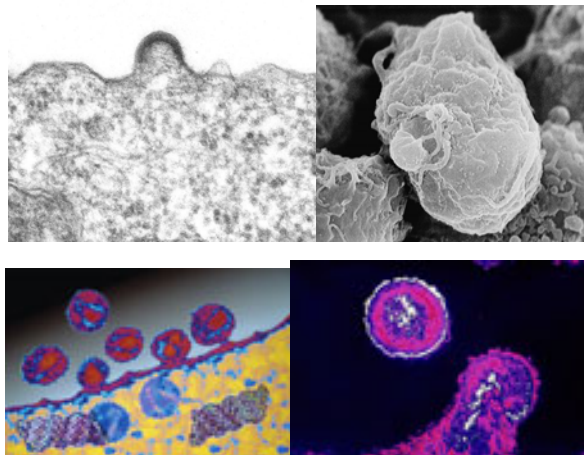


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Δ.Α. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ

**ΔΝΑ/ΑΙΜΙΑ ΑΠΟ HSV, CMV, EBV ΚΑΙ HHV8 ΣΕ HIV-1 ΕΝΗΛΙΚΕΣ –
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ HAART**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΥΜΕΩΝ Χ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

...If, as is sometimes supposed, science consisted in nothing but the laborious accumulation of facts, it would soon come to a standstill, crushed, as it were, under its own weight...The suggestion of a new idea, or the detection of a law, supersedes much that has previously been a burden on the memory, and by introducing order and coherence facilitates the retention of the remainder in an available form..._

Lord Rayleigh, University of Cambridge, 1884.

...Εάν, όπως υποτίθεται μερικές φορές, η επιστήμη δεν είναι τίποτα περισσότερο από την εργώδη συσσώρευση γεγονότων, σύντομα θα οδηγείτο σε αδιέξοδο, συνθλιβόμενη κάτω από το ίδιο της το βάρος... Η διατύπωση μιας νέας ιδέας, ή η ανακάλυψη ενός νόμου, αντικαθιστά αυτό που μέχρι τότε ήταν μεγάλο φορτίο για τη μνήμη, και εισάγοντας τάξη και συνέπεια διευκολύνει τη διατήρηση της υπόλοιπης γνώσης σε προσιτή μορφή...

Lord Rayleigh, University of Cambridge, 1884.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Ευχαριστώ πρωτίστως τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ. Α. Σπαντίδο πρώτα απ' όλα για την εμπιστοσύνη, που μου έδειξε και με συμπεριέλαβε μεταξύ των μεταπτυχιακών του φοιτητών και ακολούθως για την επιστημονική κατάρτιση και ηθική υποστήριξη, που μου προσέφερε πλούσια όλο το διάστημα, που εργάστηκα κοντά του. Εύχομαι να συνεχίσει με τον ίδιο ζήλο και έμπνευση το επιστημονικό του έργο.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής Καθηγητή κ. Α. Τσατσάκη και Επικ. Καθηγητή κ. Χ. Τσατσάνη, καθώς και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Καθηγητές κ. Γ. Σαμώνη και κ. Κραμποβίτη και Επικ. Καθηγητές κ. Α. Ζαφειρόπουλο και κ. Γ. Σουρβίνο για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον διευθυντή της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Καθηγητή κ. Δ. Τ. Μπούμπα, για τη βοήθεια και επιστημονική υποστήριξη, που μου προσφέρει τα τελευταία τρία χρόνια, που εργάζομαι κοντά του.

Ευχαριστώ από καρδιάς τη μεταδιδακτορικό κα Γ. Σούφλα για την αμέριστη βοήθεια, επιστημονική συνδρομή και ηθική συμπαράσταση, που μου έδειξε όλα αυτά τα τέσσερα χρόνια. Με την κα Σούφλα περάσαμε ατελείωτες ώρες στον πάγκο και μπροστά στον υπολογιστή για την αποπεράτωση αυτού του έργου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω στους Επικ. Καθηγητές κ. Γ. Σουρβίνο και κ. Α. Ζαφειρόπουλο, τη μεταδιδακτορικό κα Σ. Μπαριτάκη και τους συναδέλφους ιατρούς Σ. Μηγιάκη και Α. Πάσσαμ, οι οποίοι υπήρξαν πολύτιμοι αρωγοί στην προσπάθεια αυτή, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας. Επίσης ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους της πτέρυγας 5Δ για τη βοήθεια, που μου προσέφεραν σε πρακτικά θέματα και την ηθική τους συμπαράστασή.

Πολύ σημαντική υπήρξε για μένα η βοήθεια της συναδέλφου ιατρού κας Ε. Κουρμπέτη, με την εποικοδομητική κριτική, που έκανε στο άρθρο μου και την ευχαριστώ ιδιαίτερος γι' αυτό.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους συναδέλφους επιμελητές και ειδικευόμενους ιατρούς της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, καθώς και την Αναπληρώτρια διευθύντρια της Α Παθολογικής Κλινικής του Βενιζέλειου Νοσοκομείου Ηρακλείου κα Κισσαμιτάκη Βασιλική για τη βοήθεια και συμπαράστασή τους.

Ευχαριστώ επίσης τις Στυλλιανή Καπετανάκη και Αναστασία Περυσινάκη για τις γλωσσικές διορθώσεις των κειμένων. Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αδέρφια μας Χαράλαμπο, Αργυρώ, Ειρήνη, Παναγιώτη, Μαρία και ιδιαιτέρως τη σύζυγό μου ιατρό κα Περυσινάκη Γαρυφαλιά, για τη βοήθεια και συμπαράσταση που επέδειξε όλο αυτό το διάστημα - τα παιδιά μου επίσης Σοφία και Χρήστο, για την απεριόριστη αγάπη και κατανόηση, που δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια. Μεγάλη ευγνωμοσύνη τρέφω ακόμη για τους γονείς μας Χρήστο και Σοφία Παναγιωτάκη και Σάββα και Μαρία Περυσινάκη, καθώς και τους πνευματικούς μας γονείς.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο πιθανός ρόλος των ερπητοϊών ως συμπαραγόντα στη λοίμωξη από τον HIV έχει υποστηριχθεί από πολλούς ερευνητές στο παρελθόν. Δεδομένου ότι οι ερπητοϊοί συνυπάρχουν συχνά στους ασθενείς με HIV λοίμωξη, άλλοτε σε λανθάνουσα και άλλοτε σε ενεργό κατάσταση, δημιουργούνται οι προϋποθέσεις για αλληλεπίδραση μεταξύ τους σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης του ιϊκού DNA. Η συνδυασμένη αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART) οδηγεί σε καταστολή του διπλασιασμού του HIV και ανασυγκρότηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανασυγκρότηση αυτή εκφράζεται με αύξηση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων και σχετίζεται με καλύτερο έλεγχο των ευκαιριακών λοιμώξεων, καθώς και των λοιμώξεων από ερπητοϊούς. Ωστόσο σε αρκετούς ασθενείς η αποκατάσταση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων καθυστερεί να επιτευχθεί ή δεν γίνεται τελικά.

Μετά την είσοδο της HAART στη θεραπεία του AIDS, ένας μικρός μόνο αριθμός μελετών έχει διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση της παρουσίας των ερπητοϊών με τον διπλασιασμό του HIV, την απάντηση στη HAART και την πρόοδο της HIV λοίμωξης.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να υπολογίσουμε την ποιοτική DNA/αιμία των ερπητοϊών HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8 στα Περιφερικά Λευκοκύτταρα του αίματος (ΠΛΑ), μεμονωμένη και πολλαπλή, HIV-1 οροθετικών και οροαρνητικών ενηλίκων στον ελληνικό πληθυσμό και να τη συσχετίσουμε με επιδημιολογικούς και κλινικούς παράγοντες όπως την ηλικία, το φύλο, τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων και το ιϊκό φορτίο του HIV-1, καθώς και το ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε HAART. Επίσης θελήσαμε να μελετήσουμε τη σχέση μεταξύ ερπητικής DNAαιμίας μεμονωμένης και πολλαπλής, και απάντησης στη HAART, σε ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά HAART ή έχουν ήδη λάβει HAART και αλλάζουν σχήμα, όπως αυτή εκφράζεται με τη μείωση του HIV ιϊκού φορτίου (VL) και την αύξηση των CD4+ κυττάρων.

Ο πληθυσμός της μελέτης μας αποτελείτο από 163 HIV-1 οροθετικούς ασθενείς και 200 φυσιολογικούς αιμοδότες. Για την ανίχνευση του DNA των ερπητοϊών χρησιμοποιήσαμε πρωτόκολλα ποιοτικής PCR. Η ανίχνευση όλων των ερπητοϊών έγινε μία φορά για κάθε ασθενή, τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη. Οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν με μετρήσεις του αριθμού των CD4+ T-κυττάρων και του HIV-1 ιϊκού φορτίου κάθε τρεις μήνες, για μία περίοδο 21 μηνών.

Για τη συσχέτιση της ερπητικής DNAαιμίας, μεμονωμένης και πολλαπλής, με τη μεταβολή του HIV-1 ιϊκού φορτίου μετά την έναρξη της HAART, εφαρμόσαμε ανάλυση Kaplan-Meier με καταληκτικό σημείο την πτώση του ιϊκού φορτίου του HIV-1 σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα (<50 cps/ml).

Η συσχέτιση της ερπητικής DNAαιμίας με την ανασυγκρότηση του ανοσοποιητικού συστήματος μετά την έναρξη της HAART, μελετήθηκε μόνο στους ασθενείς με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια, επίπεδο CD4+ T κυττάρων < 200cells/μL. Εφαρμόστηκε επίσης ανάλυση Kaplan-Meier στις αντίστοιχες υπο-ομάδες και καταληκτικό γεγονός ορίστηκε η υπερπήδηση του ορίου των 200 κυτ/μL. Τέλος, προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την πρόοδο της HIV νόσου, όπως αυτή εκφράζεται με τη μεταβολή του αριθμού των CD4+ κυττάρων στο βάθος του χρόνου, με τη συμπαρουσία της ερπητικής DNAαιμίας.

Εκατόν δέκα έξι (71%) από τους 163 HIV-1 οροθετικούς ενήλικες ανευρέθηκαν θετικοί για την αλληλουχία DNA του CMV στα ΠΛΑ, 76 (47%) για την παρουσία DNA του HSV-1, 62 (38%) για τον EBV και 46 (28%) για την αλληλουχία DNA του HHV-8. Αντίθετα οι 48 (24%) από τους 200 φυσιολογικούς

μάρτυρες είχαν DNA του CMV στα ΠΛΑ, 0 (0%) DNA του HSV-1, 54 (27%) DNA του EBV, και 33 (17%) του HHV-8. Τα παραπάνω ποσοστά διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (σε όλες τις περιπτώσεις $P < 0.02$). Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία ή λίγο υψηλότερα από εκείνα άλλων μελετών. Αλληλουχία DNA του HSV-2 δεν ανιχνεύθηκε στα ΠΛΑ σε κανένα από τους δύο πληθυσμούς. Πολλαπλή Ερπητική DNA/αιμία ανιχνεύθηκε στο 63% των HIV-1 οροθετικών και μόλις στο 9% των HIV οροαρνητικών ($P < 10^{-7}$). Βρήκαμε στους ασθενείς, που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία με HAART, ότι η παρουσία ταυτόχρονης DNA/αιμίας στα ΠΛΑ με τους ερπητοϊούς CMV και EBV σχετίζεται σημαντικά με βραδύτερη απάντηση στη HAART ($P = 0.033$). Πιο συγκεκριμένα, είδαμε ότι οι ασθενείς αυτοί, σε μικρότερο ποσοστό και με σημαντικά βραδύτερο ρυθμό, μειώνουν το ιϊκό φορτίο του HIV σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε σχέση με τους αρνητικούς για την παραπάνω ερπητική DNAαιμία. Η συχνότητα υποτροπής και ο χρόνος, που το ιϊκό φορτίο παραμένει μη ανιχνεύσιμο είναι ανεξάρτητη της παρουσίας CMV/EBV DNA/αιμίας. Όσον αφορά την ανασυγκρότηση του ανοσοποιητικού συστήματος, με την έννοια της υπερπήδησης του κριτικού ορίου των 200 CD4+ κυττάρων, βρήκαμε στους ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά HAART, ότι η CMV DNA/αιμία σχετίζεται με βραδύτερη ταχύτητα αποκατάστασης της ανοσίας ($P = 0.035$).

Καταλήγοντας προτείνουμε ότι η πολλαπλή ερπητική DNAαιμία είναι πολύ συχνή στους HIV οροθετικούς ασθενείς. Προτείνουμε ότι η ταυτόχρονη παρουσία DNA των ιών CMV και EBV στα ΠΛΑ ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART αποτελεί φτωχό προγνωστικό δείκτη για καλή απάντηση στη θεραπεία. Ακόμα περισσότερο, η παρουσία CMV DNA/αιμίας φαίνεται να σχετίζεται με βραδύτερη ανασυγκρότηση της ανοσίας στους παραπάνω ασθενείς και η παρουσία πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας σχετίζεται με οριακά βραδύτερη ανασυγκρότηση της ανοσίας.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the qualitative single and multiple herpes virus DNAemia in the Peripheral Blood Leukocytes (PBLs) of HIV-1-positive patients and its impact on the response to highly active antiretroviral therapy (HAART) and immune reconstitution.

All (163) HIV-1-positive patients attending “Syngros AIDS Referral Center” from November 2000 - February 2001 were recruited. CMV, HSV-1, HSV-2, EBV and HHV-8 DNA was detected in PBLs by Polymerase Chain Reaction technique (PCR). Patients’ follow-up comprised regular measurements of CD4+ T-cell count and HIV-1 viral load (VL) for an average period of 21 months. Immune reconstitution was defined as an increase in the CD4 T cell count by above 200 cells/ μ l, while response to HAART was defined as a decrease in HIV-1 VL to undetectable levels.

Single and multiple herpetic DNAemia in PBLs was found to be significantly higher in HIV-1-positive patients compared to healthy controls ($P < 0.02$) for all the viruses detected apart from HSV-2, which was not detected in the PBLs of either population. Concurrent CMV and EBV DNAemia significantly correlates with a delay in the response to HAART ($P = 0.033$) in treatment-naïve patients. Untreated patients with CD4+ T-cell count < 200 cells/ μ l, and with CMV DNAemia, presented a delayed increase in CD4 count after HAART initiation ($P = 0.035$), while multiple herpetic DNAemia in the above patients was borderline associated with immune reconstitution ($P = 0.068$).

Conclusively CMV and EBV DNAemia may be a poor prognostic factor for the response to HAART in treatment naïve HIV-1 patients.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ**

AICD (Activation Induced Cell Death)

AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

AZT (Zidovudine)

bDNA (Branched DNA assay)

bp (base pair)

CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

CD4 (Cluster Differentiation marker)

cDNA (Complementary Desoxyribonucleic Acid)

CMV (Cytomegalovirus)

cps (copies)

CRF (circulating recombinant forms)

CTL (Cytolytic T lymphocytes)

dNTP (free Deoxynucleotide triphosphate)

DNA (Desoxyribonucleic Acid)

EA (Early Antigen)

EBNA (Epstein Barr virus Nuclear Antigen)

EBV (Epstein Barr virus)

EIA (Enzyme Immunoassay)

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

FITP (Fllice inhibitory protein v)

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

gp (Glycoprotein)

GPCR (G protein-coupled receptor)

HAART (Highly Active Anti-retroviral Therapy)

HHV-6 (Human Herpesvirus-6)

HHV8 (Human Herpesvirus 8)

HIV (Human Immunodeficiency Virus)

HLA (Human Leukocyte Antigen)

HSV (Human Herpesvirus)

HTLV-I (Human T cell Leukaemia Virus)

IL (Interleukine)

INF (Interferon)

KS (Kaposi Sarcoma)

KSHV (Kaposi Sarcoma Human Herpersvirus)

LTR (Long Terminal Repeats)

LYDMA (Lymphocyte Detected Membrane Antigen)

MCD (Multicentric Castleman's Disease)

M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)

MHC (Major Histocompatibility Complex)

MIP (Macrophage Inflammatory Proteins)

NK (Natural Killer)

NNRTIs (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors)

NRTIs (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors)

ORF (Open Reading Frames)

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PEL (Primary Effusion Lymphoma)

PGL (Persistent Generalized Lymphadenopathy)

RNA (Ribonucleic Acid)

RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

ssDNA (Single Stranded Desoxyribonucleic Acid)

TB (Tuberculosis)

3TC (lamivudine)

TCR (T cell Receptor)

TNF (Tumor Necrosis Factor)

Tris (Trisma base)

Taq (Thermophilus Aquaticus polymerase)

UNAIDS (Πρόγραμμα Ηνωμένων Εθνών για το AIDS)

VCA (Viral Capsid Antigen)

VL (Viral Load)

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ

ΗΠΑ (Ηνωμ.ένες Πολιτείες Αμερικής)

ΚΝΣ (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα)

ΜΒ (Μοριακό Βάρος)

ΜΠΑ (Μονοπύρηνα Περιφερικού Αίματος)

ΠΛΑ (Λευκοκύτταρα Περιφερικού Αίματος)

ΣΔ (Σακχαρώδης Διαβήτης)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
I.1. AIDS	16
I.2. HIV	19
I.2.1 Μορφολογία του HIV	19
I.2.2 Βιολογικός κύκλος του HIV	20
I.2.3. Γονιδίωμα του HIV	22
I.2.4. Μοριακή ετερογένεια του HIV	22
I.2.5. Μετάδοση του HIV	24
I.2.5.1. Παθογένεια της λοίμωξης από HIV	24
I.2.5.2. Πρωτογενής λοίμωξη, αρχική ιαιμία και διασπορά του HIV	25
I.2.5.3. Εγκατάσταση χρόνιας και επίμονης λοίμωξης	26
I.2.5.4. Προχωρημένη νόσος από HIV	27
I.2.5.5. Ρόλος της κυτταρικής ενεργοποίησης στην παθογένεια του HIV.	27
I.2.5.6. Το δίκτυο των κυτταροκινών στην παθογένεια του HIV	29
I.2.6. Διάγνωση της λοίμωξης από HIV	30
I.2.7. Εργαστηριακή παρακολούθηση του ασθενή με λοίμωξη από HIV	30
I.2.8.1. Αντιρετροϊκή θεραπεία της HIV λοίμωξης	31
α) Νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs, Nucleoside RT Inhibitors).	31
β) Μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs, Non-Nucleoside RT Inhibitors).	32
γ) Νουκλεοτιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης	32
δ) Αναστολείς πρωτεασών	32
ε) Αναστολείς σύντηξης	32
I.2.8.2. Αρχές της θεραπείας- Θεραπευτικοί στόχοι	33
I.3. ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ	35
I.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ερπητοϊών	36
I.3.2. ΑΠΛΟΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΕΡΠΗΤΟΪΟΣ 1 ΚΑΙ 2 (HSV-1 ΚΑΙ -2)	37

I.3.2.1. Ορολογία	38
I.3.2.2. Παθογένεια	38
I.3.2.3. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή	39
I.3.2.4. Επιδημιολογία	40
I.3.2.5. Ανοσοποίηση	40
I.3.2.6. Θεραπεία	41
I.3.3. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ (CMV)	41
I.3.3.1. Κλινικές απόψεις	41
I.3.3.2. Παθογένεια	42
I.3.3.3. Ανοσολογική απάντηση	43
I.3.3.4. Ενεργός ανοσοποίηση	43
I.3.3.5. Παθητική ανοσοποίηση	43
I.3.3.6. Θεραπεία	43
I.3.4. ΙΟΣ ΕΡSTEIN-BAR (EBV)	44
I.3.4.1. Ιικά αντιγόνα	44
I.3.4.2. Αθανατοποίηση των κυττάρων ξενιστών	44
I.3.4.3. Ανοσολογική απάντηση	45
I.3.4.4. Επιδημιολογία	45
I.3.4.5. Θεραπεία	46
I.3.4.6. Ενεργός ανοσοποίηση	46
I.3.4. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΕΡΠΗΤΟΪΟΣ 8 (HHV8)	47
I.3.4.1 Γενετικό υλικό του HHV8	47
I.3.4.2. Κλινικές απόψεις-Επιδημιολογία	48
I.3.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΕΡΠΗΤΟΪΩΝ – ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.	49
I.4. ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ ΚΑΙ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ	50
I.4.1. Ενεργοποίηση της προϊικής αλληλουχίας LTR	51
I.4.2. Αλληλεπίδραση σε επίπεδο υποδοχέων	53
I.4.3. Υποβοήθηση μέσω παραγωγής κυτταροκινών	54
I.4.4. Υποβοήθηση με τη δημιουργία “ψευδότυπων”	54
I.4.5. Δεδομένα από κλινικές μελέτες	56
I.4.6. Αλληλεπίδραση ερπητοϊών και HIV μετά την εφαρμογή της HAART	56

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	58
I. 5. Σκοπός της μελέτης	59
II. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	60
II.1. Δείγμα ασθενών	60
II.2. Υλικά και μέθοδοι	62
II.2.1. Συλλογή αίματος και επεξεργασία	62
II.2.2. Προσδιορισμός του αριθμού των CD4 T-κυττάρων και του HIV-1 ιϊκού φορτίου	62
II.2.3. Απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA από το περιφερικό αίμα ανίχνευση του ερπητικού DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)	62
II.2.3.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα.	62
II.2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)	63
II.2.4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	68
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
III.1. Σύγκριση Ερπητικής DNAαιμίας μεταξύ HIV-1 οροθετικών και HIV-1 οροαρνητικών ενηλίκων.	70
III.2. Σύγκριση μεμονωμένης και πολλαπλής Ερπητικής DNAαιμίας μεταξύ των διαφόρων υπο-ομάδων των HIV-1 οροθετικών ατόμων.	72
III.3. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην απάντηση στη HAART στην ομάδα των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία (ομάδα B).	72
III.4. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην απάντηση στη HAART στην ομάδα των ασθενών που άλλαξαν σχήμα HAART εξαιτίας ανεπαρκούς απάντησης στο πρώτο σχήμα (ομάδα A).	73
III.5. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητική DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART και έχουν αριθμό CD4+ κυτ.<200cells/μL [υπο-ομάδα B(minus)].	73
III.6. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση των ασθενών που	75

άλλαξαν HAART λόγω ανεπαρκούς ανταπόκρισης και έχουν αριθμό CD4+ κυτ<200cells/μL [υπο-ομάδα A(minus)]	
III.7. Επίπτωση της ερπητικής DNAαιμίας στην πορεία της HIV-1 λοίμωξης στους ασθενείς που μόλις ξεκινούν HAART (ομάδα B).	76
III.8. Επίπτωση της ερπητικής DNAαιμίας στην πορεία της HIV-1 λοίμωξης στους ασθενείς που άλλαξαν HAART λόγω ανεπαρκούς απάντησης (ομάδα A).	77
IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
IV.1. Η μεμονωμένη και πολλαπλή DNA/αιμία από HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8 σε HIV-1 θετικούς και αρνητικούς ενήλικες στον ελληνικό πληθυσμό.	79
IV.2. Η Ερπητική DNA/αιμία στους υποπληθυσμούς των HIV-1 θετικών ενηλίκων.	81
IV.3. Η σχέση μεταξύ της ερπητικής DNAαιμίας από HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8, μεμονωμένης ή πολλαπλής, και απάντησης στη HAART.	82
IV.4. Συμπεράσματα- μελλοντικές προοπτικές.	83
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84
VI. Panagiotakis SH, Spandidos DA et al. Concurrent CMV and EBV DNAemia Is Significantly Correlated with a Delay in the Response to HAART in Treatment-Naive HIV Type 1-Positive Patients. AIDS Research and Human Retroviruses 2007	95

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. 1. AIDS

Το AIDS αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις ΗΠΑ το καλοκαίρι του 1981, όταν τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) ανέφεραν την απροσδόκητη εμφάνιση πνευμονίας από *Pneumocystis carinii* σε πέντε προηγουμένως υγιείς ομοφυλόφιλους άνδρες στο Λος Άντζελες και σαρκώματος Kaposi σε 26 προηγουμένως υγιείς ομοφυλόφιλους άνδρες στο Λος Άντζελες και στη Νέα Υόρκη. Το 1983 ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) απομονώθηκε από ένα ασθενή με λεμφαδενοπάθεια και το 1984 καταδείχθηκε ως αίτιο του AIDS. Το 1985 αναπτύχθηκε μία ευαίσθητη ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού του ιού (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) η οποία βοήθησε ουσιαστικά να καθορισθεί η έκταση της πανδημίας του AIDS.

Υπολογίζεται ότι σήμερα οι μολυσμένοι ενήλικες από τον HIV είναι περίπου 37 εκατομμύρια ανά τον κόσμο και τα δύο τρίτα βρίσκονται στην κάτωθεν της Σαχάρας Αφρική. Το 50% των περιπτώσεων είναι γυναίκες, ενώ 2,5 εκατομμύρια υπολογίζονται τα παιδιά. Σύμφωνα με το Πρόγραμμα Ηνωμένων Εθνών για το AIDS (UNAIDS) οι νέες περιπτώσεις για το έτος 2003 υπολογίστηκαν στα 5 εκατομμύρια παγκοσμίως (>14000 νέες λοιμώξεις την ημέρα) και οι θάνατοι από τη νόσο στα 3 εκατομμύρια, καθιστώντας το την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως.

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις των Υπηρεσιών των Ηνωμένων Εθνών, η προσδοκώμενη διάρκεια ζωής όσων γεννηθούν το έτος 2015 στις επτά Αφρικανικές χώρες που έχουν επιπολασμό του HIV στους ενήλικες > 20% θα είναι κατά 32% περίπου χαμηλότερη από την προσδοκώμενη διάρκεια ζωής χωρίς το AIDS.

Ο χαρακτηρισμός του AIDS από τη στιγμή της αναγνώρισής του έως σήμερα έχει δεχτεί αρκετές τροποποιήσεις. Το ισχύον σύστημα ταξινόμησης, σύμφωνα με το CDC, ταξινομεί τους προσβεβλημένους από HIV εφήβους και ενήλικες σε τρεις κλινικές κατηγορίες με βάση την κλινική κατάσταση και τον αριθμό των CD4+ κυττάρων (πιν. 1 και 2). Σύμφωνα με το σύστημα αυτό κάθε άτομο με λοίμωξη από HIV και αριθμό CD4+ κυττάρων < 200/μL έχει AIDS εξ ορισμού ανεξαρτήτως της παρουσίας άλλων συμπτωμάτων ή ευκαιριακών λοιμώξεων. Άτομο που παρουσίασε κλινική κατάσταση της κατηγορίας B, ακόμη και μετά την αποδρομή αυτής δεν

μπορεί να καταταγεί ξανά στην κατηγορία A. Το ίδιο ισχύει και για την κατηγορία C σε σχέση με την κατηγορία B.

