

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας - Τμήμα Ιατρικής

Εργαστήριο Βιολογίας Καρκίνου

και

Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Κρήτης

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΤΟΜΩΝ
ΜΕ ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
ΣΤΟΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΕΛΕΓΧΟ ΓΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ HIV**

**Νίκη Ε. Μαλλιάρκη
Ιατρός Μικροβιολόγος**

Διδακτορική Διατριβή

Ηράκλειο 2002

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής
Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή
των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Επιβλέπων

Καθηγητής Β. Α. Γεωργούλιας

Συμβουλευτική Επιτροπή

Καθηγητής Β. Α. Γεωργούλιας

Καθηγητής Ι. Παπαματθαϊάκης

Καθηγήτρια Μ. Καλμαντή

Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγητής Β. Α. Γεωργούλιας

Καθηγητής Ι. Παπαματθαϊάκης

Καθηγήτρια Μ. Καλμαντή

Καθηγητής Η. Καστανάς

Καθηγητής Γ. Δελίδης

Αν. Καθηγητής Γ. Σαμώνης

Επ. Καθηγητής Δ. Μαυρουδής

Στην οικογένειά μου και στην ανιψιά μου

Με όλη την αμηχανία που συνήθως συνοδεύει παρόμοια ευχαριστήρια κείμενα, γιατί όσο ειλικρινή κι αν είναι φαίνονται τυπικά και σχεδόν πάντα είναι ελλιπή, αισθάνομαι υποχρεωμένη να αναφερθώ και δημόσια να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, όχι μόνο για την επιστημονική τους βοήθεια αλλά και για τη συνεργασία, τη στήριξη και τη φιλία τους σε μία περίοδο που αν και απαιτητική, τη νοσταλγώ πάντα.

Ένα μεγάλο μέρος της εργασίας που παρουσιάζεται στη διατριβή μου εκπονήθηκε στο Κέντρο Αναφοράς AIDS Κρήτης. Το Κέντρο λειτούργησε με ελάχιστο ανθρώπινο δυναμικό και στηρίχτηκε αρχικά στην προσωπική εργασία των ανθρώπων του Κέντρου Αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου, επιτυγχάνοντας σε ελάχιστο χρόνο να οργανωθεί άρτια και να εφαρμόσει σε ρουτίνα τεχνικές προηγμένης τεχνολογίας, διαθέσιμες σε λίγους την εποχή που ξεκίνησε η μελέτη αυτή.

Για το λόγο αυτό επιβάλλεται να ξεκινήσω από το προσωπικό της Αιμοδοσίας, που ευχαριστώ θερμά, όχι μόνο γιατί προσέφερε το υλικό της μελέτης και τα αποτελέσματα του πρωτογενούς ελέγχου που χρησιμοποίησα, αλλά και γιατί υπέμεινε για χρόνια τις σχεδόν καθημερινές οχλήσεις μας και μας εξυπηρέτησε πάντα με προθυμία και αγάπη.

Η παρουσία του Καθηγητή κ. Γεωργούλια ήταν ανεκτίμητη όχι απλά σαν επιστημονική κατεύθυνση, αλλά και σαν καθαρός τρόπος σκέψης και προσέγγισης προβλημάτων και λύσεων σε φαινομενικά αδιέξοδα. Φιλικός και ακούραστος, μου έδωσε τη δυνατότητα εκπαίδευσης στο INSERM U268 και την άνεση ενεργού επαφής και εφαρμογής σε ό,τι καινούριο αφορούσε το αντικείμενο της δουλειάς μου.

Οι βιολόγοι κ. Μαρία Σμυρλάκη (του Κέντρου Αναφοράς AIDS Κρήτης) και κ. Μανόλης Σπανάκης (του Εργαστηρίου Βιολογίας του Καρκίνου του Πανεπιστημίου Κρήτης) με οδήγησαν με υπομονή και σιγουριά στα πρώτα μου βήματα μέσα σε ένα ερευνητικό εργαστήριο και μου πρόσφεραν τις γνώσεις τους και μία πρωτόγνωρα ευχάριστη και αποδοτική συνεργασία.

Η εθελοντική παρέμβαση και εύστοχη κριτική του Καθηγητή κ. Ηλία Καστανά, ήταν καθοριστικές στην τελική διαμόρφωση της παρουσίασης της εργασίας μου.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, την Καθηγήτρια κ. Μαρία Καλμαντή και τον Καθηγητή κ. Σήφη Παπαματθαϊάκη, για τη βοήθειά τους και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν.

Τέλος, θυμάμαι πάντα με ευγνωμοσύνη τη σταθερή, διακριτική και ουσιαστική βοήθεια του Καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Σπανάκης, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Παρουσία αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών gag: μία λανθάνουσα ή εκτρωτική μόλυνση με μία ποικιλία του HIV.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Αθήνα 18-19/3/1989

2. Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Σπανάκης, Α. Καρβελά-Αγγελάκη, Π. Φουντούλη, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ενδείξεις λανθάνουσας HIV-1 μόλυνσης σε άτομα που παρουσιάζουν αντισώματα έναντι πρωτεϊνών gag του ιού.

4^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 15-18/2/1990

3. Β. Κισσαμιτάκη, Ε. Ασπετάκη, Ε. Νικολούδη, Π. Κουμινάκη, **N. Μαλλιαράκη**, Π. Ηλιάκης: Περίπτωση ασθενούς με πρωτολοίμωξη HIV που εκδηλώθηκε ως σύνδρομο λοιμώδους μονοπυρηνώσεως.

5^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο 15-18/11/1990

4. Α.Καρβελά-Αγγελάκη, **N. Μαλλιαράκη**, Μ. Θεοδωροπούλου, Π. Φουντούλη, Β. Λιάκου, Δ. Τσατσάκη, Σ. Πηρουνάκης, Ε. Νικολούδη, Ε. Μαλλιαράκη, Β. Γεωργούλιας: Ειδικότητα αντισωμάτων έναντι των gag πρωτεϊνών του HIV-1 σε χαμηλού κινδύνου αιμοδότες.

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 1991

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Αθήνα 8-10/3/1991

5. **N. Μαλλιαράκη**, Μ. Σμυρλάκη, Β. Γεωργούλιας, Ε. Πινετίδου - Μαλλιαράκη: Αποσαφήνιση αμφίβολων HIV-1 Western blot ατόμων με PCR.

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 1991

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS, Αθήνα 8-10/3/1991

6. Δ. Τσατσάκη, Σ. Μπακογιώργου, Π. Φουντούλη, Σ. Κωτσάκη, Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι πεπτιδίων της nef πρωτεΐνης του HIV σε ορούς ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot.

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 6-9/2/1992

7. Μ. Σμυρλάκη, **N. Μαλλιαράκη**, Δ. Τσατσάκη, Σ. Κωτσάκη, Λ. Καβαλιέρου, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ετερογένεια της μόλυνσης HIV: ενδείξεις από την in vitro απομόνωση του ιού και τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό.

