>	Colorado tick fever virus	North America and Europe	Ticks
	<i>Orbivirus</i>	Bluetongue viruses	North America, Central America, South America, Africa, Asia, Australia and Europe	Sandflies, mosquitoes, ticks and gnats
	<i>Seadornavirus</i>	Banna virus	China and	Mosquitoes

			Indonesia	
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Ephemerovirus</i>	Bovine ephemeral fever virus	Africa, Asia, Australia and Middle East	Mosquitoes and culicoides
	<i>Vesiculovirus</i>	Vesicular stomatitis viruses and chandipura virus	North America, Central America and Africa,	Sandflies and black flies
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Venezuelan equine encephalitis virus, eastern equine encephalitis virus, chikungunya virus and Ross River virus	North America, Central America, South America, Caribbean, Africa, Asia, Australia and Oceania	Mosquitoes and cliff swallow bugs

Η επιστημονική έρευνα συνεχίζεται για τα περίπου 500 είδη αρμοπιών με απώτερο στόχο τον έλεγχο της μετάδοσής τους. Εντούτοις, οι ιοί αυτοί συνεχίζουν να εμφανίζονται και να επανεμφανίζονται, δημιουργώντας μαζικές και εξαπλωμένες επιδημίες τόσο σε ανθρώπινους όσο και σε ζωικούς πληθυσμούς (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Σημαντικές επιδημίες αρμοπιών της τελευταίας δεκαετίας.

Ιός	Χρονιές εξάρσεων	Γεωγραφική κατανομή
Yellow fever virus	2007–2009	South America (Brazil, Paraguay, Argentina, Peru and Colombia)
Zika virus	2007	Federated States of Micronesia
Chikungunya virus	2004–2009	Indian Ocean (Comoros, La Reunion, Maldives and Sri Lanka), India, Southeast Asia (Malaysia, Singapore and Thailand) and Europe (Italy)
Chikungunya virus	1999–2000	Democratic Republic of the Congo
Chikungunya	2001–2003 and 2007–	Indonesia

virus	2009	
West Nile virus	2000–2009 and 2010	North America (Canada and USA), Greece
Rift Valley fever virus	2007	Kenya
Usutu virus	2001–2002	Europe (Austria)
Bluetongue viruses	1998–2008	Europe (Belgium, Bulgaria, Croatia, Denmark, France, Germany, Greece, Hungary, Luxembourg, Norway, The Netherlands, Portugal, Spain, Sweden, Switzerland, UK and Turkey)

Ο Πίνακας αυτός δεν περιέχει τις επιδημίες του Δάγγειου (Dengue) πυρετού.

Εργαστηριακή διάγνωση

Η εργαστηριακή διάγνωση βασίζεται:

1. στην ανίχνευση στον ορό των ασθενών των ειδικών αντισωμάτων έναντι διαφόρων ιών. Διάφορες μέθοδοι έχουν προταθεί όπως η αναστολή αιμοσυγκόλλησης, η σύνδεση συμπληρώματος, ο έμμεσος ανοσοφθορισμός και η ανοσοενζυμική μέθοδος. Η κλινική αξιολόγηση πρόσφατης λοίμωξης βασίζεται στην ανίχνευση των ειδικών IgM αντισωμάτων ή στην τετραπλάσια αύξηση των IgG αντισωμάτων μέσα σε 15 ημέρες.
2. στην εφαρμογή μοριακών τεχνικών για ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού τόσο σε κλινικά δείγματα νοσούντων (αίμα, ENY κλπ) όσο και φορέων (κουνουπιών)

Η γεωγραφική εξάπλωση των αρμποιών ως αποτέλεσμα σημαντικών επιδημιολογικών αλλαγών

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επιδημιολογική εξέλιξη του ιού του Δυτικού Νείλου σε συνάρτηση με την έκταση της γεωγραφικής του επέκτασης. Από την εποχή της ταυτοποίησής του το 1937^[58] μέχρι τα μισά της δεκαετίας του 1990 ο WNV θεωρούταν ένα ασήμαντο παθογόνο των ανθρώπων και των αλόγων, που προκαλούσε ήπιες εξάρσεις με εμπύρετα περιστατικά. Μέχρι τότε ο ιός είχε ευρεία εξάπλωση στην Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ανατολική Ευρώπη και περιοχές της Ασίας. Από το 1994 κι ύστερα, όμως, ο ιός αυτός έχει συνδεθεί με σημαντικές εξάρσεις και αυξανόμενης σοβαρότητας περιστατικά στο Ανατολικό ημισφαίριο (από την Αλγερία και τη Ρουμανία σε πολλές Μεσογειακές χώρες και την Ανατολική Ευρώπη). Το 1999 ο ιός πρωτοεντοπίστηκε στη Νέα Υόρκη σε μια έξαρση εγκεφαλίτιδας με περιορισμένο αριθμό θανάτων στους ανθρώπους αλλά μαζικούς θανάτους στους πληθυσμούς των πτηνών^[26]. Από τότε, και ενώ αρχικά θεωρήθηκε ότι η εξάπλωση είχε ελεγχθεί και περιοριστεί στην περιοχή της Νέας Υόρκης, ο ιός

εξαπλώθηκε σε όλες τις πολιτείες των ΗΠΑ και στον Καναδά μέσα σε λιγότερο από 10 χρόνια.

Πώς όμως συνδυαζόταν αυτή η επέκταση του ιού με την επιδείνωση της νόσου που προκαλούσε; Όλα τα στελέχη που ήταν υπεύθυνα για τις πρόσφατες επιδημίες σε ανθρώπους, άλογα και πτηνά ήταν τύπου 1. Όμως, τύπου 1 είναι και παλιότερα στελέχη από Βόρειο Αφρική και Μέση Ανατολή που δεν παρουσίαζαν ιδιαίτερη τοξικότητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι στελέχη τύπου 2 (που συλλέχθηκαν αρχικά από τη Μαδαγασκάρη και τη Νότιο Αφρική) που αρχικά δεν παρουσίαζαν ιδιαίτερη τοξικότητα, έχουν πλέον συνδεθεί με υψηλή νευροτοξικότητα (όπως είναι η περίπτωση των πρόσφατων περιστατικών της Κεντρικής Ελλάδας). Πρόσφατες μοριακές αναλύσεις έχουν καταγράψει συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε γονίδια του φακέλου του ιού που ίσως να σχετίζονται με την αυξημένη μολυσματικότητά του. Ο ρόλος των μεταλλάξεων αυτών είναι αντικείμενο εντατικής έρευνας. Παράλληλα, ο ρόλος των κουνουπιών φορέων μπορεί να είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικός. Ο κύριος φορέας του WNV έχει δείχτεί ότι είναι το κοινό κουνούπι των πόλεων το *Culex pipiens*. Στην Ευρώπη πιθανολογείται η ύπαρξη δύο συγγενικών ειδών *Culex pipiens*, εκ των οποίων το ένα είναι περισσότερο ανθρωπόφιλο και το άλλο περισσότερο ορνιθόφιλο. Αυτό έχει επιβραδύνει την εξάπλωση της νόσου στην Ευρώπη. Αντίθετα, στις ΗΠΑ το 40% του κοινού κουνουπιού είναι ένα υβρίδιο του ανθρωπόφιλου και ορνιθόφιλου υποείδους, αποτελώντας έτσι έναν αποτελεσματικότερο φορέα μετάδοσης ανάμεσα σε ανθρώπους και πτηνά, που ίσως να ευθύνεται σε ένα βαθμό για την πρόσφατη επιδημία του 1999 στη Νέα Υόρκη^[30].

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση αρμποϊών

Επιδημίες αρμποϊών θα συνεχίσουν και πιθανά θα ενταθούν τα προσεχή χρόνια για μια σειρά λόγους.

Πρώτον, οικολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να ευνοήσουν την εμφάνιση επιδημιών. Έχει εκτιμηθεί ότι μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει σε επίσπευση του κύκλου του ιού και στην αύξηση του ιικού φορτίου στους ενδιάμεσους φορείς. Επίσης, ακραίες καιρικές συνθήκες μπορεί να έχουν απρόβλεπτες συνέπειες. Στην Κένυα, για παράδειγμα, η επιδημία του ιού *Chikungunya* το 2004 συνδυάστηκε με περίοδο ιδιαίτερης ξηρασίας στην περιοχή. Αυτό ήταν ιδιαίτερα αξιοπερίεργο, αφού τα κουνούπια-φορείς της νόσου ευδοκίμούν σε υγρότερα περιβάλλοντα. Αποδείχτηκε, όμως, ότι κατά τη διάρκεια της ξηρασίας οι κάτοικοι των περιοχών αυτών συνέλεγαν νερό σε δοχεία που κρατούσαν κοντύτερα στα σπίτια τους, με αποτέλεσμα τα κουνούπια να αναπαράγονται αποτελεσματικότερα στα δοχεία αυτά σε μεγάλη γειτνίαση με τους ανθρώπινους πληθυσμούς^[50-54].

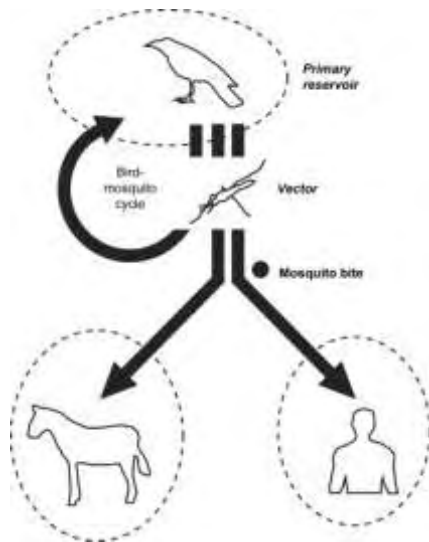
Δεύτερον, οι γρήγορες και ως επί το πλείστον ανεξέλεγκτες μετακινήσεις τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων σε παγκόσμιο επίπεδο θα μεταφέρουν αναπόφευκτα είτε τους ιούς είτε/και τους φορείς τους σε περιοχές που μέχρι πρότινος ήταν παρθένες από αυτά. Σε συνδυασμό, μάλιστα, με το πιθανότερο ενδεχόμενο το ανοσοποιητικό σύστημα των ανθρώπων και των άλλων ζωικών

πληθυσμών της περιοχής να μην έχει αντισώματα στους νέους παράγοντες, μπορεί να έχει εξαιρετικά δραματικές συνέπειες^[43-49].

Τέλος, το γενετικό υλικό των ιών έχει αποδειχτεί ότι έχει ήδη υποστεί μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την αύξηση της τοξικότητας των ιών αυτών. Οι αρμοιοί είναι *RNA* ιοί που δεν έχουν επιδιορθωτικούς μηχανισμούς κατά τη διαδικασία της αντιγραφής τους. Το αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση μεταλλάξεων που μπορούν να επηρεάσουν τη μολυσματικότητά τους, την επιδημιολογία τους, αλλά και την ικανότητα των φορέων τους να τους μεταδώσουν. Σημιακές μεταλλάξεις, για παράδειγμα, στον ιό Chikungunya (ο οποίος φυσιολογικά μεταδίδεται από τα κουνούπια του είδους *Aedes aegypti*) είχε σαν αποτέλεσμα την προσαρμογή του σε ένα συγγενικό είδος κουνουπιού-φορέα (*Aedes albopictus*), που αποδείχτηκε ότι ήταν υπεύθυνος για την επιδημία του La Reunion το 2006^[55-57].