Πίνακας 1

Αναθεώρηση του Συστήματος Κατάταξης της Λοίμωξης από τον HIV (1993) και του χαρακτηρισμού της κατάστασης AIDS για εφήβους και ενήλικες*

	Κλινικές Κατηγορίες		
	A	B	C
Κατηγορίες	Χωρίς συμπτώματα	Με συμπτώματα	Καταστάσεις
CD4+T	Οξεία	Ούτε A ούτε B	Ενδεικτικές
κυττάρων	(Πρωτοπαθής) HIV ή PGL ^x	Καταστάσεις	του AIDS
>500/μL	A1	B1	C1
200-499/μL	A2	B2	C2
<200/μL	A3	B3	C3

*Οι σκιασμένες κατηγορίες αφορούν την κατάσταση του AIDS

^xPGL: Επιμένουσα γενικευμένη Λεμφαδενοπάθεια

Πίνακας 2: Κλινικές κατηγορίες της λοίμωξης από HIV

Κατηγορία A: Περιλαμβάνει μία ή περισσότερες από τις παρακάτω καταστάσεις σε έφηβο ή ενήλικα (> 13 ετών) με τεκμηριωμένη λοίμωξη HIV

Καταστάσεις των κατηγοριών B και C δεν πρέπει να έχουν εμφανιστεί

Ασυμπτωματική λοίμωξη από HIV

Επίμονη γενικευμένη Λεμφαδενοπάθεια

Οξεία (Πρωτοπαθής) Λοίμωξη από HIV με συνοδό νόσο ή ιστορικό οξείας λοίμωξης από HIV

Κατηγορία B: Περιλαμβάνει συμπτωματικές καταστάσεις σε μολυσμένο από HIV έφηβο ή ενήλικα και οι οποίες αφενός δε συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία C εφ' ετέρου πληρούν τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα κριτήρια: (1) Οι καταστάσεις αποδίδονται στην HIV ή είναι ενδεικτικές ελαττωματικής κυτταρικής ανοσίας, ή (2) οι καταστάσεις έχουν κλινική πορεία ή αντιμετώπιση που επιπλέκεται από τη λοίμωξη από τον HIV. Παραδείγματα, αλλά όχι πλήρης κατάλογος τέτοιων καταστάσεων είναι τα ακόλουθα

Βακιλική αγγειομάτωση

Στοματοφαρυγγική καντιντίαση

Αιδοιοκολπική καντιντίαση, επίμονη, συχνή, ή όχι καλά ανταποκρινόμενη στη θεραπεία

Δυσπλασία τραχήλου μήτρας (ήπια ή σοβαρή)/in situ καρκίνος τραχήλου

Γενικά συμπτώματα όπως πυρετός (38°C), ή διάρροια διάρκειας >1μήνα

Τριχωτή λευκοπλακία του στόματος

Έρπης ζωστήρας, που εκδηλώνεται σε δύο τουλάχιστον διαφορετικά επεισόδια, ή προσβάλλει δύο τουλάχιστον δερμοτόμια

Ιδιοπαθής Θρομβοκυττοπενική Πορφύρα

Λιστερίωση

Φλεγμονώδης νόσος της πύελου, ειδικά εάν επιπλέκεται με σαλπυγγο-ωοθηκικό απόστημα

Περιφερική νευροπάθεια

Κατηγορία C: καταστάσεις που περιλαμβάνονται στον εκτεταμένο ορισμό του AIDS

Καντιντίαση των βρόγχων, της τραχείας, των πνευμόνων

Καντιντίαση του οισοφάγου

Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, διηθητικός

Κοκκιδιομύκωση, διάσπαρτη ή εξωπνευμονική

Κρυπτοκκοκίωση, εξωπνευμονική

Κρυπτοσποριδίαση του εντέρου, χρόνια (διάρκειας >1 μήνα)

CMV νόσος από (άλλη από ηπατική, του σπληνός ή των λεμφαδένων)

CMV, αμφιβληστροειδίτιδα (με απώλεια όρασης)

Εγκεφαλοπάθεια σχετιζόμενη με τον HIV

Ερπητικές λοιμώξεις: χρόνια έλκη (διάρκειας >1μήνα), ή βρογχίτιδα, πνευμονία ή οισοφαγίτιδα

Ιστοπλάσμωση, διάσπαρτη ή εξωπνευμονική

Ισοσπορίαση, χρόνια του εντέρου (διάρκειας >1μήνα)

Σάρκωμα Kaposi

Λέμφωμα Burkitt (ή αντίστοιχο με άλλη ονομασία)

Λέμφωμα, πρωτοπαθές ή του εγκεφάλου

Σύμπλεγμα λοίμωξης από Μυκοβακτηρίδιο avium ή M. Kansasii, διάσπαρτο ή εξωπνευμονικό

Μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, με οποιαδήποτε εντόπιση - πνευμονική ή εξωπνευμονική

Μυκοβακτηρίδιο, άλλο είδος ή μη αναγνωρισθέν είδος, διάσπαρτο ή εξωπνευμονικό

Pneumocystis carinii, πνευμονία

Προοδευτική πολυεστιακή λευκοεγκεφαλοπάθεια

Σημιαμία από Σαλμονέλα, υποτροπιάζουσα

Τοξοπλάσμωση του εγκεφάλου

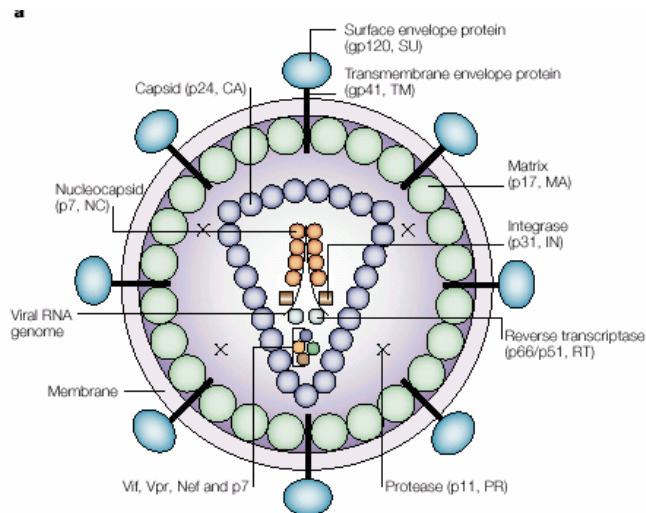
Σύνδρομο απίσχνανσης λόγω του HIV.

1.2. HIV

Ο αιτιολογικός παράγοντας του AIDS είναι ο HIV, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των *Retroviridae*, που πήρε το όνομά της από το ένζυμο την αντίστροφη μεταγραφάση (λατινικά *retro* σημαίνει προς τα πίσω-αντίστροφα) που διαθέτει, και στο γένος *Lentivirus* (λατινικά *lentus* σημαίνει αργά). Οι ιοί της ομάδας αυτής χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός vase ή cone-shaped nucleoid, την απουσία ογκογόνου ικανότητας καθώς και την μακρά ύπουλη έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Το συνηθέστερο αίτιο της νόσου από τον HIV σε ολόκληρο τον κόσμο είναι ο ιός HIV-1. Ο HIV-2 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά σε ασθενείς της Δυτ. Αφρικής το 1986, αλλά σήμερα συναντάται και αυτός σε ολόκληρο τον κόσμο, με μικρότερη όμως συχνότητα. Μεταξύ τους τα 2 είδη, HIV-1 και HIV-2 εμφανίζουν περίπου 40% ομολογία στο γένωμά τους, ενώ ειδικά για τον HIV-1 υπάρχει ένας συνεχώς αυξανόμενος κατάλογος υποτύπων (υπότυποι A έως F και η ομάδα O). Οι διαφορετικοί υπότυποι, αν και μοιράζονται αρκετά κοινά μορφολογικά, βιοχημικά και μοριακά χαρακτηριστικά, δείχνουν συνήθως διαφορετικές κυτταρικές προτιμήσεις.

1.2.1 Μορφολογία του HIV

Το ισωμάτιο (virion) του HIV, όπως αποκαλύπτεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχει εικοσαεδρική σχεδόν σφαιρική δομή διαμέτρου 100-150nm, με πολυάριθμες εξωτερικές άκανθες, που δημιουργούν οι δύο κύριες πρωτείνες του περιβλήματος (ϊικός φακέλος), η εξωτερική gp120 και η διαμεμβρανική gp41. Η εσωτερική επιφάνεια του ιϊκού φακέλου συνδέεται με την πρωτεΐνη p17 του στρώματος (matrix). Το ισωμάτιο εκβλαστάνει από την επιφάνεια του προσβεβλημένου κυττάρου ενσωματώνοντας στη λιπιδική του διπλοστοιβάδα διάφορες πρωτείνες του ξενιστή, μεταξύ άλλων αντιγόνα του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και II. Το στρώμα περιβάλλει τον κωνικό πρωτεϊνικό πυρήνα (p24, p7 και p9), που περιέχει τα δύο μόρια ssDNA με τη μορφή νουκλεοπρωτεΐνης. Συνδεδεμένα με το γένωμα του ιού είναι τα ένζυμα του ιού αντίστροφη μεταγραφάση, ιντεγκράση και πρωτεάσες.



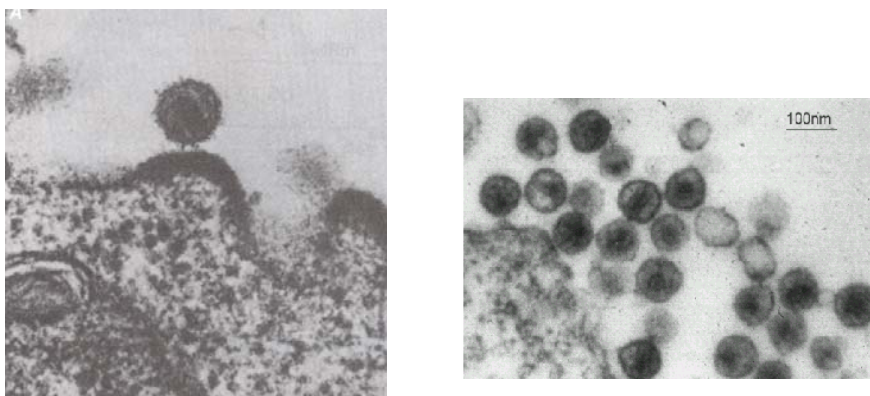
Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός HIV-1 ιοσωματίου (Nature Reviews, Robinson *et al.*, 2002)

1.2.2 Βιολογικός κύκλος του HIV

Ο HIV είναι ένας RNA ιός που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αντίστροφης μεταγραφής του γενωμικού του RNA σε DNA μέσω δράσης του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (τρανσκριπτάση) που εμπεριέχεται στο μολυσματικό ιοσωμάτιο.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος του ιού αρχίζει με την προσκόλληση της πρωτεΐνης gp120 στον υποδοχέα της, CD4 μόριο στην επιφάνεια των T-βοηθητικών λεμφοκυττάρων, μονοκυττάρων/μακροφάγων και δενδριτικών κυττάρων/κυττάρων Langerhans. Η προσκόλληση διευκολύνεται μέσω ομάδας συνυποδοχέων του συμπλέγματος της G-πρωτεΐνης, κυριότεροι εκ των οποίων είναι οι CCR5 και CXR4. Με τη σύνδεση της πρωτεΐνης gp120 στο μόριο CD4 πραγματοποιείται αλλαγή της μορφολογίας του ιϊκού περιβλήματος και σύντηξη του με τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή με τη μεσολάβηση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης gp41. Μετά τη σύντηξη, το γενωμικό RNA του HIV αποκαλύπτεται και εσωτερικοποιείται στο κύτταρο-ξενιστή και η αντίστροφη μεταγραφάση καταλύει την μεταγραφή του προς DNA διπλής έλικας. Το νεοσχηματισμένο DNA μεταφέρεται στον πυρήνα του ξενιστή κυττάρου, όπου μέσω του ενζύμου ιντεγκράση, που επίσης κωδικοποιεί ο ιός, ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου. Ο προιός όπως καλείται στη φάση αυτή, μπορεί να παραμείνει μεταγραφικά αδρανής (σε λανθάνουσα κατάσταση) ή να εκδηλώσει διάφορα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ή μέχρι και ενεργό παραγωγή του ιού.

Η ενεργοποίηση του κυττάρου ξενιστή παίζει σημαντικό ρόλο στο βιολογικό κύκλο του HIV και αποτελεί τη βάση της παθογένειας της νόσου του HIV. Η ενεργοποίηση του ιού από την λανθάνουσα κατάσταση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση πολλών κυτταρικών και ιικών παραγόντων. Σημαντικοί για την έναρξη της μεταγραφής είναι το προϊόν του ιϊκού γονιδίου *Vpr* και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες *NF-kB*, *AP-1*, *Spl*, και *NFAT*. Ο *NF-kB* συνδέεται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες της προϊικής *LTR* και επάγει την έκφραση του *Tat*, το προϊόν του οποίου (*p14*) στη συνέχεια συνδέεται με την περιοχή *tar* της *LTR* και ανισχύει την μεταγραφή όλων των υπολοίπων ιϊκών γονιδίων. Άλλα πρώιμα RNA μεταγραφικά προϊόντα του ιού κωδικοποιούν τα γονίδια *Rev* και *Nef*. Το γονίδιο *Rev* βοηθάει στη μετακίνηση των ιϊκών RNAs προς τα κυτταρικά ριβοσώματα για να φτιαχτούν οι ενζυμικές πρωτεΐνες *Vif*, *Vpr* και *Vru*. Η τελευταία επάγει την απελευθέρωση του ιού. Τελευταία θα φτιαχτούν τα προϊόντα των γονιδίων *Gag* και *Env*, που είναι δομικές πρωτεΐνες και *Pol* που κωδικοποιεί την απαραίτητη για την είσοδο του ιού στο κύτταρο-ξενιστή πρωτεάση (*p12*), την άναστροφη τρανσκριπτάση και ιντεγκράση. Το σωματίδιο του ιού σχηματίζεται με τη συναρμολόγηση όλων των δομικών πρωτεϊνών, ενζύμων και γονιδιακού RNA πάνω στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η εκβλάστηση των παραγόμενων ιοσωματίων διαμέσου ειδικών περιοχών της κυτταρικής διπλοστοιβάδας, γνωστών ως λιπιδικών πελμάτων, από τις οποίες το ιοσωμάτιο αποκτά τον εξωτερικό του φάκελο. Ένας πλήρης κύκλος αναδιπλασιασμού διαρκεί 24 ώρες.



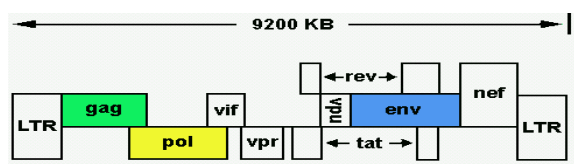
Εικόνα 2

Ιοσωμάτια HIV-1 τη στιγμή της απελευθέρωσής τους από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή (NCBI database)

Κάθε στάδιο του παραγωγικού κύκλου του HIV αποτελεί στόχο θεραπευτικής παρέμβασης. Η αντίστροφη μεταγραφάση και η πρωτεάση αποδείχθηκαν κλινικώς ευπαθείς στόχοι στη δράση των φαρμάκων. Προσφάτως οι αναστολείς σύντηξης ιού-κυττάρου έχουν δώσει καλά αποτελέσματα, ενώ οι αναστολείς της ιικής ιντεγκράσης υποβάλλονται τώρα σε κλινικές μελέτες. (Fauci & Clifford Lane 1998)

1.2.3. Γονιδίωμα του HIV

Ο HIV-1 διαθέτει γονίδια που κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιοσωματίου: **gag** κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του πυρήνα (συμπεριλαμβανομένου του αντιγόνου p24), **pol** για τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση και ιντεγκράση και **env** για τις γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος. Επίσης τα γονίδια **tat**, **rev**, **nef**, **vif**, **vpr** και **vpu** που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων και περιοχές όπως η **LTR** (long terminal repeat) επίσης ρυθμιστική της έκφρασης άλλων γονιδίων. Η κύρια διαφορά μεταξύ του γονιδιώματος του HIV-1 και του HIV-2 είναι ότι ο HIV-2 στερείται του γονιδίου **vpu** και περιέχει ένα γονίδιο **vpx** που δεν έχει ο HIV-1 (εικόνα 3, πίνακας 3) (Collier & Oxford 2006)



Εικόνα 3.
Γενωμική οργάνωση του HIV
(NCBI data base)

1.2.4. Μοριακή ετερογένεια του HIV

Ο HIV μπορεί να μεταλλαχθεί με διάφορους τρόπους, στους οποίους περιλαμβάνονται η αντικατάσταση βάσης, οι ενθέσεις και οι απαλείψεις, ο ανασυνδυασμός και η αυξομείωση των θέσεων γλυκοζυλίωσης. Ο βαθμός της ποικιλότητας μέσα στις περιοχές των πρωτεϊνών επηρεάζεται από την ανοσολογική πίεση και από τους λειτουργικούς περιορισμούς επί αυτών των πρωτεϊνών. Υπάρχουν τρεις ομάδες του HIV-1: η ομάδα M, O και N. Η ομάδα M περιλαμβάνει εννέα υποτύπους ή κλάδους που χαρακτηρίζονται με τα γράμματα A, B, C, D, F, H, J και K, καθώς και έναν αυξανόμενο αριθμό κυκλοφορούντων ανασυνδυασμένων μορφών (CRF, circulating recombinant forms). Οι ιοί του υποτύπου C της ομάδας M

αποτελούν τη συνηθέστερη μορφή παγκοσμίως. Ο βασικός υπότυπος στην Ευρώπη και στην Αμερικανική ήπειρο είναι ο B.

Πίνακας 3: Γονίδια του HIV και πρωτεΐνες (Human Virology, 2006)

Γονίδια	Πρωτεΐνες	Λειτουργία
Δομικά		
Gag	Matrix p17	Δομική
	Capsid p24	Δομική στον κωνικό πυρήνα
	Nucleocapsid p7, p6	Δομική
Pol	Protease p12	Ένζυμο
	Reverse transcriptase p66, p51	Ένζυμο
	Integrase p32	Ένζυμο
Env	Envelope glycoprotein 120	Δομική
Ρυθμιστικά		
tat	P14	Ενεργοποιεί τη μεταγραφή
Rev	P19	Μεταφέρει το mRNA στο κυτταρόπλασμα
Vif	P24	Προάγει τη λοιμογόνο ικανότητα του ιού
Nef	P27	Προάγει τη λοιμογόνο ικανότητα του ιού, την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και μειώνει τα επίπεδα μορίων MHC κλάσης I
Vpr	P16	Προάγει την απελευθέρωση του ιού
Vpr	P15	Προάγει την είσοδο του ιού στον πυρήνα του κυττάρου, διατηρεί τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G ₂
Vpx	P14	Προάγει τον αναδιπλασιασμό του ιού

I.2.5. Μετάδοση του HIV

Η κυριότερη οδός μετάδοσης του HIV παγκοσμίως είναι η ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή και αυτό είναι ιδιαίτερα ακριβές για τις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου ο αριθμός των μολυσμένων ανδρών και γυναικών είναι περίπου ίσος. Στις ανεπτυγμένες χώρες ο μεγαλύτερος αριθμός μολυσμένων ατόμων είναι ομοφυλόφιλοι άνδρες, η σύνθεση ωστόσο των ασθενών μετατίθεται βαθμιαία προς τους ετεροφυλόφιλους και τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών.

Στο τέλος του 2005, οι Ελληνικές Υπηρεσίες είχαν καταγράψει ένα συνολικό αριθμό 7718 ατόμων με μόλυνση από HIV. Στον αριθμό αυτό συμπεριλαμβάνοντο 2669 άνθρωποι που είχαν αναπτύξει AIDS από τους οποίους 1484 είχαν πεθάνει. Μόνο για το χρόνο 2005 καταγράφησαν 560 νέες περιπτώσεις HIV μόλυνσης, 101 νέες περιπτώσεις AIDS και 50 θάνατοι οφειλόμενοι σε AIDS. Ο τρόπος μετάδοσης ήταν άγνωστος στο 39% των περιπτώσεων μόλυνσης στο έτος 2005. Από το σύνολο των κρουσμάτων με γνωστή την οδό μετάδοσης, το ποσοστό των ομοφυλόφιλων ανδρών ήταν 51%, η ετεροφυλοφιλική μετάδοση αναφέρετο στο 43% και η μόλυνση με ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών στο 6%. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (91%) η ηλικία ήταν μεγαλύτερη των 25 ετών με πιο συχνές ηλικίες τα 30-34 έτη.

I.2.5. 1. Παθογένεια της λοίμωξης από HIV

Το χαρακτηριστικό στοιχείο της νόσου που προκαλεί ο HIV είναι η σοβαρή ανοσοανεπάρκεια, η οποία προέρχεται κυρίως από την προοδευτική ποσοτική και ποιοτική ανεπάρκεια της υποομάδας των βοηθητικών ή επαγωγών T λεμφοκυττάρων.

Μολονότι έχει καταδειχθεί *in vitro* ένας αριθμός μηχανισμών υπεύθυνων για την κυτταροπαθογένεια και την ανοσιακή δυσλειτουργία των CD4+ κυττάρων, ιδίως η απευθείας προσβολή και καταστροφή των με την ενεργοποίηση του HIV, παραμένει ασαφές ποιοί μηχανισμοί ή συνδυασμοί μηχανισμών είναι πρωτογενώς υπεύθυνοι για την προοδευτική εξάλειψη και την διαταραχή της λειτουργίας των CD4+ κυττάρων *in vivo*.

Όταν ο αριθμός των CD4+ κυττάρων μειωθεί κάτω από ένα κριτικό επίπεδο, ο ασθενής διατρέχει μεγάλο κίνδυνο να αναπτύξει ευκαιριακές λοιμώξεις, καθώς και νεοπλασίες, που είναι χαρακτηριστικές του AIDS. Ορισμένα μάλιστα νοσήματα σχετιζόμενα με το AIDS, όπως είναι το σάρκωμα Kaposi (KS) και οι νευρολογικές διαταραχές, δεν μπορούν να ερμηνευτούν επαρκώς από τις ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις του ιού, αφού μπορεί να εκδηλωθούν και πριν από την ανάπτυξη της βαρείας ανοσιακής ανεπάρκειας.

Η τυπική κλινική πορεία σε κάποιον μολυσμένο από τον HIV που δε λαμβάνει θεραπεία περιλαμβάνει τα εξής

1.2.5.2. Πρωτογενής λοίμωξη, αρχική ιαιμία και διασπορά του HIV

Το φαινόμενο της διασποράς του ιού στα λεμφικά όργανα είναι σημαντικός παράγοντας για την εγκατάσταση χρόνιας και επίμονης λοίμωξης.

Ο ιός που εισέρχεται απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος μέσω μετάγγισης, χρήσης μολυσμένων βελονών, τραυματισμών και από τη μητέρα στο έμβρυο, πιθανά απομακρύνεται από την κυκλοφορία και κατακρατείται στο σπλήνα και τα άλλα λεμφικά όργανα, στα κύτταρα του λεμφικού ιστού και στις παραφυάδες των λεμφοξυδιακών δενδριτικών κυττάρων, όπου αναπαράγεται μέχρι ένα κρίσιμο επίπεδο και στη συνέχεια ακολουθεί εκρηκτική ιαιμία, με την οποία διασπείρεται σε ολόκληρο το σώμα. Τα παγιδευμένα ιοσωμάτια χρησιμεύουν ως συνεχής πηγή κυτταρικής ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως είναι η ιντερλευκίνη IL-1β, ο παράγων νέκρωσης των όγκων TNF-α και η IL-6, οι οποίες αυξάνουν τον ιϊκό πολλαπλασιασμό στα μολυσμένα κύτταρα.

Όταν ο ιός εισβάλλει τοπικά στον οργανισμό του ξενιστή μέσω του σπέρματος, των κολπικών υγρών ή του μητρικού γάλακτος φαίνεται πως τα δενδριτικά κύτταρα του κόλπου, του ορθού, της ουρήθρας ή της ανώτερης γαστρεντερικής οδού, παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της λοίμωξης από αυτόν. Έχει φανεί in vitro ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να συγκρατήσουν στην επιφάνειά τους τα μολυσματικά σωματίδια του ιού επί ημέρες και από εκεί να προσβάλουν στη συνέχεια τα CD4+ κύτταρα στόχους. Στα κύτταρα αυτά μέσα ο ιός αναπαράγεται με εντατικούς ρυθμούς, πριν εκδηλωθεί η ειδική ανοσιακή απάντηση, με αποτέλεσμα στη συνέχεια

μία έκρηξη ιαιμίας με επακόλουθη διασπορά του ιού σε άλλα λεμφικά όργανα, εγκέφαλο και άλλους ιστούς.

Σχεδόν όλοι οι ασθενείς στη διάρκεια της πρωτογενούς μόλυνσης αναπτύσσουν κάποιο βαθμό ιαιμίας, η οποία συμβάλλει στη διασπορά του ιού, ακόμη κι όταν παραμένουν ασυμπτωματικοί. Η διάσωση του ιού κατά την πρωτογενή λοίμωξη επιτρέπει το σχηματισμό μιας μεγάλης δεξαμενής κυττάρων με λανθάνουσα μόλυνση, τα οποία είναι αδύνατον να εξαλειφθούν με τα ειδικά για τον ιό CD8⁺ T κυτταρολυτικά κύτταρα (CTL).

Το επίπεδο της ιαιμίας στην πρωτογενή μόλυνση από τον ιό δε φαίνεται να καθορίζει απαραίτητα την πρόοδο της νόσου. Το επίπεδο της ιαιμίας, αφού σταθεροποιηθεί η νόσος μετά από ένα έτος περίπου, μπορεί να συσχετιστεί με την ταχύτητα προόδου της νόσου. Τα μολυσμένα από τον HIV άτομα, που έχουν χαμηλό σημείο αναφοράς στους έξι μήνες έως ένα χρόνο, προχωρούν στο AIDS πολύ βραδύτερα απ' ότι άτομα που έχουν υψηλό σημείο αναφοράς κατά το χρόνο εκείνο (Mellors 1996).

1.2.5.3. Εγκατάσταση χρόνιας και επίμονης λοίμωξης

Η εγκατάσταση χρόνιας λοίμωξης αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο της νόσου από HIV, κατά τη διάρκεια της οποίας διατηρείται σχεδόν πάντα κάποιος βαθμός αναπαραγωγής του ιού. Η εγκατάσταση χρόνιας λοίμωξης βασίζεται στην ικανότητα του ιού να διαφεύγει του ελέγχου και της εξουδετέρωσης του ανοσοποιητικού συστήματος (CD8⁺ CTL και εξουδετερωτικών αντισωμάτων) μέσω της ικανότητάς του να μεταλλάσσεται. Άλλοι μηχανισμοί διαφυγής των CD8⁺ T κυτταρολυτικών κυττάρων είναι μέσω ελάττωσης των μορίων HLA τάξης I παρουσίασης αντιγόνων από την επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων, μέσω της πρωτεΐνης Nef του ιού, και μέσω συγκέντρωσης των μολυσμένων κυττάρων στόχων σε περιοχές προφυλαγμένες από το ανοσοποιητικό σύστημα όπως το ΚΝΣ. Μηχανισμός αποφυγής της χημικής ανοσίας αποτελεί η προσαρμοστική απόκρυψη θέσεων σύνδεσης με υποδοχείς για να αποτραπεί η εξουδετέρωση από αντισώματα.

Παρά τον περιορισμό της ιαιμίας σε <50 αντίγραφα ιικού RNA ανά ml έως και επί 5 έτη με ισχυρούς συνδυασμούς πολλών αντιρετροϊκών φαρμάκων, το εν λόγω απόθεμα κυττάρων με λανθάνουσα μόλυνση παραμένει και μπορεί να δώσει ιούς ικανούς για αναπαραγωγή. Επιπλέον, το απόθεμα αυτό ανανεώνεται με

περιοδικές ανακάμψεις της ιικής αναπαραγωγής, ενώ οι ασθενείς τελούν υπό θεραπεία, και οπωσδήποτε κατά τη διάρκεια διακοπών της θεραπείας για εβδομάδες ή μήνες, οπότε παρατηρούνται σοβαρές αναζωπυρώσεις.

Έχει διαπιστωθεί ότι αρκετές γενετικές μεταλλάξεις στους υποδοχείς CCR5, CXCR4, ακόμα και σε μόρια HLA τάξης I (A, B και C) συντελούν στην καθυστέρηση της προόδου της νόσου από τον HIV. Άλλη αιτία καθυστέρησης μπορεί να αποτελούν ελαττώματα σε γονίδια του ιού, όπως έχουν αναφερθεί για το γονίδιο nef.

Κατά τη διάρκεια της ασυμπτωματικής περιόδου της λοίμωξης, η μέση ταχύτητα μείωσης των CD4+ κυττάρων είναι περίπου 50/μl το χρόνο.