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 6-9/2/1992

8. Μπιμπάκη Κ., Αγγελάκη Α., Φουντούλη Π., Τσατσάκη Δ., Θεοδωροπούλου Μ., **Μαλλιαράκη N.**, Μαλλιαράκη-Πινετίδου Ε., Γεωργούλιας Β.: Έλεγχος HIV μόλυνσης σε εγκύους γυναίκες στην Κρήτη

3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 6-9/2/1992

9. Μ. Σμυρλάκη-Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Δ. Τσατσάκη, Σ.Κωτσάκη, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Συσχέτιση in vitro πολλαπλασιασμού του HIV-1 και της γενετικής του ανάλυσης με γονιδιακό πολλαπλασιασμό.
2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Αθήνα 1992

10. Μ. Θεοδωροπούλου-Σμυρλάκη, Δ. Τσατσάκη, **N. Μαλλιαράκη**, Κ. Μπιμπάκη, Σ. Κωτσάκη, Β. Ψαράκη, Ε. Μαλλιαράκη, Β.Γεωργούλιας: Ιολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά της μόλυνσης HIV.
5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 10-13/2/1994

11. Φουντούλη Π., **Μαλλιαράκη N.**, Θεοδωροπούλου Μ., Τσατσάκη Δ., Καρβελά-Αγγελάκη Α., Λιάκου-Μπιμπάκη Κ., Κωτσάκη Σ., Μαλλιαράκη-Πινετίδου Ε., Γεωργούλιας Β.: Ειδικότητα αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών gag του HIV σε άτομα με αδιευκρίνιστο Western Blot: ενδείξεις εκτροπικής μόλυνσης;
5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS και Σεξουαλικά Μεταδομένων Νοσημάτων, Αθήνα 10-13/2/1994

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Μ. Theodoropoulou, **N. Malliaraki**, E. Spanakis, E. Malliaraki-Pinetidou, V. Georgoulis: Detection of serum antibodies against only the gag proteins: a latent or an abortive infection with an HIV variant.
V International Conference on AIDS, Montréal 1989

2. A. Agelakis, A. Bibakis, P. Fountouli, **N. Malliarakis**, M. Theodoropoulou, G. Katrinakis, E. Nikoloudis, S. Pirounakis, E. Malliarakis, V. Georgoulis: Specificity of anti-gag antibodies detected during HIV screening of low risk subjects.
VI International Conference on AIDS, San Francisco 20-24/6/1990

3. Gravanis A., Theodoropoulou M., **Malliarakis N.**, Fostinis Y., Marcoyannakis M., Saridakis Y., Stournaras C., Georgoulis V.: A human endometrial adenocarcinoma cell line susceptible to HIV infection.
VI International Conference on AIDS, San Francisco 20-24/6/1990

4. **N. Malliaraki**, M. Smirlaki, P. Fountouli, A. Karvela-Agelakis, K. Liakou, D. Tsatsaki, E. Malliaraki-Pinetidou, V. Georgoulis: Characterization of the HIV infection status of subjects displaying antibodies only against viral gag proteins.
VII International Conference on AIDS, Florence 16-21/6/1991

5. **Malliaraki N.**, Smirlaki M., Fountouli P., Karvela-Aggelaki A., Liakou K., Tsatsaki D., Kotsakis S., Malliaraki-Pinetidou E., Georgoulis V.: HIV infectious status of subjects displaying antibodies against gag proteins .
VIII International Conference on AIDS / III STD World Congress, Amsterdam 19-24/7/1992

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

ΕΛΛΗΝΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ

1. Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Σπανάκης, Α. Καρβελά -Αγγελάκη, Π. Φουντούλη, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ενδείξεις λανθάνουσας HIV-1 μόλυνσης σε άτομα που παρουσιάζουν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών gag του ιού.

Ιατρική 57(6) : 602, 1990

2. Μ. Περράκη, Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Αυξημένα επίπεδα διαλυτού υποδοχέα IL-2 (sIL-2Ra) σε οροθετικούς για HIV ασθενείς. Κυτταρική παραγωγή και κλινικές συσχετίσεις.

Ιατρική 64(2) : 154, 1993

3. Μ. Σμυρλάκη - Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Δ. Τσατσάκη, Σ. Κωτσάκη, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Κλινική ετερογένεια της λοιμώξεως με τον HIV: ενδείξεις από την in vitro απομόνωση του ιού και τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό.

Ιατρική 65(2) : 160, 1994

4. Δ. Τσατσάκη, Σ. Μπακογιώργου, Π. Φουντούλη, Σ. Κωτσάκη, Μ. Θεοδωροπούλου, **N. Μαλλιαράκη**, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι πεπτιδίων της πρωτεΐνης nef του HIV σε άτομα με HIV μόλυνση και σε ορούς ατόμων με αδιευκρίνιστο Western Blot.

Ιατρική 66 (Παράρτημα) : 35, 1994

5. Π. Φουντούλη, **N. Μαλλιαράκη**, Μ. Θεοδωροπούλου, Δ. Τσατσάκη, Κ. Λιάκου - Μπιμπάκη, Σ. Κωτσάκη, Ε. Μαλλιαράκη-Πινετίδου, Β. Γεωργούλιας: Ειδικότητα των anti-gag αντισωμάτων που διαπιστώνονται σε άτομα «χαμηλού κινδύνου» για HIV λοίμωξη με αδιευκρίνιστο Western Blot.

Ιατρική 70 : 33, 1996

ΔΙΕΘΝΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ

1. Theodoropoulou M., **Malliaraki N.**, Spanakis E., Tsatsaki D. Katrakazou A., Aggelaki A., Fountouli P., Malliaraki-Pinetidou E., Georgoulis V.: Serum antibodies against HIV-1 gag-encoded proteins: A latent or an abortive HIV infection?

Georg-Speyer-Haus Journal 1:1, 1990

EEC Workshop: Molecular Biology of Human Retroviruses

2. V.A. Georgoulis, **N.E. Malliaraki**, M. Theodoropoulou, E. Spanakis, P. Fountouli, D. Tsatsaki, S. Kotsaki, A. Karvela-Aggelaki, E. Malliaraki-Pinetidou: Indeterminate HIV-1 Western blot may indicate an abortive infection in some low-risk blood donors.

Transfusion 37 : 65, 1997

Περιεχόμενα

	σελ.
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εισαγωγή	2
Απομόνωση HIVs	2
Κεφάλαιο Α. Ρετροϊοί	
Χαρακτηριστικά	4
Γονιδιακή οργάνωση	4
Ταξινόμηση	5
Προέλευση	5
Δράση	6
Σύντομη ανασκόπηση	6
Κεφάλαιο Β. Ο ιός HIV	
1. Γονιδιακή οργάνωση	8
Οι αλληλουχίες LTR	8
Οι κωδικές αλληλουχίες	9
Η γενετική ποικιλότητα του HIV	9
HIV-2	11
2. Πρωτεΐνες	11
Δομικές: Gag, Pol, Env	11
Ρυθμιστικές: Tat, Rev	14
Επικουρικές: Nef, Vif, Vpr, Vpx	14
3. Μορφολογία	19
4. Κύκλος πολλαπλασιασμού	20
5. Υποδοχείς και συνυποδοχείς	22
Υποδοχέας CD4	22
Υποδοχείς χημειοκινών	22
Τροπισμός των HIVs	22
Αντοχή στη μόλυνση από HIV	23
Κεφάλαιο Γ. Η λοίμωξη από HIV	
1. Φυσική ιστορία και ανοσοπαθγένεια	25
2. Ρόλος των λεμφοειδών οργάνων	26
3. Ανοσολογική απάντηση στον HIV	28
Χυμική ανοσία	28
Κυτταρική ανοσία	29
4. Επιδημιολογία	30
Κεφάλαιο Δ. Εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης HIV	