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ ΙΟ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

Ο Ιός του Δυτικού Νείλου αποτελεί ένα από τα 500 διαφορετικά είδη αρμποϊών και ανήκει στην οικογένεια *Flaviviridae*, το γένος *Flavivirus*^[42]. Όπως συμβαίνει στο σύνολο των αρμποϊών, έτσι και ο WNV μεταδίδεται μέσω αιματοφάγων αρθρόποδων (κουνούπια, κρότωνες), συμμετέχοντας έτσι σε ένα ζωονοτικό κύκλο που περιλαμβάνει ένα πρωτογενή μη ανθρώπινο σπονδυλωτό ξενιστή και ένα πρωτογενή φορέα αρθρόποδο^[18,29,22]. Οι άνθρωποι και τα οικιακά ζώα δεν αναπτύσσουν ιικό φορτίο ικανό να προσφέρει στον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού. Ωστόσο, τα συμπτώματα που εμφανίζουν μετά από μόλυνση μπορεί να έχουν σοβαρές συνέπειες στην υγεία τους (όπως μηνιγγίτιδα, εγκεφαλοπάθεια και αιμορραγικό πυρετό), καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη ελέγχου της πορείας/κατανομής του ιού^[18,29,22].

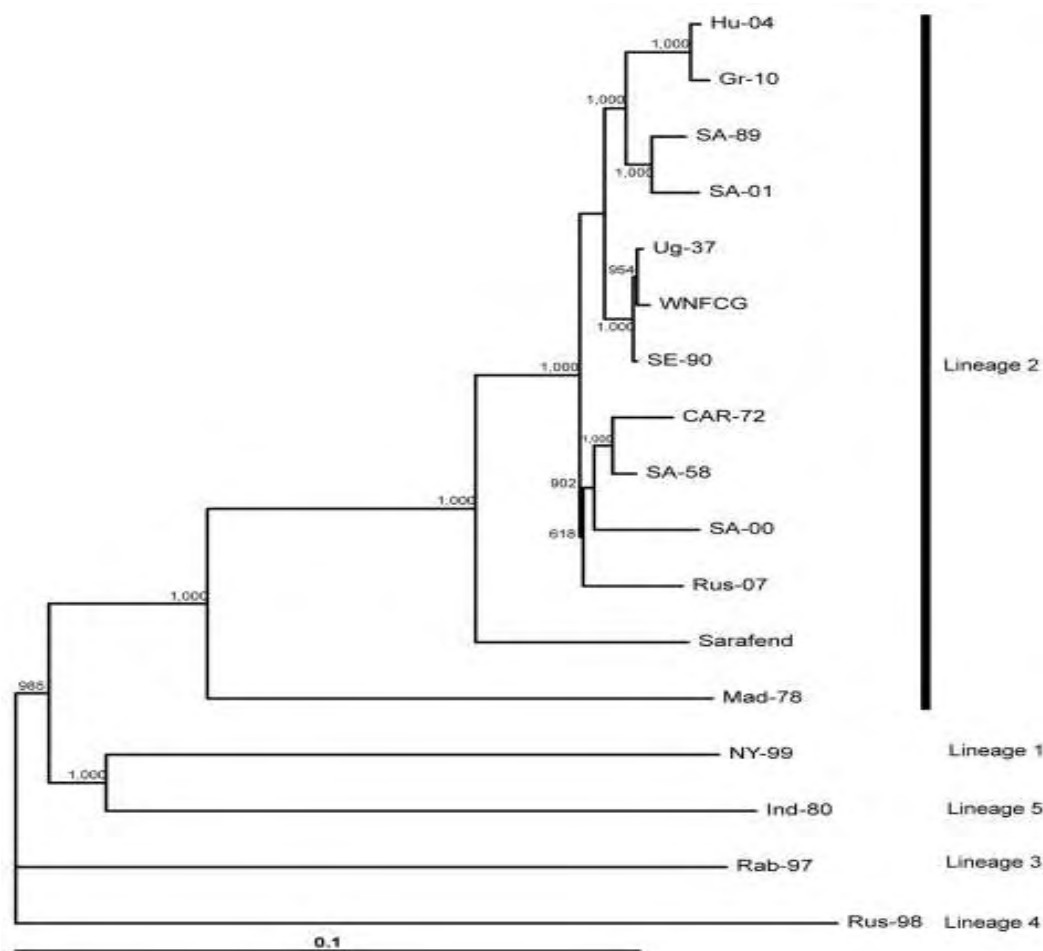


Εικόνα 1: Παράσταση του κύκλου αναπαραγωγής του Ιού του Δυτικού Νείλου^[25].

Ταξινόμηση

Τα στελέχη του ιού ταξινομούνται σε τουλάχιστον επτά γενετικές σειρές^[15]. Αυτά της σειράς 1 είναι τα περισσότερο διαδεδομένα και απαντώνται σε Αφρική, Ευρώπη, Αυστραλία, Ασία και Αμερική, ενώ τα στελέχη της σειράς 2 κατανέμονται κυρίως στην υπο-Σαχάρια Αφρική και τη Μαδαγασκάρη. Τα στελέχη της σειράς 3 ("Rabensburg Virus") διαδίδονται από συγκεκριμένα είδη των κουνουπιών *Culex* και *Aedes* στη νότια Μοραβία, στην Τσεχία και στα σύνορα της Αυστρίας χωρίς όμως να προκαλείται παθογένεση στα θηλαστικά. Το στέλεχος LEIV-Krns88-190, το οποίο έχει απομονωθεί από κρότωνες *Dermacentor Marginatus* στην περιοχή του Καυκάσου, εκπροσωπεί τη σειρά 4. Η σειρά 5 περιλαμβάνει το Ινδικό στέλεχος (παλαιότερα ανήκε στον κλάδο 1c), ενώ για τη σειρά 6 έχει προταθεί το στέλεχος Sarawak Kunjin, το οποίο διακρίνεται από τους υπόλοιπους ιούς Kunjin. Επιπλέον, μια έβδομη σειρά έχει προταθεί για τον Αφρικανικής προέλευσης ιό Koutango και

τέλος μια όγδοη σειρά για στέλεχος που απομονώθηκε στη Νότια Ισπανία από κουνούπια *Cx. pipiens* το καλοκαίρι του 2012 ^[15]. (βλ. Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Φυλόγραμμα βασισμένο σε πλήρεις γονιδιωματικές αλληλουχίες επιλεγμένων WNV στελεχών. Συντομογραφίες των στελεχών (πηγή απομόνωσης, χώρα, έτος, αριθμός πρόσβασης στο GenBank): Hu-04: *Accipiter gentilis*, Hungary, 2004, [DQ116961](#); Gr-10: *Culex pipiens*, Greece, 2010, [HQ537483](#); SA-89: human, South Africa, 1989, [EF429197](#); SA-01: human, South Africa, 2001, [EF429198](#); Ug-37: human, Uganda, 1937, [AY532665](#); WNFCG: derivate of Ug-37, [M12294](#); SE-90: *Mimomyia lacustris*, Senegal, 1990, [DQ318019](#); CAR-72: *Cx. tigripes*, Central African Republic, 1972, [DQ318020](#); SA-58: human, South Africa, 1958, [EF429200](#); SA-00: human, South Africa, 2000, [EF429199](#); Rus-07: human, Russia, 2007, [FJ425721](#); Sarafend: derivate of Ug-37, [AY688948](#); Mad-78: *Coracopsis vasa*, Madagascar, 1978, [DQ176636](#); NY-99: human, USA, 1999, [AF202541](#); Ind-80: human, India, 1980, [DQ256476](#); Rab-97: *Cx. pipiens*, Czech Republic, 1997, [AY765264](#); Rus-98: *Dermacentor marginatus*, Russia, 1998, [AY277251](#). Παρατίθενται αυτοδύναμες τιμές 1000 αντιγράφων. Οι κύριες γενετικές σειρές φαίνονται στα δεξιά. Η οριζόντια μπάρα δείχνει τη γενετική απόσταση^[15].

Γεωγραφική εξάπλωση

Η ιδιότητα του ιού να προσβάλλει τα πτηνά, πολλά εκ των οποίων είναι μεταναστευτικά, σε συνδυασμό με την απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών του ιού που έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση μεταλλάξεων, καθιστούν την παρακολούθηση της πορείας του ιδιαίτερως σημαντική για την πρόβλεψη και πρόληψη εμφάνισης νέων επιδημιών. Ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1937 στην Uganda^[11] ενώ νέα στελέχη απομονώθηκαν και τη δεκαετία του '50 τόσο στην Αίγυπτο όσο και στη Σενεγάλη. Ωστόσο, έως και τα μέσα της δεκαετίας του '90, ο WNV θεωρούνταν ένα ασήμαντο παθογόνο των ανθρώπων και των αλόγων

που προκαλούσε ήπιες εξάρσεις με εμπύρετα περιστατικά. Από το 1994 και ύστερα, όμως, ο ιός αυτός έχει συνδεθεί με σημαντικές εξάρσεις και αυξανόμενης σοβαρότητας περιστατικά στο Ανατολικό ημισφαίριο.

Το 1999 ο ιός πρωτοεντοπίστηκε στη Νέα Υόρκη σε μια έξαρση εγκεφαλίτιδας με περιορισμένο αριθμό θανάτων στους ανθρώπους, αλλά μαζικούς θανάτους σε πληθυσμούς πτηνών. Σύγκριση μεταξύ των πρώτων στελεχών του WNV που απομονώθηκαν στην περιοχή της Νέας Υόρκης και αυτών του Παλαιού Κόσμου κατέδειξε τη στενή σχέση του Αμερικανικού ιού με στελέχη που απομονώθηκαν στο Ισραήλ το 1998 (lineage 1). Πιθανολογείται ότι ο ιός εισήχθη είτε από κάποιον μολυσμένο ταξιδιώτη ή μέσω της μεταφοράς μολυσμένων κουνουπιών και πουλιών από τη Μέση Ανατολή. Από τότε ο ιός εξαπλώθηκε σε όλες τις πολιτείες των Η.Π.Α., τον Καναδά, αλλά και άλλες χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής^[9].

Σε αντίθεση με την Αμερική, η παρουσία του WNV στην Κεντρική Ευρώπη είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια^[11]. Στελέχη του ιού έχουν απομονωθεί από κουνούπια, ανθρώπους, μεταναστευτικά πτηνά και τρωκτικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών. Ωστόσο, έως και το 2003, δεν υπήρχε κανένας συσχετισμός ανάμεσα στην ύπαρξη του ιού και την εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων παρά την έξαρση του ιού στη Ρουμανία τα έτη 1996-1997 όπου καταγράφηκαν περιστατικά εγκεφαλίτιδας σε ανθρώπους. Το 2003 ο WNV ήταν υπεύθυνος για την έξαρση εγκεφαλίτιδας που προκλήθηκε σε κοπάδι από χήνες στην Ουγγαρία. Τα ποσοστά θνησιμότητας έφτασαν το 14% ανάμεσα σε χήνες ηλικίας έξι εβδομάδων ενώ την ίδια χρονιά παρατηρήθηκαν και κρούσματα σε 14 ανθρώπους με ήπια συμπτώματα εγκεφαλίτιδας και μηνιγγίτιδας. Ένα χρόνο αργότερα, τον Αύγουστο του 2004, ένα γεράκι νεοσσός (*Accipiter gentilis*) εμφάνισε συμπτώματα του ΚΝΣ και τελικά πέθανε σε εθνικό πάρκο της νότιο-ανατολικής Ουγγαρίας. Όταν χρησιμοποιήθηκαν ιστοπαθολογικές μέθοδοι και RT-PCR, βρέθηκαν τόσο ιικά αντιγόνα όσο και νουκλεϊκά οξέα του ιού στα όργανα του πουλιού^[11].

Οι πιο πρώιμοι εκπρόσωποι της ομάδας που περιλαμβάνει στελέχη από Ισραήλ/Η.Π.Α./Ουγγαρία/03 αναφέρθηκαν από την ομάδα του Malkinson M. και προήλθαν από νοσούντες και νεκρούς λευκούς πελεκάνους στο Ισραήλ το 1998. Ωστόσο, αυτοί οι πελεκάνοι είχαν εκκολληθεί στην Κεντρική Ευρώπη και κατά τη διάρκεια της φθινοπωρινής μεταναστευτικής περιόδου προς το νότο, ισχυροί άνεμοι τους άλλαξαν την πορεία προς το Ισραήλ. Οι υδροβιότοποι της Νοτιοανατολικής Ουγγαρίας αποτελούν το φυσιολογικό ενδιαίτημα αυτών των πελεκάνων όπου τρέφονται και φωλιάζουν, συνεπώς είναι αρκετά πιθανό ο WNV να εισήχθη στο Ισραήλ από εκεί. Επιπλέον, η φάρμα με τις χήνες όπου συνέβη και η έξαρση των κρουσμάτων το 2003 βρίσκεται στην ίδια περιοχή. Αυτά τα γεγονότα, σε συνδυασμό με την στενή φυλογενετική σχέση των στελεχών από Η.Π.Α./Ισραήλ/Ουγγαρία προτείνουν την μετέπειτα μετανάστευση του ιού από το Ισραήλ στη Νέα Υόρκη^[11].