1.2.5.4. Προχωρημένη νόσος από HIV

Στους ασθενείς, που δε λαμβάνουν θεραπεία και σ' αυτούς που η θεραπεία δεν περιόρισε αρκετά την αναπαραγωγή του ιού, μετά από κάποια χρονική περίοδο, συνήθως ετών, ο αριθμός των CD4+ κυττάρων πέφτει κάτω από ένα κριτικό όριο (200/μl) και ο ασθενής γίνεται πολύ ευάλωτος σε ευκαιριακές λοιμώξεις. Η απομείωση των CD4+ κυττάρων συνεχίζει να είναι προοδευτική και συνεχής μέχρι τα CD4+ κύτταρα να πέσουν στα 10/ μl ή ακόμα και στο μηδέν και όμως ο ασθενής να επιβιώνει επί μήνες ή επί έτη. Η κατάσταση αυτή απαντάται όλο και πιο συχνά, όσο η θεραπεία γίνεται περισσότερο επιθετική και συνοδεύεται με χορήγηση προφυλακτικής αγωγής εναντίον επικίνδυνων ευκαιριακών λοιμώξεων. Τελικά οι ασθενείς που φθάνουν σ' αυτή τη σοβαρότατη κατάσταση ανοσοκαταστολής συνήθως υποκύπτουν σε ευκαιριακές λοιμώξεις ή νεοπλασίες.

1.2.5.5. Ρόλος της κυτταρικής ενεργοποίησης στην παθογένεια του HIV.

Η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος στην είσοδο κάθε ξένου αντιγόνου στον οργανισμό αποτελεί ουσιώδες στοιχείο της σωστής ανοσολογικής απάντησης. Η ασυνήθης ανοσολογική ενεργοποίηση αποτελεί το χαρακτηριστικό της λοίμωξης από τον HIV και το βασικό στοιχείο της παθογένειας της νόσου. *Στη λοίμωξη από HIV το ανοσοποιητικό σύστημα παραμένει μονίμως ενεργοποιημένο εξαιτίας της εμμονής του ιϊκού πολλαπλασιασμού καθ' όλη τη διάρκεια της νόσου.* Αυτή η ενεργοποιημένη κατάσταση αντικατοπτρίζεται στην υπερδραστηριότητα των

Β κυττάρων, που οδηγεί σε υπεργαμμασφαιριναιμία, σε αυθόρμητο πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων, ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, στην εμφάνιση δεικτών ενεργοποίησης επάνω στα CD4+ και CD8+ κύτταρα, σε υπερπλασία των λεμφαδένων ιδίως στα πρώιμα στάδια της νόσου, σε αυξημένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, στα αυξημένα επίπεδα νεοπτερίνης, β2-μικροσφαιρίνης, INF και διαλυτών υποδοχέων της IL-2, καθώς και σε φαινόμενα αυτοανοσίας. Ακόμη και απουσία άμεσης μόλυνσης κυττάρου στόχου, οι πρωτεΐνες του περιβλήματος του HIV μπορούν να αλληλεπιδράσουν με κυτταρικούς υποδοχείς, όπως μόρια CD4 και υποδοχείς χημειοκινών και να ενεργοποιήσουν μηχανισμούς απόπτωσης.

Εκτός από τους ενδογενείς παράγοντες- κυτταροκίνες υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες, όπως άλλα μικρόβια ή ιοί, που συνδέονται με αυξημένη κυτταρική ενεργοποίηση και μπορούν να ενισχύσουν τον πολλαπλασιασμό του HIV και να επηρεάσουν σοβαρά την παθογένειά του. Η συλλοίμωξη ή ταυτόχρονη επιμόλυνση κυττάρων από τον HIV και άλλους ιούς ή ιϊκά γονίδια κατέδειξε ότι ορισμένοι ιοί, όπως ο HSV τύπου 1, ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), οι ερπητοϊοί HHV-6 και HHV-8, ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο HBV, ο αδενοϊός, ο ιός της ψευδολύσσας και ο HTLV-I μπορούν να ενισχύσουν τη μολυσματικότητα του HIV. Μερικά μικρόβια, όπως το Mycoplasma, έχει αναφερθεί ότι έχουν το ίδιο αποτέλεσμα. Η προσβολή από νηματώδεις σκώληκες διαπιστώθηκε ότι προκαλεί ανοσιακή ενεργοποίηση που διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό του HIV, ενώ η θεραπεία τους ελάττωσε την αιμία. Άτομα που έχουν μολυνθεί από τον HIV έχουν περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν ενεργό φυματίωση, αποδείχθηκε όμως ότι και η ενεργός φυματίωση επιταχύνει την πορεία της λοίμωξης από τον HIV. Βρέθηκε ότι η αιμία ανέρχεται σημαντικά με την ενεργό φυματίωση (TB), σε σύγκριση με τα προ της TB επίπεδα και με τα επίπεδα μετά την επιτυχή θεραπεία της ενεργού TB.

Η επίμονη ανοσολογική ενεργοποίηση μπορεί να επιφέρει ποικίλες καταστροφικές συνέπειες. Από ιολογική άποψη η αντίστροφη μεταγραφή, η ενσωμάτωση και η εξάπλωση του ιού είναι πιο αποδοτικές σε ενεργοποιημένα κύτταρα. Η ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος επάγει επίσης την εξαφάνιση κυττάρων με προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) και την έκκριση κυτταροκινών, που μπορούν να αυξήσουν τη λοιμογόνο ικανότητα του HIV.

Η απόπτωση αποτελεί μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και φυσιολογικό μηχανισμό εκκαθάρισης κυττάρων, όπως π.χ. ενεργοποιημένων ώριμων περιφερικών T λεμφοκυττάρων στο τέλος μιας ανοσολογικής απάντησης, μηχανισμό

θανάτωσης κυτταρικών στόχων των κυτταροτοξικών T και NK κυττάρων, όπως κυττάρων μολυσμένων με ιούς ή καρκινικά κύτταρα, και τέλος κυττάρων φλεγμονωδών που βρίσκονται σε ανοσο-προνομιούχα σημεία όπως είναι ο οφθαλμός.

Εικάζεται ότι στη λοίμωξη από τον HIV μεταδίδονται προς τα CD4+ κύτταρα διαδοχικά σήματα ενεργοποίησης, οδηγώντας στη συνέχεια τα κύτταρα σε απόπτωση (AICD-Activation Induced Cell Death). Η σύνδεση του μορίου CD4 με την πρωτεΐνη gp120 ή με συμπλέγματα gp120/anti-gp120 επιδίδει το πρώτο από τα δύο σήματα που απαιτούνται για την απόπτωση (Cicala 1999). Το δεύτερο σήμα μεταδίδεται με αντιγόνο μέσω του υποδοχέα TCR των T κυττάρων. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, δεν είναι απαραίτητη η άμεση μόλυνση των CD4+ T κυττάρων από τον ιό ώστε να συμβεί η απόπτωση. Από την άλλη πλευρά πάλι έχει παρατηρηθεί ότι σε μολυσμένα από τον ιό CD4+ κύτταρα υπάρχουν μεταβολές της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης που επίσης σχετίζονται με απόπτωση. Οι μηχανισμοί, που εμπλέκονται σ' αυτή τη διεργασία, περιλαμβάνουν την αύξηση των αποπτωτικών υποδοχέων θανάτου Fas (συμπληρωματικό τους μόριο ο αποπτωτικός παράγοντας FasL και διαμεσολαβητικό μόριο το FADD προκειμένου για την ενεργοποίηση του μονοπατιού των κασπασών), την ελάττωση των επιπέδων της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (η πρωτεΐνη αυτή εμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, που αποτελεί ενδοκυττάριο επαγωγέα της απόπτωσης και αναστέλλει τη μεταγραφή του FasL, που επίσης επάγει απόπτωση) και την ενεργοποίηση των εξαρτώμενων από την κυκλίνη κινασών. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων Tat, Env, και Vpr έχουν συσχετιστεί σημαντικά με την απόπτωση των CD4+ T κυττάρων. Αντίθετα η πρωτεΐνη Nef αποδείχθηκε ότι δε διαθέτει αποπτωτικές ιδιότητες. Μελέτες έχουν δείξει ότι απόπτωση της λοίμωξης από τον HIV πλήττει "παρατυχόντα" κύτταρα όπως τα CD8+ T κύτταρα και B κύτταρα, μαζί με τα CD4+ T κύτταρα. Η απόπτωση ανοσοϊκανών κυττάρων συμβάλλει στις ανοσιακές ανωμαλίες της νόσου, πρόκειται όμως μάλλον για μή ειδικό μηχανισμό που απλά αντικατοπτρίζει την ασυνήθη κατάσταση του ανοσολογικού συστήματος

1.2.5.6. Το δίκτυο των κυτταροκινών στην παθογένεια του HIV

Οι κυτταροκίνες που επάγουν την έκφραση του HIV περιλαμβάνουν τις IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, TNF- α , TNF- β , M-CSF, GM-CSF. Μεταξύ αυτών οι πιο ισχυροί και πιο σταθεροί επαγωγείς της έκφρασης του HIV είναι οι προφλεγμονώδεις

κυτταροκίνες TNF- α , IL-1 β και IL-6. Οι μοριακοί μηχανισμοί της ρύθμισης του HIV είναι καλύτερα κατανοητοί στην περίπτωση του TNF- α , ο οποίος ενεργοποιεί τις NF- κ B πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές της έκφρασης του HIV.

1.2.6. Διάγνωση της λοίμωξης από HIV

Η τυπική εξέταση για τον HIV βασίζεται στην τεχνική ELISA, αποκαλούμενη επίσης και ανοσοενζυματικός προσδιορισμός (EIA, Enzyme Immunoassay), η οποία διαθέτει ευαισθησία μεγαλύτερη του 99,5%. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει αντισώματα εναντίον της ιϊκής πρωτεΐνης env. Δεν είναι η καλύτερη όμως από πλευράς ειδικότητας. Η συνηθέστερη επιβεβαιωτική δοκιμασία είναι σε στύπωση κατά Western. Σε ασθενή με θετική ή αμφίβολη EIA και αρνητικό στύπωμα Western μπορεί με βεβαιότητα να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το αποτέλεσμα της EIA ήταν ψευδώς θετικό. Τα αντισώματα εναντίον των πρωτεϊνών του ιού εμφανίζονται 6-12 μήνες μετά τη μόλυνση και 3-6 εβδομάδες μετά την ανάπτυξη της ιαιμίας. Σε ασθενείς με θετική ή απροσδιόριστη EIA και απροσδιόριστο στύπωμα Western οι τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιϊκού RNA στο πλάσμα όπως είναι η RT-PCR ή η μέθοδος bDNA

1.2.7. Εργαστηριακή παρακολούθηση του ασθενή με λοίμωξη από HIV

Οι μετρήσεις των CD4+ T λεμφοκυττάρων και του ιϊκού RNA στον ορό ή στο πλάσμα των ασθενών αποτελούν παραμέτρους για την πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία. Ενώ ο αριθμός των CD4+ κυττάρων παρέχει πληροφορίες για την τρέχουσα ανοσολογική κατάσταση του ασθενή, το επίπεδο του ιϊκού RNA προβλέπει τι θα συμβεί στον αριθμό των CD4+ κυττάρων στο εγγύς μέλλον και επομένως την κλινική πορεία του ασθενή.

Ο αριθμός των CD4+ T κυττάρων υπολογίζεται με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής και από τον ολικό αριθμό των λευκοκυττάρων και τον λευκοκυτταρικό τύπο.

Για τη μέτρηση των επιπέδων του RNA του HIV στο πλάσμα ή στον ορό χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της RT-PCR και η bDNA. Με την τεχνική RT-PCR, μετά από χορήγηση DNAάσης παρασκευάζονται αντίγραφα cDNA από όλα τα είδη

του RNA που κυκλοφορούν στο πλάσμα, επομένως και από το RNA του HIV. Το cDNA στη συνέχεια ενισχύεται με PCR και ταυτοποιείται με τη χρήση ειδικών εκκινητών. Η μέθοδος bDNA περιλαμβάνει τη χρήση ενός συστήματος σε στερεή φάση για τη σύλληψη νουκλεϊκών οξέων και ενίσχυση σημάτων μέσω διαδοχικών υβριδιώσεων των νουκλεϊκών οξέων, ώστε να ανιχνευθούν μικροποσότητες RNA. Σήμερα οι τεχνικές bDNA δίνουν τις ίδιες τιμές με αυτές της RT-PCR, και με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης, που προηγείται και εξασφαλίζει ακόμα μεγαλύτερη συμπύκνωση του πλάσματος, μπορούν να ανιχνεύσουν μέχρι και 50-75 αντίγραφα/mL

1.2.8.1. Αντιρετροϊκή θεραπεία της HIV λοίμωξης

Τα φάρμακα για τη θεραπεία της λοίμωξης από τον HIV ανήκουν σε τρεις κατηγορίες. Φάρμακα που αναστέλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, φάρμακα αναστολείς της πρωτεάσης του ιού και φάρμακα που εμποδίζουν την είσοδο τού ιού στο κύτταρο του ξενιστή.

α) Νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης. (NRTIs, Nucleoside RT Inhibitors).

Η **ζιδοβουδίνη (AZT)** ήταν το πρώτο φάρμακο της κατηγορίας αυτής. Όπως ισχύει και για την ακυκλοβίρη, το μόριο πρέπει να φωσφορυλιωθεί ενδοκυττάρια για να γίνει ενεργό. Αναστέλλει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και με τον τρόπο αυτό την επιμήκυνση της νουκλεοτιδικής αλύσσου του ιϊκού DNA. Η ειδικότητα του φαρμάκου έγκειται στο ότι το μόριό της συνδέεται περισσότερο με την ιϊκή μεταγραφάση παρά με την κυτταρική DNA πολυμεράση. Έχουν εντοπιστεί ήδη τέσσερις μεταλλάξεις στο γονίδιο της RT σε στελέχη HIV ανθεκτικών στην AZT. Κατά παράδοξο τρόπο η αντοχή αυτή αναστρέφεται από μεταλλάξεις του ίδιου γονιδίου της RT σε άλλες περιοχές επαγόμενες από άλλα φάρμακα, όπως για παράδειγμα τη διδανοσίδη (ddi). Πολλά άλλα φάρμακα χορηγούνται συναγωνιστικά με την AZT και μάλιστα σε χαμηλότερες δόσεις ούτως ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα αντοχής. Άλλα φάρμακα της κατηγορίας αυτής είναι η **διδανοσίνη**, η **ζακλιταβίνη**, η **σταβουδίνη**, η **λαμιβουδίνη**, η **αμπακαβίρη** και η **εμπρισιταβίνη**.

β) Μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης. (NNRTIs, Non-Nucleoside RT Inhibitors).

Συνιστούν εκατοντάδες ενώσεις με πολύ ισχυρή ανασταλτική δράση εναντίον του ιού *in vitro*, αλλά εξαιρετικά γρήγορα δημιουργούνται αθεκτικά στελέχη HIV απέναντι τους. Παρουσιάζουν πολλή ειδική σύνδεση με την RT και χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τους νουκλεοσιδικούς αναστολείς και τους αναστολείς των πρωτεασών. Γνωστά φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι η **νεβιραπίνη**, η **δελαβιριδίνη** και η **εφαβιρένζη**.

γ) Νουκλεοτιδικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης

Επίσης αναστέλουν την RT και μπορούν να αντικαταστήσουν ένα NRTI στη HAART θεραπεία. Εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι η **τενοφοβίρη**.

δ) Αναστολείς πρωτεασών

Χωρίς τη δράση της πρωτεάσης ο ιός δεν μπορεί να διαμορφώσει οριστικά τις δομικές του πρωτεΐνες και να ολοκληρώσει τον αναπαραγωγικό του κύκλο. Χάνει έτσι τη μολυσματική του ικανότητα. Πρόκειται για πάρα πολύ αποτελεσματικά φάρμακα, με δράση εκλεκτική έναντι της ιϊκή πρωτεάσης, είναι γενικά καλά ανεκτά αλλά είναι δύσκολη η παρασκευή τους και απαιτούν μεγάλες δόσεις, μέχρι 2-3 gr ημερησίως. Ο ιός δημιουργεί εύκολα μεταλλάξεις και ανοχή απέναντί τους και μάλιστα συχνά διασταυρούμενη. Φάρμακα της ομάδας είναι η σακιναβίρη, η ινδιναβίρη, η ριτοναβίρη, η νελφίναβιρη και άλλα. Η προσθήκη τους βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της αντιρετροϊκής θεραπείας. Όταν χρησιμοποιούνται στο αρχικό θεραπευτικό σχήμα, σε συνδυασμό με αναστολείς της RT είναι ικανά να διατηρήσουν το HIV VL <50 αντίγρ./mL στην πλειοψηφία των ασθενών επί τουλάχιστον 5 χρόνια.

ε) Αναστολείς σύντηξης

Τα φάρμακα αυτά εμποδίζουν τη σύνδεση του ιού με τον υποδοχέα ή συνυποδοχέα τους στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή, τη σύντηξη των

μεμβρανών και την είσοδο του HIV στο κύτταρο. Τέτοιο φάρμακο είναι η ενφουρβιτίδη. Η χορήγησή του έχει ένδειξη σε συνδυασμό με άλλα αντιρετροϊκά φάρμακα σε ασθενείς που έχουν λάβει ήδη θεραπεία, αλλά δεν ανταποκρίθηκαν.

Οι συνηθέστερες επιλογές για την αρχική θεραπεία είναι δύο διαφορετικά σχήματα με συνδυασμό τριών φαρμάκων. Το πρώτο χρησιμοποιεί δύο νουκλεοσιδικούς αναστολείς (ένας εκ των οποίων είναι η λαμβουδίνη 3TC) και έναν μη νουκλεοσιδικό αναστολέα. Το δεύτερο σχήμα χρησιμοποιεί δύο νουκλεοσιδικούς αναστολείς και έναν αναστολέα πρωτεάσης.

1.2.8.2. Αρχές της θεραπείας- Θεραπευτικοί στόχοι

Οι αρχές της θεραπείας για τη λοίμωξη από HIV έχουν συνταχθεί από Επιτροπή που συγκρότησε το Υπουργείο Υγείας των ΗΠΑ και το Ίδρυμα Henry J. Kaiser. Η Αναφορά της παραπάνω Επιτροπής παρέχει οδηγίες για την αντιρετροϊκή θεραπεία, πότε πρέπει να ξεκινάει, ποιά είναι τα φάρμακα πρώτης γραμμής, πότε αλλάζουμε τη θεραπεία και ποιές είναι οι θεραπευτικές επιλογές, όταν αλλάζουμε θεραπεία. Η αναφορά επίσης περιλαμβάνει συστάσεις για την εργαστηριακή παρακολούθηση των ασθενών, ενώ λαμβάνουν τη θεραπεία, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται η περιοδική μέτρηση του RNA του HIV στο πλάσμα, ο αριθμός των CD4+ T-κυττάρων, καθώς και δοκιμασίες αντίστασης του HIV στα διάφορα φάρμακα.

Θεραπεία πρέπει να παρέχεται σε όλους τους ασθενείς με συμπτώματα της HIV λοίμωξης. Συστάσεις για την παροχή αντιρετροϊκής θεραπείας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς προϋποθέτουν την ανάλυση και τον έλεγχο πολλών παραγόντων. Γενικά θεραπεία πρέπει να προσφέρεται σε όλους εκείνους που έχουν αριθμό CD4+ T-κυττάρων μικρότερο από 350 κύτ./mm³ και επίπεδα RNA του HIV στο πλάσμα που ξεπερνούν τα 55.000αντίγρ./ml υπολογιζόμενα με RT-PCR ή με τεχνική bDNA. Η απόφαση για την έναρξη θεραπείας σε ασυμπτωματικούς ασθενείς βασίζεται στην επιθυμία και ετοιμότητα του ίδιου του ασθενή να ξεκινήσει θεραπεία, το βαθμό της υπάρχουσας ανοσοανεπάρκειας, όπως αυτός ορίζεται από τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων και τον κίνδυνο για εξέλιξη της νόσου, όπως αυτός ορίζεται από τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων και τα επίπεδα του RNA του HIV στο πλάσμα. Επίσης από τα δυνητικά οφέλη και τους πιθανούς κινδύνους, που συνεπάγεται η έναρξη της

θεραπείας σε ασυμπτωματικούς ενήλικες, καθώς και τον προσδοκώμενο βαθμό συμμόρφωσης με τη λήψη του συγκεκριμένου θεραπευτικού σχήματος.

Από τη στιγμή και μετά που αποφασίζεται η χορήγηση της αντιρετροϊκής θεραπείας, *οι στόχοι πρέπει να είναι η μέγιστη και μονιμότερη καταστολή του ιϊκού φορτίου, η αποκατάσταση και/ή διατήρηση της ανοσολογικής ικανότητας, η βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών και η μείωση της σχετιζόμενης με τον HIV νοσηρότητα και θνησιμότητα.* Τα αποτελέσματα της θεραπείας αξιολογούνται κατά κύριο λόγο από τα επίπεδα RNA του HIV στο πλάσμα, τα οποία αναμένονται να πέσουν κατά ένα- \log_{10} (υποδεκαπλασιασθούν) σε οχτώ εβδομάδες και να μην είναι ανιχνεύσιμα (<50 αντιγρ./mL) σε 4-6 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας. Στο ίδιο χρονικό διάστημα, πρώτους 1-2 μήνες, τα CD4+ T-κύτταρα αναμένονται να αυξηθούν κατά 100-150 κτύ./mm³. Η αύξηση των CD4+ T-κυττάρων είναι συνήθως πιο απότομη τον πρώτο μήνα. *Αποτυχία της θεραπείας στους 4-6 μήνες μπορεί να αποδοθεί σε όχι καλή συμμόρφωση του θεραπευόμενου, ανεπαρκή δραστηριότητα των φαρμάκων, υποθεραπευτικές δόσεις, αντίσταση του ιού και άλλους παράγοντες που δεν μπορούν να εξηγηθούν επαρκώς.* Ασθενείς των οποίων η θεραπεία αποτυγχάνει παρά το υψηλό επίπεδο συμμόρφωσης στο θεραπευτικό σχήμα, πρέπει να αλλάζουν θεραπεία. Γενικά πάντως στην απόφαση για αλλαγή αντιρετροϊκής θεραπείας φαίνεται να βαραίνει περισσότερο το επίπεδο του ιϊκού φορτίου και οι μεταβολές του, παρά ο αριθμός των CD4+ T-κυττάρων. Η αλλαγή του θεραπευτικού σχήματος πρέπει να κατευθύνεται από τη συλλογή ενός λεπτομερούς ιστορικού των προηγούμενων θεραπειών και τα αποτελέσματα δοκιμασιών ανάπτυξης αντοχής στα φάρμακα. Άλλη αιτία αλλαγής της θεραπείας μπορεί να αποτελεί η τοξικότητα των φαρμάκων (ηπατική στεάτωση με άνοδο των ηπατικών ενζύμων, παγκρεατίτιδα, αύξηση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων, περιφερική νευροπάθεια, μεταβολές στην κατανομή του λίπους, αντίσταση στην ινσουλίνη, ΣΔ) .

Η μείωση του ιϊκού φορτίου σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα εξαρτάται από τα αρχικά επίπεδα των CD4+ T-κυττάρων, την αρχική τιμή του ιϊκού φορτίου, την ισχύ του θεραπευτικού σχήματος, τη συμμόρφωση του ασθενή στη θεραπεία, την προηγούμενη έκθεση σε αντιϊκά φάρμακα και την παρουσία ευκαιριακών λοιμώξεων.

1.3. ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ

Το όνομα “έρπητας” έχει ιστορία 25 αιώνων στο ιατρικό λεξικό. Πρώτος ο Ιπποκράτης είχε χρησιμοποιήσει τη λέξη αυτή για να περιγράψει μία ποικιλία δερματικών βλαβών, που πρέπει να ήταν ταυτόσημες με τις βλάβες του απλού έρπητα και του έρπητα ζωστήρα και να τονίσει τον επεκτατικό και αναρριχητικό τους χαρακτήρα. Το 1736 ο Jean Astruc ταξινόμησε την κατάσταση αυτή στα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και επεσήμανε τη συχνότητα ανεύρεσής τους μεταξύ ομοφυλόφιλων. Το 1921 οι Luger και Lauda διαπίστωσαν ότι το αιτιοπαθογόνο αίτιο δεν ήταν μικρόβιο και το 1929 ο Goodpasture κατέληξε στο ότι ο υπεύθυνος ιός ταξιδεύει κατά μήκος των νευραξόνων από τις περιφερικές θέσεις της λοίμωξης και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στα νευρικά κύτταρα των γαγγλίων.

Οι ερπητοΐοι συνιστούν μία μεγάλη και πολύ σημαντική ομάδα λοιμογόνων παραγόντων. Στον άνθρωπο προκαλούν ποικιλία συνδρόμων, από απλές βλεννογόνο-δερματικές βλάβες μέχρι σοβαρές και επικίνδυνες για τη ζωή λοιμώξεις. *Μία σημαντική τους ιδιότητα είναι ότι καθιστούν λανθάνουσα λοίμωξη στον ξενιστή και μπορούν στη συνέχεια να επανενεργοποιηθούν.*

Πίνακας 4. Μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών που προσβάλλουν τους ανθρώπους (Human Virology, 2006)

Υποοικογένεια	Ονοματολογία στην καθομιλουμένη Συντομογραφία	Αριθμητικός χαρακτηρισμός
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Απλός ερπητοϊός 1 (HSV-1)	HHV-1
	Απλός ερπητοϊός 2 (HSV-2)	HHV-2
	Έρπης ζωστήρας (VZV)	HHV-3
	Ερπητοϊός B	-
<i>Betaherpesvirinae</i>	Κυτταρομεγαλοϊός (CMV)	HHV-5
	Ανθρώπινος ερπητοϊός 6 (HHV-6)	HHV-6
	Ανθρώπινος ερπητοϊός 7 (HHV-7)	HHV-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Ιός Epstein-Barr (EBV)	HHV-4
	Ερπητοϊός σχετιζόμενος με το σάρκωμα Kaposi (KSHV)	HHV-8

Η οικογένεια των ερπητοϊών (Herpesviridae) που μολύνει τον άνθρωπο αποτελείται από τρεις υπο-οικογένειες: των Alphaherpesvirinae, των Betaherpesvirinae και των Gammaherpesvirinae, που διακρίνονται μεταξύ τους από τη διαφορετική δομή του γενώματός τους και τις βιολογικές τους ιδιότητες. Αναλυτικά η οικογένεια των ερπητοϊών, οι υπο-οικογένειες και τα μέλη του κάθε γένους φαίνονται στον πίνακα 4.

1.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά των ερπητοϊών

Τα ιοσωμάτια των ερπητοϊών συνιστώνται από τρεις ομόκεντρους χιτώνες, τον εξωτερικό φάκελο, το περίβλημα κι το εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο και τον εσωτερικό πυρήνα. Η διάμετρός τους είναι 120-200nm.

Το γένωμά τους είναι ένα γραμμικό μόριο διπλής αλύσσου DNA (ds), μεγέθους 125-229 kbp και κωδικοποιεί περίπου 80-100 πολυπεπτίδια. Δε χρησιμοποιούν διαδικασία splicing των γονιδίων τους προκειμένου να επιτύχουν μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών. Διαθέτουν ειδικά προγραμματισμένη μεταγραφή με πρώϊμα και καθυστερημένα ανοίγματα (switches), προκειμένου να επιτυγχάνουν ενωρίς σύνθεση μεταγραφικών προϊόντων που υπεισέρχονται στη διαδικασία διπλασιασμού του DNA και καθυστερημένη σύνθεση δομικών πρωτεϊνών.

Οι HSV-1, HSV-2 και οι VZV κωδικοποιούν για κινάση της θυμιδίνης (TK), πρωτεΐνη που διαμεσολαβεί για τη δράση συγκεκριμένων αντικών φαρμάκων.

Η περισσότερο μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας των ερπητοϊών είναι η γλυκοπρωτεΐνη C του HSV1, η οποία συνδέεται με τις κυτταρικές πρωτεογλυκάνες. Άλλες ιικές γλυκοπρωτεΐνες (B, D και H) συμμετέχουν σε μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία ο λιπιδικός φάκελος του ιού συγχωνεύεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή. Το εξωτερικό περίβλημα του ιού μεταφέρεται σε πυρηνικό πόρο, οπότε και ελευθερώνεται το γραμμικό DNA, το οποίο εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου γίνεται το μεγαλύτερο μέρος της μεταγραφής, του αναδιπλασιασμού του DNA και η συγκρότηση των εξωτερικών ιικών περιβλημάτων. Ο ιός επάγει επίσης τη διακοπή στη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων του κυττάρου ξενιστή.