1. Ανίχνευση αντισωμάτων	34
Μέθοδοι πρωτογενούς ελέγχου: ELISA, ταχείες, απλές, σιέλου, ούρων	34
Επιβεβαιωτικές μέθοδοι: Western blot, RIPA, IFA, LIA	36
Έλεγχος για HIV-2	39
2. Ανίχνευση αντιγόνου	42
3. Καλλιέργεια και απομόνωση του ιού	43
4. Ανίχνευση ιϊκού γενετικού υλικού	44
Southern blot	44
Dot blot	44
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	45
Ιϊκό φορτίο: bDNA, RT-PCR, QC-PCR, NASBA, real-time PCR	46
5. Εκτίμηση ανοσολογικής λειτουργίας	52
Προβλήματα στη διάγνωση της λοίμωξης HIV	55
Ερευνητικό ερώτημα	56
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Υλικό και μέθοδοι	
Υλικό	58
Μέθοδοι	62
1.α. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος	62
1.β. Απομόνωση μακροφάγων	62
2.α. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για φαινοτυπική μελέτη	63
2.β. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για έλεγχο έκφρασης ιϊκών πρωτεϊνών	63
3.α. Καλλιέργεια κυττάρων	63
3.β. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων	64
3.γ. Απομόνωση ιού	64
3.δ. In vitro μόλυνση κυττάρων	65
4. Ανίχνευση δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης	65
5.α. Απομόνωση μεγαλομοριακού DNA	66
5.β. Απομόνωση ιϊκού RNA	67
5.γ. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων	67
6.α. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	67
6.β. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	68
6.γ. Southern blot	69
6.δ. Υβριδοποίηση μετά από σήμανση ανιχνευτή με τεχνική τυχαίας έναρξης	71

6.ε. RNA/cDNA dot blot	74
7.α. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	74
7.β. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	75
7.γ. Μεταφορά DNA σε μεμβράνη μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο	77
7.δ. Υβριδοποίηση μετά από σήμανση ανιχνευτή με τεχνική τελικής σήμανσης	77
Αποτελέσματα	
1. Συνολικά αποτελέσματα πρωτογενούς ελέγχου και επιβεβαιωτικών δοκιμασιών	80
2. Ομάδα μελέτης	81
* Δημογραφικά χαρακτηριστικά	84
* Έλεγχος για HIV-1	84
* Έλεγχος για HIV-2	84
* Αντιγόνο p24	84
* Έλεγχος για HTLV-I/II	85
3. Ομάδα ελέγχου	85
4. Αλγόριθμος διερεύνησης αμφίβολων ατόμων	88
4-1. Ορολογική διερεύνηση	89
* Western blot πρώτης γενιάς	89
* Ειδικότητα της αντίδρασης έναντι των πρωτεϊνών του HIV	89
* Εξέλιξη της ορολογικής εικόνας	90
* Σχόλια	95
4-2. Ιολογική μελέτη	97
* Έκφραση ιικών πρωτεϊνών	97
* Καλλιέργεια κυττάρων / απόπειρα απομόνωσης ιού	100
Ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης	100
Ανίχνευση αντιγόνου p24	100
Επιφανειακή έκφραση ιικών πρωτεϊνών	102
Προσπάθεια in vitro μόλυνσης κυττάρων	102
Ανίχνευση HIV-σχετικών αλληλουχιών σε υπερκείμενα καλλιέργειας	103
4-3. Μελέτη με μοριακές τεχνικές	107
* Southern blot	
Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-1 προϊού σε ολικά μονοκύτταρα	107
Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-1 προϊού σε μακροφάγα	108
Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-2 προϊού σε ολικά μονοκύτταρα	109
* Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε ολικά μονοκύτταρα	110

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε μακροφάγα	112
4-4. Μελέτη φαινοτύπου λεμφοκυττάρων	114
4-5. Ορολογικός έλεγχος των ερωτικών συντρόφων αμφίβωλων ατόμων	116
4-6. Τελική ανάλυση	118
Συζήτηση	126
Συμπεράσματα	139
Βιβλιογραφία	141

Συντομογραφίες

AIDS	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας
HIV-1, HIV-2	Ιοί της ανθρώπινης ανοσολογικής ανεπάρκειας
SIVs	Ιοί της ανοσολογικής ανεπάρκειας των πιθήκων
RT	Ανάστροφη μεταγραφάση
Ag p24	Αντιγόνο p24
ssRNA	Μονόκλωνο RNA
dsDNA	Δίκλωνο DNA
cDNA	Συμπληρωματικό DNA
FDCs	Λεμφοζιδιακά δενδριτικά κύτταρα
CTLs	Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα
EIA	Ανοσοενζυμική μέθοδος
CO	Κατώφλι μεθόδου (cutoff)
WB	Western blot
RIPA	Ραδιοανοσοκαθίζηση
IF	Ανοσοφθορισμός
RIBA	Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης με ανασυνδυασμένα αντιγόνα
PBMCs	Μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος
ΜΦ	Μακροφάγα
PHA-P	Φυτοαιμοσυγκολλητίνη
PBS	Ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
FCS	Ορός εμβρύου βοός
REs	Περιοριστικές ενδονουκλεάσες
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Θ.Π.	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
MTN	Μονάδα Τεχνητού Νεφρού
ΑΜΔ	Αιμοδότης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρώτη αναφορά του συνδρόμου που σήμερα ονομάζεται Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας ή AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome), έγινε στις 5/6/1981 στο Morbidity and Mortality Weekly Report του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Μεταδοτικών Νοσημάτων (CDC) των Η.Π.Α., με την ανακοίνωση πέντε περιστατικών [1].

Με την εμφάνιση του AIDS στις αρχές της δεκαετίας του '80, κλονίστηκε η πεποίθηση ότι οι λοιμώξεις [αντίθετα με μη μεταδοτικές νόσους όπως κακοήθειες, καρδιοπάθειες και εκφυλιστικές ασθένειες] δεν αποτελούσαν πια σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία στις αναπτυγμένες χώρες.

Αρχικά το AIDS χαρακτηρίστηκε σαν «σύνδρομο ομοφυλοφίλων» («gay syndrome») [2] ή GRID (Gay Related Immune Deficiency), επειδή τα πρώτα κρούσματα διαγνώστηκαν σε προηγούμενα υγιείς νέους ομοφυλόφιλους άνδρες και τα κυριότερα συμπτώματα του συνδρόμου οφείλονταν σε ανοσοανεπάρκεια [3,4].

Η ανακάλυψη όμως του ίδιου συνδρόμου σε αιμορροφιλικούς [5,6], δέκτες μετάγγισης αίματος και παραγώγων [7], χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (IVDUs) και σεξουαλικούς συντρόφους αυτών [8], κλόνισε την υπόθεση του «gay syndrome» και το 1982 καθιερώθηκε διεθνώς η ονομασία AIDS [9].