Σε ό,τι αφορά το στέλεχος της σειράς 2 που απομονώθηκε από γεράκια της ίδιας περιοχής στην Ουγγαρία το 2004, το πιθανότερο σενάριο περιλαμβάνει την εισαγωγή του μέσω μεταναστευτικών πουλιών από την Νότιο Αφρική. Τα γεράκια δεν μεταναστεύουν οπότε ο ιός θα πρέπει να μεταφέρθηκε από πουλιά που ξεχειμώνιασαν στην Κεντρική Αφρική και εν συνεχεία μετέφεραν τον ιό στους υδροβιότοπους της Ουγγαρίας όπου ο ντόπιος πληθυσμός κουνουπιών προσαρμόστηκε στο να φέρει τον ιό^[11].

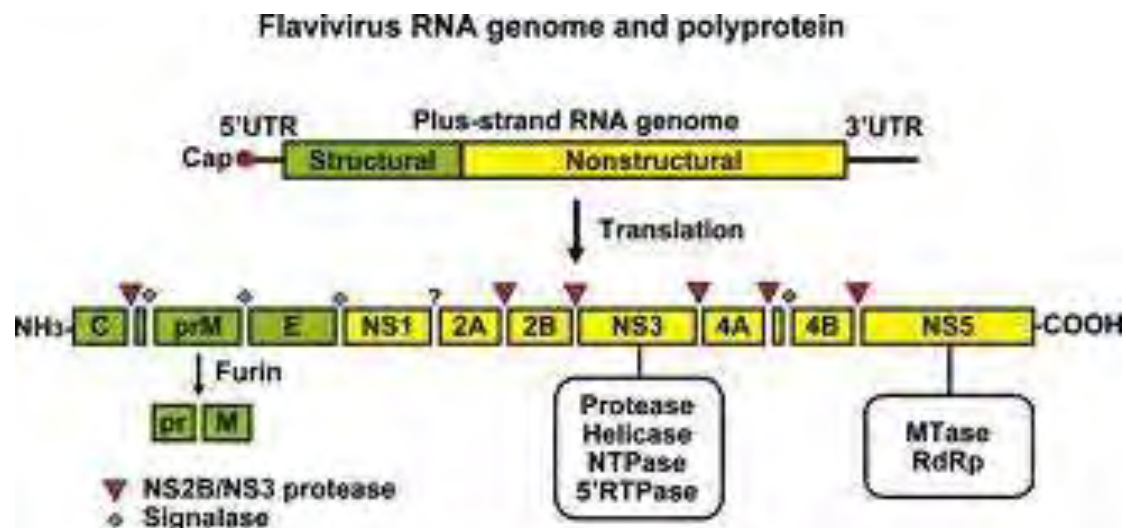
Ιική εξέλιξη και προσαρμογή

Οι RNA ιοί έχουν την εκπληκτική ικανότητα να προσαρμόζονται σε μεταβολές του περιβάλλοντος εξαιτίας του υψηλού ρυθμού μεταλλαγμένης που εμφανίζουν^[34]. Επιδημίες οφειλόμενες στον WNV αλλά και σε άλλους RNA ιούς έχουν προκληθεί από μικρές γονιδιωματικές αλλαγές, ικανές να αυξήσουν την ικανότητα μετάδοσης του ιού από τα κουνούπια φορείς. Στην περίπτωση του WNV, η υποκατάσταση ενός αμινοξέος είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ικανότητα μετάδοσης του ιού στα πρώιμα στάδια μετά την λήψη μολυσμένου αίματος. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής για τον WNV έχουν δείξει ότι ο ιός εμφανίζει μεγάλη γενετική ποικιλομορφία εντός των φορέων και ότι αυτό το φαινόμενο είναι πιο έντονο σε πληθυσμούς κουνουπιών από ότι στα πτηνά^[32,34].

Η μόλυνση από WNV στα κουνούπια είναι χρόνια, ενώ η μόλυνση στα πτηνά είναι οξεία και είτε i) αντιμετωπίζεται στην αρχή της ανοσολογικής απόκρισης ή ii) τερματίζεται λόγω θανάτωσης. Επιπλέον, η μόλυνση στα ασπόνδυλα αντιμετωπίζεται από μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (RNAi). Η αποσιώπηση μέσω RNAi παρεμβολής οφείλεται στις πολύπλοκες δευτεροταγείς δομές του γονιδιώματος των RNA ιών, που σχηματίζουν dsRNA ενδιάμεσα κατά την αντιγραφή. Έχει αποδειχθεί ότι οι περιοχές που είναι πιο συχνά στόχοι των viRNA (virus-derived small interfering RNAs) εμφανίζουν μεγαλύτερους ρυθμούς μεταλλαγμένης σε μια προσπάθεια του ιού να αποφύγει την αποικοδόμηση. Συνεπώς, τα μεταλλαγμένα γονιδιώματα επιλέγονται έναντι του άγριου τύπου επειδή είναι λιγότερο επιρρεπή στην αποικοδόμηση από το σύμπλοκο RISC^[32,34].

Δομή του ιού

Τα ισωμάτια των Φλαβοϊών έχουν σφαιρικό σχήμα, με διάμετρο περίπου 50nm. Το νουκλεοκαψίδιο έχει διάμετρο 30nm, αποτελείται από καψιδιακό και γενωμικό RNA και περιβάλλεται από διπλό λιπιδικό στρώμα στο οποίο εσωκλείονται ο ιικός φάκελος και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το γονιδίωμα των Φλαβοϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA μήκους ~11Kb με θετική πολικότητα (βλ. Εικόνα 3).



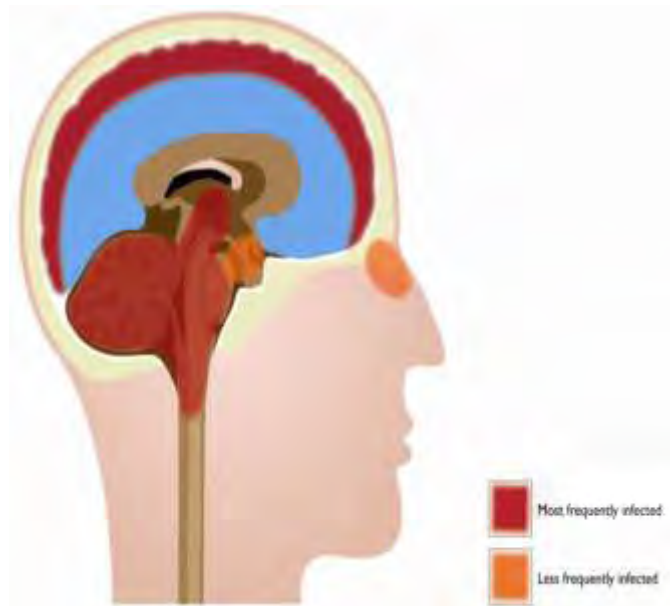
Εικόνα 3: Δομή του γονιδιώματος Φλαβοϊών^[33].

Και τα δύο άκρα του γενωμικού RNA περιέχουν αμετάφραστες περιοχές (UTR), γνωστές ως 5' και 3'-UTR. Το γονιδιωματικό RNA των Φλαβοϊών περιέχει ένα

μακρύ ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο (ORF). Η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη μεταφράζεται - και δέχεται τροποποιήσεις τόσο κατά τη μετάφραση όσο και μετα-μεταφραστικά από ιικές και κυτταρικές πρωτεάσες - σε τρεις δομικές (καψιδίου [C], προμεμβρανική [prM]/μεμβρανική [M], φακέλου [E]) και επτά μη δομικές πρωτεΐνες (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Όλες οι πρωτεΐνες NS φαίνεται πως συμμετέχουν στην ιική σύνθεση του RNA είτε άμεσα είτε έμμεσα. Ανάμεσα τους, η NS3 δρα ως: πρωτεάση σερίνης (μαζί με τον συμπαραγόνο NS2b), 5'-RNA τριφωσφατάση, νουκλεοτιδική τριφωσφατάση και ελικάση. Η NS5 δρα ως μεθυλοτρανσφεράση και RNA -εξαρτώμενη RNA πολυμεράση^[18,21,20].

Κύκλος ζωής του ιού

Μετά την έγχυση από το έντομο φορέα, ο ιός πιστεύεται πως μολύνει τα κερατινοκύτταρα του δέρματος καθώς και τα κύτταρα Langerhans τα οποία μεταφέρουν τον ιό στους λεμφαδένες όπου λαμβάνει χώρα η πρώτη φάση αντιγραφής του ιού. Εν συνεχεία, ο WNV μεταφέρεται σε περιφερειακά όργανα, όπως είναι το συκώτι και η σπλήνα, όπου ξεκινά η δεύτερη φάση αντιγραφής, σε επιθηλιακά και μακροφάγα κύτταρα αντιστοίχως. Μετά από περίοδο μιας εβδομάδας ο ιός εισέρχεται στο ΚΝΣ και την ίδια στιγμή παύει η παρουσία του στον ορό. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για τον τρόπο με τον οποίο ο ιός διασχίζει τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, όπως είναι η αύξηση της διαπερατότητας του φραγμού λόγω μιας τοπικής παραγωγής TNF- α , η διάρρηξη του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού ή η άμεση αξονική μεταφορά του ιού μέσω των περιφερειακών νευρώνων (βλ. Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Συχνότητα μόλυνσης διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου από τον WNV. Οι περιοχές που στοχεύονται με μεγαλύτερη συχνότητα είναι: ο εγκεφαλικός φλοιός, ο θάλαμος, τα βασικά γάγγλια, το εγκεφαλικό στέλεχος, η παρεγκεφαλίδα και ο νωτιαίος μυελός (πρόσθιο κέρατο) και δηλώνονται με σκούρο κόκκινο χρώμα. Η μόλυνση του οσφρητικού βολβού και του ιππόκαμπου είναι λιγότερο συχνές και δηλώνονται με το πορτοκαλί χρώμα^[29].