Ο ιικός αναδιπλασιασμός είναι κατ' αποκλειστικότητα πυρηνικός και ελέγχεται αυστηρά από α , β , και γ γονίδια που κωδικοποιούν για αντίστοιχες πρωτεΐνες. Οι α

πρωτεΐνες έχουν δράση ρυθμιστική για μεταγραφή, ενώ οι β είναι ένζυμα, όπως οι DNA πολυμεράσες, οι γ είναι δομικές πρωτεΐνες.

Οι ιοί των τριών υπο-οικογενειών προκαλούν διάφορα κλινικά σύνδρομα, που ποικίλουν από ήπιες υποδόριες βλάβες έως λοιμώξεις απειλητικές για τη ζωή.

Όλοι οι ιοί της οικογένειας αυτής καθιστούν χρονιότητα, παραμένοντας σε λανθάνουσα κατάσταση (πίνακας 5), διατηρώντας το γενετικό τους υλικό, είτε συνδεδεμένο με το DNA του κυττάρου ξενιστή, είτε με τη μορφή επισώματος

Αν και έχουμε σήμερα μία σχετικά λεπτομερή εικόνα των κυρίων σταδίων στη ζωή ενός ιού, δεν ξέρουμε ακόμα τα πάντα γύρω από τις στρατηγικές, που έχουν αναπτύξει όλους αυτούς τους αιώνες, ούτως ώστε να μπορούν να επιβιώσουν. Στην πραγματικότητα, λεπτομερείς μελέτες που εκπονούνται για τον πολλαπλασιασμό των ιών, συνεχίζουν να αποκαλύπτουν βασικά γεγονότα για μηχανισμούς ελέγχου και γενετικές στρατηγικές.

Πίνακας 5. Λανθάνουσες λοιμώξεις των ερπητοϊών

Ιός	Θέσεις λανθάνουσας λοίμωξης
HSV-1/HSV-2	Νευρώνες νωτιαίων γαγγλίων
VZV	Νευρώνες νωτιαίων γαγγλίων
EBV	B- λεμφοκύτταρα
CMV	Λεμφοκύτταρα/Μακροφάγα;
HHV8	Λεμφοκύτταρα του αίματος

Από τα μέλη της οικογένειας των ερπητοϊών, αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι ο απλός ερπητοϊός -1 και -2 (HSV-1,-2), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο Epstein Barr virus (EBV) και ο ανθρώπινος ερπητοϊός 8 (HHV-8).

1.3.2. ΑΠΛΟΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΕΡΠΗΤΟΪΟΣ 1 ΚΑΙ 2 (HSV-1 ΚΑΙ -2)

Οι ερπητοϊοί HSV-1, HSV-2 έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ τους και δεν υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ των συνδρόμων, που προκαλούν. Όλα αυτά τα σύνδρομα μπορεί να προκληθούν από οποιονδήποτε από τους δύο ιούς, αλλά ως γενικός κανόνας ισχύει ότι ο HSV-1 προσβάλλει το άνω μέρος του σώματος και ο

HSV-2 προσβάλλει συχνότερα, αλλά όχι αποκλειστικά, το κάτω μέρος του σώματος, και προκαλεί λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων.

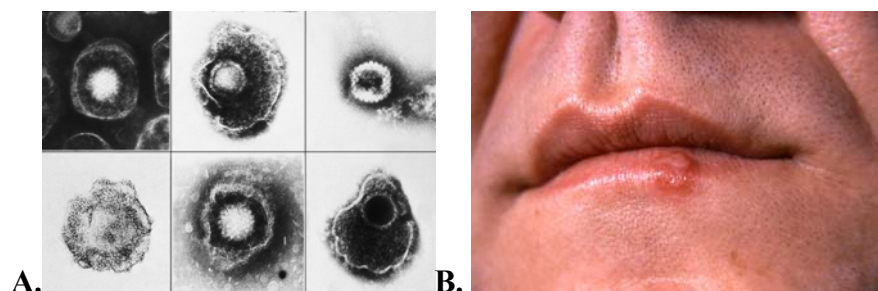
I. 3.2.1. Ορολογία

Με τον όρο **πρωτοπαθή λοίμωξη** αναφερόμαστε στην πρώτη λοίμωξη από έναν από τους δύο HSV ιούς. Καθώς υπάρχει μικρή διασταυρούμενη προστασία είναι πιθανό αργότερα το άτομο να μολυνθεί από το άλλο είδος. Για να το διαχωρίσει κανείς από την πρωτοπαθή λοίμωξη σε άτομο εντελώς μη ανοσοποιημένο, ένα τέτοιο επεισόδιο το χαρακτηρίζουμε ως **αρχική λοίμωξη**.

Με τον όρο **αναζωπύρωση**, αναφερόμαστε στην παραγωγή λοιμογόνων ιών από ένα κύτταρο που έφερε τον ιό σε λανθάνουσα κατάσταση. Εάν εκδηλωθεί κλινικά εμφανής νόσος, τότε μιλάμε για **υποτροπή** ή **επιδείνωση**.

I.3.2.2. Παθογένεια

Οι επιφάνειες του δέρματος και των βλεννογόνων είναι οι πύλες εισόδου και οι θέσεις πολλαπλασιασμού των ιών, όπου προκαλούν λύση των κυττάρων και σχηματισμό φυσαλίδων. Στις επιφάνειες των βλεννογόνων οι φυσαλίδες ρήγνυνται σύντομα και σχηματίζουν ρηγά έλκη, ενώ στο δέρμα παραμένουν ανέπαφες για αρκετές ημέρες πριν σχηματίσουν κρούστα και στη συνέχεια ιανθούν. Το διαυγές υγρό των φυσαλίδων περιέχει μεγάλο αριθμό ιοσωματίων.



Εικόνα 4. Α. Εικόνα διαφόρων ερπητοϊών στο E.M.
Β. Επιχείλιος έρπητας από HSV-1

Ο τοπικός αναδιπλασιασμός του ιού συνοδεύεται από διασπορά στους περιφερικούς λεμφαδένες και κατόπιν αιμία, η οποία είναι μικρής σημασίας εκτός και

αν συμβεί αιματογενής διασπορά στο ΚΝΣ, που τότε έχει ως συνέπεια μηνιγγίτιδα ή εγκεφαλίτιδα. Εντούτοις τέτοιες καταστάσεις είναι σχετικά σπάνιες. Το ΚΝΣ εμπλέκεται με ένα πιο περίπλοκο μηχανισμό, ο οποίος είναι κεντρικός στην παθογένεια της λοίμωξης από HSV.

Σύντομα μετά τον αναδιπλασιασμό που συμβαίνει στο δέρμα ή στο βλεννογόνο, τα ιοσωμάτια μεταναστεύουν στα συμπαθητικά γάγγλια, μέσω των αισθητικών νευρώνων της περιοχής. Οι πρωτοπαθείς λοιμώξεις του προσώπου και των γεννητικών οργάνων εμπλέκουν αντίστοιχα τα νωτιαία συμπαθητικά γάγγλια του τριδύμου και του οσφυοϊερού πλέγματος. Ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση στα γάγγλια με τρόπο που δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ο ιός μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη λανθάνουσα κατάσταση, εάν μεταφερθεί ένα γάγγλιο από ζώο με λανθάνουσα λοίμωξη και επωαστεί σε καλλιεργητικό υλικό για αρκετές ημέρες.

Από τη στιγμή που ο HSV έχει εγκατασταθεί στο γάγγλιο *in vivo*, είναι δυνατό να παρατηρηθούν αναζωπυρώσεις σε διάστημα εβδομάδων ή μηνών. Τα ερεθίσματα για τέτοια επεισόδια μπορεί να είναι διάφορα. Οι δημοφιλείς όροι «έλκη από κρύωμα» ή στις ΗΠΑ «φυσαλίδες από πυρετό» καταδεικνύουν τη συσχέτιση των υποτροπών αυτών με το κρυολόγημα και άλλες εμπύρετες καταστάσεις, ενώ η έκθεση στον ήλιο, η εμμηνορρυσία, η θεραπευτική ακτινοθεραπεία, καθώς και η χειρουργική του τριδύμου νεύρου, είναι άλλοι γνωστοί εκλυτικοί παράγοντες. Πιθανολογείται ότι το νευρικό κύτταρο ξενιστής στα γάγγλια είναι διεγερμένο και παράγει λοιμογόνα ιοσωμάτια, τα οποία περνούν τους αισθητικούς νευράξονες, με σκοπό να διπλασιαστούν και πάλι στα δερματικά κύτταρα με την παραγωγή φυσαλίδων στο ή κοντά στο σημείο της πρωτοπαθούς λοίμωξης. Εικάζεται ότι τα κύτταρα στα οποία επανενεργοποιείται ο ιός λύνονται με τη διαδικασία αυτή. Εάν συμβαίνει αυτό, τότε είναι εύλογη η σταδιακή καταστροφή όλου του αποθέματος των κυττάρων με λανθάνουσα λοίμωξη και αυτό πιθανώς, σε συνδυασμό με την ανοσολογική απάντηση, μπορεί να ευθύνονται για την εξασθένηση του φαινομένου των αναζωπυρώσεων.

I.3.2.3. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή

Με την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή παράγονται αντισώματα IgM, IgG, και IgA. Η ανοσομετατροπή που παρατηρείται μετά τη αληθή πρωτοπαθή λοίμωξη είναι χρήσιμη διαγνωστικά. Το αντίσωμα IgG, παραμένει για αρκετά χρόνια, αλλά δε

προλαμβάνει τις αναζωπυρώσεις. Ο ιός πιθανώς προστατεύεται από ουδετεροποίηση εντός του νευρικού συστήματος που είναι σχετικά δυσπρόσιτο από το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανοσολογική απάντηση με την παραγωγή αντισωμάτων ποικίλει. Συχνά δεν ανιχνεύεται με τις συνήθεις μεθόδους και ως εκ τούτου είναι χαμηλής διαγνωστικής αξίας.

Η σημασία της κυτταρικής ανοσίας στον έλεγχο της λοίμωξης καταδεικνύεται ευρέως από την τάση των λοιμώξεων από HSV να γίνονται γενικευμένες στους ασθενείς που παρουσιάζουν ελλείμματα της T κυτταρικής ανοσίας.

I.3.2.4. Επιδημιολογία

Οι περισσότεροι άνθρωποι είναι μολυσμένοι στην ενήλική τους ζωή. Ο ιός συνήθως αποκτάται κατά τη βρεφική ή την παιδική ηλικία, αλλά υπάρχει τουλάχιστον σε κάποιες κοινωνίες μια δεύτερη κορύφωση της μόλυνσης στην εφηβεία, όταν οι ευκαιρίες για διασπορά ανανεώνονται με την έναρξη της σεξουαλικής δραστηριότητας. Πρωτοπαθείς λοιμώξεις μετά την ηλικία των 30 ετών είναι σπάνιες. Από τη στιγμή που αποκτηθούν, ο HSV παραμένει σε λανθάνουσα λοίμωξη εφ' όρου ζωής. Παρατηρούνται αναζωπυρώσεις τουλάχιστον στις μισές περιπτώσεις, αλλά ασυμπτωματική παρουσία του ιού στη σίελο και στις εκκρίσεις των γεννητικών οργάνων υπάρχει τόσο στους συμπτωματικούς όσο και στους ασυμπτωματικούς φορείς (Collier L, Oxford J 2006).

I.3.2.5. Ανοσοποίηση

Δεν υπάρχει ακόμη διαθέσιμο εμβόλιο για τους ιούς HSV-1 και HSV-2. Θα υπήρχε ενδεχομένως λόγος για ανοσοποίηση προς τον HSV-2 πριν την εφηβεία, αλλά το κόστος και ο κίνδυνος που σχετίζονται με ένα τέτοιο εμβολιασμό αποτρέπουν από την εφαρμογή του, ειδικά τώρα που υπάρχει διαθέσιμη αποτελεσματική αντική θεραπεία.

I.3.2.6. Θεραπεία

Η ακυκλοβίρη (ACV) είναι το φάρμακο εκλογής για τη θεραπεία και σε μερικές περιπτώσεις για τη πρόληψη λοιμώξεων από HSV. Είναι διαθέσιμα σκευάσματα ενδοφλέβια, από του στόματος και για τοπική επίθεση.

I.3.3. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΣ (CMV)

I.3.3.1. Κλινικές απόψεις

Με μια πρώτη προσέγγιση οι λοιμώξεις από CMV είναι περισσότερο συγκεχυμένες, επειδή ποικίλουν περισσότερο όσον αφορά τις ηλικίες που προσβάλλουν, τον τρόπο μετάδοσης και τις κλινικές εκδηλώσεις. Ένας καλός τρόπος ταξινόμησης είναι με βάση την ηλικία μόλυνσης, καθώς αυτός ο παράγοντας είναι καθοριστικός για το είδος της νόσου, που θα αναπτυχθεί. Ο CMV μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα καθόλη τη διάρκεια της ζωής - από πριν τη γέννηση έως το θάνατο.

Ο CMV μπορεί να μεταδοθεί στο έμβρυο μέσω του πλακούντα και είναι σημαντική αιτία εμβρυϊκής νοσηρότητας και θνησιμότητας.

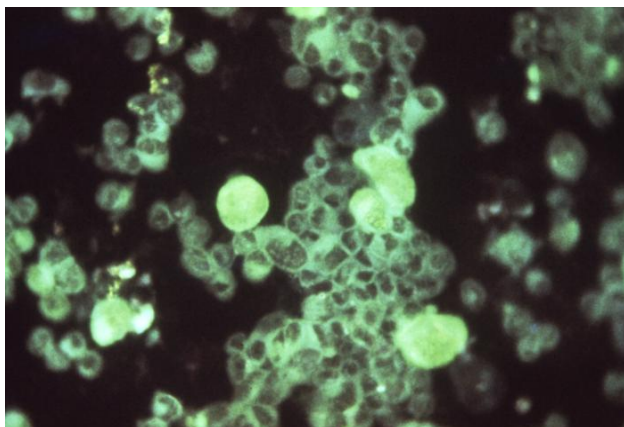
Τα φυσιολογικά έμβρυα μπορεί να προσβληθούν από τον CMV με το πρωτόγαλα και με το θηλασμό. Το μητρικό αντίσωμα δε μολύνεται από ιούς, που υπάρχουν στα ούρα και στη σίελο.

Τα επόμενο κύμα λοιμώξεων συμβαίνει στην εφηβεία και πρώτη ενήλικη ζωή, όταν η μετάδοση γίνεται με το φιλί ή τη σεξουαλική επαφή. Σ' αυτή την ηλικία ο CMV προκαλεί μερικές φορές σύνδρομο, όπως αυτό της λοιμώδους μονοκυρήνωσης από τον EBV. Πρόκειται για εμπύρετο νόσο με σπληνομεγαλία, διαταραγμένη ηπατική λειτουργία, μερικές φορές με ίκτερο, και παρουσία ανώμαλων λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα.

Ο CMV βρίσκεται τόσο συχνά στους ομοφυλόφιλους άνδρες (95%) σε σημείο, που πριν την ανακάλυψη του HIV, θεωρούταν η αιτία του AIDS (Davis, 1987).

1.3.3.2. Παθογένεια

Ο CMV παρουσιάζει περισσότερες ιδιομορφίες όσον αφορά την παθογένειά του. Η μόλυνση γίνεται από διάφορες οδούς και διαρκεί για μιά ζωή. Ο τρόπος με τον οποίο αυτό συμβαίνει δεν είναι ξεκάθαρος, ίσως περιλαμβάνει ένα *συνδυασμό πραγματικής λανθάνουσας φάσης, με την ενσωμάτωση του γενώματος του ιού στο DNA των λευκοκυττάρων και χρόνιας λοίμωξης με την παραγωγή λοιμογόνων ιοσωματίων (virions)*. Η παρουσία έγκλειστων του ιού στα νεφρικά κύτταρα και στα κύτταρα των σιελογόνων αδένων ασυμπτωματικών ατόμων αποτελεί επιχείρημα υπέρ του δεύτερου μηχανισμού. Κατά τη διάρκεια της ζωής παρατηρείται επίσης διαλείπουσα αποβολή του ιού στα σωματικά υγρά όπως τα ούρα, τη σίελο, τις κολπικές εκκρίσεις, το σπέρμα και το μητρικό γάλα με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλές ευκαιρίες για μετάδοση. Η μετάγγιση αίματος μπορεί να είναι αιτία λοίμωξης. Στα περισσότερα άτομα η λοίμωξη είναι ασυμπτωματική, αλλά σε εκδηλωμένη νόσο σχεδόν όλα τα όργανα μπορούν να καταστραφούν. Όπως συμβαίνει και με άλλους ερπητοϊούς η αναζωπύρωση είναι σημαντικό χαρακτηριστικό της παθογένειας, και για να γίνουν τα πράγματα πιο περίπλοκα οι επιλοιμώξεις από άλλα είδη είναι δυνατές.



Εικόνα 5. Με τη χρήση ανοσοφθορισμού εντοπίζεται ο CMV στον πνεύμονα ανθρώπινου εμβρύου

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι λοιμώξεις από τον CMV στα τελικά στάδια της νόσου του AIDS είναι συνέπεια αιματογενούς διασποράς του CMV. Μελέτες σε φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο. Οι λοιμώξεις αυτές είναι συνήθως ασυμπτωματικές.

Τα μικρά παιδιά μολύνονται εύκολα και είναι ασυμπτωματικά κατά την παραμονή τους σε βρεφονηπιακούς και παιδικούς σταθμούς, όπου το περιβάλλον είναι εύκολο να μεταμοσχευμένους και ασθενείς με AIDS προτείνουν ότι η CD4-εξαρτώμενη, CMV-ειδική κυτταροτοξική T λεμφοκυτταρική δραστηριότητα είναι

κριτικής σημασίας για την πρόληψη του διπλασιασμού του CMV και την πρόκληση νόσου τελικού οργάνου, και ότι η επηρεασμένη CD4 κυτταρική λειτουργία και ο αριθμός των CD4 κυττάρων είναι η πρωτοπαθής αιτία του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού του CMV (Jacobson MA. 2006). Ο ιός προκαλεί στους ασθενείς με AIDS και αριθμό CD4 κυττάρων μικρότερο από $50/\text{mm}^3$ γαστρεντερική νόσο, αμφιβληστροειδίτιδα, νευρολογική νόσο και πνευμονία. Με την είσοδο της HAART η επίπτωση των παραπάνω διαταραχών έχει μειωθεί σημαντικά.

I.3.3.3. Ανοσολογική απάντηση

Η πρωτοπαθής λοίμωξη αλλά όχι οι αναζωπυρώσεις, επάγει την παραγωγή αντισωμάτων IgM τα οποία εκμεταλλευόμαστε διαγνωστικά. Όπως είναι φανερό από την επιμονή της λοίμωξης τα IgG αντισώματα παραμένουν εφ' όρου ζωής. Η σπουδαιότητα του κυτταρικής ανοσίας τονίζεται από την τάση για επανενεργοποίηση σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς.

I.3.3.4. Ενεργός ανοσοποίηση

Εμβόλιο που έχει παρασκευαστεί από το Towne στέλεχος του CMV φαίνεται να προστατεύει τους μεταμοσχευμένους με νεφρό αλλά απέτυχε να επάγει επαρκή παραγωγή αντισωμάτων σε φυσιολογικές γυναίκες που φροντίζουν μικρά παιδιά.

I.3.3.5. Παθητική ανοσοποίηση

Υπάρχει μαρτυρία ότι η χορήγηση υψηλών τίτλων αντισωμάτων CMV προστατεύει τους ανοσοκατεσταλαμένους ασθενείς από την CMV πνευμονίτιδα.

I.3.3.6. Θεραπεία

Επειδή ο CMV δε διαθέτει το ένζυμο κινάση της θυμιδίνης (TK) όπως οι ερπητοϊοί HSV και VZV, το φάρμακο ακυκλοβίρη είναι ανενεργές για την καταπολέμηση του ιού αυτού. Η γκανσυκλοβίρη είναι παρόμοιο φάρμακο που φωσφορυλιώνεται από διαφορετικό ένζυμο και χρησιμοποιείται με κάποια επιτυχία στη θεραπεία των ανοσοκατασταλαμένων ασθενών, συμπεριλαμβανομένων και των

ασθενών με AIDS. Νεότερα εξίσου αποτελεσματικά φάρμακα είναι η φοσκαρνέτη, η σινοφοβίρη και η βαλγκανσυκλοβίρη (Collier L, Oxford J 2006).

I.3.4. ΙΟΣ EPSTEIN-BAR (EBV)

Ο EBV διαφέρει σημαντικά από τους άλλους ερπητοϊούς για δύο διαφορετικούς λόγους, πρώτον για το είδος των ιϊκών αντιγόνων που κωδικοποιεί και δεύτερον για την αθανатоποίηση των κυττάρων που προκαλεί στη λανθάνουσα φάση του.

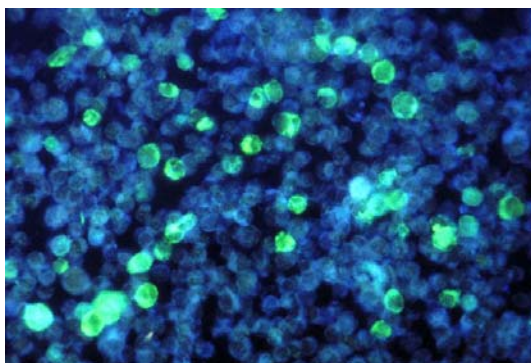
I.3.4.1. Ιικά αντιγόνα

Ο EBV κωδικοποιεί περισσότερα από 80 αντιγόνα στα B- λεμφοκύτταρα που μολύνει, μερικά από τα οποία εκφράζονται σε κύτταρα με λανθάνουσα λοίμωξη του ιού. Το πρώτο κατά σειρά εμφάνισης είναι το πυρηνικό του αντιγόνο Epstein Barr virus Nuclear Antigen (EBNA), το οποίο απαντάται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων. Άλλα σημαντικά αντιγόνα είναι

- LYDMA (Lymphocyte Detected Membrane Antigen), που αποτελεί στόχο των κυτταροτοξικών T-κυττάρων
- EA (Early Antigen), που εμπλέκεται στον διπλασιασμό του DNA του ιού
- VCA (Viral Capsid Antigen), δομική πρωτεΐνη
- Διάφορες άλλες γλυκοπρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη σύνδεση με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και γι' αυτό με τη μολυσματικότητα του ιού. Αντιπροσωπευτικότερη αυτών η gp340/220 που επάγει και την παραγωγή ειδικού αντισώματος.

I.3.4.2. Αθανατοποίηση των κυττάρων ξενιστών

In vivo, ο πλήρης λυτικός κύκλος του ιικού διπλασιασμού λαμβάνει χώρα στο διαφοροποιημένο πλακώδες επιθηλιακό κύτταρο, απ' όπου στη συνέχεια ο ιός διασπείρεται στην κυκλοφορία.



Εικόνα 6. Λευχαιμικά κύτταρα όπου εντοπίζεται ο EBV

Όταν τα B κύτταρα εκτίθενται *in vitro* στον EBV, ένα ποσοστό αυτών αναπτύσσουν λανθάνουσα λοίμωξη, που χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία κυκλικού ιικού γένωματος. Τα κύτταρα αυτά στη συνέχεια μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστο, κατάσταση γνωστή ως αθανатоποίηση, και να δίνουν γένεση σε μια λεμφοκυτταρική κυτταρική σειρά. Αυτή η διαδικασία ενοχοποιείται για τη ογκογενετική ικανότητα του ιού. Παρόμοια φαινόμενα παρατηρούνται και *in vivo* με αποτέλεσμα από τη στιγμή που κάποιο άτομο μολυνθεί να φέρει δια βίου B λεμφοκύτταρα με το γένωμα του ιού. Υπάρχουν έξι EBNAs, τρία από τα οποία ενέχονται στην επίτευξη της αθανатоποίησης (Collier L, Oxford J 2006).

I.3.4.3. Ανοσολογική απάντηση

Ο EBV δεν προκαλεί ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας, όπως οι άλλοι ερπητοϊοί. Η ικανότητά του να προκαλεί φλεγμονώδη νόσο αποδεικνύει τη δυνατότητά του για άμεση και έμμεση καταστροφή κυττάρων *in vivo*.

I.3.4.4 Επιδημιολογία

Ο EBV όπως και ο CMV αποβάλλεται διαλειπόντως από σημαντικό μέρος του πληθυσμού. Μολυσματικός ιός παράγεται στο φάρυγγα, πιθανά στο λεμφικό ιστό και εμφανίζεται στη σίελο.

Σε φτωχές κοινωνίες η λοίμωξη από τον EBV όπως και από τον CMV, μεταδίδεται νωρίς στη ζωή και προκαλεί κατά κύριο λόγο ασυμπτωματικές λοιμώξεις. Εντούτοις αντίθετα με το CMV η αρχική λοίμωξη καταλείπει δια βίου ανοσία. Η λοιμώδης μονοπυρήνωση είναι πιο συχνή στις αναπτυγμένες χώρες, όπου η

λοίμωξη μεταδίδεται αργότερα κατά τη διάρκεια της ζωής, με μεγαλύτερη επίπτωση μεταξύ 16 και 18 ετών.

I.3.4.5. Θεραπεία

Η χρήση των κορτικοστεροειδών στη λοιμώδη μονοκυρήνωση είναι αμφιλεγόμενη. Σε μια πολυκεντρική μελέτη, όπου στην ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε εικονικό φάρμακο, διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός ακυκλοβίρης και πρεδνιζόνης μείωσε τη διασπορά του ιού από τον οροφάρυγγα, αλλά δεν επηρέασε τη διάρκεια των συμπτωμάτων, ούτε και την αποχή από την εργασία. Γενικά δε συνιστάται η χορήγηση κορτικοστεροειδών ως ρουτίνα, ωστόσο θεωρούνται απαραίτητα, όταν επίκειται απόφραξη των αεροφόρων οδών ή όταν η λοίμωξη είναι απειλητική για τη ζωή του ασθενούς.

Με την ακυκλοβίρη μπορεί να παρατηρηθεί μικρής διάρκειας καταστολή της διασποράς του ιού, αλλά καμιά επίδραση στη λανθάνουσα λοίμωξη. Έτσι δεν έχει προκύψει σε καμιά μελέτη πραγματικό κλινικό όφελος από τη χρήση ακυκλοβίρης, τόσο για τη θεραπεία της λοιμώδους μονοκυρήνωσης όσο και για τη θεραπεία κακοηθειών σχετιζόμενων με EBV.

Ανέκδοτη χρήση Ιντερλευκίνης -2, Ιντερφερόνης άλφα, ενδοφλέβιας ανοσοσφαιρίνης έχει αναφερθεί, χωρίς σαφές κλινικό όφελος με πιθανές εξαιρέσεις τη λεμφοειδή κοκκιωμάτωση και τη μετά τη μεταμόσχευση λεμφοϋπερπλαστική νόσο.

I.3.4.6. Ενεργός ανοσοποίηση

Η πληθώρα των δεδομένων, που ενοχοποιούν τον EBV ως αιτία για πλήθος νεοπλασιών στους ανθρώπους, αποτέλεσαν το κίνητρο για την ανάπτυξη αντι-ιικού εμβολίου, προκειμένου για τη θεραπεία του καρκίνου. Η Gr350/220 είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες της λυτικής φάσης του ιού και η οποία βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες των μολυσμένων κυττάρων, καθώς και στην εξωτερικότερη επιφάνεια του ιικού περιβλήματος. Η Gr350/220 συνδέεται με τον CD21 υποδοχέα των Β λεμφοκυττάρων για την έναρξη της λοίμωξης και με αυτήν αντιδρούν τα περισσότερα αντισώματα κατά του ιού. Για όλους αυτούς τους λόγους το γονίδιο gr350/220 είναι το βασικότερο γονίδιο της λυτικής φάσης του ιού, το οποίο

χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του εμβολίου. Σε μελέτες με πειραματόζωα ένα τέτοιο εμβόλιο φάνηκε αρκετά αποτελεσματικό. Στην Κίνα ήδη δοκιμάζεται εμβόλιο με ανασυνδυασμένο γονίδιο gp350/220 (Beaulieu & Sullivan 2006).