Απομόνωση HIVs

Το 1983 η Barré-Sinoussi και συν., απομόνωσαν έναν καινούριο ανθρώπινο ρετροϊό, από υλικό βιοψίας λεμφαδένων ενός νεαρού ομοφυλόφιλου με γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια, τον οποίο ονόμασαν LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) [10]. Η αναπόφευκτη σύγκριση του LAV με τους μέχρι τότε γνωστούς ανθρώπινους ρετροϊούς HTLV-I και -II, έδειξε ότι ο καινούριος ιός ήταν διαφορετικός. Ταυτοποιήθηκε επίσης μια πρωτεΐνη του LAV, η p24, που δεν υπήρχε στον HTLV-I.

Λίγο αργότερα η ομάδα του R. Gallo στις Η.Π.Α. απομόνωσε έναν ρετροϊό από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος ασθενούς με AIDS, που ονόμασε HTLV-III [11,12].

Ταυτόχρονα, σχεδόν, απομονώθηκε από τον Levy και συν. ιός από ασθενείς με AIDS, που ονομάστηκε ARV (AIDS-associated RetroVirus) [13].

Σύντομα αποδείχτηκε ότι οι παραπάνω ιοί ήταν ταυτόσημοι και για αποφυγή συγχύσεων έγινε αποδεκτή η μετονομασία του αιτίου του AIDS σε ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας: HIV (Human Immunodeficiency Virus), από τη Διεθνή Επιτροπή για την Ταξινόμηση των Ιών το 1986 [14,15]. Με την ανακάλυψη, από την ομάδα του L. Montagnier, του συγγενικού ιού HIV-2 στη Δ. Αφρική στα τέλη του 1985 [16], η ονομασία του αρχικού ιού καθιερώθηκε σαν HIV-1.

Η μόλυνση του ανθρώπου από τον HIV-1 θεωρείται αποτέλεσμα ζωνοτικής μετάδοσης ενός ρετροϊού των χιμπατζήδων (Pan troglodytes) [17] από φυσικά μολυσμένους πιθήκους στον άνθρωπο. Για τον HIV-2 η δεξαμενή στα θηλαστικά είναι ο πίθηκος sooty mangabey (Cercopithecus atys) [18,19]. Με βάση την απόκλιση στην ομολογία μεταξύ διαφορετικών στελεχών του HIV και τον πιθανό ρυθμό μεταλλάξεων, υπολογίζεται με μαθηματικά μοντέλα ότι ο ιός αυτός έχει μολύνει τον άνθρωπο για περισσότερα από 20 και λιγότερα από 100 χρόνια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΡΕΤΡΟΪΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α: ΡΕΤΡΟΪΟΙ

Χαρακτηριστικά

Με βάση ορισμένα χαρακτηριστικά του (μορφολογία, χημική σύσταση, δομή, μέγεθος, ανοσοβιολογικοί χαρακτήρες) ο HIV ταξινομήθηκε στην οικογένεια των Ρετροϊών (Retroviridae).

Οι ρετροϊοί αποτελούν μεγάλη και ετερογενή οικογένεια RNA-ιών με περίβλημα, η οποία ορίζεται από κοινούς ταξονομικούς παρονομαστές [20,21].

Το σχήμα και η θέση του εσωτερικού πυρηνοκαψιδίου είναι χαρακτηριστικά για τα διάφορα γένη της οικογένειας. Οι διάφοροι μορφολογικοί τύποι ιοσωματίων που παρατηρούνται στα μολυσμένα κύτταρα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οδήγησαν στην ονοματολογία Α,Β,С και D ιοσωματίων. Ο τύπος C, στον οποίο ανήκουν όλοι οι ανθρώπινοι ρετροϊοί, έχει κεντρικό πυκνό νουκλεοκαψίδιο διαμέτρου περίπου 70 nm που περιβάλλεται από φάκελο.

Το γονιδίωμα αποτελείται από δύο όμοια μόρια RNA, μήκους 7-12 kb, που είναι μονόκλωνο (single-strand: ss), γραμμικό, μη κατατμημένο και θετικής πολικότητας.

Ξεχωριστό χαρακτηριστικό της οικογένειας αποτελεί η στρατηγική πολλαπλασιασμού, βασικά βήματα της οποίας είναι η ανάστροφη μεταγραφή του ιικού RNA σε γραμμικό δίκλωνο (double-strand: ds) DNA και η ενσωμάτωση του τελευταίου [προϊός] στο γενετικό υλικό του κυττάρου-ξενιστή. Στην ανάστροφη μεταγραφή, εξάλλου, οφείλει η οικογένεια και το όνομά της (REverse TRanscription).

Γονιδιακή οργάνωση

Οι ρετροϊοί διακρίνονται γενικά σε απλούς και σύνθετους, με βάση τη γονιδιακή οργάνωση.

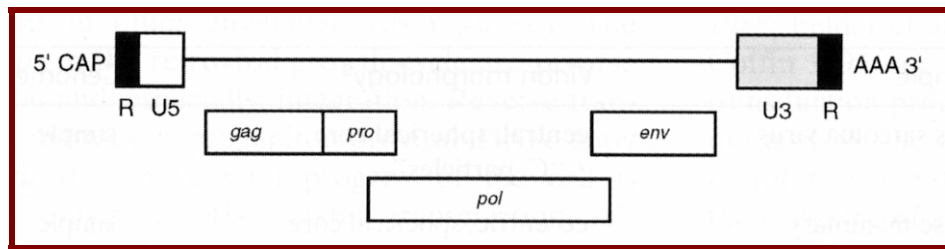
Το γονιδίωμα όλων των ρετροϊών περιέχει τρεις μείζονες κωδικοποιούσες περιοχές, που περιέχουν τη γενετική πληροφορία για τις πρωτεΐνες του ιοσωματίου, πάντα με την ακόλουθη σειρά από το 5' προς το 3' άκρο (σχήμα 1):

1. *gag* (gene antigen group), που κατευθύνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών του εσωτερικού του ιοσωματίου οι οποίες σχηματίζουν τη μήτρα, το καψίδιο και τις νουκλεοπρωτεϊνικές δομές
2. *pol*, που περιέχει την πληροφορία για τα ένζυμα ιντεγκράση και ανάστροφη μεταγραφάση και
3. *env*, από την οποία προέρχονται η επιφανειακή και διαμεμβρανική συνιστώσα της πρωτεΐνης του ιικού περιβλήματος.

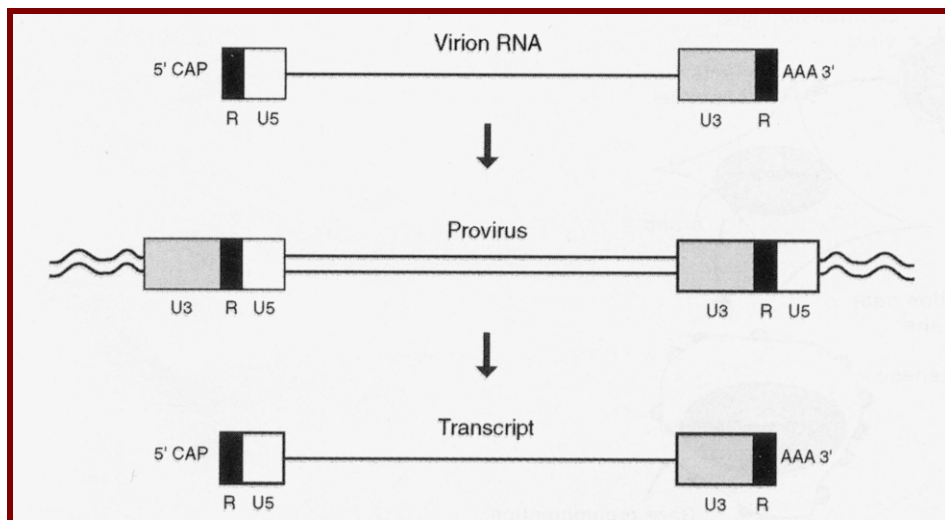
Μία επιπλέον, μικρότερη, κωδικοποιούσα περιοχή που υπάρχει σε όλους τους ρετροϊούς είναι η *pro*, που κωδικοποιεί για την πρωτεάση του ιοσωματίου και βρίσκεται μεταξύ *gag* και *env*.