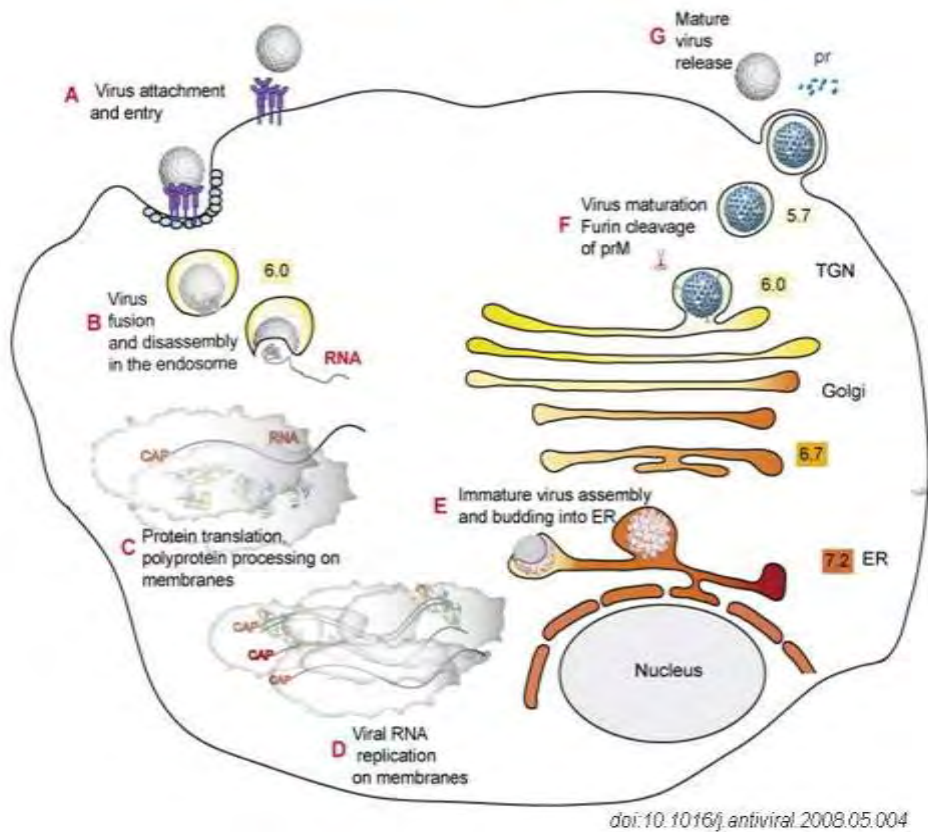
Ο WNV αλληλεπιδρά με επιφανειακές λεκτίνες (C-type λεκτίνες DC-SIGN και DC-SIGNR) που είναι παρούσες σε κάποια δένδριτικά κύτταρα και μακροφάγα, υποδηλώνοντας έτσι ότι αυτά τα μόρια λειτουργούν σαν υποδοχείς πρόσδεσης του ιού. Τα δύο αυτά μόρια έχουν εντοπιστεί σε μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, συνεπώς θα μπορούσαν να συμμετέχουν στη διάδοση του ιού στο ΚΝΣ. Επιπροσθέτως, η ιντεγρίνη ανβ₃ βρέθηκε να διαμεσολαβεί στην είσοδο του WNV, ωστόσο ο ιός μπορεί να μολύνει τα κύτταρα και απουσία της.

Μετά την πρόσδεση στην κυτταρική επιφάνεια, ο WNV εισέρχεται στα κύτταρα με ενδοκυττάρωση. Στα ενδοσώματα, η πρωτεΐνη E υφίσταται σημαντικές δομικές μετατροπές που οδηγούν στην έκθεση ενός συγκεκριμένου τμήματος της E (του πεπτιδίου σύντηξης) και στην είσοδο του στη μεμβράνη του ξενιστή. Μετά τη σύντηξη των μεμβρανών, το καψίδιο και επακολούθως το ιικό RNA απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και ξεκινά η σύνθεση της πολυπρωτεΐνης.

Οι Φλαβοϊοί προκαλούν δραματικές μεταβολές στη μορφολογία των ενδοκυτταρικών μεμβρανών. Οι ιικές πρωτεΐνες και το RNA συσσωρεύονται σε δομές που ονομάζονται αντιγραφικά συγκροτήματα (RCs) και περιβάλλονται από μεμβράνες του ξενιστή. Η πρωτεΐνη NS4A διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία καθώς η έκφραση της πρωτεΐνης απουσία φλαβοϊικής μόλυνσης επάγει παρόμοιες μεμβρανικές αναδιατάξεις. Η ιική αντιγραφική μηχανή περιβάλλεται από τις μεμβράνες του ξενιστή που διαχωρίστηκαν στο πρώιμο στάδιο του εκκριτικού μονοπατιού και τα αντιγραφικά συγκροτήματα εδρεύουν σε εγκοιλώσεις του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Μικρά κανάλια ή πόροι ρυθμίζουν την ελεύθερη πρόσβαση της αντιγραφικής μηχανής στο κυτταρόπλασμα, καθιστώντας δυνατή την ανταλλαγή RNA και νουκλεοτιδίων. Το RNA που εντοπίζεται στα αντιγραφικά συγκροτήματα είναι κυρίως δίκλωνο. Μιας και το dsRNA είναι ένα ενδιάμεσο στάδιο κατά την αντιγραφή του RNA των Φλαβοϊών, υποδεικνύεται ότι η σύνθεση του RNA λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά σύμπλοκα. Επιπροσθέτως, αυτό το εύρημα υποδηλώνει το ρόλο του μεμβρανικού περιβλήματος στην προστασία του dsRNA από κυτταροπλασματικά μόρια του ξενιστή που στοχεύουν dsRNA. Συνεπώς, η ενδογενής αντι-ιική απόκριση αναστέλλεται.

Το νεοσυντιθέμενο RNA αλληλεπιδρά με την C πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζεται το νουκλεοκαψίδιο, το οποίο στη συνέχεια βλαστάνει στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Κατά τη διάρκεια της εκβλάστησης, οι δομικές πρωτεΐνες E και prM, που είναι παρούσες ως ετεροδιμερή στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, σχηματίζουν το φάκελο γύρω από το καψίδιο. Στη συνέχεια τα βίρια μεταφέρονται κατά μήκος του εκκριτικού μονοπατιού όπου λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του ιού. Ρόλο κλειδί στη διαδικασία παίζει η διαμεσολάβηση της φουρίνης στη διάσπαση της πρωτεΐνης prM σε pr και M που οδηγεί στην απομάκρυνση του pr θραύσματος. Επακολούθως, τα M και E ετεροδιμερή διαχωρίζονται, η πρωτεΐνη σχηματίζει ομοδιμερή και τα ώριμα βίρια εξέρχονται του κυττάρου^[29].

The Flavivirus Life Cycle



Εικόνα 5: Κύκλος ζωής των Φλαβοϊών.

ΑΝΟΣΟΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΤΟΝ WNV

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών είναι καλά προετοιμασμένο έναντι των ιικών λοιμώξεων. Όπως έχει αποδειχθεί από μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια-μοντέλα τόσο οι εγγενείς όσο και οι χυμικές και κυτταρικές ανοσοαπαντήσεις συμβάλλουν στην άμυνα του οργανισμού ενάντια στον WNV.

Φυσική ανοσία

Ειδικά στην περίπτωση των πρωτογενών λοιμώξεων, η φυσική ανοσία παίζει σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο του WNV. Σαν άμυνα πρώτης γραμμής, τα κύτταρα του ξενιστή αντιλαμβάνονται την παρουσία του ιού μέσω υποδοχέων αναγνώρισης παθογόνων (PRRs) και στη συνέχεια ενεργοποιούν πρωτεΐνες τελεστές που προσβάλλουν διάφορους μηχανισμούς της ιικής αντιγραφικής μηχανής. Οι PRRs είναι πρωτεΐνες όπως οι υποδοχείς TLR (toll-like receptor), οι οποίες αναγνωρίζουν ειδικές για τον ιό δομές όπως το dsRNA. Μετά τη δέσμευση τους στους προσδέτες στόχους, οι PRR εκκινούν την αντι-ιική απόκριση επάγοντας τις ιντερφερόνες τάξης I (IFN- α και IFN- β) μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι ιντερφερόνες τάξης I εκκρίνονται και προσδένονται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας μέσω του αυτοκρινούς ή παρακρινούς μονοπατιού, ενεργοποιώντας το μονοπάτι JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) το οποίο οδηγεί στην μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων ISG (interferon-stimulated genes), συμπεριλαμβανομένων και αρκετών αντι-ιικών μορίων τελεστών.

Μια ισχυρή και γρήγορη απόκριση των IFN-I έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητη για τον επιτυχή έλεγχο του WNV. Οι PRR που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και διατήρηση της IFN-I απόκρισης είναι οι RIG-1 και MDA-5. Και οι δύο πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από την παρουσία ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα και επάγουν την παραγωγή IFN-I μέσω σηματοδοτικών καταρρακτών. Μετά την ενεργοποίηση των RIG-1 και MDA-5, η σηματοδότηση λαμβάνει χώρα με τη συμβολή του μορίου-προσαρμοστή IPS-1, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων IRF-3 και IRF-7. Αυτές οι πρωτεΐνες διαμεσολαβούν στη μεταγραφή των IFN-I γονιδίων, αν και η συμβολή τους εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο.

Η έλλειψη του IPS-1 οδηγεί σε ανεξέλεγκτη φλεγμονώδη απόκριση. Ποντίκια με ανεπάρκεια σε IPS-1 εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή μη-εξουδετερωτικών αντισωμάτων, αυξημένο αριθμό CD8⁺ T κυττάρων ειδικών για τον ιό και εξαπλούμενες μη ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Επιπροσθέτως, ο WNV εισδύει στο ΚΝΣ νωρίτερα και αντιγράφεται πιο αποτελεσματικά οδηγώντας σε αυξημένους ρυθμούς θνησιμότητας εν συγκρίσει με την απόδοση που έχει σε ποντίκια άγριου τύπου. Συνεπώς, το μόριο IPS-1 παίζει σημαντικό ρόλο στο συντονισμό των ανοσολογικών αποκρίσεων έναντι του WNV.

Μια άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στις αντι-ιικές αποκρίσεις είναι η κασπάση-12. Πρόκειται για μια πρωτεάση με λειτουργία σε αποπτωτικά και φλεγμονώδη σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχει βρεθεί ότι η κασπάση-12 ρυθμίζει την ουβικουιτινίωση της RIG-1 μέσω της E3 λιγάσης ουβικουιτίνης TRIM25, η οποία είναι σημαντική στην εκκίνηση περαιτέρω αντι-ιικών σημάτων. Ποντίκια με έλλειψη της κασπάσης-12 είναι περισσότερο επιρρεπή σε μολύνσεις από WNV και εμφανίζουν αυξημένο ιικό φορτίο στο ΚΝΣ.

Πέραν των RIG-1 και MDA-5, έχει βρεθεί ότι και οι TLR-3 και TLR-7 εμπλέκονται στον αμυντικό μηχανισμό έναντι του WNV. Και οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και στα ενδοσώματα. Η TLR-3 εντοπίζει το dsRNA και ενεργοποιεί τους παράγοντες IRF-3/IRF-7 μέσω του μορίου προσαρμοστή TRIF. Ο ρόλος της στην προστασία κατά του WNV φαίνεται να είναι επικρατέστερος στον εγκέφαλο αλλά δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Η TLR-7 αναγνωρίζει ssRNA πλούσια σε ουριδίνη και γουανοσίνη. Με τη συμμετοχή του μορίου-προσαρμοστή MyD88 παίζει σημαντικό ρόλο στη στράτευση λευκοκυττάρων στην εστία της μόλυνσης. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται από την παρουσία της κυτοκίνης IL-23. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της IFN-I στο αίμα βρίσκονται αυξημένα μετά από μόλυνση απουσία της TLR-7 υποστηρίζει την άποψη ότι διάφορες διακριτές PRRs συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού σε σχετικά πλεονάζοντα αριθμό.

Αρκετές αντι-ιικές πρωτεΐνες τελεστές των οποίων η δράση επάγεται από ιντερφερόνες έχουν αναλυθεί για το ρόλο που διαδραματίζουν στις μολύνσεις από τον WNV. Τόσο η πρωτεϊνική κινάση (Pkr) που ενεργοποιείται παρουσία dsRNA όσο και η RNAaseL/2',5'-συνθετάση ολιγοαδενυλικών (OAS) εμποδίζουν άμεσα την αντιγραφή παρεμβαίνοντας στην ιική και κυτταρική μετάφραση. Ποντίκια από τα οποία απουσιάζουν αυτές οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν μεγαλύτερη ευπάθεια στον ιό από ότι τα ζώα άγριου τύπου. Επιπλέον, οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο OAS1 σχετίζονται με την ευαισθησία τόσο των ανθρώπων όσο και των αλόγων στον WNV.