I.3.4. ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΕΡΠΗΤΟΪΟΣ 8 (HHV8)

Ο ανθρώπινος ερπητοϊός HHV-8 επίσης γνωστός και ως Kaposi sarcoma associated herpesvirus (KSHV) έχει αναγνωριστεί ως αιτιολογικός παράγοντας σε όλους τους κλινικούς τύπους του σαρκώματος Kaposi (KS): Αφρικανικό ενδημικό, κλασσικό Μεσογειακό, HIV-σχετιζόμενο και μετά από μεταμόσχευση KS (Chang Y, 1994; Moore PS, 1995). Ακόμα περισσότερο ο ιός φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του Primary Effusion Lymphoma (PEL) και της νόσου των πλασματοκυττάρων Multicentric Castleman's Disease (MCD).

I.3.4.1 Γενετικό υλικό του HHV8

Το γένομα του ιού HHV8 περιλαμβάνει την κεντρική κωδική περιοχή με 140 περίπου kbp και την περιοχή των τελικών επαναλήψεων, συνολικά 80 ανοιχτά πλαίσια διαβάσματος (ORFs). Τα γονίδια του είναι δύο ειδών: τα συντηρημένα (conserved) που υπάρχουν και σε άλλους ερπητοϊούς και κωδικοποιούν πρωτεΐνες δομικές και διπλασιασμού και τα ειδικά της υποοικογένειας των Gammaherpesvirinae και του γένους των rhadinovirus. Διάφορα από αυτά τα γονίδια παρουσιάζουν ομολογία με ανθρώπινα γονίδια. Τέτοια γονίδια παράγουν ομόλογα κυτοκινών και υποδοχέων κυτοκινών όπως το *ORF K2* παράγει την ανάλογη της *IL 6* (*v IL6*), τα *ORF K4, K4.1, K6*, τις ιικές *Macrophage Inflammatory Proteins I, II και III* (*v MIP I/II/III*) και το (ORF 74) τον ανάλογο του υποδοχέα της *IL8/G protein-coupled receptor* (*v IL8/GPCR*). Στην ίδια κατηγορία υπάρχουν γονίδια σχετιζόμενα με την κυτταρική υπερπλασία και την κυτταρική απόπτωση όπως το *ORF 72* που παράγει την viral cyclin D, το *ORF K9* για τον Interferon response factor (*v IRF*), το *ORF K13* για την Flice inhibitory protein (*v FITP*), το ORF 16 για τον αντιαποπτωτικό παράγοντα Bcl2, το γονίδιο *ORF4* τη δεσμευτική του συμπληρώματος πρωτεΐνη και το *ORF K14* μόριο κυτταρικής προσκόλλησης. Ακόμη βρίσκονται γονίδια ειδικά του HHV8 που *in vitro* αποκαλύπτουν δυναμικό κυτταρικής μεταμόρφωσης όπως τα *ORF K12* που παράγει το Kaposin και το *ORF 1* μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που

αλληλεπιδρά με υποδοχείς κινασών. Τα γονίδια αυτά έχουν πιθανά ογκογενετική δράση. Η παρουσία στο περιφερικό αίμα κυττάρων μολυσμένων με HHV8 εικάζεται ότι προδιαθέτει στην ανάπτυξη σαρκώματος Kaposi σε ασθενείς HIV(+) και αποτελεί πρώιμο προγνωστικό δείκτη για K.S ή και μέσο παρακολούθησης της θεραπείας και της κλινικής εξέλιξής του (Whitby D, 1995).

I.3.4.2. Κλινικές απόψεις-Επιδημιολογία

Ο HHV8 ανιχνεύθηκε στο περιφερικό αίμα ιδιαίτερα στο λεμφοκυτταρικό κλάσμα ασθενών με HIV μόλυνση με ή χωρίς K.S, στο σπέρμα HIV(+) ομοφυλόφιλων, στο ουροποιητικό σύστημα σε μικρές αναλογίες, και επί υγιών ανδρών και γυναικών. Ο HHV8 ανιχνεύθηκε ακόμη στο σίελο και σε ιστούς του στόματος και τον φάρυγγα.

Μεταξύ των HIV-μολυσμένων ατόμων, οι ομοφυλόφυλοι άνδρες είναι η ομάδα με το μεγαλύτερο κίνδυνο για ανάπτυξη KS ανεξάρτητα από γεωγραφική και εθνική προέλευση. Αντισώματα εναντίον του HHV-8 ανιχνεύονται στο 80%–95% των HIV-1 οροθετικών ασθενών με KS και σε όλους σχεδόν τους ασθενείς με τον κλασσικό και ενδημικό τύπο. Ο κίνδυνος για ανάπτυξη KS είναι μεγαλύτερος στους ασθενείς που εμφανίζουν την ορομετατροπή για τον HHV8 μετά τη μόλυνση με τον HIV απ'ότι όταν συμβαίνει το αντίθετο. Η μόλυνση με τον HHV-8 μοιάζει να είναι σπάνια στο γενικό πληθυσμό (3%–5%) στη βόρεια, κεντρική και δυτική Ευρώπη, βόρεια Αμερική, νότιοανατολική Ασία και Καραϊβική. Η νότιος Ιταλία, η Σικελία και η Σαρδηνία παρουσιάζουν ένα ενδιάμεσο ορολογικό επιπολασμό, που ποικίλει από περιοχή σε περιοχή και κυμαίνεται από 5%–35%. Στην πραγματικότητα αυτό είναι συμβατό με τα υψηλότερα ποσοστά κλασσικού KS που παρατηρούνται σ'αυτές τις περιοχές. Η υπο-Σαχάριος Αφρική είναι άλλη μία περιοχή με υψηλή οροθετικότητα για τον HHV-8 (30%–60%), ιδιαίτερα στις περιοχές με το ενδημικό KS. Στην Ελλάδα, από τις λιγοστές μελέτες που έχουν γίνει, η οροθετικότητα στον HHV-8 περιγράφεται υψηλότερη σε σχέση με τις δυτικές χώρες. Συγκεκριμένα σε μία σειρά 248 HIV-1 ατόμων ανευρέθηκε σε ποσοστό 48% (119/248). Ο επιπολασμός μεταξύ των ανδρών ήταν 46.9% (99/211) και μεταξύ των γυναικών 54.1% (20/37), στατιστικά όχι διαφορετικός μεταξύ των δύο φύλων. Ο επιπολασμός μεταξύ των ομοφυλόφιλων ανδρών ήταν 46.3% (81/175) κα μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων

ναρκωτικών (ανεξαρτήτου σεξουαλικής συμπεριφοράς) 52.4%. (Panayiotakopoulos GD, 2005)

1.3.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΕΡΠΗΤΟΪΩΝ – ΔΕΛΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.

Μελέτες με τη χρήση ορολογικών μεθόδων, που αφορούν τη συχνότητα των παραπάνω ιών στο γενικό πληθυσμό, καθώς και σε ειδικές ομάδες, έχουν δείξει ότι η οροθετικότητα είναι υψηλότερη ανάμεσα στους HIV-1 θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους φυσιολογικούς ενήλικες. Πιο συγκεκριμένα, η οροθετικότητα για τον CMV ανάμεσα στους HIV-1 αρνητικούς ενήλικες κυμαίνεται στις διάφορες μελέτες μεταξύ 50% και 95.2% και για τον EBV μεταξύ 76.7% και 99.4% (Stanberry LR et al 2004, Clarke LM et al 1996, Shepp DH et al 1996, Holland CA 2000) ενώ στους HIV-1 θετικούς ενήλικες κυμαίνεται μεταξύ 79.7% και 90.3% και 90% αντίστοιχα (Morris MC et al 2002, Ozkan A et al 2003, Ferres M et al 1995, Andersson-E A et al 1995). Η οροθετικότητα του HSV-1 στο γενικό πληθυσμό κυμαίνεται στις διάφορες μελέτες μεταξύ 68% και 91.2% (Mertz GJ et al 1992, Wagner HU et al 1994, Russell DB et al 2001, Fleming DT et al 1997) και ανάμεσα στους HIV-1-θετικούς είναι περίπου 73% (Garcia-Corbeira P et al 1999, Martin JN et al 1998, Gambus G et al 2001, Cattani P et al 2003). Η συχνότητα αντισωμάτων έναντι του HHV-8 ανευρίσκεται μεταξύ 0%-12% των φυσιολογικών αιμοδοτών (Fujii T et al, Verbeek W et al) και στο 8%-56% των HIV θετικών ασθενών (Whitby D et al 1995)

1.4. ΕΡΠΗΤΟΪΟΙ ΚΑΙ HIV ΛΟΙΜΩΞΗ

Ο πιθανός ρόλος των ερπητοϊών ως συμπαράγοντα στη λοίμωξη από τον HIV έχει υποστηριχθεί από πολλούς ερευνητές στο παρελθόν. Δεδομένου ότι HIV και ερπητοϊοί συνυπάρχουν συχνά στον ίδιο ασθενή, άλλοτε σε λανθάνουσα και άλλοτε σε ενεργό κατάσταση, δημιουργούνται οι προϋποθέσεις για αλληλεπίδραση μεταξύ τους σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο, με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης του ιϊκού τους DNA (πιν. 6) (Webster 1989, Scala 1993, Griffiths 1998, Lennette 2005).

Πίνακας 6. Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ HIV και ιών-συμπαράγοντων, οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αυξημένο αναδιπλασιασμό του HIV (Webster et al 1989)

Αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης	Μόλυνση από τον HIV και συμπαράγοντα ιό	
	Στο ίδιο κύτταρο	Σε γειτονικό κύτταρο
Ενεργοποιεί το προϊικό HIV DNA	Ενεργοποίηση μεταγραφής	Απελευθέρωση κυτταροκινών
Μεταβάλλει τον τροπισμό του HIV RNA	Παραγωγή ψευδότυπων	Αντιγονοπαρουσίαση Αύξηση των CD4 υποδοχέων και συνυποδοχέων Επαγωγή εναλλακτικού υποδοχέα

Από πολύ νωρίς οι Webster et al (1989) είχαν δημοσιεύσει ότι η CMV λοίμωξη HIV-1 οροθετικών αιμορροφιλικών ασθενών σχετιζόταν με ταχεία εξέλιξη της HIV-1 λοίμωξης (Webster 1989). Οι Tremblay et al (1993) είχαν επίσης παρατηρήσει αυξημένη παραγωγή ιών HIV-1 όταν επώασαν Μονοπύρηνα του Περιφερικού Αίματος (ΜΠΑ) HIV-1 οροθετικών ενηλίκων με ζωντανά παρασκευάσματα διαφόρων ερπητοϊών (Tremblay 1989). Οι Mc Keating et al (1990) είχαν ανακοινώσει ότι οι υποδοχείς FcRs που επάγονται στην επιφάνεια HEL ινοβλαστών μετά από μόλυνση από CMV επιτρέπουν στα ανοσοσυμπλέγματα του

HIV-1 να εισέλθουν στα κύτταρα που κανονικά είναι αδιαπέρατα απ'αυτόν (Mc Keating 1990).

I.4.1. Ενεργοποίηση της προϊκής αλληλουχίας LTR.

Μελέτες που ακολούθησαν έδειξαν ότι οι ερπητοϊοί HSV, EBV, CMV και HHV-8 επάγουν τον πολλαπλασιασμό του HIV-1 μέσω ενεργοποίησης της αλληλουχίας *Long Terminal Repeat (LTR)* του ιϊκού DNA και έναρξη της μεταγραφής. Αυτό γινόταν δυνατό άλλοτε μέσω παραγωγής ειδικών πρωτεϊνών ενεργοποίησης του ιού, όπως η πρωτεΐνη *Vpr* και άλλοτε μέσω παραγωγής ενδοκυττάρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο *NF-kB* (Davis MG 1987; Gendelman HE 1986; Kenney S 1988; Yurochko AD 1995; Sun Q 2005).

Τα πρώτα πειράματα επιτέλεσαν οι Gendelman et al (1986), που έδειξαν ότι όταν το DNA ορισμένων ιών συνυπάρξει με προϊκό DNA του HIV επάγει τη μεταγραφή του δευτέρου. Ο Gendelman μετέφερε σε κυτταρικές σειρές ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, που έφερε τη γονιδιακή περιοχή *LTR* του HIV συνδεδεμένη με το γονίδιο ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης *CAT*, και πλασμίδιο με DNA από διάφορους άλλους ιούς μεταξύ αυτών και του HSV-1 (γονιδιακή περιοχή *EcoRI-C*). Το πείραμα οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή του προϊόντος *CAT* που ήταν συνδεδεμένο με την *LTR* του HIV (Gendelman, 1986).

Ένα χρόνο αργότερα οι Davis et al ανακοίνωσαν ανάλογα συμπεράσματα με την ενεργοποίηση και έκφραση του ίδιου γονιδίου *CAT* από τη γονιδιακή περιοχή *IE gene region 2* του ιού CMV και το 1988 οι Kenney et al από το γονίδιο *BamHI MFL1* του EBV (γονίδια άμεσης φάσης). Η περιοχή αυτή της *LTR* που ενεργοποιείτο και άρχιζε τη μεταγραφή του προϊού HIV-1 ήταν άλλη από την *tat* εξαρτώμενη περιοχή (Davis 1987, Kenney 1988).

Το 1990 οι Mallon και συν. έδειξαν ότι το προϊόν του γονιδίου άμεσης φάσης *BZLF1* του EBV ενεργοποιεί την *LTR* αλληλουχία του HIV-1 προκαλώντας 18 φορές αύξηση της δραστηριότητας της 8-γαλακτοσιδάσης στα κύτταρα που έφεραν το γονίδιο της συνδεδεμένο με την HIV-1 *LTR* αλληλουχία, ενώ το προϊόν του γονιδίου του HIV-1 *tat* 44 φορές. Κύτταρα μολυσμένα και με τα δύο γονίδια *BZLF1* και *tat* παρουσίαζαν αύξηση 214 φορές στην έκφραση της 8-γαλακτοσιδάσης. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει τη συνεργική δράση των γονιδίων *BZLF1* και *tat* στην έκφραση του σχετιζόμενου με την HIV-1 *LTR* αλληλουχία *lacZ* γονιδίου της

γαλακτοσιδάσης και εντελει στην έκφραση της HIV-1 LTR αλληλουχίας (Mallon 1990).

Οι Scala και συν. (1993) δημιούργησαν δύο EBV-αρνητικές ανθρώπινες B-κυτταρικές σειρές, που σταθερά εξέφραζαν το γονίδιο EBNA2 της λανθάνουσας φάσης του EBV και τις μόλυναν με πλασμίδια, που μετέφεραν άλλοτε τη γνήσια και άλλοτε τη μεταλλαγμένη αλληλουχία LTR του HIV-1. Βρήκαν ότι υπήρχε μια σταθερά αυξημένη έκφραση της HIV-1 LTR στα EBNA2 θετικά κύτταρα σε σχέση με τα αρνητικά που προτείνει ότι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί το EBNA2 γονίδιο μπορούν πιθανά να ενεργοποιήσουν τον εκκινητή του HIV-1 επάγοντας πυρηνικούς παράγοντες που συνδέονται με τις cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες του HIV-1. Πειράματα από τους ίδιους μελετητές με πλασμίδια που μετέφεραν τα γονίδια EBNA1, EBNA3 και EBNA1P δεν ενεργοποιούσαν σημαντικά την HIV-1 LTR αλληλουχία. Η δράση αυτή του EBNA2 παρατηρήθηκε και σε HeLa σειρές επιθηλιακών κυττάρων που έφεραν τον HIV-1 (Scala 1993).

Το 1993 οι Feng et al έδειξαν και πάλι ότι ο HSV-1 ενεργοποιεί in vitro την έκφραση γονιδίων του HIV-1 σε μακροφάγα U937 που φιλοξενούν τον HIV σε λανθάνουσα φάση μέσω μονοπατιών διαφορετικών του NFκB (Feng 1993).

Οι Yurochko et al (1995) μελέτησαν πάλι τη συλλοίμωξη με τον CMV και έδειξαν ότι η in vitro μόλυνση HEL ινοβλαστών με γονίδια του HCMV (*pcDNA3*, *IE1-72*, *IE2-55* και *IE2-86*) προάγει την έκφραση των εκκινητών *p105/p50* και *p65* του *NF-κB* στους ινοβλάστες και κατά συνέπεια την ιική μεταγραφή του HIV (Yurochko 1995).

Οι Sun et al (2005) μελέτησαν τον πιθανό ρόλο του HHV-8 ως συμπαραγόντα του HIV και είπαν ότι το γονίδιο *vFLIP K13* του HHV-8 ίσως ενεργοποιεί την LTR HIV-1 μέσω ενεργοποίησης του κλασσικού μονοπατιού του NF-κB και σε συνεργασία με την πρωτεΐνη Tat του HIV-1 (Sun Q 2005)

Μια άλλη πολύ σημαντική μελέτη για πιθανή αλληλεπίδραση ερπητοϊού και HIV-1, αυτή τη φορά σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, έγινε από τους Diaz et al, που έδειξαν ότι η πρωτεΐνη *Us11* του HSV-1 η οποία είναι καθυστερημένο μεταγραφικό προϊόν του ιού και μεταφέρεται μαζί του στο ιοσωμάτιο, μπορεί να ρυθμίσει και να επάγει τη μεταγραφή και έκφραση του γονιδίου *env* του HIV-1 σε κύτταρα HeLa που μόλυνονται με DNA και των δύο ιών (Diaz 1996).

Οι Moreno et al (1997) παρατήρησαν σε κύτταρα νευρογλοίας που μόλυναν με ιούς HIV-1 και CMV, ότι ο CMV προήγαγε την έκφραση της LTR περιοχής του

HIV-1 όταν η έκφραση των γονιδίων και η παραγωγή πρωτεϊνών του HIV-1 ήταν από μόνη της μικρή, ενώ αντίθετα κατέστειλε την ενεργοποίηση της LTR περιοχής όταν η έκφραση των πρωτεϊνών του HIV-1 ήταν μεγάλη (Moreno 1997).

1.4.2. Αλληλεπίδραση σε επίπεδο υποδοχέων

Ιοί που επάγουν την έκφραση των υποδοχέων CD4 του HIV, όπως κάνει ο HHV-6 στα CD-8+ κυτ και τα NK, κάνουν τα κύτταρα περισσότερο ευπαθή στη μόλυνση από τον HIV (Lusso et al 1991, Lusso 1993), ενώ ιοί όπως ο HHV-7 που χρησιμοποιούν κοινούς υποδοχείς με τον HIV για να εισέλθουν στο κύτταρο φαίνεται να δρουν ανταγωνιστικά και να μειώνουν τον πολλαπλασιασμό του HIV (Lusso et al 1994).

Οι Pleskoff et al έδειξαν ότι όταν το γονίδιο *US28* του CMV, που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα β-χημοκίνης, ενσωματωθεί στο γονιδίωμα CD4 θετικών κυτταρικών σειρών που αντιστέκονται στην είσοδο του HIV (glioma derived cell line U373MG-CD4), επάγει την είσοδο του ιού σ' αυτά και κατά συνέπεια τη μόλυνση. Από άλλους μάλιστα έχει προταθεί ότι ο υποδοχέας *US28* βρίσκεται συνδεδεμένος στο φάκελλό του CMV, απ' όπου μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή από την είσοδο κιόλας του ιού στο κύτταρο, ενώ δεν έχει αρχίσει ακόμα να πολλαπλασιάζεται (Pleskoff 1997).

Ανταγωνιστική παρά συναγωνιστική δράση του ερπητοϊού HHV-8 για τον HIV-1 έδειξαν οι Moore et al το 1996 με την εκλεκτική έκφραση του γονιδίου *vMIP-I* του HHV-8 σε κυτταρικές καλλιέργειες που ήταν μολυσμένες με τον HIV-1. Οι ερευνητές είχαν μεταφέρει το γονίδιο *vMIP-I* του HHV-8 με πλασμίδιο μεταφορέα. Υπέθεσαν πως η παραγόμενη χημοκίνη δεσμεύει τον κυτταρικό συν-υποδοχέα του HIV-1 και έτσι δρα ανταγωνιστικά προς την είσοδο του στο κύτταρο (Moore 1996).

Την ανταγωνιστική δράση του HHV-8 δεν επιβεβαίωσαν οι Mercader et al, οι οποίοι αντίθετα έδειξαν μία σημαντική αύξηση του διπλασιασμού του HIV-1 όταν καλλιέργησαν *in vitro* CD4+ T-κυτταρικές σειρές μολυσμένες με HIV-1 παρουσία B-κυτταρικών σειρών μολυσμένων με HHV-8, αλλά και *in vivo* με την ένεση T λεμφοκυττάρων μολυσμένων με HIV-1 και εναιωρήματος ιών HHV-8 σε ανθρώπινο δέρμα που είχαν μεταμοσχεύσει πάνω σε σοβαρά ανοσοκατασταλμένο ποντίκι (Mercader 2001). Η διαφορά των αποτελεσμάτων στις παραπάνω μελέτες οφείλεται

πιθανά στο γεγονός ότι ο Moore δε χρησιμοποίησε ολόκληρο τον ιό HHV-8 για να μολύνει τα κύτταρά του αλλά το επιμέρους γονίδιο.

I.4.3. Υποβοήθηση μέσω παραγωγής κυτταροκινών

Η έρευνα για πιθανή παρακρινική δράση μεταξύ ερπητοϊών και HIV-1, μέσω παραγωγής χημειοκινών, έχει ξεκινήσει από πολύ παλιά.

Οι Clouse et al είχαν διεγείρει αρχικά μονοκύτταρα από υγιές προσωπικό του εργαστηρίου τους με ανενεργά παρασκευάσματα ερπητοϊών και χρησιμοποίησαν το παραγόμενο προϊόν (κυτταροκίνες) στο μέσο καλλιέργειας προμνοκυττάρων/μακροφάγων και T κυττάρων που έφεραν τον HIV-1 σε λανθάνουσα κατάσταση (χρόνια μόλυνση). *Βρήκαν ότι το υλικό που προερχόταν από τη διέγερση με τους ιούς CMV και EBV και όχι με τους HSV, VZV και HHV6, οδηγούσε τελικά σε πολλαπλασιασμό του HIV-1 (cytokine induced signal transduction) (Clouse 1989).*

Αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (μακροφάγα), που έχουν μολυνθεί από έναν ιό, διεγείρουν και ενεργοποιούν ανοσολογικά, T-μνημονικά κύτταρα που φέρουν τον HIV-1 προϊό σε λανθάνουσα κατάσταση επάγοντας τον πολλαπλασιασμό του. Οι Dobrescu et al βρήκαν να ισχύει αυτό σε μια σειρά CD4 T-κυττάρων μολυσμένων με HIV-1 που έφεραν υποδοχείς για το αντιγόνο *V beta 12* του CMV όταν έρχονταν σε επαφή με μονοκύτταρα μολυσμένα με τον CMV που έφεραν στην επιφάνειά τους το συγκεκριμένο Ag του ιού (Dobrescu 1995).

I.4.4. Υποβοήθηση με τη δημιουργία “ψευδότυπων”

“Ψευδότυποι” (pseudotypes) HIV είναι ισωμάτια (virion) που περιλαμβάνουν RNA του HIV περιβαλλόμενο από στρώμα γλυκοπρωτεϊνών που προέρχεται από ένα “συνεργάτη” ερπητοϊό. Οι “ψευδότυποι” δημιουργούνται όταν οι δύο ιοί βρεθούν στο ίδιο κύτταρο και αποτελούν δομές, που δυνητικά μπορούν στη συνέχεια να μολύνουν άλλα κύτταρα χρησιμοποιώντας ως υποδοχέα, τον υποδοχέα του ερπητοϊού αντί του δικού τους CD4 μορίου. Έχει δειχθεί ότι ο HSV-1 μολύνει επίμονα λεμφοκύτταρα Περιφερικού Αίματος και CD4+ T-κυτταρικές σειρές, οι οποίες στη συνέχεια μετά από επιλοίμωξη με τον HIV παράγουν ισωμάτια HIV που σχηματίζουν “ψευδότυπους” με τον γλυκοπρωτεϊνικό φάκελο του HSV-1 (Calistri 1998).

Σχηματισμό “ψευδότυπων” μεταξύ HIV-1 και CMV έχουν περιγράψει και οι Margalith et al σε κύτταρα νεφρικών σωληναρίων που ήταν μολυσμένα και με τους δύο ιούς (Margalith 1995).

Πιν. 7 Ενδείξεις, από in vitro δεδομένα, για τη συνέργεια ερπητοϊών και HIV, με αποτέλεσμα την προώθηση του πολ/σμού του HIV

√: Τα δεδομένα υποστηρίζουν τη διέγερση

X: Τα δεδομένα απορρίπτουν τη διέγερση (ή δείχνουν αναστολή)

Κενό: χωρίς δεδομένα

Ιός	Ενεργοποίηση της μεταγραφής	Απελευθέρωση κυτοκινών (παρακρινική δράση)	Εναλλακτικός HIV υποδοχέας	Επαγωγή έκφρασης ή ανταγωνισμός CD4 υποδοχέων ή συνυποδοχέων	Ενεργοποίηση μέσω αντιγόνοπαρουσίας	Δημιουργία ψευδότυπων
HSV	√ (Gendelman, 1986, Feng 1993, Diaz 1996)	X (Clouse 1989)				√ (Calistri 1998)
VZV		X (Clouse 1989)				
EBV	√ (Kenney 1988, Mallon, 1990, Scala 1999)	√ (Clouse 1989)				
CMV	√ (Davis 1987, Yurochko 1995, Moreno 1997)	√ (Clouse 1989)	√ (Pleskoff 1997)		√ (Dobrescu 1995)	√ (Margalith 1995)
HHV-6	√	X (Clouse 1989)		√ (Lusso et al 1991)		
HHV-7				X (Lusso et al 1994)		
HHV-8	√ (Sun 2005)			X (Moore 1996)		

I.4.5. Δεδομένα από κλινικές μελέτες

Οι Mole et al είχαν ανακοινώσει αυξημένα επίπεδα HIV ιικού φορτίου του (μέση τιμή αύξησης 3,4 φορές) κατά τη διάρκεια οξέων επεισοδίων μόλυνσης HIV ασθενών από τον HSV, που σε μερικούς παρέμεναν υψηλά ακόμα και μετά το οξύ επεισόδιο (Mole 1997). Επίσης πολλοί επιστήμονες είχαν παρατηρήσει ότι η θεραπεία με φοσκαρνέτη, γνωστό αντι-ερπητικό φάρμακο, οδηγούσε σε σημαντική μείωση των επιπέδων του HIV-1 ιικού φορτίου σε όλους σχεδόν τους ασθενείς που την ίδια στιγμή ήταν μολυσμένοι με τους ιούς CMV, HSV και HHV8 (Devianne-Garrigue 1998, Kaiser 1995).

Οι Kovacs et al ανακοίνωσαν από μια μεγάλη μελέτη 440 βρεφών που γεννήθηκαν από HIV θετικές μητέρες και παρακολούθηθηκαν για τέσσερα χρόνια, ότι τα βρέφη που ήταν θετικά (με κ/ες ή ορολογικές δοκιμασίες) και για CMV λοίμωξη, είχαν ταχύτερη πρόοδο της HIV λοίμωξης και πιο συχνή προσβολή του ΚΝΣ. Το αποτέλεσμα αυτό δε συνέβαινε μέσω ευόδωσης του διπλασιασμού του HIV-1 αλλά μέσω άλλων μηχανισμών, που δεν είναι ακριβώς ξεκάθαροι (Kovacs 1999).