Στα δύο άκρα του γονιδιώματος υπάρχουν μη κωδικοποιούσες ρυθμιστικές αλληλουχίες (U5, R, U3), που έχουν τον κύριο έλεγχο της μεταγραφής του προϊού (σχήμα 2).

Οι απλοί ρετροϊοί συνήθως μεταφέρουν μόνο αυτήν τη στοιχειώδη γενετική πληροφορία, ενώ οι σύνθετοι κωδικοποιούν και για πρόσθετες ρυθμιστικές πρωτεΐνες.



Σχήμα 1: Γονιδιακή δομή απλού ρετροϊού με τις τέσσερις βασικές κωδικοποιούσες περιοχές και τις ρυθμιστικές αλληλουχίες στα άκρα του γονιδιώματος. (Retroviruses, CSHL Press, 1997)



Σχήμα 2: Σύγκριση των RNA και DNA (προϊός) μορφών του ρετρο-ϊικού γονιδιώματος. (Retroviruses, CSHL Press, 1997)

Ταξινόμηση

Οι ρετροϊοί, με βάση τη γονιδιακή τους οργάνωση και την αμινοξική συγγένεια, χωρίζονται σε επτά γένη που διαιρούνται περαιτέρω σε υπογένη, είδη, τύπους και στελέχη [20]. Πέντε από αυτά αντιπροσωπεύουν ρετροϊούς με ογκογόνες ιδιότητες (παλαιότερα αναφέρονταν σαν ογκογόνοι) και τα άλλα δύο είναι οι *src*- και οι *lenti*-ιοί [22].

Οι *lenti*-ιοί, στους οποίους ανήκει και ο HIV, είναι σύνθετοι ρετροϊοί που εμφανίζονται σε όλα τα σπονδυλωτά, δεν περιέχουν ογκογονίδια, διαθέτουν την πιο πολύπλοκη γονιδιακή δομή και στρατηγική έκφρασης από όλους τους ρετροϊούς, είναι επιρρεπείς σε συχνές μεταλλάξεις του γονιδιώματός τους και συχνά είναι κυτταροπαθογόνοι για τα μολυσμένα κύτταρα.

Προέλευση

Η προέλευση των ρετροϊών παραμένει αιγματοειδής και διάφορες θεωρίες έχουν προταθεί για να την εξηγήσουν. Ίσως το μόνο σίγουρο είναι ότι οι ρετροϊοί και κάποια κυτταρικά κινητά γενετικά στοιχεία έχουν εξελικτική ομοιότητα, δηλαδή ότι οι μεταξύ τους ομοιότητες αντιπροσωπεύουν μια εξελικτική σχέση [23-25].

Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 5% του συνολικού γονιδιώματος των σπονδυλωτών αποτελείται από ρετροστοιχεία και ότι μέχρι και εξαπλάσιο ποσοστό προήλθε από ανάστροφη μεταγραφή άλλων RNAs [26,27].

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει ποικιλία αρχαίων ενδογενών ρετροϊών [HERVs: Human Endogenous RetroViruses] [28], αλλά δεν έχουν απομονωθεί μολυσματικά στοιχεία.

Δράση

Στόχοι των ρετροϊών είναι κυρίως τα κύτταρα του αιμοποιητικού, ανοσολογικού και κεντρικού νευρικού συστήματος. Προκαλούν ευρύτατο φάσμα ασθενειών, μεταξύ των οποίων κακοήθειες (όπως λευχαιμίες, λεμφώματα και σαρκώματα), ή αντίθετα εμποδίζουν την κυτταρική ανάπτυξη οδηγώντας σε απλασία ποικίλων κυτταρικών τύπων.

Σύντομη ανασκόπηση

Από το 1904 που περιγράφηκε ο πρώτος ρετροϊός, ο ιός της λοιμώδους αναιμίας των ίππων (EIAV: equine infectious anemia virus) [29], έχουν ανακοινωθεί εκατοντάδες ρετροϊών, αν και η γονιδιακή αλληλουχία έχει πλήρως χαρακτηριστεί μόνον σε λίγους.

Ο κύκλος ζωής των ιών αυτών παρέμενε σκοτεινός μέχρι το 1970 οπότε οι Temin και Baltimore ανακάλυψαν, ανεξάρτητα, μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, την **ανάστροφη μεταγραφάση** (RT: reverse transcriptase) [30,31], η οποία παρέχει στους ρετροϊούς την ικανότητα να αναστρέφουν τη συνηθισμένη ροή της γενετικής πληροφορίας [DNA→ RNA→ πρωτεΐνη] και να πολλαπλασιάζονται μέσω ενός dsDNA ενδιάμεσου σταδίου, τον προϊό. Ο προϊός ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή και παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση μέχρι τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί, οπότε παράγονται καινούρια ιοσωμάτια ή ξεκινά διαδικασία ογκογένεσης.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 η ομάδα του R. Gallo πέτυχε την απομόνωση των πρώτων ανθρώπινων ρετροϊών, HTLV-I και -II (Human T-Lymphotropic Virus-I και -II) [32,33]. Ο HTLV-I συσχετίζεται με δύο σπάνιες νοσολογικές οντότητες: την T-λευχαιμία/λέμφωμα των ενηλίκων (ATL) που ενδημεί στη Ν. Ιαπωνία, την Καραϊβική και περιοχές της Αφρικής [34] και μια προοδευτική μυελοπάθεια γνωστή σαν HTLV-I -σχετιζόμενη μυελοπάθεια/τροπική σπαστική παραπάρεση (HAM/TSP) [35]. Ο HTLV-II απομονώθηκε από ασθενείς με λευχαιμία από τριχωτά κύτταρα, αλλά δεν έχει ακόμα απόλυτα εξακριβωθεί η παθογονικότητά του [36].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: Ο ΙΟΣ ΗΙΥ

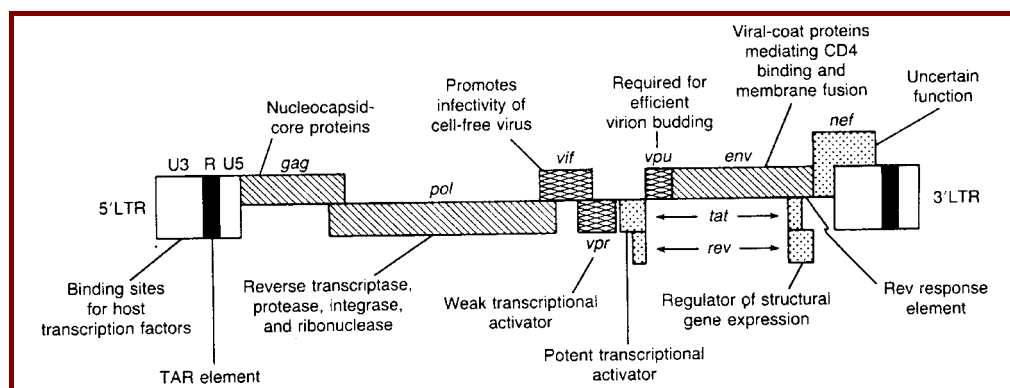
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β: Ο ΙΟΣ HIV