Τα φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα είναι εξειδικευμένα στην αναγνώριση και θανάτωση των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιούς. Δρουν αναγνωρίζοντας την πρωτεΐνη E του WNV μέσω του μορίου υποδοχέα NKp44, το οποίο είναι παρόν μόνο στα ενεργοποιημένα NK κύτταρα και συμμετέχει στην πυροδότηση της κυτταρολυτικής δραστηριότητάς τους. Ωστόσο, η μόλυνση από τον WNV οδηγεί σε αύξηση των MHC class I μορίων με αποτέλεσμα την αναστολή της κινητοποίησης των NK κυττάρων. Αντιθέτως, η αύξηση των MHC class I μορίων στην κυτταρική επιφάνεια οδηγεί στη αυξημένη αναγνωρισιμότητα των μολυσμένων κυττάρων από τα CD8+ T κύτταρα σε μετέπειτα στάδια της λοίμωξης. Απ' ότι φαίνεται ο WNV αντιμετωπίζει τη δράση των NK κυττάρων στα πρώιμα στάδια της μόλυνσης με αντίτιμο την αυξημένη ευαισθησία του στα κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTL) αργότερα. Αυτό δηλώνει την ανάγκη του WNV για αποτελεσματική αποφυγή των εγγενών μηχανισμών του ανοσοποιητικού με σκοπό την επίτευξη υψηλής βιραιμίας, ικανής για τη μετάδοση του ιού στο κουνούπι-φορέα.

Άλλο ένα σημαντικό συστατικό της εγγενούς απόκρισης του ανοσοποιητικού έναντι του WNV είναι το σύστημα του συμπληρώματος, το οποίο παίζει σπουδαίο ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας και αποτελεί μηχανισμό εκκαθάρισης τόσο για την φυσική όσο και για την επίκτητη ανοσία. Αποτελείται από πολλές διακριτές πρωτεΐνες με πρωτεολυτική δράση και η ενεργοποίηση του περιλαμβάνει τη διαδοχική ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών σαν ένα είδος ενζυμικού καταρράκτη. Ο καταρράκτης του συμπληρώματος μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω τριών διαφορετικών οδών. Η κλασσική οδός περιλαμβάνει τη δέσμευση της πρωτεΐνης του συμπληρώματος C1q σε συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος ή στην επιφάνεια του παθογόνου παράγοντα. Η οδός των λεκτινών ενεργοποιείται όταν μια πρωτεΐνη του πλάσματος, η λεκτίνη που συνδέεται με τημαννόζη, συνδεθεί με τελικά μόρια μαννόζης των γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των μικροοργανισμών. Η εναλλακτική οδός ξεκινά με την αυθόρμητη πρωτεόλυση της πρωτεΐνης C3 του συμπληρώματος. Το μείζον πρωτεολυτικό κλάσμα C3b που προκύπτει συνδέεται ομοιοπολικά με μικροοργανισμούς και είναι ικανό να διαμεσολαβήσει για την καταστροφή τους. Ποντίκια ανεπαρκή σε C1q, C3 ή άλλα συστατικά του συμπληρώματος επιδεικνύουν αυξημένο ιικό φορτίο στο ΚΝΣ καθώς και αυξημένη θνησιμότητα^[18].

Χυμική απόκριση

Διάφορα ευρήματα υπογραμμίζουν την σημασία των αντισωμάτων στον έλεγχο του WNV. Ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη B αντισωμάτων πεθαίνουν μετά από μόλυνση από τον ιό αλλά προστατεύονται μετά από παθητική μεταφορά IgG. Παρομοίως, ποντίκια με ανεπάρκεια IgM πεθαίνουν γρήγορα μετά από μόλυνση δηλώνοντας την ανάγκη για IgM αντισώματα. Η χυμική απόκριση σε μια πρωτογενή μόλυνση από τον ιό χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση IgM αντισωμάτων σε πρώιμο στάδιο. Η IgM απάντηση συμβαδίζει με την εκκαθάριση της βιραιμίας στον ορό. Αντιθέτως, τα IgG εμφανίζονται αργότερα (περίπου μετά από μια εβδομάδα), όταν η βιραιμία στον ορό έχει τελειώσει και ο ιός έχει περάσει στο ΚΝΣ.

Τα αντισώματα στοχεύουν κυρίως την πρωτεΐνη E. Η E πρωτεΐνη περιλαμβάνει τρεις διακριτές δομικές περιοχές, τις DI, DII και DIII, οι οποίες συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του ιικού σωματίου, στην σύντηξη των μεμβρανών και την πρόσδεση στους υποδοχείς αντιστοίχως. Όλες οι περιοχές περιέχουν επιτόπους για

αντισώματα, αλλά η DIII αποσπά τις περισσότερες απαντήσεις. Ωστόσο, στις ανθρώπινες λοιμώξεις, τα περισσότερα αντισώματα που παράγονται ενάντια στην Ε πρωτεΐνη έχουν μειωμένη ή και απύσχα εξουδετερωτική δράση και στοχεύουν την περιοχή DII. Η παρουσία μη εξουδετερωτικών αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ενίσχυση της λοίμωξης. Το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα όταν ιοί δεσμευμένοι σε μη εξουδετερωτικά αντισώματα εισέρχονται σε νέα κύτταρα μέσω των υποδοχέων Fcγ που εδράζονται στην κυτταρική επιφάνεια. Η οψωνίνη του συμπληρώματος C1q είναι ικανή να επάγει αυτό το φαινόμενο μέσω της πρόσδεσης της σε ειδικές αντι-WNV IgG υποκατηγορίες. Η C1q μειώνει τον αριθμό των αντισωμάτων που δεσμεύονται στο ιικό σωματίο εξουδετερώνοντας έτσι τη δραστηριότητά του.

Εκτός από την πρωτεΐνη Ε, τόσο η prM όσο και η NS1 αποτελούν στόχους αντισωμάτων. Η NS1 είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη που προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια και ο προστατευτικός ρόλος των αντισωμάτων έναντι της NS1 εξαρτάται από τους υποδοχείς Fcγ. Αυτή η δράση προτείνει ότι τα αντι-NS1 αντισώματα δεσμεύονται σε μολυσμένα κύτταρα και διαμεσολαβούν στη φαγοκυττάρωση και εξάλειψη τους μέσω φαγοκυττάρων που εκφράζουν Fcγ υποδοχείς^[18].

Κυτταρική απόκριση

Τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα (CTL) αναγνωρίζουν τα αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα MHC I μόρια των μολυσμένων κυττάρων, λύουν αυτά τα κύτταρα και εκκρίνουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η λυτική δραστηριότητα των CTL εκτελείται από την περφορίνη, από τις πρωτεάσες σερίνης Α και Β ή από αλληλεπιδράσεις προσδετών Fas-Fas. Όμοια με τα αντισώματα έτσι και η λειτουργία των Τ κυττάρων είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των λοιμώξεων από τον WNV. Ποντίκια ελλιπή σε CD4+ και CD8+ κύτταρα είναι ευάλωτα στις λοιμώξεις ενώ στους ανθρώπους η απώλεια τους οδηγεί σε αυξημένο ρίσκο νευρολογικών λοιμώξεων. Παρομοίως, ελαττώματα στην εξωκυττάρωση των κοκκίων που εκκρίνουν τις πρωτεάσες σερίνης Α και Β καθώς και την περφορίνη φέρουν αντίστοιχα αποτελέσματα. Όλες αυτές οι ανεπάρκειες σχετίζονται με μια σημαντικά αυξημένη διεισδυτικότητα από την πλευρά του ιού καθιστώντας τα Τ κύτταρα απαραίτητα για τον έλεγχο του WNV στο ΚΝΣ.

Αμέσως μετά την είσοδο του ιού στον οργανισμό, τα CD8+ Τ κύτταρα αρχίζουν μια πορεία μετανάστευσης προς το ΚΝΣ με σκοπό την εξουδετέρωση του ιού αρχίζοντας από τον εγκέφαλο. Το ΚΝΣ των υγιών οργανισμών περιέχει περιορισμένο αριθμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, συνεπώς, τα CD8+ Τ κύτταρα πρέπει να φθάσουν στους νευρικούς ιστούς. Για αυτό το σκοπό εμπλέκονται χημοκίνες όπως είναι η CXCL10, η CCL5 και ο υποδοχέας της CCR5. Έλλειψη του CCR5 προκαλεί μειωμένη μετανάστευση λευκοκυττάρων στο ΚΝΣ και αυξημένη ευαισθησία στον WNV.

Η παρουσία των CD8+ Τ κυττάρων στο ΚΝΣ σχετίζεται τόσο με την προστασία των νευρικών κυττάρων όσο και με την καταστροφή τους. Η φαινομενικά ασυμβίβαστη αυτή δράση που δρα κατ' ουσία σαν δίκοπο μαχαίρι φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του ιικού στελέχους που αντιμετωπίζει ο οργανισμός. Τα CD8+ Τ κύτταρα δρουν ευεργετικά όταν αντιμετωπίζουν ιδιαίτερα μολυσματικά στελέχη του ιού, καταστρέφοντας τα πριν προκληθεί μεγάλη ζημιά. Ωστόσο στην

περίπτωση λιγότερο μολυσματικών στελεχών, η αυξημένη προσέλευση λευκοκυττάρων έχει επιζήμια δράση για τα νευρικά κύτταρα.

Σε αυτό το πλαίσιο, έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι η συχνότητα των ρυθμιστικών Τ κυττάρων (Tregs) αποτελεί δείκτη πρόβλεψης της κατάληξης της μόλυνσης από τον ιό. Τα Tregs συνήθως ελέγχουν τις κυτταρικές ανοσολογικές αποκρίσεις και ειδικότερα σταματούν την πλεονάζουσα δράση των CD8+ Τ κυττάρων όταν αυτή υπάρχει. Ένα υψηλό επίπεδο ρυθμιστικών Τ κυττάρων σχετίζεται με ασυμπτωματικές μολύνσεις, ενώ αντιθέτως, ένα χαμηλό επίπεδο σχετίζεται με αυξημένο ιικό φορτίο στο ΚΝΣ και σοβαρά συμπτώματα.

Σε απάντηση στους συνδιεγέρτες, τα Τ λεμφοκύτταρα, και ειδικά τα CD4+ Τ κύτταρα, εκκρίνουν ταχύτατα κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες είναι πρωτεΐνες που δρουν σαν μεσολαβητές της ανοσίας και της φλεγμονής. Η πρώτη κυτοκίνη που παράγεται μέσα σε 1 με 2 ώρες μετά την ενεργοποίηση, είναι η ιντερλευκίνη-2 (IL-2). Η IL-2 διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των ειδικών για αντιγόνο Τ κυττάρων. Για να ενεργοποιηθούν τα CD8+ Τ κύτταρα πρέπει να βρίσκονται κοντά τους ενεργοποιημένα CD4+ βοηθητικά Τ κύτταρα που θα τους προσφέρουν την IL-2 μιας και τα ίδια δεν την παράγουν σε μεγάλες ποσότητες.

Τα Τ κύτταρα σχετίζονται επίσης με την αύξηση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων στις μεγαλύτερες ηλικίες. Τ κύτταρα γηραιών ποντικών ειδικά για τον WNV έχουν ελαττώματα στην παραγωγή κυτοκινών και λυτικών κοκκίων όπως επίσης και μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης στο ΚΝΣ. Συνεπώς, η αποτελεσματικότητα των Τ κυττάρων έναντι του WNV μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας^[18].