I.4.6. Αλληλεπίδραση ερπητοϊών και HIV μετά την εφαρμογή της HAART

Στις αναπτυγμένες χώρες η εισαγωγή της HAART έχει οδηγήσει σε σημαντική μείωση της θνητότητας από AIDS. Μέσω αναστολής του διπλασιασμού του HIV για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η HAART μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση της ανοσολογικής λειτουργίας (ανοσολογική ανασυγκρότηση) και σε αποκατάσταση της ανοσίας έναντι συγκεκριμένων παθογόνων. Σαν αποτέλεσμα η επίπτωση των ευκαιριακών λοιμώξεων έχει μειωθεί και εάν η ανάκαμψη της ανοσίας είναι επαρκής, η δευτερογενής προφύλαξη έναντι της πνευμονίας από *Pneumocystis carinii* και της αμφιβληστροειδίτιδας από CMV μπορεί να διακόπτεται χωρίς υποτροπή της νόσου. Δεν ανταποκρίνονται όμως όλοι οι ασθενείς το ίδιο στη HAART. Για το λόγο αυτό παραμένει σημαντική ακόμα η ανάγκη κατανόησης παραγόντων κινδύνου, όπως π.χ. η συμπαρουσία της ερπητικής DNA/αιμίας, για την πρόοδο της νόσου AIDS και για τη θνητότητα των ασθενών.

Οι Deayton et al έχουν ανακοινώσει ότι η CMV DNA αιμία σε HIV-1 θετικούς ασθενείς είναι δείκτης φτωχής πρόγνωσης, ακόμα και μετά την εισαγωγή της HAART (Deayton 2004). Ανάλογη είναι και η παρατήρηση των Jabs et al ότι το ιικό

φορτίο του CMV αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα για αυξημένη θνητότητα σε ασθενείς με AIDS (Jabs 2005). Οι Kempen et al διαπίστωσαν επίσης σε μη τυχαιοποιημένη μελέτη τους, ότι ασθενείς με AIDS και CMV ρετινίτιδα που έλαβαν HAART και γκανσικλοβίρη παρουσίασαν μικρότερη θνητότητα από εκείνους που έλαβαν μόνο HAART (Kempen 2003).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να υπολογίσουμε την ποιοτική DNA/αιμία των ερπητοϊών HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8 στα Περιφερικά Λευκοκύτταρα του αίματος (ΠΛΑ), μεμονωμένη και πολλαπλή, HIV-1 οροθετικών και οροαρνητικών ενηλίκων στον ελληνικό πληθυσμό και να τη συσχετίσουμε με επιδημιολογικούς και κλινικούς παράγοντες, όπως την ηλικία, το φύλο, τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων και το ιϊκό φορτίο του HIV-1, καθώς και το ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε HAART.

Η συχνότητα της ερπητικής DNA/αιμίας, αν και αρκετά μελετημένη στο διεθνή χώρο, στον ελληνικό πληθυσμό είναι σχεδόν άγνωστη.

Είδαμε επίσης από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για τον πιθανό ρόλο των ερπητοϊών ως συμπαραγόνα στη HIV λοίμωξη. Τα περισσότερα όμως δεδομένα προέρχονται από μελέτες πριν την εισαγωγή της HAART στη θεραπεία του AIDS ή είναι σε επίπεδο *in vitro* χωρίς να λαμβάνεται υπόψη ο παράγοντας ανοσολογική ανασυγκρότηση, που σήμερα επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της HAART.

Στη μελέτη μας θελήσαμε να διερευνήσουμε πόσο ισχυρή είναι αυτή η σχέση (συμπαραγόνα) μεταξύ των παραπάνω ερπητοϊών και του HIV υπό το φώς των νέων δεδομένων, που αφορούν την ανοσολογική ανασυγκρότηση με την είσοδο της HAART σε *in vivo* επίπεδο. Για το λόγο αυτό μελετήσαμε τη σχέση μεταξύ ερπητικής DNAαιμίας, μεμονωμένης ή πολλαπλής, και απάντησης στη HAART, σε ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά HAART ή έχουν ήδη λάβει HAART και αλλάζουν σχήμα, με κριτήριο τη μείωση του HIV ιϊκού φορτίου (VL) σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα και την αύξηση του αριθμού των CD4+ κυττάρων .

II. ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Δείγμα ασθενών

Ο πληθυσμός της μελέτης μας αποτελείτο από 163 HIV-1 οροθετικούς ασθενείς και 200 φυσιολογικούς αιμοδότες. Συμπεριλήφθησαν όλοι οι ασθενείς που παρακολούθηθηκαν στο Νοσοκομείο “Συγγρός-Κέντρο Αναφοράς για το AIDS στην Ελλάδα” από τον Νοέμβριο του 2000 μέχρι και το Φεβρουάριο του 2001.

Οι ασθενείς υπέγραψαν έγγραφη συγκατάθεση συμμετοχής στη μελέτη σύμφωνα με την τοπική Επιτροπή Ηθικής του Νοσοκομείου.

Εκατόν τέσσερις (64%) από τους 163 HIV-1 οροθετικούς λάμβαναν HAART κατά την έναρξη της μελέτης μας. Θα αναφερόμαστε στο εξής στους ασθενείς αυτούς με τον όρο “παλαιοί σε HAART”. Πενήντα εφτά ασθενείς (35%) δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη και δύο ασθενείς (1%) θεραπεύονταν με θεραπεία άλλη από HAART, την οποία δεν άλλαξαν.

Σαράντα τέσσερις ασθενείς από τους πρώτους (παλαιοί σε HAART) άλλαξαν θεραπευτικό σχήμα HAART εντός τριών μηνών από την ένταξή τους στη μελέτη. Οι 17 (39%) απ’ αυτούς άλλαξαν σχήμα, λόγω ανεπαρκούς ανταπόκρισης στη HAART (“ομάδα A”) και υπόλοιποι 27 (61%) λόγω επιπλοκών.

Από τους ασθενείς, που δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπεία, 35 ξεκίνησαν HAART μέσα στους επόμενους τρεις μήνες από την έναρξη της μελέτης, λόγω επιδείνωσης της νόσου τους (“ομάδα B”).

Οι ομάδες A και B διαιρέθηκαν παραπέρα η καθεμία χωριστά σε δύο υπο-ομάδες με βάση τον αριθμό των CD4+ T-κυττάρων, με σκοπό την εκτίμηση της ανασυγκρότησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Η διαίρεση έγινε με βάση το όριο των 200 CD4+ T-κυττάρων/μL σε κάθε ομάδα, αφού από το επίπεδο αυτό και κάτω η ανοσοανεπάρκεια είναι σοβαρότερη (Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents 2002) Οι υπο-ομάδες, που προέκυψαν A(minus) και B(minus) είχαν αριθμό CD4+ T-κυττάρων < 200 και οι υπο-ομάδες A(plus) και B(plus) είχαν αριθμό CD4+ T-κυττάρων \geq 200.

Η υπο-ομάδα A(minus) αποτελείτο από 7 ασθενείς με αριθμό CD4+ κυτ. <200 cells/μL (mean value=98 cells/μL) και η υπο-ομάδα A(plus) από 10 ασθενείς με αριθμό CD4+ κυτ. \geq 200 cells/μL (mean value=380 cells/μL).

Πίνακας 8. Χαρακτηριστικά ασθενών κατά την ένταξη στη μελέτη

	N	%
Συνολικός αριθμός ασθενών	163	100
Άνδρες	140	86
Γυναίκες	23	14
Ασθενείς με HIV VL<50 copies/μl	88	54
Ασθενείς με HIV VL≥50 copies/μl	75	56
Ασθενείς με CD4+<200 κυτ/μL	29	18
Ασθενείς με CD4+≥200 κυτ/μL	134	82
Ασθενείς με εμπειρία στη HAART	104	64
<ul style="list-style-type: none"> • Ασθενείς που άλλαξαν σχήμα HAART λόγω ανεπαρκούς απάντησης (Ομάδα A) 	17	10
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Υποομάδα A minus (CD4+<200 κυτ /μL) 	7	4
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ➢ Υποομάδα A plus (CD4+≥200cells/μL) 	10	6
<ul style="list-style-type: none"> • Ασθενείς που άλλαξαν σχήμα HAART λόγω τοξικότητας από τα φάρμακα 	27	17
Ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά HAART (Ομάδα B)	35	21
<ul style="list-style-type: none"> • Υποομάδα B minus (CD4+<200 cells/μL) 	15	9
<ul style="list-style-type: none"> • Υποομάδα B plus (CD4+≥200 cells/μL) 	20	12
Ασθενείς με εμπειρία θεραπείας άλλη από HAART	2	1

Η υπο-ομάδα B (minus) αποτελείται από 15 ασθενείς με αριθμό CD4+ κυτ. <200 cells/μl (mean value=134 cells/μL) και η υπο-ομάδα B(plus) από 20 ασθενείς με αριθμό CD4+ κυτ. ≥200 cells/μL (mean value=390 cells/μL) (πιν. 8)

Ανιχνεύσαμε την παρουσία του DNA των ερπητοϊών HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8 στα Περιφερικά Λευκοκύτταρα του αίματος (ΠΛΑ) όλων των ασθενών και όλων των μαρτύρων, χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα ποιοτικής PCR. Η ανίχνευση όλων των ερπητοϊών έγινε μία φορά για κάθε ασθενή, τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη.

Παράλληλα έγιναν μετρήσεις του αριθμού των CD4+ T-κυττάρων και του HIV-1 ιικού φορτίου κάθε τρεις μήνες, για μία περίοδο 21 μηνών.

II.2. Υλικά και μέθοδοι

II.2.1. Συλλογή αίματος και επεξεργασία

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε σε EDTA αντιπηκτικά σωληνάρια. Μέρος από αυτό χρησιμοποιήθηκε για άμεση μέτρηση των CD4⁺ T κυττάρων. Με φυγοκέντρηση απομονώθηκε το ελεύθερο κυττάρων πλάσμα, στο οποίο μετρήθηκε το ιικό φορτίο του HIV-1. Τα εναπομείναντα κύτταρα του αίματος χρησιμοποιήθηκαν για το extraction του γενωμικού DNA.

II.2.2. Προσδιορισμός του αριθμού των CD4 T-κυττάρων και του HIV-1 ιικού φορτίου

Η μέτρηση του RNA του HIV-1 στο πλάσμα έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική ενίσχυσης του RNA (Nuclisens-NASBA Diagnostics). Ο αριθμός των CD4⁺ T-κυττάρων προσδιορίστηκε με four-color κυτταρομετρία ροής και τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων από τους Becton Dickinson (San Jose, California, USA).

II.2.3. Απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA από το περιφερικό αίμα - ανίχνευση του ερπητικού DNA μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR)

II.2.3.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από περιφερικό αίμα.

Περίπου 5 ml περιφερικού αίματος συλλέγονται και διατηρούνται με αντιπηκτικό (K-Na EDTA) σε θερμοκρασία 4⁰C. Αρχικά γίνεται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων (απύρηνα) με επώαση του αίματος σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 10 mM Tris HCl pH 8.0, 320 mM σουκρόζη, 5 mM MgCl₂ και 1% Triton-X-100. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 2500 rpm. Το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται και επαναιωρείται σε διάλυμα που περιέχει Tris pH 8.0 400 mM, EDTA 60 mM, NaCl 150 mM και SDS 1%. Ακολουθεί προσθήκη 1/20 όγκου υπερχλωρικού νατρίου 5 μM, προσθήκη χλωροφόρμιου και κατακρήμνηση του DNA με αιθανόλη. Η ποσότητα του DNA που

απομονώθηκε και η καθαρότητά του υπολογίζονται έπειτα από φωτομέτρηση στα 260 nm και στα 280 nm.

II.2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1987 από τον Mullis και τους συνεργάτες του (Mullis & Faloona 1987). Έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία, αντικαθιστώντας σε καθολική βάση τους έως τότε υπάρχοντες τρόπους ανάλυσης του DNA σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια. Η μέθοδος επιτυγχάνει σε χρόνο που δεν υπερβαίνει τις 2-3 ώρες, την ειδική ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με εκθετικό τρόπο, ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη τους. Η μεγάλη απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών DNA, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε πολύ μικρό αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μία σχετική αποδιάταξη.

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση προερχόμενη από θερμοφιλά βακτηρίδια (*Thermus aquaticus*- Taq), μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων και το ζευγάρι των εκκινήτων (primers). Οι τελευταίοι είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία ως προς δύο θέσεις εκατέρωθεν της DNA αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί, οπότε και προσδένονται σ'αυτές. Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95⁰C για 1min, ώστε να διαχωριστούν οι άλυσσοι και να μπορέσει να γίνει ο υβριδισμός, ο οποίος με τη σειρά του σηματοδοτεί την έναρξη της προσθήκης, από την DNA πολυμεράση, δεσοξυριβονουκλεοτιδίων ομολόγων προς τις αντίστοιχες θέσεις της μητρικής αλύσου. Ακολουθούν 30-35 κύκλοι, καθένας εκ των οποίων περιλαμβάνει τρία βήματα: 94⁰C αποδιάταξη, 55-60⁰C υβριδισμός των εκκινήτων και 72⁰C πολυμερισμός, διάρκειας περίπου 30-40sec το κάθε βήμα. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση $N = \eta (1+e)^c$, όπου N= η τελική ποσότητα του προϊόντος, η= η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e= η απόδοση της αντίδρασης και c= ο αριθμός των κύκλων της PCR (Mullis & Faloona 1987).

Ρυθμιστικοί παράγοντες της PCR

Η επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού, τόσο ως προς την απόδοση, όσο και ως προς την ειδικότητα, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τους παρακάτω παράγοντες.

Επιλογή των κατάλληλων εκκινητών

Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Η επιλογή εικοσαμερών (20bp) για εκκινητές επιτρέπει την ειδική ενίσχυση αλληλουχιών, αφού μήκος τόσων βάσεων είναι συνήθως μοναδικό στο γονιδίωμα. Τους δίνει επίσης τέτοια θερμοδυναμική σταθερότητα, ώστε σε θερμοκρασία 55⁰C να αποδιατάσσονται. Η συνήθης συγκέντρωση ενός εικοσαμερούς εκκινητή σε μία PCR αντίδραση είναι 0.5 μM.

Προσδιορισμός της ακριβούς θερμοκρασίας αναδιάταξης των εκκινητών

Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλει ανάλογα με το είδος των βάσεων των εκκινητών και του DNA υποστρώματος. Κυμαίνεται μεταξύ 37⁰C και 60⁰C, τιμές ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού T_m (θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο). Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριδισμό, με χαμηλότερη όμως απόδοση, ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες αυξάνουν την απόδοση σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR αντίδρασης από σύνδεση των εκκινητών σε θέσεις του γονιδιώματος με σχετική μόνο ομολογία προς αυτούς.

Κατάλληλες συγκεντρώσεις δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg

Τα ιόντα Mg είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για τη δράση της πολυμεράσης και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην ποσότητά τους. Μεγάλες συγκεντρώσεις MgCl₂ αυξάνουν την ενεργότητα της πολυμεράσης, μειώνοντας όμως ταυτόχρονα την

πιστότητά της. Το αντίθετο ισχύει για μικρότερες συγκεντρώσεις. Οι συνήθεις ιδανικές συγκεντρώσεις ιόντων Mg κυμαίνονται περί τα 25 mM/αντίδραση. (Myers και Gelfand 1991)

Ρυθμιστικά διαλύματα της PCR

Τα δ/τα αυτά ρυθμίζουν την τιμή του pH για τη μέγιστη απόδοση της πολυμεράσης.

Κανονικοποίηση συνθηκών αντίδρασης PCR

Για δεδομένο ζευγάρι εκκινητών, η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μία αντίδραση PCR περιλαμβάνει σειρά πειραμάτων όπου σταδιακά και ανεξάρτητα κάθε φορά μεταβάλλονται η θερμοκρασία και η συγκέντρωση των ιόντων Mg.

Συνθήκες αντιδράσεων PCR που χρησιμοποιήθηκαν

Το δ/μα των PCR αντιδράσεων προκειμένου για την ανίχνευση του ερπητικού DNA αποτελείτο από: PCR buffer 1X, 0,5mM MgCl₂, 0,05mM από κάθε dNTP, 0,3mM από κάθε primer and 0,65 μονάδες ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ιό φαίνονται στον πιν.9.

Οι συνθήκες PCR για τον HHV8 αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 3min, στη συνέχεια 8 κύκλοι στους 94°C για 40sec, 57°C για 30sec και 72°C για 30sec και 27 κύκλοι των 94°C για 40sec, 57°C για 30sec και 72°C για 30sec, και ένα τελικό στάδιο τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 10min. Το προϊόν της PCR ήταν 96bp (εικόνα 7)

Οι συνθήκες PCR για τον CMV αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 94°C για 3min, στη συνέχεια 13 κύκλοι στους 94°C για 45sec, 57°C για 30sec και 72°C για 30sec και 27 κύκλοι των 94°C για 45sec, 55°C για 30sec και 72°C για 30sec ακολουθούμενοι από το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 10min. Το προϊόν της PCR ήταν 167bp. (εικόνα 7)

Οι συνθήκες κυκλοποίησης για τους ιούς HSV-1 και -2 ήταν: 94°C για 3min, 37 κύκλοι των 94°C για 50sec, 64°C για 40sec και 72°C για 50sec και τελική

επιμήκυνση στους 72°C για 10min. Το αναμενόμενο προϊόν της PCR ήταν 478bp.(εικόνα 7)

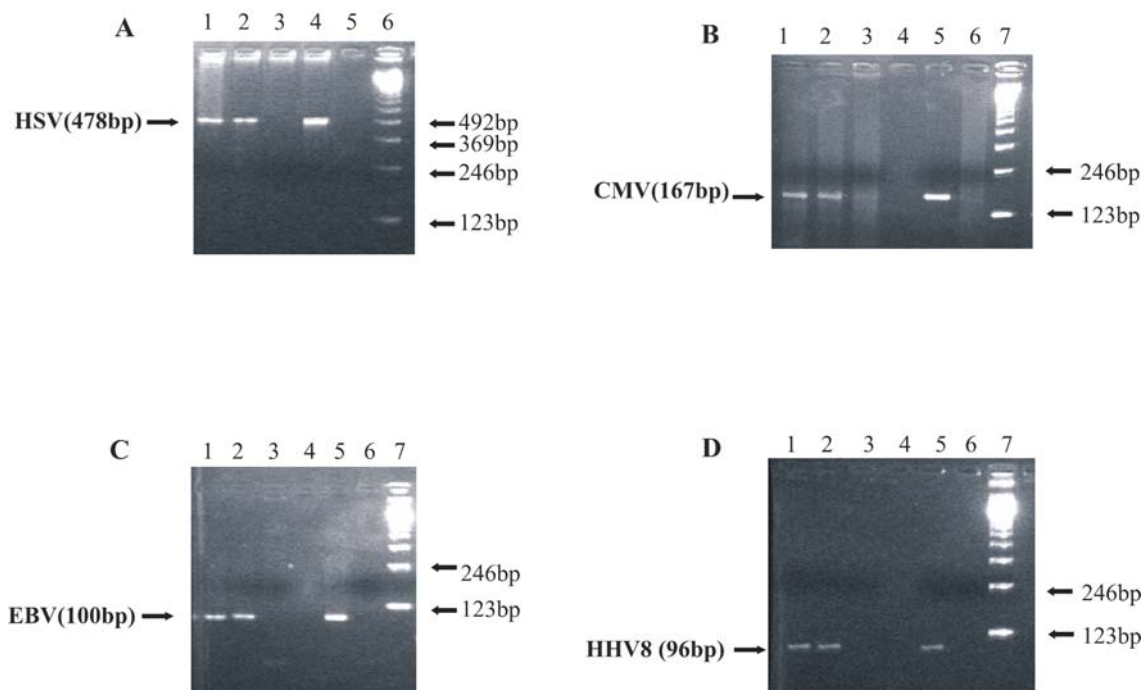
Πίνακας 9. Αλληλουχίες των εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των ερπητοϊών HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8

HSV	
Forward primer	5'-CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGA-3'
Reverse primer	5'-GTAGATGGTGCGGGTGATGTT-3'
CMV	
Forward primer	5'-GTGACCAAGGCCACGACGTT-3'
Reverse primer	5'-TCTGCCAGGACATCTTTCTC-3'
EBV	
Forward primer	5'-AGCACCCCCACATATCTCTTCTT-3'
Reverse primer	5'-CGAGTCATCTACGGGGACACGGA-3'
Forward primer nested	5'-GGAGAAGGTCTTCTCGGCCTC-3'
Reverse primer nested	5'-TTCAGAGAGCGAGACCCTGC-3'
HHV-8	
Forward primer	5'-GGACAGCGTGTCAGACTTCG-3'
Reverse primer	5'-CTTGAAGATCTTTTCAGCCTC-3'

Τα θετικά για τον HSV δείγματα επωάζονταν με το περιοριστικό ένζυμο-ενδονουκλεάση, *AvaII*, στους 37°C για 6 ώρες. Τα προϊόντα πέψης για τον HSV-1 ήταν MB 87, 183 and 206 bp ενώ για τον HSV-2 ήταν 87 and 389 bp.(εικόνα 8) Τα προϊόντα της PCR που αντιστοιχούσαν στους HSV-1 and HSV-2 ενσωματώνονταν σε ένα πλασμίδιο-όχημα και υποβάλλονταν σε μία δεύτερη πέψη, χρησιμοποιώντας το ίδιο ένζυμο *AvaII*, ούτως ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης και ακριβής πέψη των επιμέρους κλασμάτων.

Οι συνθήκες της PCR για τον EBV ήταν: αποδιάταξη στους 94°C για 3 min, 35 κύκλοι των 94°C για 30sec, 65°C για 30sec και 72°C για 30sec και τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7min. Οι συνθήκες της 'εσωτερικής' PCR ήταν οι ίδιες με της 'εξωτερικής' με μόνη διαφορά τη θερμοκρασία υβριδισμού που ήταν 68°C. Τα προϊόντα κάθε PCR ήταν 194bp και 100bp αντίστοιχα.(εικόνα 7) Χρησιμοποιήσαμε

‘εσωτερική’ PCR για την ανίχνευση του EBV σε όλους τους ασθενείς και τους μάρτυρες, προκειμένου να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου για ανίχνευση μέχρι και 200 αντίγραφα/ml.

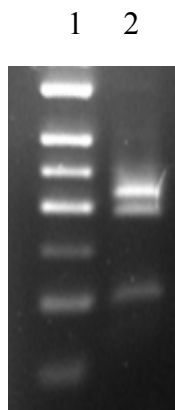


Εικόνα 7. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές ζώνες θετικών και αρνητικών δειγμάτων για κάθε ερπητοϊό που μελετήσαμε:

A. Θετικά δείγματα για **HSV** στα πηγάδια 1 και 2, αρνητικό δείγμα στο πηγάδι 3, θετικό control HSV στο πηγάδι 4, αρνητικό control της PCR αντίδρασης στο πηγάδι 5, DNA ladder στο πηγάδι 6

B. CMV, C. EBV, και D. HHV8: θετικά δείγματα στα πηγάδια 1 και 2, αρνητικό δείγμα στο πηγάδι 3, άδειο πηγάδι 4, θετικό control του κάθε ιού στο πηγάδι 5, αρνητικό control της PCR αντίδρασης στο πηγάδι 6, DNA ladder στο πηγάδι 7.

Η παρουσία των αλληλουχιών DNA του κάθε ιού επιβεβαιώθηκε από τα θετικά δείγματα με τη μέθοδο της ανεύρεσης της ακριβής αλληλουχίας βάσεων DNA (μέθοδο sequencing) στο προϊόν της PCR. Προκειμένου να είμαστε σίγουροι ότι οι αντιδράσεις PCR, που σχεδιάσαμε και εφαρμόσαμε, ήταν αρκετά ευαίσθητες ώστε να ανιχνεύουν σχετικά χαμηλά επίπεδα ιικού DNA, διαδοχικές αραιώσεις, στο



Εικόνα 8. Στην εικόνα αυτή παρουσιάζονται τα

προϊόντα πέψης θετικού δείγματος HSV-1
μετά από επώαση με το ένζυμο *Ava II*.

Πηγάδι 1: DNA ladder **Πηγάδι 2:**

προϊόντα πέψης θετικού δείγματος HSV-1
(MB 87, 183 και 206 bp)

δεκαπλάσιο, του κλωνοποιημένου ιϊκού προϊόντος της PCR με ένα γνωστό αριθμό αντιγράφων (4×10^6 αντίγραφα/ml) ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Η ευαισθησία έτσι όλων των PCR αντιδράσεων και η ανίχνευση κάθε ερπητοϊού έφθανε τα 200 αντίγραφα/ml.

Τα προϊόντα των PCR αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. (εικόνα 7 και 8)

II.2.4. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Προκειμένου για τη σύγκριση των συχνοτήτων ερπητικής DNAαιμίας μεταξύ HIV-1 οροθετικών ασθενών και φυσιολογικών μαρτύρων έγιναν προηγουμένως οι απαραίτητες προσαρμογές όσον αφορά το φύλο και χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Προκειμένου για τις συγκρίσεις των διαφόρων μεταβλητών μεταξύ των υπο-ομάδων στους HIV-1 οροθετικούς ασθενείς χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές και μη παραμετρικές δοκιμασίες. Τιμές του *P* μικρότερες του 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές..

Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση της ερπητικής DNAαιμίας, μεμονωμένης και πολλαπλής, στη μεταβολή του ιϊκού φορτίου μετά την έναρξη της HAART, στις ομάδες των ασθενών που ξεκίνησαν ή άλλαξαν HAART εφαρμόσαμε ανάλυση Kaplan-Meier. Ως καταληκτικό σημείο ορίσαμε το χρόνο που χρειάστηκε για να μειωθεί το ιϊκό φορτίο του HIV-1 σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα (<50 cps/ml). Οι ασθενείς που δεν έφτασαν ποτέ σ' αυτό το σημείο ή άλλαξαν θεραπεία, ορίστηκαν ως αποτυγχόντες.

Η επίδραση της ερπητικής DNAαιμίας στην ανασυγκρότηση του ανοσοποιητικού συστήματος μετά την έναρξη της HAART μελετήθηκε μόνο στους ασθενείς με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια όπως αυτή ορίζεται στο επίπεδο των CD4+ T κυττάρων < 200cells/μL. Εφαρμόστηκε και πάλι ανάλυση Kaplan-Meier στις αντίστοιχες υπο-ομάδες Aminus και Bminus. Καταληκτικό γεγονός ορίστηκε η υπερπήδηση του ορίου των 200cells/μL και συγκρίθηκαν οι χρόνοι που χρειάστηκαν για να γίνει αυτό στις επιμέρους ομάδες

Τέλος, προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την πρόοδο της HIV νόσου, όπως αυτή εκφράζεται με τη μεταβολή του αριθμού των CD4+ κυττάρων στο βάθος του χρόνου, στις παραπάνω ομάδες ασθενών, με τη συν-παρουσία μίας ή πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας. Για το σκοπό αυτό εφαρμόσαμε το γενικό γραμμικό μοντέλο του στατιστικού πακέτου SPSS για επαναλαμβανόμενες τιμές CD4 κυττάρων (Repeated measures, multivariate και univariate).

Οι στατιστικοί υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS software, version 11.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο πληθυσμός μελέτης αποτελείτο από 163 HIV-1 οροθετικούς ενήλικες. Εκατόν σαράντα (86%) ήταν άντρες και 23 (14%) ήταν γυναίκες. Ο μέσος όρος ηλικίας του δείγματος ήταν 40,5 (23-77) έτη και η μέση ηλικία ορομετατροπής για τον HIV-1 ήταν τα 35 έτη. Η οδός μετάδοσης του HIV-1 ήταν σεξουαλική σε ποσοστό 87%, από μετάγγιση αίματος 10% και αδιευκρίνιστη σε ποσοστό 3%. Οι 64 ενήλικες (39%) είχαν AIDS σύμφωνα με τα κριτήρια ταξινόμησης για το AIDS του 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults.

Κατά την ένταξή τους στη μελέτη, 29 (18%) ασθενείς είχαν αριθμό CD4+ T-κυττάρων <200 κυτ/μL με μέση τιμή 118 κυτ/μL και 134 (82%) είχαν αριθμό CD4+ T-κυττάρων \geq 200 κυτ/μL με μέση τιμή τα 602 cells/μL. Το ιικό φορτίο (VL) του HIV-1 στα 88 (54%) από τα 163 άτομα ήταν μη ανιχνεύσιμο (< 50 copies/ml).