1. Γονιδιακή οργάνωση

Το γονιδίωμα του HIV κλωνοποιήθηκε [37-39] και η νουκλεοτιδική αλληλουχία του έχει χαρτογραφηθεί πλήρως [40-42]. Αποτελείται από μονή αλυσίδα γραμμικού RNA θετικής κατεύθυνσης, μήκους περίπου 9.2 kb για τον HIV-1 και 9.7 kb για τον HIV-2, σε δύο αντίγραφα ενωμένα σε ένα 70S σύμπλεγμα [43].

Στον HIV υπάρχει ασυνήθιστα εκτεταμένη επικάλυψη μεταξύ των γονιδίων *gag* και *pol*, δεν υπάρχει επικάλυψη μεταξύ των γονιδίων *gag* και *env* και το γονιδίωμά του διαθέτει πρωτοφανώς μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών και επικουρικών γονιδίων που ενισχύουν ή καταστέλλουν την ιική έκφραση. Τα γονίδια αυτά είναι τα *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* και *vpru* (HIV-1) ή *vpx* (HIV-2).

Το ιικό RNA μοιάζει με μόριο κυτταρικού mRNA στο ότι διαθέτει μεθυλιωμένο κάλυμμα στο 5' άκρο, είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3' άκρο και έχει αρκετές μεθυλιωμένες (A) μονάδες εσωτερικά. Το γονιδιακό RNA του ιού έχει την ίδια χημική πολικότητα με το mRNA από το οποίο μεταφράζονται τα ιικά προϊόντα (θετική κατεύθυνση).



Σχήμα 3: Γονιδιακή δομή του HIV-1 (προϊός). Φαίνονται τα εννέα γνωστά γονίδια του ιού, καθώς και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες LTR στα άκρα του ιικού γονιδιώματος. (The Medical Management of AIDS, 5th edition)

Οι αλληλουχίες LTR

Το DNA γονιδίωμα του HIV οριοθετείται από πανομοιότυπες αλληλουχίες LTR (Long Terminal Repeats: μακρές επαναλαμβανόμενες τελικές αλληλουχίες), μη κωδικοποιούσες περιοχές απαραίτητες για την ενσωμάτωση του ιού στο γονιδίωμα του ξενιστή και την αναγνώριση από το σύστημα μεταγραφής του κυττάρου [44].

Το γεγονός ότι βρίσκονται στα γονιδιώματα όλων των ρετροϊών, όσο ελλειμματικοί και αν είναι, δείχνει ότι η παρουσία τους είναι κρίσιμη για τη διαδικασία αναπαραγωγής του ιού.

Συγκεκριμένα, οι LTRs περιλαμβάνουν:

1. μια μικρή κεντρική αλληλουχία R (Repeated sequence), μήκους 98 bp στον HIV-1 και 174 bp στον HIV-2, που επαναλαμβάνεται στα δύο άκρα του RNA γονιδιώματος. Τα όριά της καθορίζονται από τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής (1^η βάση της R) και της πολυαδενυλίωσης (αμέσως μετά την τελευταία βάση της R). Στο προϊικό DNA βρίσκεται επίσης δύο φορές, μεταξύ των περιοχών U3 και U5 σε κάθε LTR. Περιέχει

την αλληλουχία-σήμα (AAUAAA) για πολυαδενυλίωση και την περιοχή TAR (σύνδεση της πρωτεΐνης Tat).

2. μια περιοχή U5 (Unique 5'), 84 νουκλεοτίδια στον HIV-1 και 129 στον HIV-2, μεταξύ της 5'R και της θέσης σύνδεσης του tRNA^{lys3} εκκινητή για τη σύνθεση της αρνητικής κατεύθυνσης (-) DNA αλυσίδας. Βρίσκεται μία φορά στο γονιδιακό RNA και δύο στο ιικό DNA σαν τμήμα της LTR.

3. μια U3 περιοχή (Unique 3'), 454 bp στον HIV-1 και 457 bp στον HIV-2, μεταξύ της 3'R και της λεγόμενης πολυουρινικής σειράς, μικρής αλληλουχίας πλούσιας σε πουρίνες που αφαιρείται κατά την ανάστροφη μεταγραφή για να παραχθεί ο RNA εκκινητής για τη σύνθεση της θετικής (+) κατεύθυνσης DNA αλυσίδας. Η U3 περιοχή του HIV είναι εντυπωσιακή στο ότι κωδικοποιεί για ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame: ORF) και συγκεκριμένα περιέχει 110 κωδικόνια του 3' τμήματος του γονιδίου *nef*. Η U3 περιέχει επίσης τα περισσότερα cis-δρώντα στοιχεία ελέγχου της μεταγραφής, που είναι θέσεις σύνδεσης για κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες και για ενισχυτές της γονιδιακής έκφρασης (π.χ. NF-κB και Sp1).

Οι κωδικές αλληλουχίες

Το γονίδιο *gag*, μήκους περίπου 1500 bp, αποτελεί το πρώτο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του ιικού γονιδιώματος και κοντά στο 5' άκρο του υπάρχει ένα «τυπικό» κωδικόνιο έναρξης [45], που είναι και το πρώτο από το μεθυλιωμένο κάλυμμα. Κωδικοποιεί για μία πρόδρομη Gag πολυπρωτεΐνη Pr55.

Το ORF *pro*, μήκους περίπου 460 bp, επικαλύπτει το *gag* κατά σχεδόν 200 βάσεις. Βρίσκεται σε διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης από το *gag* και κωδικοποιεί για την ιική πρωτεάση.

Το γονίδιο *pol*, μήκους περίπου 2500 bp, βρίσκεται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το *pro*. Κωδικοποιεί για τα ιικά ένζυμα: NH₂ - RT (p65/p50) - IN (p32) - COOH.

Το γονίδιο *env*, μήκους περίπου 2500 bp, κωδικοποιεί για μία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη gp160.

Σε αντίθεση με τους άλλους ικανούς για πολλαπλασιασμό ρετροϊούς, τα γονίδια *pol* και *env* του HIV δεν αλληλεπικαλύπτονται και χωρίζονται από περιοχή με αρκετά λειτουργικά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης.

Ολόκληρη η μήκους 600 bp περιοχή που κωδικοποιεί για το γονίδιο *vif* (viral infectivity factor, προηγούμενα ονοματιζόμενο *sor* ή Q ή A ή P') βρίσκεται μεταξύ των γονιδίων *pol* και *env* και επικαλύπτει τμήμα του πρώτου, σε χωριστό όμως ORF.

Μεταξύ των *pol* και *env* βρίσκονται επίσης δύο ακόμα ORFs, τα *vpr* (235 bp) (παλαιότερα R) και *vpu* (μόνο στον HIV-1, 245 bp), που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες επικουρικές πρωτεΐνες.