Αναστολή της φυσικής ανοσίας από μηχανισμούς του WNV

Είναι γνωστό για τους φλαβοϊούς ότι η αντι-ιική δράση της IFN-I εμφανίζει τη μέγιστη αποδοτικότητα κατά τα πρώιμα στάδια της μόλυνσης, και ότι γίνεται λιγότερο αποτελεσματική όταν η μόλυνση έχει εγκατασταθεί, πράγμα που δηλώνει την ύπαρξη ενεργών αντιμέτρων από την πλευρά του ιού. Η αναστολή δράσης της IFN-I από τον WNV συμβαίνει σε αρκετά διακριτά σημεία, π.χ. μέσω της «μεταμφίεσης» του ιικού dsRNA ώστε να αποφευχθεί η στόχευση από τις PRR του κυτταροπλάσματος, ή μέσω ανταγωνιστικών ενεργειών από ιικές πρωτεΐνες σε συγκεκριμένα συστατικά των έμφυτων καταρρακτών μεταγωγής σήματος. Επιπροσθέτως, πολλοί ιοί συμπεριλαμβανομένου του WNV, χρησιμοποιούν 2'-Ο-μεθυλίωση των 5' cap δομών των RNA τους, σε μια προσπάθεια να μιμηθούν τα κυτταρικά mRNA και να αποφύγουν το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η ενεργοποίηση μιας IFN-I-εξαρτώμενης αντι-ιικής δράσης εναντίον εξαιρετικά ιογόνων στελεχών του WNV συμβαίνει σχετικά αργά (μετά την έναρξη της ιικής αντιγραφής), όπως φαίνεται από την καθυστερημένη ενεργοποίηση της IRF-3. Αυτό δείχνει ότι τα παθογόνα στελέχη του WNV καθυστερούν την ανίχνευση τους από τους PRR, επιτρέποντας την εγκαθίδρυση της λοίμωξης προτού ενεργοποιηθεί η φυσική ανοσία. Τόσο η προστασία της ιικής αντιγραφικής μηχανής από κυτταρικές μεμβράνες όσο και η παρέμβαση των ιικών πρωτεϊνών σε κυτταρικούς παράγοντες που δρουν ανοδικά της IRF3 αποτελούν μηχανισμούς που εξυπηρετούν την παραπάνω ιική συμπεριφορά.

Κάποια από τα πρωτεϊνικά παράγωγα του WNV έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν άμεσα στις προσπάθειες της έμφυτης ανοσοαπόκρισης για έλεγχο του ιού. Η πρωτεΐνη NS2A αναστέλλει τη μεταγραφή του IFN- β γονιδίου, ενώ η NS5 του στελέχους NY99 (Νέας Υόρκης/1999) αναστέλλει την IFN-I-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της STAT-1, μιας πρωτεΐνης του σηματοδοτικού μονοπατιού JAK-STAT. Συνεπώς, η μεταγραφή των ISGs εξασθενεί, οδηγώντας στην καλύτερη επιβίωση του WNV στο κύτταρο ξενιστή.

Η RIP-1 είναι μια κινάση που δρα τόσο σε TLR-3- όσο και σε RIG-1- διαμεσολαβούμενα μονοπάτια ιικής αναγνώρισης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η RIP-1 ουβικουιτινιώνεται ως απάντηση στην αναγνώριση του dsRNA και μεσολαβεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF κ B. Ωστόσο, η E πρωτεΐνη του WNV αναστέλλει την ουβικουιτινίωση και έτσι παύει η κυτταρική απόκριση στην παρουσία dsRNA^[18,25,29,27].

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΩΝ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

1. Ορολογική μέθοδος

Ορολογική μέθοδος ανίχνευσης ειδικών IgM και IgG αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου	Ορός αίματος ή το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY)
---	---

Ερμηνεία αποτελεσμάτων ορολογικής μεθόδου – Προβλήματα
 Ανίχνευση ειδικών IgM αντισωμάτων στο ENY, τα οποία δεν περνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, υποδηλώνει in situ παραγωγή σε ασθενείς με προσβολή του ΚΝΣ. Διαγνωστική είναι και η παρουσία IgM αντισωμάτων στον ορό. Τα IgG αντισώματα, ακολουθούν την εμφάνιση των IgM αντισωμάτων με καθυστέρηση μίας περίπου εβδομάδος. Στα IgG αντισώματα είναι διαγνωστική είτε η ορομεταστροφή, είτε η σημαντική αύξηση του τίτλου τους σε διαδοχικά δείγματα. Πρόβλημα ερμηνείας των ορολογικών μεθόδων αποτελούν οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους ιούς όπως του κίτρινου πυρετού και της Ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας που προκαλούνται είτε από φυσική νόσηση είτε μετά εμβολιασμό και η μακρά παραμονή των αντισωμάτων στο αίμα και το ENY των ασθενών.

2. Μοριακές μέθοδοι

Μέθοδος real time PCR για την ανίχνευση RNA του ιού Δυτικού Νείλου	Αίμα, ENY
---	------------------

Ερμηνεία αποτελεσμάτων μοριακής μεθόδου – Προβλήματα
 Με τις μοριακές μεθόδους αναζητείται το RNA του ιού σε κλινικά δείγματα όπως αίμα, ENY και ιστοί. Η ιαιμία που προκαλεί ο ιός του Δυτικού Νείλου διαρκεί κατά μέσο όρο 6 ημέρες και θεωρείται ότι κορυφώνεται μερικές ημέρες αμέσως μετά το τσίμπημα του κουνουπιού και την έναρξη των συμπτωμάτων της λοίμωξης. Στο διάστημα αυτό μπορεί να γίνει ανίχνευση στο αίμα με μοριακή μέθοδο. Το χρονικό διάστημα από την 8η έως την 15η ημέρα εφόσον εμφανιστούν κλινικές εκδηλώσεις στο ΚΝΣ είναι δυνατή η ανίχνευση του ιού και στο ENY με Real time PCR. Η διαγνωστική αξία των μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση του ιού στο αίμα είναι περιορισμένη, γιατί το επίπεδο ιαιμίας είναι χαμηλό και η διάρκειά της σύντομη, ενώ ο ιός δεν ανευρίσκεται στο αίμα όταν εμφανιστούν συμπτώματα στο ΚΝΣ. Η χρησιμότητα των μοριακών μεθόδων είναι μεγαλύτερη για την ανίχνευση του ιού στο ENY καθώς και την εξέταση αιμοδοτών.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί το ποσοστό έκθεσης στον ιό του Δυτικού Νείλου υγιών ατόμων στην περιοχή της Θεσσαλίας κατά τη διετία 2009-2010 μέσω της ανίχνευσης ειδικών έναντι του ιού αντισωμάτων. Η χρονική περίοδος επιλέχθηκε έτσι ώστε η έκθεση στον ιό να συγκριθεί λίγο πριν την εμφάνιση κρουσμάτων στην περιοχή μας. Σημειώνεται ότι τα πρώτα κρούσματα του ιού εμφανίστηκαν στη Θεσσαλία το καλοκαίρι του 2011.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ανοσοενζυμικές μέθοδοι

Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια με του ανοσοφθορισμού με τη διαφορά ότι η σήμανση του αντιγόνου ή του αντισώματος γίνεται με ένζυμο αντί με φθοριόχρωμα.

Η σήμανση των πρωτεϊνών με ένζυμα και η χρησιμοποίησή τους για μελέτη της πρωτογενούς αντίδρασης περιγράφηκε συγχρόνως από τους Avrameas και Uriel αφενός και Nakane και Pierce (1966) αφ' ετέρου.

Το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-ενζύμου διατηρεί τις ανοσολογικές και ενζυμικές του ιδιότητες και η ένωση αντιγόνου-αντισώματος διαπιστώνεται με την ανίχνευση του ενζύμου, που γίνεται με χημικές μεθόδους.

Γενικές αρχές

Η επιλογή του ενζύμου για τη σήμανση έχει μεγάλη σημασία για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου.

Τα κριτήρια για την εκλογή του ενζύμου είναι τα εξής:

1. Να είναι σε πολύ καθαρή κατάσταση
2. Να έχει ισχυρή και σταθερή ενζυμική δράση
3. Να είναι διαλυτό
4. Να έχει μικρό μοριακό βάρος
5. Να συνδέεται με το αντιγόνο ή το αντίσωμα χωρίς να χάνει την ενζυμική του δράση.
6. Να ανιχνεύεται σε μικρή ποσότητα με απλή μέθοδο, ευαίσθητη και φθηνή
7. Να έχει διαλυτό χρωμογόνο υπόστρωμα, το οποίο να είναι αβλαβές και φθινό.
8. Να μη βρίσκεται στα βιολογικά υγρά το ένζυμο, το υπόστρωμα ή αναστολέας του ενζύμου.

Τα ένζυμα, που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι η αλκαλική φωσφατάση, η υπεροξειδάση, η όξινη φωσφατάση, η οξειδάση της γλυκόζης, η β-γαλακτοσιδάση κλπ. αλλά εκείνα, που έχουν μεγαλύτερη εφαρμογή είναι τα δύο πρώτα.

Για τα ένζυμα αυτά υπάρχει μεγάλη ποικιλία από υποστρώματα, τα οποία άχρωμα στην αρχή παράγουν χρώμα μετά τη διάσπασή τους από το ένζυμο.

Σαν υπόστρωμα της υπεροξειδάσης χρησιμοποιείται το υπεροξειδίο του υδρογόνου και σαν χρωμογόνο η 3,3-διαμινοβενζιδίνη, η HCL ο-φαινυλενοδιαμίνη και το 5-αμινοσαλικυλικό οξύ. Σαν υπόστρωμα της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιούνται το διαμμωνικό άλας της φωσφορικής ναφθόλης και η φωσφορική π-νιτροφαινόλη.

Η σύνδεση των ενζύμων με το αντίσωμα ή το αντιγόνο γίνεται με διδύναμα ή πολυδύναμα αντιδραστήρια μεταξύ των οποίων τη μεγαλύτερη εφαρμογή έχουν η γλουταραλδεϋδη και το υπεριοδικό οξύ.

Σαν ειδικοί αντιοροί μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα. Και τα δύο έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα πολυκλωνικά είναι μακράς διάρκειας, απαιτούν απλές συνθήκες φύλαξης, είναι φθηνά, σχεδόν όλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τομές παραφίνης, αλλά είναι λιγότερο εξειδικευμένα, γιατί στρέφονται εναντίον περισσότερων επιτόπων. Τα μονοκλωνικά είναι εξειδικευμένα, γιατί στρέφονται απέναντι ενός επιτόπου, αλλά διατηρούνται για βραχύ χρόνο, είναι δαπανηρά και πολλά από αυτά δεν δίνουν καλά αποτελέσματα σε τομές παραφίνης.

Μη ειδική χρώση μπορεί να οφείλεται σε μη καθαρότητα του ενζύμου, σε περιεκτικότητα του αντιορού σε μη ειδική πρωτεΐνη ή σε ενδογενή ενζυμική δράση. Κατά τη χρήση της υπεροξειδάσης μη ειδική χρώση προκαλείται από τα ερυθροκύτταρα και τα κοκκία λευκοκυττάρων και μακροφάγων, ενώ κατά τη χρήση της αλκαλικής φωσφατάσης χρωματίζονται τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και μακροφάγα.

Η ενδογενής υπεροξειδάση μπορεί να αδρανοποιηθεί πριν από την ιστοχημική χρώση με διάφορους τρόπους, όπως με κατεργασία του ιστού με μείγμα υπεροξειδίου του υδρογόνου και μεθανόλης.

Τεχνικές

Από τις ανοσοενζυμικές μεθόδους άλλες είναι ανάλογες με τον ανοσοφθορισμό, άμεσο ή έμμεσο και άλλες με τις ραδιοανοσολογικές. Στις πρώτες, που εφαρμόζονται κυρίως στην ανοσοϊστοχημεία, αντιγόνο ή αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο ενώνεται με ένα ιστικό ή κυτταρικό αντίσωμα ή αντιγόνο.

Οι πιο σε χρήση όμως ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι:

- 1) Η ανάλογη της RIA μέθοδος, στην οποία σε γνωστή ποσότητα αντισώματος προστίθεται αντιγόνο ελεύθερο και αντιγόνο σημασμένο με ένζυμο. Σημασμένο και μη σημασμένο αντιγόνο συναγωνίζονται να ενωθούν με τη μικρή ποσότητα του αντισώματος, που έπειτα κατακρημνίζεται με δεύτερο αντίσωμα. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ενζυμική δραστηριότητα του ιζήματος, που συγκρίνεται με πρότυπο καμπύλη. Η ενζυμική δραστηριότητα του ιζήματος είναι αντιστρόφως ανάλογη με το ποσό του μη σημασμένου αντιγόνου. Η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό απινών.
- 2) Η ELISA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό αντισώματος ή αντιγόνου. Για προσδιορισμό του αντισώματος το αντιγόνο ενώνεται με τη στερεά φάση που μπορεί να είναι σωλήνες, σφαιρίδια, μικροπλάκες από πολυβινύλιο ή πολυστερίνη. Η στερεά φάση επωάζεται με τον προς εξέταση ορό και μετά προστίθεται αντισφαιρίνη σημασμένη με ένζυμο. Η δραστηριότητα του ενζύμου, που συνδέεται με τη στερεά φάση είναι ανάλογη με το ποσό του αντισώματος, που συνδέθηκε.