Εκατόν τέσσερις (64%) από τους 163 HIV-1 οροθετικούς ενήλικες λάμβαναν HAART τη στιγμή της ένταξης στη μελέτη. Ο μέσος αριθμός σχημάτων HAART που είχε αλλαχτεί ανά ασθενή ήταν 2.4. Πενήντα επτά ασθενείς (35%) δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία και δύο ασθενείς (1%) λάμβαναν άλλη από HAART θεραπεία, η οποία δεν άλλαξε.

Το δείγμα των HIV αρνητικών αιμοδότων αποτελείτο από 88 άντρες και 112 γυναίκες.

III.1. Σύγκριση Ερπητικής DNAαιμίας μεταξύ HIV-1 οροθετικών και HIV-1 οροαρνητικών ενηλίκων.

Εκατόν δέκα έξι (71%) από τους 163 HIV-1 οροθετικούς ενήλικες ανευρέθηκαν θετικοί για την αλληλουχία DNA του CMV στα ΠΛΑ, 76 (47%) για την παρουσία DNA του HSV-1, 62 (38%) για τον EBV και 46 (28%) για την αλληλουχία DNA του HHV-8. Αντίθετα οι 48 (24%) από τους 200 φυσιολογικούς μάρτυρες είχαν DNA του CMV στα ΠΛΑ, 0 (0%) DNA του HSV-1, 54 (27%) DNA του EBV, και 33 (17%) του HHV-8. Τα παραπάνω ποσοστά διαφέρουν μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά (σε όλες τις περιπτώσεις $P<0.02$). Αλληλουχία DNA του HSV-2 δεν ανιχνεύθηκε στα ΠΛΑ σε κανένα από τους δύο πληθυσμούς. Μεμονωμένη Ερπητική DNAαιμία στα ΠΛΑ ανιχνεύθηκε στο 30% των HIV-1

οροθετικών ενηλίκων και στο 49% των HIV-1 οροαρνητικών ($P=10^{-4}$), ενώ πολλαπλή Ερπητική DNAαιμία ανιχνεύθηκε στο 63% των HIV-1 οροθετικών και μόλις στο 9% των HIV οροαρνητικών ($P<10^{-7}$) (πιν. 10). Είναι ενδιαφέρον ότι μόνο ένα 7% των HIV-1 οροθετικών ασθενών ήταν αρνητικοί για οποιαδήποτε Ερπητική DNAαιμία. Όσον αφορά την πολλαπλή Ερπητική DNAαιμία 37% από τους HIV-1 μολυσμένους ενήλικες ήταν θετικοί για δύο ερπητοϊούς, 24% για τρεις και 3% για τέσσερις ενώ μόνο 9% των φυσιολογικών μαρτύρων ήταν θετικοί για δύο ερπητοϊούς, 1% για τρεις ($P<10^{-7}$ για δύο και τρεις ερπητοϊούς), και κανένας για τέσσερις ($P=0.045$). Οι συνδυασμοί CMV-HSV (34%) και CMV-HSV-EBV (13%) ήταν οι συχνότεροι για δύο και τρεις ιούς αντίστοιχα.

Δεν υπήρχαν διαφορές όσον αφορά οποιαδήποτε μεμονωμένη ή πολλαπλή Ερπητική DNAαιμία μεταξύ των δύο φύλων και στους δύο πληθυσμούς.

Πίνακας 10. Οι συχνότητες της DNA/αιμίας των υπό μελέτη ερπητοϊών στους HIV-1 θετικούς και HIV-1 αρνητικούς ενήλικες.

	HIV-1 positive (N=163)	HIV-1 negative (N=200)	<i>P value</i>
CMV	116 (71%)	48 (24%)	<0.0001
HSV-1	76 (47%)	0 (0%)	<0.0001
EBV	62 (38%)	54 (27%)	0.02
HHV-8	46 (28%)	33 (16.5%)	0.01
No virus	11 (7%)	83 (41.5%)	< 10^{-7}
Single herpes virus DNAemia	49 (30%)	99 (49.5%)	0.0001
2 herpes virus concurrent DNAemia	60 (37%)	17 (8.5%)	< 10^{-7}
3 herpes virus concurrent DNAemia	39 (24%)	1 (0.5%)	< 10^{-7}
4 herpes virus concurrent DNAemia	4 (2.5%)	0 (0%)	0.025
Any multiple herpes virus DNAemia	103 (63.2%)	18 (9%)	< 10^{-7}

III.2. Σύγκριση μεμονωμένης και πολλαπλής Ερπητικής DNAαιμίας μεταξύ των διαφόρων υπο-ομάδων των HIV-1 οροθετικών ατόμων.

Μόνο η HHV-8 Ερπητική DNAαιμία ανιχνεύθηκε οριακά συχνότερη ($P=0.05$) στους HIV-1 οροθετικούς με $<200\text{κυτ}/\mu\text{L}$ σε σχέση με τους HIV-1 οροθετικούς με $\text{CD4}>200\text{κυτ}/\mu\text{L}$.

Στους HIV-1 οροθετικούς και HIV-1 VL $>50\text{cps}/\text{ml}$ ανιχνεύσαμε συχνότερα (49%) DNA του EBV σε σχέση με εκείνους που έχουν HIV-1 VL $<50\text{cps}/\text{ml}$ (28%) ($P=0.006$).

Δεν βρήκαμε καμμία συσχέτιση μεταξύ Ερπητικής DNAαιμίας και λήψης ή όχι HAART, όπως επίσης και μεταξύ Ερπητικής DNAαιμίας και κατάστασης ή όχι AIDS.

III.3. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην απάντηση στη HAART στην ομάδα των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία (ομάδα B)

Η παρουσία παράλληλης CMV and EBV DNAαιμίας σχετίζεται σημαντικά με καθυστέρηση στην απάντηση στη HAART στην ομάδα B των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία. Η ομάδα αυτή των ασθενών αποτελείτο από 35 άτομα, με μέση ηλικία ένταξης στη μελέτη τα 37 (27-60) έτη, μέση ηλικία HIV-1 ορομετατροπής τα 33,5 (25-59) έτη και μέση τιμή CD4^+ κυττάρων 282 (± 178) $\text{κυτ}/\mu\text{L}$. Από τους ασθενείς αυτούς 11 ήταν θετικοί για το συγκεκριμένο συνδυασμό ερπητοϊών με μία βασική τιμή HIV-1 VL της τάξης των 369.695 cps/ml ενώ 24 ήταν αρνητικοί με μία βασική τιμή HIV-1 VL της τάξης των 301.382 cps/ml (t test 0,133; t test sign. 0,876). Έξι μόνον από τους θετικούς για τον παραπάνω συνδυασμό ερπητοϊών ασθενείς (55%) απάντησαν στην HAART με μείωση του HIV-1 VL σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε διάστημα 20 εβδομάδων. Αντίθετα οι 20 από τους αρνητικούς ασθενείς (83%) απάντησαν με πτώση του HIV-1 VL σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε χρονικό διάστημα 13 εβδομάδων ($p=0.033$) (Σχήμα 1). Από τους υπόλοιπους τέσσερις αρνητικούς ασθενείς που δεν απάντησαν, τρεις ήταν θετικοί για τρεις ταυτόχρονα άλλους ερπητοϊούς και ένας αρνητικός για οποιαδήποτε ερπητική DNAαιμία. Ολόκληρη δε η υπο-ομάδα αυτή αποτελείτο από 14 ασθενείς με

πολλαπλή DNAαιμία άλλη από CMV EBV, 8 ασθενείς με μεμονωμένη DNAαιμία και 2 αρνητικούς για οποιοδήποτε ερπητιό.

Αναφορικά με το χρονικό διάστημα και τον αριθμό των ασθενών στους οποίους το ιϊκό φορτίο του HIV παρέμεινε μη ανιχνεύσιμο, μετά από την αρχική επιτυχή απάντηση στη HAART, δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο υπο-ομάδων, με ή χωρίς ταυτόχρονη CMV και EBV DNAαιμία ($p=0,724$). (Σχήμα 2)

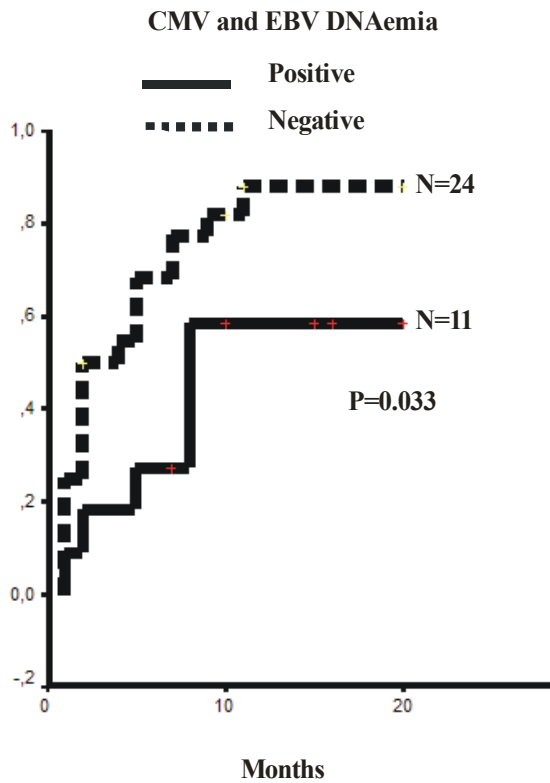
Δεν παρατηρήσαμε καμία άλλη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ερπητικής DNAαιμίας μεμονωμένης ή πολλαπλής και απάντησης στη HAART στην ομάδα αυτή των ασθενών.

III.4. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην απάντηση στη HAART στην ομάδα των ασθενών που άλλαξαν σχήμα HAART, εξαιτίας ανεπαρκούς απάντησης στο πρώτο σχήμα (ομάδα A)

Δεν παρατηρήσαμε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ ερπητικής DNAαιμίας μεμονωμένης ή πολλαπλής και απάντησης στη HAART στην ομάδα A των ασθενών που άλλαξαν σχήμα HAART. Η ομάδα αυτή αποτελείτο από 17 ασθενείς, εκ των οποίων οι 4 είχαν μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία και μέση τιμή HIV-1 VL ίση με 190.762 cps/ml και οι 13 πολλαπλή DNAαιμία και μέση τιμή HIV-1 VL ίση με 223.250 cps/ml. Οι δύο από τους τέσσερις με την μεμονωμένη και οι επτά από τους 13 με την πολλαπλή DNAαιμία μείωσαν το HIV-1 VL σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα.

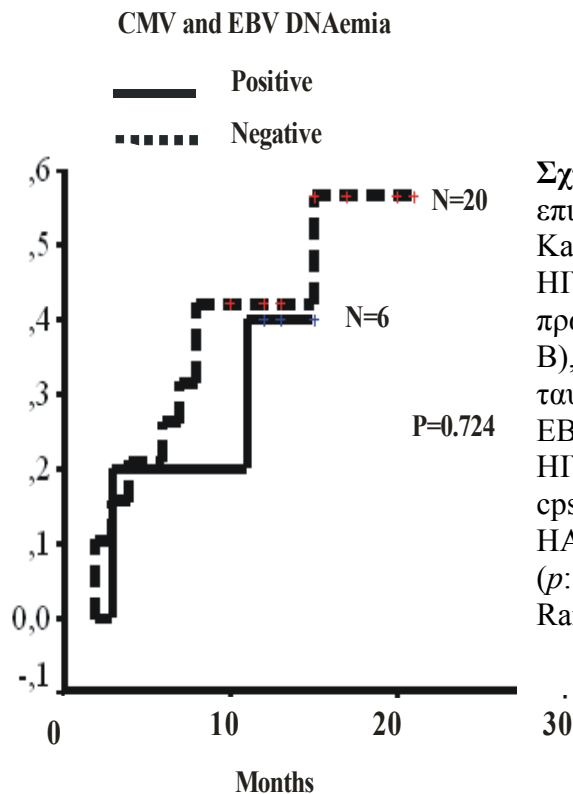
III.5. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART και έχουν αριθμό CD4+ κυτ.<200cells/μL [υπο-ομάδα B(minus)]

Η υπο-ομάδα αυτή των ασθενών B(minus) (μέση τιμή αριθμού CD4+ T κυττάρων 134 cells/μL) αποτελείτο από 15 ασθενείς, 5 εκ των οποίων είχαν μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία και 10 είχαν πολλαπλή. Όλοι οι ασθενείς υπερπήδησαν το όριο των 200cells/μL μετά την έναρξη της HAART. Η Kaplan-Meier analysis ανέδειξε μία οριακά ταχύτερη αποκατάσταση του ανοσίου στους



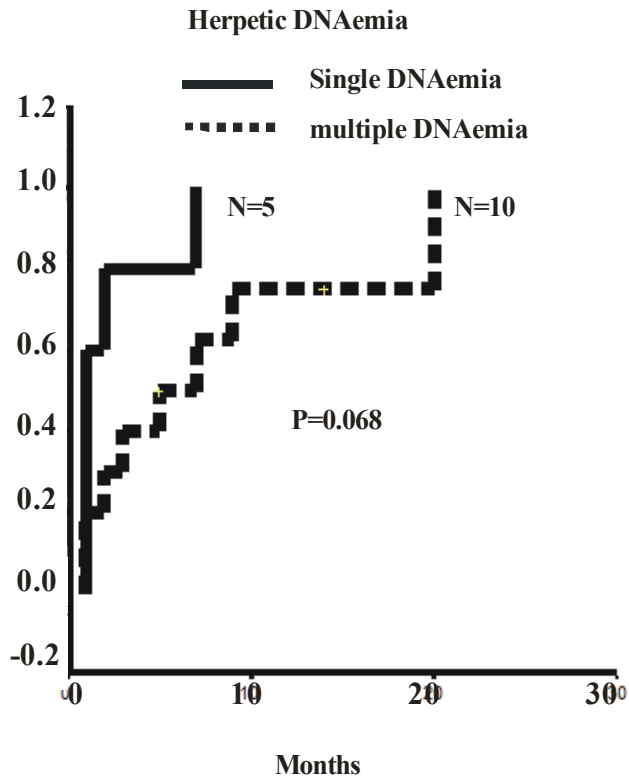
Σχήμα (1). Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan Meier ανάλυσης στην ομάδα των HIV οροθετικών ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία με HAART (ομάδα B), που αναδεικνύουν την επίδραση της ταυτόχρονης DNAαιμίας με CMV και EBV στην απάντηση στη HAART, με καταληκτικό σημείο την πτώση του ιικού φορτίου του HIV-1 σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50 cps/ml).

(p : στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, N : αριθμός ασθενών)



Σχήμα (2). Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan Meier ανάλυσης στην ομάδα των HIV οροθετικών ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία με HAART (ομάδα B), που αναδεικνύουν την επίδραση της ταυτόχρονης DNAαιμίας με CMV και EBV στη διατήρηση του ιικού φορτίου του HIV σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (<50 cps/ml) μετά από επιτυχή απάντηση στη HAART.

(p : στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, N : αριθμός ασθενών)



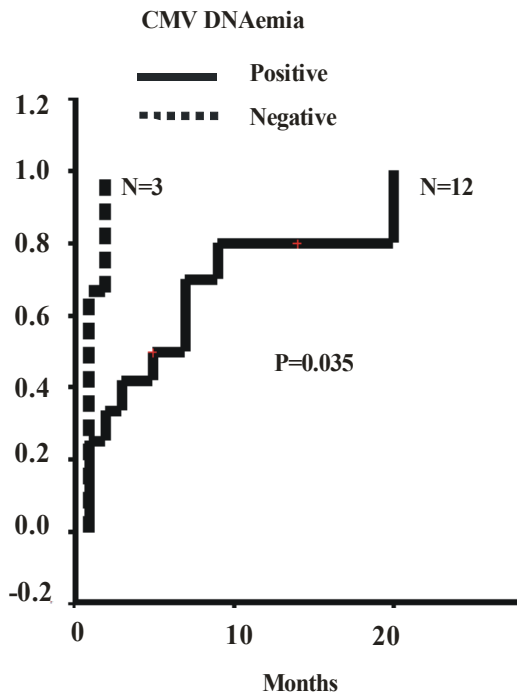
Σχήμα (3) Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan–Meier ανάλυσης στην υπο-ομάδα B(minus) των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART και έχουν αριθμό CD4+ T κυττάρων < 200 κυτ/μL, που αναδεικνύουν την επίδραση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση, με καταληκτικό σημείο την υπερπήδηση του ορίου των 200 CD4+ κυτ/μL μετά την έναρξη της HAART.

ασθενείς με τη μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία ($P=0.068$) σε σχέση με αυτούς που είχαν την πολλαπλή DNAαιμία. (Σχήμα 3)

Η παρουσία της CMV DNAαιμίας στην υπο-ομάδα B(minus) βρέθηκε να σχετίζεται με σημαντικά βραδύτερη αποκατάσταση της ανοσίας ($P=0.035$). Δώδεκα ασθενείς της υπο-ομάδας αυτής ήταν θετικοί για CMV DNAαιμία και τρεις αρνητικοί. (Σχήμα 4)

III.6. Επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση των ασθενών που άλλαξαν HAART λόγω ανεπαρκούς ανταπόκρισης και έχουν αριθμό CD4+ κυτ < 200cells/μL [υπο-ομάδα A(minus)]

Ο πληθυσμός της υπο-ομάδας ήταν επτά ασθενείς (μέση τιμή CD4+ T κυττάρων 98 cells/μL). Δύο μόνο από τους ασθενείς υπερπήδησαν το όριο μετά την αλλαγή της HAART, ένας εκ των οποίων είχε μεμονωμένη και ο άλλος πολλαπλή DNAαιμία. Οι τέσσερις από τους άλλους πέντε πέθαναν στο διάστημα της παρακολούθησης. Η Kaplan-Meier ανάλυση δεν ανέδειξε καμία στατιστική σημαντικότητα σε συσχέτιση με ερπητική DNAαιμία στο δείγμα αυτό.



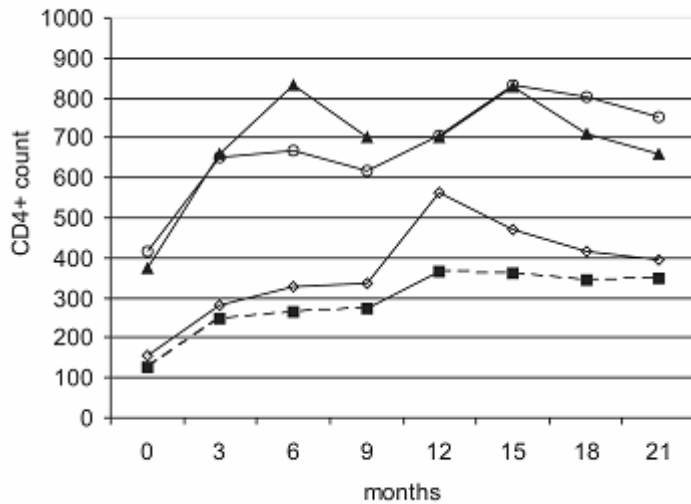
Σχήμα (4) Αντίστροφες καμπύλες επιβίωσης (one minus survival plots) της Kaplan–Meier ανάλυσης στην υπο-ομάδα B(minus) των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART και έχουν αριθμό CD4+ T κυττάρων < 200 κυτ/μL, που αναδεικνύουν την επίδραση της μεμονωμένης CMV DNAαιμίας στην ανοσολογική ανασυγκρότηση, με καταληκτικό σημείο την υπερπήδηση του ορίου των 200 CD4+ κυτ/μL μετά την έναρξη της HAART.

(*p*: στατιστική σημαντικότητα του Log Rank test, *N*: αριθμός ασθενών)

III.7. Επίπτωση της ερπητικής DNAαιμίας στην πορεία της HIV-1 λοίμωξης στους ασθενείς που μόλις ξεκινούν HAART (ομάδα B)

Το Σχήμα 6 παρουσιάζει την πρόοδο των μέσων τιμών των CD4+ T κυττάρων ανά τρίμηνο στους 35 ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία με HAART (ομάδα B) σε σχέση με την παρουσία μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας. Από τους δεκαπέντε ασθενείς με αριθμό CD4+ κυτ <200 cells/μL [υποομάδα B(minus)] πέντε ανιχνεύθηκαν με μεμονωμένη και δέκα με πολλαπλή ερπητική DNAαιμία, ενώ από τους είκοσι με CD4+ count \geq 200 cells/μL [υποομάδα B(plus)] δύο δεν είχαν καθόλου έρπητα, τρεις είχαν μεμονωμένη και δεκαπέντε πολλαπλή ερπητική DNAαιμία. Οι δύο χωρίς έρπητα δε συμπεριλήφθησαν στο διάγραμμα. Οι ασθενείς με τη μονή ερπητική DNAαιμία στην υπο-ομάδα B(minus) φαίνεται να επιτυγχάνουν υψηλότερα επίπεδα μέσης τιμής CD4 counts σε σχέση με αυτούς της ίδιας υπο-ομάδας που είχαν πολλαπλή DNAαιμία. Τα άτομα αυτής της υπο-ομάδας δεν έφτασαν ποτέ τιμές CD4 counts τόσο υψηλές όσο τα άτομα της υπο-ομάδας B(plus).

Σχήμα (5). Καμπύλες προόδου των μέσων τιμών των CD4+ T κυττάρων στους 35 ασθενείς που ξεκινούν πρώτη φορά HAART (ομάδα B) σε περιοδικά διαστήματα τριών μηνών σε σχέση με την παρουσία μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας και τη βασική τιμή του CD4 [υποομάδες B(minus) και B(plus)].

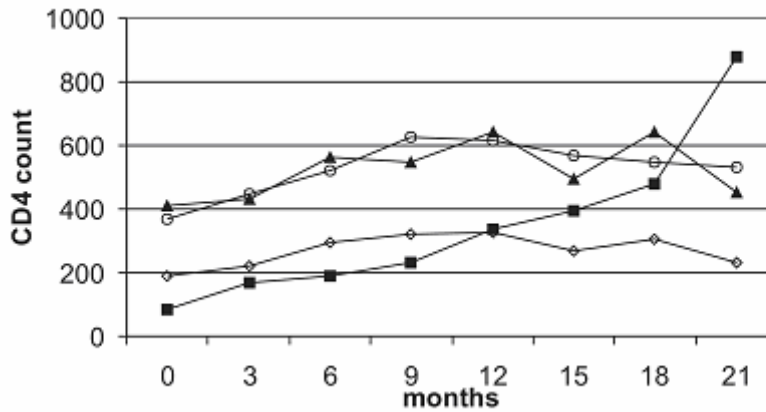


(◇) μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα B minus, (■) πολλαπλή ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα B minus, (▲) μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα B plus, (○) πολλαπλή ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα B plus

III.8. Επίπτωση της ερπητικής DNAαιμίας στην πορεία της HIV-1 λοίμωξης στους ασθενείς που άλλαξαν HAART λόγω ανεπαρκούς απάντησης (ομάδα A)

Ανάλογη καταγραφή της προόδου των μέσων τιμών των CD4 κυττάρων στους 17 ασθενείς της ομάδας A απεικονίζεται στο ιστόγραμμα του σχήματος 7. Ένας από τους επτά ασθενείς με αρχική τιμή CD4 count <200 cells/μL [υποομάδα A(minus)] ανιχνεύθηκε με μεμονωμένη και έξι με πολλαπλή ερπητική DNAαιμία. Από το σύνολο των 10 ασθενών με CD4 count \geq 200 cells/μL [υποομάδα A(plus)] 3 είχαν μεμονωμένη και 7 πολλαπλή ερπητική DNAαιμία. Οι τέσσερις από τους έξι ασθενείς ασθενείς, με πολλαπλή ερπητική DNAαιμία και CD4 count <200 cells/μL, πέθαναν λίγο μετά τον 7^ο μήνα παρακολούθησης και οι υπόλοιποι δύο της υπο-ομάδας αυτής επειδή παρουσίαζαν υψηλές τιμές CD4 count ανέβασαν τους μέσους όρους στο ιστόγραμμα.

Σχήμα (6). Καμπύλες προόδου των μέσων τιμών των CD4+ T κυττάρων στους 17 ασθενείς που άλλαξαν HAART εξαιτίας ανεπαρκούς απάντησης (ομάδα A) σε περιοδικά διαστήματα τριών μηνών σε σχέση με την παρουσία μεμονωμένης και πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας και τη βασική τιμή του CD4 [υποομάδες A(minus) και A(plus)].



(◇) μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα A minus, (■) πολλαπλή ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα A minus, (▲) μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα A plus, (○) πολλαπλή ερπητική DNAαιμία στην υποομάδα A plus

IV ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1. Η μεμονωμένη και πολλαπλή DNA/αιμία από HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8 σε HIV-1 θετικούς και αρνητικούς ενήλικες στον ελληνικό πληθυσμό.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε την επίπτωση της μεμονωμένης και πολλαπλής Ερπητικής DNAαιμίας σε HIV-1 οροθετικούς ενήλικες και HIV-1 οροαρνητικούς, ανιχνεύοντας την ύπαρξη αλληλουχιών DNA των ερπητοϊών CMV, HSV-1, HSV-2, EBV και HHV-8 στα ΠΛΑ. Η παρουσία της DNAαιμίας συσχετίστηκε στη συνέχεια με επιδημιολογικές και κλινικές παραμέτρους των δειγμάτων, όπως το φύλο, ο αριθμός των CD4+ T κυττάρων, το ιικό φορτίο του HIV-1 και η εμπειρία της HAART.

Για την ανίχνευση του DNA των ερπητοϊών χρησιμοποιήσαμε ποιοτικά πρωτόκολλα PCR σε Λευκοκύτταρα του Περιφερικού Αίματος (ΠΛΑ), αντί της ποσοτικής ανίχνευσης της ερπητικής DNAαιμίας στο πλάσμα. Γνωρίζοντας από προηγούμενες μελέτες, που επίσης είχαν ασχοληθεί με την ανίχνευση CMV και EBV DNAαιμίας, ότι τα επίπεδα του ιικού DNA στα λευκοκύτταρα του αίματος

(πολυμορφοπύρηννα και περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα) παραμένουν υψηλότερα και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτά του πλάσματος, θεωρήσαμε ότι με τον τρόπο αυτό μπορούμε να εντοπίσουμε πιο αξιόπιστα την ενεργό λοίμωξη καθώς και τη λανθάνουσα φάση της CMV και EBV μόλυνσης στα δείγματά μας (Mendez 1998, Gerna 1994, Fafi-Kremer 2004).

Προηγούμενες μελέτες άλλωστε επάνω στην ανίχνευση DNA των ερπητοϊών CMV και HHV-8, έχουν δείξει ότι η χρήση της ποιοτικής PCR στα ΠΛΑ είναι περισσότερο ευαίσθητη και λιγότερο σύνθετη για τη γρήγορη και καθημερινή ανίχνευση της ιϊκής DNAαιμίας (Schafer 1998, Mendez 1998, Albrecht 2004).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ερπητικής DNAαιμίας στα ΠΛΑ και το πλάσμα χρησιμοποιείται σήμερα κυρίως για την πρόγνωση της συμπτωματικής λοίμωξης και για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της αντιϊκής θεραπείας (Tremblay 1989, Feng 1993).

Οι van der Kuyl και συν. ανίχνευσαν την παρουσία DNA των ερπητοϊών CMV και HHV-8 στα Μονοπύρηννα του Περιφερικού Αίματος (ΜΠΑ) σε 181 ασθενείς με AIDS, με ή χωρίς Kaposi. Βρήκαν ότι 50% των ασθενών ήταν θετικοί για τον CMV και 32% για τον HHV-8 (van der Kuyl 1998). Στο δικό μας πληθυσμό HIV οροθετικών ατόμων ανιχνεύσαμε μεγαλύτερη συχνότητα CMV και περίπου ίδια HHV8.

Οι Albrecht και συν. ανίχνευσαν DNA του HHV-8 στα ΜΠΑ σε ποσοστό 12% από 293 HIV+ ασθενείς που μελέτησαν και ο Taylor με τους συν. σε ποσοστό 18% από 174 ιερόδουλες στη Μομπάσα που ήταν γνωστές HHV-8 οροθετικές (οι 50% από αυτές ήταν και HIV-1 θετικές, ενώ καμία δεν είχε κλινική ένδειξη για KS). Η παρουσία του DNA του HHV-8 στη δεύτερη μελέτη, πρέπει να σημειώσουμε, ήταν ανεξάρτητη της οροθετικότητας για τον HIV-1 (Albrecht 2004, Taylor 2004). Η δική μας HHV-8 DNAαιμία ήταν συχνότερη από των προηγούμενων μελετών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη ευαισθησία της μεθόδου μας.