Το γονίδιο *nef* (παλαιότερα 3' ORF ή F ή B), μήκους περίπου 400 bp, ακολουθεί την gp41 περιοχή του *env* και επικαλύπτει την U3 περιοχή της 3' LTR κατά 300 περίπου νουκλεοτίδια.

Το γονίδιο *tat* (transactivator of transcription, παλαιότερα *tat-3* ή *ta*) έχει ασυνήθιστη δομή, αποτελούμενο από δύο χωριστά απομακρυσμένα εξόνια: το πρώτο μεταξύ *vif* και *env* (210 bp) και το δεύτερο (45 bp) προς την 3' άκρη του γονιδιώματος, μέσα στο *env* αλλά σε διαφορετικό αναγνωστικό πλαίσιο.

Τέλος, το γονίδιο *rev* (regulator of virion expression, παλαιότερα *art* ή *trs*), αποτελείται και αυτό από δύο χωριστά εξόνια, το πρώτο μεταξύ *vif* και *env* (75 bp) και το δεύτερο (270 bp) στη διαμεμβρανική περιοχή του *env*, σε διαφορετικό ORF από αυτό.

Η γενετική ποικιλότητα του HIV

Η μοριακή ανάλυση διαφορετικών στελεχών του HIV-1 αποκάλυψε σημαντική μεταβλητότητα σε ορισμένες περιοχές του γονιδιώματός τους, κύρια σε συγκεκριμένες

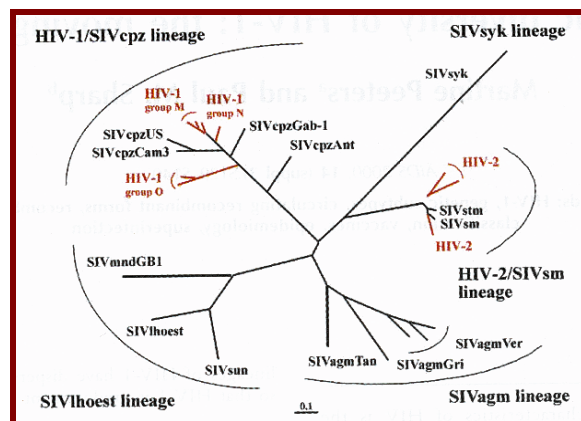
περιοχές των γλυκοπρωτεϊνών του περιβλήματος [46]. Παρατηρήθηκε, μάλιστα, ετερογένεια αλληλουχιών του ιού ακόμα και στον ίδιο άρρωστο και αυτό οδήγησε στον όρο «quasispecies» για να περιγραφεί η παρουσία στα μολυσμένα άτομα «σμήνους» ιών και όχι ενός μόνο στελέχους [47]. Η συνεχής ανάδυση καινούριων παραλλαγών του HIV θεωρείται αποτέλεσμα δύο παραγόντων. Αφενός, φαίνεται ότι έχουν γίνει πολλαπλές εισαγωγές γενετικά διαφορετικών ρετροϊών των πιθήκων στον άνθρωπο [48]. Αφετέρου, μετά την εισαγωγή τους στον ανθρώπινο πληθυσμό αυτοί οι ιοί των πιθήκων ταχύτατα απέκτησαν ακόμη περισσότερη γενετική ποικιλότητα, λόγω της ανακρίβειας της ανάστροφης μεταγραφάσης [49] σε συνδυασμό με τον εξαιρετικά ταχύ ρυθμό ανακύκλωσης in vivo (ο ρυθμός παραγωγής του HIV υπολογίζεται σε περίπου $10^9 - 10^{10}$ ισοσώματα/ημέρα) [50-52]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η ανάστροφη μεταγραφάση ευνοεί τους ανασυνδυασμούς [53], έτσι ώστε προκύπτουν ριζικά διαφορετικοί γονιδιακοί συνδυασμοί σε άτομα μολυσμένα από γενετικά διάφορους ιούς.

Φυλογενετική ανάλυση πολυάριθμων στελεχών του HIV-1 από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αποκάλυψε τρεις ομάδες, ονοματιζόμενες M (main), N (new ή non-M, non-O) και O (outlier) [54] (σχήμα 4), οι οποίες αντιπροσωπεύουν χωριστές εισαγωγές του ιού στον άνθρωπο [17] και εμφανίζουν ανομοιογενή γεωγραφική κατανομή που συνεχώς μεταβάλλεται.

Τα περισσότερα στελέχη HIV-1 σε όλο τον κόσμο ανήκουν στην ομάδα M, η οποία διαιρείται περαιτέρω σε 9 υποτύπους ή κλάδους (A,B,C,D,F,G,H,J,K). Περίπου 10-20% των στελεχών της ομάδας M που έχουν απομονωθεί (μεταξύ των οποίων και οι παλαιότερα αναφερόμενοι υπότυποι E και I) είναι ανασυνδυασμένοι ιοί (μωσαϊκά), με γονιδιακά στοιχεία διαφορετικών υποτύπων και ονομάζονται κυκλοφορούσες ανασυνδυασμένες μορφές (Circulating Recombinant Forms: CRFs) [55,56].

Στελέχη της ομάδας O ενδημούν στη Δυτική Κεντρική Αφρική (Καμερούν, Γκαμπόν) [57], όπου και πάλι αποτελούν μειονότητα (μέγιστη επίπτωση 2-5% των στελεχών HIV-1). Έχουν ανακοινωθεί τόσο στις ΗΠΑ, όσο και στην Ευρώπη. Η απόκλιση τους από την ομάδα M είναι τέτοια (αμινοξική ομολογία 50% για την Env) ώστε να μην ανιχνεύονται με κάποιες ορολογικές μεθόδους σε ποσοστό που φτάνει το 20% [58,59]. Υπάρχουν ήδη ενδείξεις για την ύπαρξη ανασυνδυασμένων M/O στελεχών [60].

Η πρόσφατα ανακαλυφθείσα ομάδα N αντιπροσωπεύεται μέχρι στιγμής από δύο μόνο στελέχη ασθενών από το Καμερούν [61].



Σχήμα 4: Εξελικτική σχέση μεταξύ των λεντι-ϊών των ανώτερων θηλαστικών HIV-1, HIV-2 και SIV. Παρουσιάζονται οι πέντε κύριοι κλάδοι: HIV-1/SIVcpz, HIV-2/SIVsm, SIVvagn, SIVhoest και SIVsyk. [cpz: chimpanzee, sm: sooty mangabey, agm: african green monkey, lhoest: L' Hoest monkey, syk: Sykes' monkey = είδη πιθήκων στα οποία απομονώθηκαν τα αντίστοιχα στελέχη]. (AIDS 2000; 14(suppl 3): S130)

HIV-2

Η γονιδιακή οργάνωση του HIV-2 (σχήμα 5) [62] είναι ανάλογη με του HIV-1: 5' LTR - *gag* - *pol* - κεντρική περιοχή - *env* - *nef* - 3' LTR, υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές μεταξύ αντίστοιχων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών.