Για τον προσδιορισμό του αντιγόνου, το αντίσωμα ενώνεται με τη στερεά φάση, προστίθεται το δείγμα, που περιέχει το αντιγόνο και στη συνέχεια δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο. Η μέθοδος απαιτεί να υπάρχουν τουλάχιστον δύο σημεία σύνδεσης στο αντιγόνο, είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό αντιγόνων μεγάλου μοριακού βάρους και είναι γνωστή σαν μέθοδος sandwich (δίπλου αντισώματος).

Εφαρμογές

Η ELISA χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον προσδιορισμό αντισωμάτων απέναντι σε βακτήρια, ιούς, παράσιτα όπως και την αναζήτηση ιών. Η μέθοδος του διπλού αντισώματος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ορμονών, την αναζήτηση δεικτών όγκων, όπως το CEA και η α-FP κλπ.

Στην ανοσοϊστοχημεία οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση νεοπλασμάτων, τη διαφορική διάγνωση κακοήθων λεμφωμάτων και την ανίχνευση ορμονών, κυτταρικών υποδοχέων και λεκτινών^[41].

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ (Elisa)

Η αντίδραση μεταξύ ενός αντιγόνου και ενός αντισώματος στο εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ειδικών αντισωμάτων έναντι κάποιου αντιγόνου. Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA ανιχνεύει την πιθανή ύπαρξη στο αίμα των ασθενών ενός συγκεκριμένου αντισώματος που σχετίζεται με μια ασθένεια. Ένα θετικό αποτέλεσμα αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο αντίσωμα υπάρχει και συνεπώς ότι ο <<ασθενής>> νοσεί ή έχει νοσήσει από τη συγκεκριμένη ασθένεια.

Το πρώτο στάδιο της εφαρμογής της μεθόδου στη διάγνωση είναι η αφαίρεση των ερυθρών και των λευκών αιμοσφαιρίων από το δείγμα αίματος ενός ασθενή, τα οποία μπορούν να αλλοιώσουν το τελικό αποτέλεσμα. Αυτό επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος (4000 σ.α.λ. για 10 λεπτά) και ανάκτηση του υπερκείμενου ορού, ο οποίος περιέχει και τα αντισώματα. Κατά την εφαρμογή της ELISA χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα του ορού, που πιθανώς περιέχει το συγκεκριμένο αντίσωμα που μας ενδιαφέρει, ο οποίος αντιδρά με το συγκεκριμένο αντιγόνο που χαρακτηρίζει τη μολυσματική ή αυτοάνοση ασθένεια από την οποία πιθανώς νοσεί το εξεταζόμενο άτομο. Εάν όντως υπάρχει το αντίσωμα στο δείγμα, αυτό αναγνωρίζει ειδικά το αντιγόνο προς εξέταση και δημιουργεί σύμπλοκα με αυτό.

Η ανίχνευση της ειδικής αυτής αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος επιτυγχάνεται όταν προστίθεται και ένα δεύτερο αντίσωμα. Το αντίσωμα αυτό παράγεται από τον ορό ενός πειραματόζωου το οποίο έχει προηγουμένως εμβολιασθεί με ανθρώπινο αντίσωμα. Το ανθρώπινο αντίσωμα στη συγκεκριμένη περίπτωση λειτουργεί ως αντιγόνο και το ζώο, συνεπώς, παράγει αντισώματα εναντίον ανθρώπινων αντισωμάτων. Μόλις απομονωθεί, αυτό το δεύτερο αντίσωμα μπορεί να συνδεθεί με χημικό τρόπο με ένα σύστημα το οποίο μπορεί να παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα. Στη μέθοδο ELISA, το σύμπλοκο της ειδικής αντίδρασης αντιγόνων-αντισωμάτων εκτίθεται στο δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ειδικά το αντίσωμα του συμπλόκου (ενάντια του οποίου σχηματίστηκε με τον εμβολιασμό του πειραματόζωου) και προσδένεται ειδικά σε αυτό, σχηματίζοντας μια χαρακτηριστική δομή. Το χημικό σύστημα σήμανσης μιας θετικής αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος αποτελείται από ένα ένζυμο που είναι συνδεδεμένο στο δεύτερο αυτό αντίσωμα. Όταν προστεθεί το κατάλληλο χημικό υπόστρωμα, το ένζυμο το μετατρέπει σε μια κεχρωσμένη ουσία και αυτή η παραγωγή χρώματος μπορεί να μετρηθεί. Εναλλακτικά, το πρώτο αντίσωμα μπορεί να συζευχθεί ομοιοπολικώς με τη βιοτίνη (μια μικρή υδατοδιαλυτή βιταμίνη) η οποία έχει την ιδιότητα να συνδέεται ισχυρώς με στρεπταβιδίνη (μια βακτηριακή πρωτεΐνη) και συνεπώς, η στρεπταβιδίνη να λάβει τη θέση του δεύτερου αντισώματος.

Η μέθοδος ELISA μετράει την ποσότητα του ενζύμου (και συνεπώς, την ειδική αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος) από την αντίστοιχη ποσότητα χρώματος που παράγεται. Όσο περισσότερο ένζυμο υπάρχει, τόσο περισσότερο δευτερογενές αντισώμα πρέπει να είναι συνδεδεμένο στο αντίσωμα προς εξέταση. Το ποσό του δευτερογενούς αντισώματος αντίστοιχα προσδιορίζει το ποσό του αντισώματος που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε με την ELISA και να συσχετίσουμε με τις κλινικές εκδηλώσεις ενός ασθενή.

Δείγμα

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού της παρουσίας αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος 182 φαινομενικά υγιών ατόμων στην περιοχή της Θεσσαλίας κατά τις χρονικές περιόδους 2010-2011. Η δειγματοληψία έγινε τυχαία και όλοι οι συμμετέχοντες απάντησαν σε ερωτηματολόγιο το οποίο περιελάμβανε δημογραφικά στοιχεία κάθε συμμετέχοντα (ηλικία, φύλο, επάγγελμα, τόπος κατοικίας, ιστορικό).

Μεθοδολογία

Στον ορό των συμμετεχόντων μετρήθηκαν με την ανοσο-ενζυμική μέθοδο (ELISA) IgM και IgG αντισώματα έναντι αντιγόνων του ιού του Δυτικού Νείλου. Σε κάθε συμμετέχοντα ελήφθη ποσό 5 ml αίματος το οποίο τοποθετήθηκε σε ειδικό αποστειρωμένο σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό και μέσα σε δύο έως έξι ώρες φυγοκεντρήθηκε για τη λήψη ορού. Όλοι οι οροί καταψύχθηκαν σε -20ο C.

Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε με ανοσο-ενζυμική μέθοδο χρησιμοποιώντας εμπορική δοκιμασία West Nile Virus Focus Diagnostics. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή όταν ο λόγος των IgG αντισωμάτων του υπό εξέταση ορού / προς τον τίτλο αντισωμάτων του ορού ελέγχου (IgG index) είναι μεγαλύτερος του 1.5 θεωρείται θετικός, αν ο λόγος είναι 1.3-1.5 θεωρείται οριακός και αν είναι μικρότερος του 1.3 θεωρείται αρνητικός. Αντίστοιχα, ο λόγος των IgM αντισωμάτων του υπό εξέταση ορού / προς τον τίτλο αντισωμάτων του ορού ελέγχου ((IgM index) είναι μεγαλύτερος του 1.1 θεωρείται θετικός, αν ο λόγος είναι 0.9-1.1 θεωρείται οριακός και αν είναι μικρότερος του 0.9 θεωρείται αρνητικός.

Αντιδραστήρια απαραίτητα για την εφαρμογή της μεθόδου

1. Φιαλίδιο με ορό προς εξέταση
2. Vortex
3. Απιονισμένο νερό
4. Elisa plate spectrophotometer , wavelength=450nm
Χρησιμοποιήθηκε kit της εταιρίας Focus Diagnostics West Nile virus IgG DxSelect με τα παρακάτω αντιδραστήρια.
5. Πηγαδάκια IgG αντιγόνου, 12 λωρίδες με πηγαδάκια, 8 ανά λωρίδα που σχηματίζουν πλαίσιο. Κάθε πηγαδάκι έχει επιστρωθεί με ανασυνδυασμένο αντιγόνο WNV.
6. Πηγαδάκια IgM αντιγόνου, 12 λωρίδες με πηγαδάκια, 8 ανά λωρίδα που σχηματίζουν πλαίσιο. Κάθε πηγαδάκι έχει επιστρωθεί με ανασυνδυασμένο αντιγόνο WNV.
7. IgG conjugate, 16ml. Χρησιμοποιήθηκαν IgG αντιανθρώπινα αντισώματα από κατσίκια.

8. IgM conjugate, 16ml. Χρησιμοποιήθηκαν IgG αντιανθρώπινα αντισώματα από κατσίκα.
9. Θετικό control, 0,3ml. Ένα φιαλίδιο ανθρώπινου ορού με 0,1 % αζίδιο νατρίου.
10. Αρνητικό control, 0,3ml. Ένα φιαλίδιο ανθρώπινου ορού με 0,1 % αζίδιο νατρίου.
11. Cut-off calibrator, 0,3ml
12. Sample Diluent, 100ml
13. 10x Wash Buffer, 100ml
14. Υπόστρωμα, 16ml. TMB και υπεροξείδιο του υδρογόνου στο buffer
15. Stop reagent, 16ml. 1M θειικού οξέος

Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα epi-info έκδοση 3.4.3. και εφαρμόστηκε μονοπαραγοντική ανάλυση για τον καθορισμό των παραγόντων που επηρεάζουν την τιμή του δείγματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρακάτω αναφέρονται τα δημογραφικά στοιχεία των ατόμων όσον αφορά το φύλο, την περιοχή και τη διαμονή κατά τη χρονική περίοδο της μελέτης.

Φύλο

Άρρεν 82

Θήλυ 100

Περιοχή

Καρδίτσα 50

Λάρισα 100

Τρίκαλα 32

Διαμονή

Αστικός 80

Αγροτικός 102

Από τα 182 άτομα που συμμετείχαν στην μελέτη 30 εμφάνισαν θετικά IgG αντισώματα (16.4%), ενώ, κανένα άτομο δεν εμφάνισε θετικά IgM αντισώματα. Το IgG index ήταν 2.9 (1.465-7.067).

Από την μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση προκύπτουν τα εξής:

A. δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στα οροθετικά άτομα της μελέτης ως αναφορά το φύλο

B. δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στα οροθετικά άτομα της μελέτης ως αναφορά τη διαμονή

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το καλοκαίρι του 2010 τεκμηριώθηκε για πρώτη φορά εγκεφαλίτιδα από ιό του Δυτικού Νείλου στην Ελλάδα. Σύμφωνα με στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ, το καλοκαίρι και φθινόπωρο του 2010 διαγνώστηκαν συνολικά 262 κρούσματα από ιό του Δυτικού Νείλου, το 70% περίπου των οποίων αφορούσε κρούσματα με εκδηλώσεις από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), ενώ το 30% παρουσίασε ήπιες εκδηλώσεις και σημειώθηκαν συνολικά 35 θάνατοι σε υπερήλικα άτομα με υποκείμενα νοσήματα. Η πλειονότητα των κρουσμάτων καταγράφηκε στην Κεντρική Μακεδονία, με επίκεντρο τις πεδινές περιοχές Ημαθίας και Πέλλας. Μελέτες που έχουν γίνει πρόσφατα στις περιοχές αυτές, ενοχοποιούν το κοινό οικιακό κουνούπι *Culex pipiens* ως τον κύριο διαβιβαστή του ιού. Επίσης, το καλοκαίρι του 2011 σημειώθηκαν κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου. Από τα 101 κρούσματα που δηλώθηκαν, 76 εμφάνισαν εκδηλώσεις του ΚΝΣ και 25 ηπιότερες εκδηλώσεις. Καταγράφηκαν εννέα (9) θάνατοι σε ασθενείς άνω των 65 ετών με υποκείμενα νοσήματα. Αντίθετα από το 2010, τα κρούσματα του 2011 παρουσιάστηκαν νοτιότερα και συγκεκριμένα στις περιοχές Ανατολικής Αττικής, **Λάρισας και Καρδίτσας**.