Το DNA του EBV στα ΜΠΑ ανιχνεύθηκε από τους Fafi-Kremer και συν. σε ποσοστό 73% ομάδας 66 HIV ασθενών που ήταν οροθετικοί για τον EBV αλλά δεν είχαν ασθένειες σχετιζόμενες με αυτόν. Στην ίδια μελέτη το DNA του EBV ανιχνεύθηκε στο 28% των υγιών μαρτύρων που ήταν επίσης EBV οροθετικοί (Fafi-Kremer 2004). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής συμφωνούν με τα δικά μας.

Τα ΜΠΑ έχουν επισημανθεί ως πιθανές θέσεις πολλαπλασιασμού και λανθάνουσας φορέας του HSV από τον Cantin και συν. που περιέγραψαν την

ανίχνευση DNA του HSV στα ΜΠΑ σε 35 από 40 φυσιολογικούς HSV οροθετικούς αιμοδοτές. Οι θέσεις αυτές λανθάνουσας φορείας προτιμώνται ίσως σε περιπτώσεις αιματογενούς μετάδοσης του HSV (Cantin 1994). Οι Corey και συν. δεν επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα αποτελέσματα σε δική τους μελέτη, στην οποία δεν ανίχνευσαν καθόλου αλληλουχίες DNA του HSV στα ΜΠΑ σε 27 HSV και HIV οροθετικούς ασθενείς (Corey 1996). Στη μελέτη μας ανιχνεύσαμε DNA του HSV-1 στα ΜΠΑ των HIV-1 θετικών ενηλίκων αλλά όχι και των μαρτύρων. Η επηρεασμένη ανοσία ίσως μπορεί να εξηγήσει το εύρημα αυτό. Δεν ανιχνεύσαμε HSV-2 DNA αιμία ούτε στους HIV-1 θετικούς αλλά ούτε και στους υγιείς μάρτυρες. Ο HSV είναι τυπικό παράδειγμα ιού που παραμένει σε λανθάνουσα φάση στον ξενιστή. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής παραμένει στο νευρικό σύστημα (γαγγλιακοί νευρώνες) και σπάνια εμφανίζεται στο περιφερικό αίμα (Ahmed 1990).

Αποτελέσματα επίσης από άλλες μελέτες ερπητικής DNA αιμίας στα ΠΛΑ ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και φυσιολογικών μαρτύρων που έχουν γίνει από τους Alvarez-Lafuente και συν. και Zhang και συν. έχουν αναδείξει DNA αιμία από CMV, HSV και EBV σε ποσοστά 33%, 0% and 21% αντίστοιχα των φυσιολογικών τους μαρτύρων (Alvarez-Lafuente 2005, Zhang 1993). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα δικά μας.

Παρατηρήσαμε μία σημαντική διαφορά όσον αφορά την παρουσία μεμονωμένης και πολλαπλής Ερπητικής DNA αιμίας μεταξύ των HIV-1 οροθετικών ενηλίκων και των HIV-1 αρνητικών μαρτύρων. Η παρατήρηση αυτή εξηγείται από το διαφορετικό τρόπο ζωής και τις σεξουαλικές συνήθειες των δύο δειγμάτων μας. Είναι ενδιαφέρον ότι σχεδόν όλοι οι HIV-1 οροθετικοί ενήλικες (93%) είχαν ένα τουλάχιστον ερπητιό ανιχνεύσιμο στο DNA των ΜΠΑ και στο 63% ανιχνεύσαμε δύο ή περισσότερους ταυτόχρονα ερπητιοίους. Την ίδια στιγμή οι HIV-1 οροαρνητικοί είχαν μόνο στο 9% πολλαπλή Ερπητική DNA αιμία. *Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δύο ομάδων αν και αναμενόμενες δεν είχαν μέχρι τώρα μελετηθεί με την τεχνική της PCR για τόσους πολλούς ταυτόχρονα ερπητιοίους στη βιβλιογραφία.*

Δεν παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ερπητική DNA αιμία και το φύλο μεταξύ των πληθυσμών, γεγονός που προτείνει ότι *το φύλο δεν αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την επίπτωση της ερπητικής DNA αιμίας.*

IV.2. Η Ερπητική DNA/αιμία στους υποπληθυσμούς των HIV-1 θετικών ενηλίκων.

Επίσης δε βρήκαμε σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την ερπητική DNAαιμία στις διάφορες υπο-ομάδες των HIV-1 οροθετικών ατόμων, σε σχέση με τον αριθμό των CD4+ T κυττάρων και τη νόσο AIDS. Τα προηγούμενα υποδηλώνουν μία *σχετική ομοιογένεια στη επιδημιολογία των ερπητοϊών στις επιμέρους ομάδες των HIV-1 οροθετικών ενηλίκων*. Η μόνη διαφορά αφορούσε την παρουσία της EBV DNAαιμίας, που ανιχνεύθηκε σε πολύ υψηλότερο ποσοστό στους HIV-1 ασθενείς με VL > 50cps/ml ($P=0.006$), παρατήρηση που υποστηρίζει τις θεωρίες περί αλληλεπίδρασης των ιών HIV-1 και EBV μεταξύ τους.

IV.3. Η σχέση μεταξύ της ερπητικής DNAαιμίας από HSV-1, -2, CMV, EBV and HHV-8, μεμονωμένης ή πολλαπλής, και απάντησης στη HAART.

Μετά την είσοδο της HAART στη θεραπεία του AIDS, ένας μικρός μόνο αριθμός μελετών έχει μέχρι σήμερα διερευνήσει την πιθανή επίδραση της ερπητικής παρουσίας στην απάντηση στη HAART και την πρόοδο της HIV λοίμωξης.

Βρήκαμε στους ασθενείς, που ξεκινούν πρώτη φορά θεραπεία με HAART, ότι η παρουσία ταυτόχρονης DNAαιμίας στα ΜΠΑ από τους ερπητοϊούς CMV και EBV σχετίζεται σημαντικά με βραδύτερη απάντηση στη HAART. Πιο συγκεκριμένα είδαμε, ότι οι ασθενείς αυτοί σε μικρότερο ποσοστό και με σημαντικά βραδύτερο ρυθμό μειώνουν το ιικό φορτίο του HIV σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε σχέση με τους αρνητικούς για την παραπάνω ερπητική DNAαιμία, μετά την έναρξη της HAART. Η συχνότητα υποτροπής και ο χρόνος που το ιικό φορτίο παρέμεινε μη ανιχνεύσιμο ήταν ανεξάρτητο της παρουσίας της CMV/EBV DNAαιμίας.

Οι Deayton και συνεργάτες του ανίχνευσαν το DNA του CMV στο περιφερικό αίμα με ποιοτική PCR και συσχέτισαν την παρουσία του με φτωχότερη έκβαση των ασθενών, ακόμα και υπό HAART, χρησιμοποιώντας ως καταληκτικά σημεία, την εκδήλωση νόσου σχετιζόμενη με το AIDS και το θάνατο (Deayton 2004)

Όσον αφορά την αποκατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, με την έννοια της υπερπήδησης του κριτικού ορίου των 200 CD4+ κυττάρων, στην ομάδα των ασθενών που ξεκινά πρώτη φορά HAART, βρήκαμε ότι η CMV DNA/αιμία καθυστερεί σημαντικά την ταχύτητα της ανοσολογικής απάντησης ($P=0.035$). Για την

επίδραση της μεμονωμένης ή πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας βρήκαμε μία μόνο οριακά ταχύτερη αποκατάσταση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων στους ασθενείς με τη μεμονωμένη ερπητική DNAαιμία ($P=0.068$). Τελικά όλοι οι ασθενείς της υποομάδας αυτής υπερπήδησαν το όριο των 200 CD4+ T κυττάρων και οι τιμές των CD4+ T κυττάρων που αποκτούν στη συνέχεια βρήκαμε να εξαρτώνται περισσότερο από τις βασικές τιμές που είχαν κατά την έναρξη της θεραπείας και λιγότερο, στατιστικά όχι σημαντικό, από τη διαφορά στην ερπητική DNAαιμία. Ο αριθμός όμως των ασθενών στην υπο-ομάδα αυτή με αριθμό CD4+ T κυττάρων < 200 κυτ/mm³ ήταν σχετικά μικρός, με συνέπεια η εξαγωγή συμπερασμάτων να εμπεριέχει τον κίνδυνο σφάλματος.

Επίσης είναι σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις των Goossens και των συνεργατών του, οι οποίοι υπολογίζοντας τη μέση τιμή των CD4 T κυττάρων μετά από την έναρξη HAART σε μια σειρά HIV+ ασθενών, έχουν δημοσιεύσει καθυστερημένη αποκατάσταση της ανοσίας στους ασθενείς που ήταν οροθετικοί για τον CMV, αλλά όχι για τον HSV (Goossens 2002). Η χρήση βεβαίως των μέσων όρων ενέχει τον κίνδυνο σφάλματος, διότι δεν αναδεικνύει το εύρος και τη διασπορά των επιμέρους τιμών.

Η μελέτη μας δεν ανέδειξε καμία στατιστική σημαντικότητα όσον αφορά τη μείωση του ιϊκού φορτίου του HIV ή την αύξηση των CD4 T κυττάρων στο δείγμα των ασθενών με παλαιότερη εμπειρία στη HAART, που αλλάζουν θεραπευτικό σχήμα λόγω ανεπαρκούς απάντησης στο προηγούμενο, πιθανά λόγω της ήδη εγκαταστημένης βαρύτατης ανοσοανεπάρκειάς των.

IV.4. Συμπεράσματα- μελλοντικές προοπτικές

Καταλήγοντας θα μπορούσαμε να πούμε ότι η πολλαπλή ερπητική DNAαιμία είναι πολύ συχνή στους HIV οροθετικούς ασθενείς. Προτείνουμε ότι η ταυτόχρονη παρουσία DNA των ιών CMV και EBV στα ΠΛΑ των ασθενών που ξεκινούν πρώτη φορά HAART αποτελεί φτωχό προγνωστικό δείκτη για καλή ανταπόκριση στη HAART, η παρουσία του CMV καθυστερεί την ανασυγκρότηση της ανοσίας μετά τη HAART και η παρουσία πολλαπλής ερπητικής DNAαιμίας φαίνεται να σχετίζεται επίσης με οριακά βραδύτερη ανασυγκρότηση της ανοσίας των.

Αντιερπητικά φάρμακα εναντίον των ιών CMV και EBV σε συνδυασμό με την HAART θα μπορούσαν ίσως να βελτιώσουν την ανταπόκριση των ασθενών στη

θεραπεία. Διπλές τυχαιοποιημένες μελέτες με χορήγηση HAART και ή χωρίς παράλληλη αντιερπητική αγωγή χρειάζονται προκειμένου να ελεγχθεί το πιθανό όφελος και να διευκρινισθεί η σχέση μεταξύ της απάντησης στη HAART και της ανοσολογικής ανασυγκρότησης με την κλινική έκβαση της HIV νόσου και την επιβίωση των ασθενών.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. National Center for Infectious Diseases Division of HIV/AIDS Kenneth G. Castro, M.D. John W. Ward, M.D. Laurence Slutsker, M.D., M.P.H. James W. Buehler, M.D. Harold W. Jaffe, M.D. Ruth L. Berkelman, M.D. Office of the Director Associate Director for HIV/AIDS James W. Curran, M.D., M.P.H.

Ahmed R, Stevens JG: Viral persistence, Fields Virology, (Fields BN, DM Knipe eds), Second edition, Raven Press, New York, 1990.

Albrecht D, Meyer T, Lorenzen T, Stoehr A, Arndt R, Plettenberg A: Epidemiology of HHV-8 infection in HIV-positive patients with and without Kaposi sarcoma: diagnostic relevance of serology and PCR. *JCV*. 2004;30:145-9.

Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D, Lamas JR: Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:1357-9.

Andersson-Ellstrom A, Svennerholm B, Forssman L. Prevalence of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in teenage girls. *Scand J Infect Dis* 1995;27:315-8.

Beaulieu BL, Sullivan JL. Clinical manifestations and treatment of Epstein-Barr virus infection In: Up To Date, Rose, BD(Ed), Up To Date, Wellesley, MA, 2006.

Blackbourn DJ, Lennette ET, Ambroziak J, Mourich DV, Levy JA. Human Herpesvirus 8 detection in nasal secretions and saliva. *J Infect Dis* 1998;177:213-216.

Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, Moore PS, Chang Y, Weiss RA: Angiogenic

and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*. 1997; 278(5336):290-4

Calistri A, Parolin C, Pizzato M, Calvi P, Giaretta I, Palu G: Herpes simplex virus chronically infected human T lymphocytes are susceptible to HIV-1 superinfection and support HIV-1 pseudotyping. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;21:90-8.

Cantin E, Chen J, Gaidulis L, Valo Z, McLaughlin-Taylor E: Detection of herpes simplex virus DNA sequences in human blood and bone marrow cells. *J Med Virol*. 1994;42:279-86.

Cattani P, Cerimele F, Porta D, Graffeo R, Ranno S, Marchetti S, *et al*. Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:274-9.

Chang Y., Cesarman E., Pessin MS. *et al*.: Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS- associated K.S. *Science* 1994;266: 1865-1869.

Cicala, C., Arthos, J., Ruiz, M., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Riva, A., Wildt, K., Cohen, O., and Fauci, A. S: Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J Immunol* 1999;163(1): 420-6.

Clarke LM, Duerr A, Feldman J, Sierra MF, Daidone BJ, Landesman SH. Factors associated with cytomegalovirus infection among human immunodeficiency virus type 1-seronegative and -seropositive women from an urban minority community. *J Infect Dis* 1996;173:77-82.

Clouse KA, Robbins PB, Fernie B, Ostrove JM, Fauci AS: Viral antigen stimulation of the production of human monokines capable of regulating HIV1 expression. *J Immunol* 1989;143:470-5.

- Collier L, Oxford J 2006, *Human Virology*, 3rd edn, Oxford University Press, Oxford.
- Corey L, Hobson A, Schacker T: Lack of detection of HSV DNA in PBMCs and lymph nodes of HIV-infected persons. *J Med Virol*. 1996;48:47.
- Davis MG, Kenney SC, Kamine J, Pagano JS, Huang ES: Immediate-early gene region of human cytomegalovirus transactivates the promoter of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1987;USA 84, 8642-8646.
- Deayton JR, Prof Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD: Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet*, 2004 ;363:2101-2.
- Devianne-Garrigue I, Pellegrin I, Denisi R, Dupon M, Ragnaud JM, Barbeau P, Breilh D, Leng B, Fleury HJ, Pellegrin JL: Foscarnet decreases HIV-1 plasma load. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998;18(1):46-50.
- Diaz JJ, Dodon MD, Schaerer-Uthurralt N, Simonin D, Kindbeiter K, Gazzolo L, Madjar JJ. Post-transcriptional transactivation of human retroviral envelope glycoprotein expression by herpes simplex virus Us11 protein. *Nature*. 1996 Jan 18;379(6562):273-7
- Dobrescu D, Ursea B, Pope M, Asch AS, Posnett DN: Enhanced HIV-1 replication in V beta 12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 1995;82:753-63
- Fafi-Kremer S, Brengel-Pesce K, Bargues G, Bourgeat MJ, Genoulaz O, Seigneurin JM, Morand P: Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *JCV* 2004;30:157-64.

- Fauci A S, Clifford Lane H 1998, "Human Immunodeficiency Virus (HIV) Disease: AIDS and Related Disorders" in Harrison's *Principles of Internal Medicine*, 14th edn, McGraw Hill, United States of America.
- Feng CP, Kulka M, Aurelian L: NF-kappa B-binding proteins induced by HSV-1 infection of U937 cells are not involved in activation of human immunodeficiency virus. *Virology*. 1993 ;192:491-500.
- Ferres M, Prado P, Ovalle J, Fuentes R, Villaroel L, Ferreccio C, *et al.* Seroprevalence of Epstein Barr virus infection in a healthy population of Santiago de Chile. *Rev Med Chil* 1995;123:1447-52.
- Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Prime W, Fielding P, Walshaw MJ, Turnbull L: Genetic alterations in bronchial lavage as a potential marker for individuals with a high risk of developing lung cancer. *Cancer Res*. 1999; 59: 2690-5.
- Fleming DT, McQuillan GM, Johnson RE, Rahmias AJ, Aral SO, Lee FK, *et al.* Herpes simplex virus type 2 in the United States, 1976 to 1994. *N Engl J Med* 1997;337:1105-1.
- Gambus G, Bourboulia D, Esteve A, Lahoz R, Rodriguez C, Bolao F, *et al.* Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *Aids* 2001;15:1167-74.
- Garcia-Corbeira P, Dal-Re R, Aguilar L, Granizo JJ, Garcia-de-Lomas J. Is sexual transmission an important pattern for herpes simplex type 2 virus seroconversion in the Spanish general population? *J Med Virol* 1999;59:194-7.
- Gendelman HE, Phelps W, Feigenbaum L, Ostrove JM, Adachi A, Howley PM, Khoury G, Ginsberg HS: Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1986; 83: 9759-9763.

- Gerna G, Furione M, Baldanti F, Sarasini A: Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients. *J Clin Microbiol.* 1994;32:2709-17.
- Goossens VJ, Schreij G, van der Geest S, *et al.* A delay in CD4 cell response after initiation of highly active antiretroviral therapy is associated with the presence of anti-cytomegalovirus but not with anti-herpes simplex virus antibodies. *AIDS* 2002;16:1682-4.
- Griffiths PD. Studies of viral co-factors for human immunodeficiency virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol.* 1998 Feb;79 (Pt 2):213-20
- Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ: Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood.* 1999;93(4):1137-44.
- Holland CA, Ma Y, Moscicki B, Durako SJ, Levin L, Wilson CM. Seroprevalence and risk factors of hepatitis B, hepatitis C, and human cytomegalovirus among HIV-infected and high-risk uninfected adolescents: findings of the REACH Study. Adolescent Medicine HIV/AIDS Research Network. *Sex Transm Dis* 2000;27:296-303.
- Jabs DA, Holbrook JT, Van Natta ML, Clark R, Jacobson MA, Kempen JH, Murphy RL: Risk factors for mortality in patients with AIDS in the era of highly active antiretroviral therapy. *Ophthalmology.* 2005 May;112(5):771-9
- Jacobson MA. AIDS related Cytomelalovirus gastrointestinal disease.In: Up To Date, Rose, BD(Ed), Up To Date, Wellesley, MA, 2006.
- Kaiser L, Perrin L, Hirschel B, Furrer H, Von Overbeck J, Olmari M, Yerly S. Foscarnet decreases human immunodeficiency virus RNA. *J Infect Dis.* 1995; 172(1):225-7.

- Kempen JH, Jabs DA, Wilson LA, Dunn JP, West SK, Tonascia J: Mortality risk for patients with cytomegalovirus retinitis and acquired immune deficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003 Nov 15;37(10):1365-73. Epub 2003 Oct 14.
- Kenney S, Kamine J, Markovitz D, Fenrick R, Pagano J: An Epstein-Barr virus immediate-early gene product trans-activates gene expression from the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988;85:1652-1656.
- Kovacs A, Schluchter M, Easley K, Demmler G, Shearer W, La Russa P, Pitt J, Cooper E, Goldfarb J, Hodes D, Kattan M, McIntosh K. Cytomegalovirus infection and HIV-1 disease progression in infants born to HIV-1-infected women. Pediatric Pulmonary and Cardiovascular Complications of Vertically Transmitted HIV Infection Study Group. *N Engl J Med*. 1999;341(2):77-84
- Lee B, Ratajczak J, Doms RW, Gewirtz AM, Ratajczak MZ: Coreceptor/chemokine receptor expression on human hematopoietic cells: biological implications for human immunodeficiency virus-type1 infection. *Blood*. 1999;93(4):1145-56.
- Lennette ET, Busch MP, Hecht FM, Levy JA: Potential herpesvirus interaction during HIV type 1 primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005;21:869-75.
- Lusso P: Human herpesvirus-6 may be a cofactor in AIDS. *Am Fam Physician*. 1991;44(3):936.
- Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, Gallo RC: Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature*. 1993;362(6419):458-62
- Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, Garzino-Demo A, Berneman ZN, Gallo RC: CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *PNAS* 1994;91(9):3872-6

- Mallon R, Borkowski J, Albin R, Pepitoni S, Schwartz J, Kieff E. The Epstein-Barr virus BZLF1 gene product activates the human immunodeficiency virus type 1 5' long terminal repeat. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):6282-5.
- Margalith M, D'Aquila RT, Manion DJ, Basgoz N, Bechtel LJ, Smith BR, Kaplan JC, Hirsch MS: HIV-1 DNA in fibroblast cultures infected with urine from HIV-seropositive cytomegalovirus (CMV) excretors. *Arch Virol.* 1995;140(5):927-35.
- Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 1998;338:948-54.
- Mertz GJ, Benedetti J, Ashley R, Selke SA, Corey L. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann Intern Med* 1992;116:197-202.
- Moreno TN, Fortunato EA, Hsia K, Spector SA, Spector DH. A model system for human cytomegalovirus-mediated modulation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat activity in brain cells. *J Virol.* 1997 May;71(5):3693-701
- Morris MC, Edmunds WJ, Hesketh LM, Vyse AJ, Miller E, Morgan-Capner P, *et al.* Sero-epidemiological patterns of Epstein-Barr and herpes simplex (HSV-1 and HSV-2) viruses in England and Wales. *J Med Virol* 2002;67:522-7.
- Mendez J, Espy M, Smith TF, Wilson J, Wiesner R, Paya CV: Clinical significance of viral load in the diagnosis of cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Transplantation* 1998;65:1477-1481
- McKeating JA, Griffiths PD, Weiss RA: HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature* 1990;343:659-61.

- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA : Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272:1167-70
- Mercader M, Taddeo B, Panella JR, Chandran B, Nickoloff BJ, Foreman KE: Induction of HHV-8 lytic cycle replication by inflammatory cytokines produced by HIV-1-infected Tcells. *Am J Pathol*, 2000;156(6):1961-71.
- Mole L, Ripich S, Margolis D, Holodniy M: The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis.* 1997;176(3):766-70.
- Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, Chang Y: Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* 1996; 274, 1739-1744.
- Moore PS, Chang Y: Detection of HV-like DNA sequences in Kaposi's sarcoma in patients with and those without HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:1181-1185.
- Moreno TN, Fortunato EA, Hsia K, Spector SA, Spector DH: A model system for human cytomegalovirus-mediated modulation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat activity in brain cells. *J Virol.* 1997;71(5):3693-701.
- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50
- Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991 Aug 6; 30(31):7661-6
- Ozkan A, Kilic SS, Kalkan A, Ozden M, Demirdag K, Ozdarendeli A. Seropositivity of Epstein-Barr virus in Eastern Anatolian Region of Turkey. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003;21:49-53.

- Palella Jr FJ, Chmiel JS, Moorman AC, Holmberg SD: HIV Outpatient Study Investigators. Durability and predictors of success of highly active antiretroviral therapy for ambulatory HIV-infected patients. *AIDS*. 2002;16:1617-26.
- Panayiotakopoulos GD, Mavroyianni D, Politou M, Aroni K, Kosmopoulou O, Kontos A, Choremi-Papadopoulou H, Pediaditis J, Kordosis T: Human Herpesvirus-8 Seropositivity and Clinical Correlations in HIV-1-Positive and Highly Exposed, Persistently HIV-Seronegative Individuals in Greece. *Aids Patient Care and Stds* 2005;19:375-383.
- Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-Infected Adults and Adolescents. Bethesda (MD): Department of Health and Human Services (DHHS) and the Henry J. Kaiser Family Foundation ; 2002 Febr 4.
- Passam A, Zafiroopoulos A, Miyakis S, Zagoreos I, Stavrianeas NG, Krambovitis E, et al. CCR2-64I and CXCL12 3_A alleles confer a favorable prognosis to AIDS patients undergoing HAART therapy. *JCV* 2005; 34:302-9.
- Peterson PK, Gekker G, Chao CC, Hu SX, Edelman C, Balfour HH Jr.: Human cytomegalovirus-stimulated peripheral blood mononuclear cells induce HIV-1 replication via a tumor necrosis factor-alpha-mediated mechanism. *J Clin Invest*, 1992;89:574-80.
- Pleskoff O, Treboute C, BreLOT A, Heveker N, Seman M, Alizon M: Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science*, 1997;276, 1874-1878.
- Russell DB, Tabrizi SN, Russell JM, Garland SM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 in HIV-infected and uninfected homosexual men in a primary care setting. *J Clin Virol* 2001;22:305-13.
- Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anaemia and beta-thalassemia with enzymatically

- amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988 Sep1; 319(9):537-41
- Scala G, Quinto I, Ruocco MR, Mallardo M, Ambrosino C, Squitieri B, Tassone P, Venuta S: Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1993 May;67(5):2853-61.
- Schafer P, Tenschert W, Cremaschi L, Gutensohn K, Laufs R.J: Utility of major leukocyte subpopulations for monitoring secondary cytomegalovirus infections in renal-allograft recipients by PCR. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1008-14.
- Shepp DH, Moses JE, Kaplan MH. Seroepidemiology of cytomegalovirus in patients with advanced HIV disease: influence on disease expression and survival. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996;11:460-8.
- Sozzani S, Ghezzi S, Iannolo G, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Sica A, Locati M, Mackay C, Wells TN, Biswas P, Vicenzi E, Poli G, Mantovani A: Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J Exp Med*. 1998;187(3):439-44
- Stanberry LR, Rosenthal SL, Mills L, Succop PA, Biro FM, Morrow RA, *et al*. Longitudinal risk of herpes simplex virus (HSV) type 1, HSV type 2, and cytomegalovirus infections among young adolescent girls. *Clin Infect Dis* 2004;39:1433-8.
- Sun Q, Matta H, Chaudhary PM: Kaposi's sarcoma associated herpes virus-encoded viral FLICE inhibitory protein activates transcription from HIV-1 Long Terminal Repeat via the classical NF-kappaB pathway and functionally cooperates with Tat. *Retrovirology*. 2005;Feb15;2(1):9.
- Taylor MM, Chohan B, Lavreys L, Hassan W, Huang ML, Corey L, Ashley Morrow R, Richardson BA, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Kreiss J: Shedding

of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and -seronegative Kenyan women. *J Infect Dis.* 2004;190:484-8.

Tremblay M, Gornitsky M, Wainberg MA: Active replication of human immunodeficiency virus type 1 by peripheral blood mononuclear cells following coinfection with herpes viruses. *J Med Virol.* 1989 Oct;29:109-14.

van der Kuyl AC, Polstra AM, van den Burg R, Jan Weverling G, Goudsmit J, Cornelissen MTaylor MM, Chohan B, Lavreys L, Hassan W, Huang ML, Corey L, Ashley Morrow R, Richardson BA, Mandaliya K, Ndinya-Achola J, Bwayo J, Kreiss J: Shedding of human herpesvirus 8 in oral and genital secretions from HIV-1-seropositive and -seronegative Kenyan women. *J Infect Dis.* 2004;190:484-8.

Wagner HU, Van Dyck E, Roggen E, Nunn AJ, Kamali A, Schmid DS, *et al.* Seroprevalence and incidence of sexually transmitted diseases in a rural Ugandan population. *Int J Std AIDS* 1994;5:332-7.

Webster A, Grundy JE, Lee CA, Emery VC, Cook DG, Kernoff PB, Griffiths PD: Cytomegalovirus infection and progression to AIDS. *Lancet* 1989;2(8664):681.

Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, Brink NS, Copas A, Boshoff C, *et al.* Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;346:799-802.

Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES: Human cytomegalovirus upregulates NF- κ B activity by transactivating the NF- κ B p105, p50 and p65 promoters. *Journal of Virology* 1995;69: 5391-5400.

Zhang L, Nikkari S, Skurnik M, Ziegler T, Luukkainen R, Mottonen T, Toivanen P: Detection of herpesviruses by polymerase chain reaction in lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1080-6.