Ερέθισμα για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης σχετικά με την ανίχνευση ειδικών για τον ιό αντισωμάτων σε υγιή πληθυσμό της Θεσσαλίας αποτέλεσε η αλλαγή της επιδημιολογικής εικόνας των λοιμώξεων του ιού του Δυτικού Νείλου κατά τα έτη 2010-2011 στην περιοχή μας. Ενώ το 2010 υπήρξαν 8 κλινικά επιβεβαιωμένα περιστατικά λοίμωξης από το ιό, το 2011 καταγράφονται 25 περιστατικά γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ιός κατά το 2010 πιθανόν να κυκλοφόρησε ευρέως μέσω κάποιων υποδοχών στην περιοχή, να μόλυνε υποκλινικά κάποιο ποσοστό ατόμων και κάτω από ιδιαίτερες συνθήκες κάποια άτομα να εμφάνισαν το 2011 την ανάλογη συμπτωματολογία. Γενικά θεωρείται ότι 1 κλινικό περιστατικό του ιού αντιστοιχεί σε 150 υποκλινικές ή ασυμπτωματικές μολύνσεις. Στη δικιά μας μελέτη σε τυχαιοποιημένο δείγμα 182 ατόμων από τη Θεσσαλία 30 άτομα βρέθηκαν να έχουν ειδικά στον ιό αντισώματα. Οι μέχρι σήμερα ορολογικές μελέτες στην Ελλάδα, δείχνουν ότι το ποσοστό των υγιών ατόμων με ειδικά έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου αντισώματα ήταν περίπου 1%, το οποίο επιβεβαιώνει ότι ο ιός κυκλοφορούσε ήδη στη χώρα από παλιά. Σε μια μελέτη του Μπιλλίνη και συνεργατών έχει δειχθεί ότι πτηνά τα οποία σκοτώθηκαν στην Βόρεια Ελλάδα κατά την περίοδο 2009-2010 είχαν θετικά για τον ιό αντισώματα. Οκτώ μήνες αργότερα εμφανίστηκε η επιδημία στην περιοχή της Μακεδονίας.

Ενδιαφέρον στοιχείο της μελέτης είναι ότι παρά το υψηλό ποσοστό έκθεσης στον ιό τα κλινικά περιστατικά ήταν λιγότερα από αυτά που θα αντιστοιχούσαν σύμφωνα με τη σχέση 1/150. Έχει ήδη λεχθεί ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου που κυκλοφορεί στη χώρα μας ανήκει στην σειρά 2 που είναι λιγότερο λοιμογόνα. Ωστόσο, κάποια στελέχη υπέστησαν μια μετάλλαξη, την H249P στην πρωτεΐνη NS3 και κατέστησαν περισσότερο παθογόνα. Πιθανότατα, αρχικά ο ιός που κυκλοφόρησε να μην έφερε τη μετάλλαξη και ο πληθυσμός παρά την έκθεση να παρέμεινε ασυμπτωματικός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1.** Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1174-9.
- 2.** Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med* 2010; 30:47-65.
- 3.** Kantzanou MN, Moschidis ZM, Kremastinou G, et al. Searching for West Nile virus (WNV) in Greece. *Transfus Med* 2010; 20:113-7.
- 4.** Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 1998; 352:767-71.
- 5.** Danis K, Papa A, Papanikolaou E, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. *Euro Surveill* 2011; 16.
- 6.** Papa A, Danis K, Baka A, et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro Surveill* 2010; 15.
- 7.** Papa A, Perperidou P, Tzouli A, Castilletti C. West Nile virus--neutralizing antibodies in humans in Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10:655-8.
- 8.** Antoniadis A, Alexiou Daniel S, Malissiovas N, et al. Seroepidemiological survey for antibodies to arboviruses in Greece. *Arch Virol* 1990; [suppl 1]:277-85.
- 9.** Gratz N. The vector-borne human infections of Europe – their distribution and burden on public health. . Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2004.
- 10.** Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:128-32.
- 11.** Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:618-23.
- 12.** Rizzo C, Salcuni P, Nicoletti L, et al. Epidemiological surveillance of West Nile neuroinvasive diseases in Italy, 2008 to 2011. *Euro Surveill* 2012; 17.
- 13.** Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, et al. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill* 2011; 16.
- 14.** Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1176-80.
- 15.** Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vazquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:920-2.
- 16.** Shi PY, Wong SJ. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003 Nov;3(6):733-41.
- 17.** Papa A, Danis K, Athanasiadou A, Delianidou M, Panagiotopoulos T. Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. *J Med Virol.* 2011 Oct;83(10):1857-60.

- 18.** Ulbert S. West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology* 2011;54(4): 171-84.
- 19.** Valiakos G, Touloudi A, Iacovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V, Billinis C. Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveill.* 2011 May 5;16(18). pii: 19862.
- 20.** Lelli D, Moreno A, Brocchi E, Sozzi E, Capucci L, Canelli E, Barbieri I, Zeller H, Cordioli P. West Nile virus: characterization and diagnostic applications of monoclonal antibodies. *Virology* 2012 Apr 13;9:81. doi: 10.1186/1743-422X-9-81.
- 21.** Gray RR, Veras NM, Santos LA, Salemi M. Evolutionary characterization of the West Nile Virus complete genome. *Mol Phylogenet Evol.* 2010 Jul;56(1): 195-200.
- 22.** Center for Food Security and Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics. West Nile Virus Infection. 2009 August.
- 23.** Charrel RN, Brault AC, Gallian P, Lemasson JJ, Murgue B, Murri S, Pastorino B, Zeller H, de Chesse R, de Micco P, de Lamballerie X. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology*. 2003 Oct 25;315(2):381-8.
- 24.** Heiss BL, Maximova OA, Pletnev AG. Insertion of microRNA targets into the flavivirus genome alters its highly neurovirulent phenotype. *J Virol.* 2011 Feb;85(4): 1464-72. doi: 10.1128/JVI.02091-10. Epub 2010 Dec 1.
- 25.** Wilson JR, de Sessions PF, Leon MA, Scholle F. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol.* 2008 Sep;82(17):8262-71. doi: 10.1128/JVI.00226-08. Epub 2008 Jun 18
- 26.** Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, MacKenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, McNamara T, Gubler DJ. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 1999 Dec 17;286(5448):2333-7.
- 27.** Arjona A, Ledizet M, Anthony K, Bonafé N, Modis Y, Town T, Fikrig E. West Nile virus envelope protein inhibits dsRNA-induced innate immune responses. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8403-9.
- 28.** Papa A. West Nile virus infections in Greece: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Jul;10(7): 743-50.
- 29.** Stephanie M. Lim, Penelope Koraka, Albert D.M.E. Osterhaus, and Byron E.E. Martina. West Nile Virus: Immunity and Pathogenesis. *Viruses.* 2011 June; 3(6): 811–828.
- 30.** Robin M. Moudy,* Mark A. Meola, Laura-Lee L. Morin, Gregory D. Ebel, and Laura D. Kramer. A Newly Emergent Genotype of West Nile Virus Is Transmitted Earlier and More Efficiently by *Culex* Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77(2), 2007, pp. 365–370

- 31.** Theodore Oliphant,¹ Grant E. Nybakken,² Michael Engle,³ Qing Xu,⁴ Christopher A. Nelson,² Soila Sukupolvi-Petty,³ Anantha Marri,³ Bat-El Lachmi,⁵ Udy Olshevsky,⁵ Daved H. Fremont,² Theodore C. Pierson,⁴ and Michael S. Diamond^{1,2,3}. Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Dec. 2006, p. 12149–12159
- 32.** Doug E. Brackney, Jennifer E. Beane, Gregory D. RNAi Targeting of West Nile Virus in Mosquito Midguts Promotes Virus Diversification. *Pathog.* 2009 July; 5(7): e1000502. Published online 2009 July 3. doi: 10.1371/journal.ppat.1000502
- 33.** Aruna Sampath^a, R. Padmanabhan^b. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research* Volume 81, Issue 1, January 2009, Pages 6–15.
- 34.** Greta Jerzak,¹ Kristen A. Bernard,^{1,2} Laura D. Kramer^{1,2}. Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection. *Journal of General Virology* (2005), 86, 2175–2183
- 35.** Brett E Pickett and Elliot J Lefkowitz. Recombination in West Nile Virus: minimal contribution to genomic diversity. *Virology Journal* 2009, **6**: 165 doi:10.1186/1743-422X-6-165.
- 36.** Gabriel L. Hamer , * Uriel D. Kitron, Tony L. Goldberg , Jeffrey D. Brawn, Scott R. Loss , Marilyn O. Ruiz, Daniel B. Hayes , and Edward D. Walker. Host Selection by *Culex pipiens* Mosquitoes and West Nile Virus Amplification. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(2), 2009, pp. 268–278.
- 37.** Pei-Yong Shi and Susan J Wong. Serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3(6), 733–741 (2003).
- 38.** Maria-Dolores Fernandez-Garcia,¹ Michela Mazzon,² Michael Jacobs,^{2,3,*} and Ali Amara^{1,3,.]} Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. Cell Press.
- 39.** Eric Ka-Wai Hui. Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases. *Microbes and Infection* 8 (2006) 905e916.
- 40.** Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. *Medical Microbiology* (Pages 47-66)
- 41.** Μ. Παυλάτου. *Ανοσολογία 2^η έκδοση* (1987) Σελ. 288-291
- 42.** International Catalog of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates (4th Edition). Karabatsos N (Ed.). American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, TX, USA, (1985)
- 43.** Gerardin P, Guernier V, Perrau J et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect. Dis.* 8,99 (2008)
- 44.** Sergon K, Njuguna C, Kalani R et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 333-337 (2008)
- 45.** Sergon K, Yahaya AA, Brown J. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, 2005. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76,1189-1193 (2007)
- 46.** Lahariya C, Pradhan SK. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years. *Review J. Vector Borne Dis.* 43, 151-160 (2006)

- 47.** Kalantri SP, Joshi R, Riley LW. Chikungunya epidemic: an indian perspective. *Natl Med. J. India* 19,315-322 (2006)
- 48.** Outbreak news. Yellow fever, Paraguay. *Wkly Epidemiol. Rec.* 83,105 (2008)
- 49.** Yellow fever preparedness. *Lancet* 371,786 (2008)
- 50.** Chretien JP, Anyamba A, Bedno SA et al. Drought associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 405-407 (2007)
- 51.** Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv. Virus Res.* 72, 1-76 (2008)
- 52.** Garcia- Rejon J, NA Lorono-Pino, Farfan-Ale JA et al. Dengue virus-infected *Aedes aegypti* in the home environment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 940-950 (2008)
- 53.** Gratz NG: Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* 18, 215-227 (2004)
- 54.** Valerio L, Marini F, Bongiorno G et al.: Blood-feeding preferences of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) in urban and rural settings within the province of Rome, Italy. *Parasitology* 50,103-104 (2008)
- 55.** Schuffenecker I, Iteman I, Michault A et al.: Genome Microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med.* 3, 263 (2006)
- 56.** Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D et al.: Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 2, e1168 (2007)
- 57.** Tsetsarkin KA, Vanlandigham DL, McGee CE, Higgs S: A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3,e201 (2007)
- 58.** Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med.* 20, 471-492