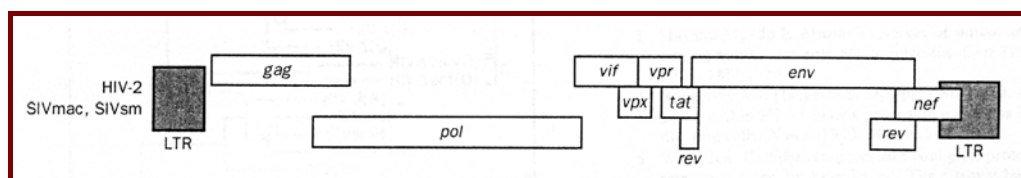
Η «κεντρική περιοχή» περιέχει πέντε μείζονα αναγνωστικά πλαίσια, από τα οποία τα τέσσερα εμφανώς σχετίζονται με τα ORFs του HIV-1 και κωδικοποιούν για τα γονίδια *vif*, *vpr*, *tat* και *rev*. Το πέμπτο, το *vpx* (παλαιότερα X), δεν φαίνεται να έχει αντίστοιχο στον HIV-1 και βρίσκεται μεταξύ του *pol* και του πρώτου εξονίου του *tat*, σε διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης.

Οι LTRs του HIV-2 είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του HIV-1, γεγονός που μερικά εξηγεί τη συνολική διαφορά μεγέθους μεταξύ των γονιδιωμάτων των δύο ιών.

Η γονιδιακή ομολογία των HIVs είναι περίπου 60% για τις περισσότερο διατηρημένες *gag* και *pol* περιοχές και 30-40% για τα υπόλοιπα γονίδια και τις LTRs. Η αμινοξική ομολογία των Gag και Pol πρωτεϊνών των δύο ιών είναι μόνο 58% και 60%, αντίστοιχα [62], παρά το γεγονός ότι αντισώματα στον ορό ατόμων μολυσμένων με HIV-1 αντιδρούν με τις πρωτεΐνες του HIV-2. Για τις Env πρωτεΐνες η ομολογία είναι ακόμα μικρότερη, περίπου 40%.

Με κριτήρια παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των υποτύπων της ομάδας M του HIV-1, αναγνωρίστηκαν έξι υπότυποι για τον HIV-2 (A-F) [63].

Το επίκεντρο της μόλυνσης από HIV-2 ήταν η Δυτική Αφρική, όπου κυρίως βρίσκεται ακόμα ο ιός. Σε αντίθεση με τον HIV-1, η επίπτωση της λοίμωξης από HIV-2 παραμένει σταθερή ή και φαίνεται να ελαττώνεται [64]. Ο HIV-2 εμφανίζει μικρότερη συχνότητα σεξουαλικής μετάδοσης, σχεδόν απουσία κάθετης μετάδοσης και μεγαλύτερο χρόνο επώασης πριν την ανάπτυξη νόσου [65,66].



Σχήμα 5: Γονιδιακή οργάνωση του HIV-2. (Lancet, 1996; 348: 33)

2. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες του HIV διακρίνονται σε δομικές (Gag, Pol, Env), ρυθμιστικές (Tat, Rev) και επικουρικές (Vru ή Vpx, Vpr, Vif, Nef) [σχήμα 3].

ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι δομικές πρωτεΐνες μεταφράζονται από τα αντίστοιχα γονίδια σαν τρεις πρόδρομες πολυπρωτεΐνες: τις Gag, Gag-Pol και Env.

Gag πρόδρομη πρωτεΐνη

Από το γονίδιο *gag* προκύπτει πρόδρομη Gag πρωτεΐνη, μεγέθους 55 kD (Pr ή p55), η οποία εκφράζεται από μη ματισμένο mRNA. Μετά την απελευθέρωση του ιοσωματίου και κατά την ωρίμανσή του, η Pr55 χωρίζεται με τη δράση της ιικής πρωτεάσης σε

τέσσερις μικρότερες πρωτεΐνες με τη γραμμική σειρά: NH₂ - MA (matrix, p17) - CA (capsid, p24) - p6 - NC (nucleocapsid, p9) - COOH.

Το πολυπεπτίδιο **MA (p17)** προέρχεται από το μυριστιλιωμένο N-άκρο της p55. Τα περισσότερα μόρια MA παραμένουν χαλαρά συνδεδεμένα στην επιφάνεια του λιπιδικού περιβλήματος που περιβάλλει το καψίδιο, «φοδράροντας» την εσωτερική πλευρά της διλιπιδικής στιβάδας και σταθεροποιώντας το ισωμάτιο. Ένα μικρό ποσοστό MA, όμως, συνδέεται με την ιντεγκράση και βρίσκεται έτσι στα βαθύτερα στρώματα του ισωματίου [67]. Αυτό διευκολύνει τη μεταφορά του ιϊκού DNA στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου, πριν την ενσωμάτωσή του [68], αφού ο κυτταρικός μηχανισμός εισόδου στον πυρήνα αναγνωρίζει ένα καρβοφιλικό σήμα πάνω στη MA. Το φαινόμενο αυτό επιτρέπει στον HIV να μολύνει μη διαιρούμενα κύτταρα, ιδιότητα ασυνήθιστη για τους ρετροϊούς [69]. Η MA εμπλέκεται στα αρχικά στάδια του ιϊκού πολλαπλασιασμού και είναι απαραίτητη για την εκβλάστηση από την κυτταρική μεμβράνη. Παρατηρήθηκε επίσης ότι αναστολή της μυριστιλίωσης της MA φαίνεται να ακυρώνει τη συναρμολόγηση του ισωματίου και να μειώνει τη μολυσματικότητα του HIV [70].

Το φωσφορυλιωμένο **p24 (CA)** πολυπεπτίδιο αποτελεί το κύριο συστατικό του κωνικού πυρήνα του ισωματίου, είναι το ευκολότερα ανιχνεύσιμο αντιγόνο του ιού και ο προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι του χρησιμοποιείται για την ορολογική διάγνωση της HIV λοίμωξης με ELISA. Η κυκλοφιλίνη A (cypA) αποδείχτηκε ότι αλληλεπιδρά με την p24 περιοχή της Pr55, οδηγώντας στην ενσωμάτωσή της στο ισωμάτιο [71,72]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ Gag και cypA είναι σημαντική, γιατί η αναστολή της από την κυκλοσπορίνη A εμποδίζει τον ιϊκό πολλαπλασιασμό [73].

Η **p9 (NC)** περιοχή της Gag είναι ειδικά υπεύθυνη για την αναγνώριση του καλούμενου σήματος για «πακετάρισμα» του HIV [74], μία ιδιαίτερη δομή κοντά στο 5' άκρο του ιϊκού RNA [75]. Η NC προάγει τον διμερισμό του ιϊκού γονιδιώματος (δύο RNA αντίγραφα του γονιδιώματος ανά ισωμάτιο) και διευκολύνει την ανάστροφη μεταγραφή [76].

Η **p6** πρωτεΐνη μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πρόδρομης Gag Pr55 και της επικουρικής πρωτεΐνης Vpr, οδηγώντας στην ενσωμάτωση της τελευταίας στα σχηματιζόμενα ισωμάτια [77,78].

Gag – Pol πρόδρομη πρωτεΐνη

Η ιϊκή πρωτεάση (PR), ιντεγκράση (IN) και ανάστροφη μεταγραφή (RT) εκφράζονται πάντα μέσα στο πλαίσιο μίας Gag-Pol πρωτεΐνης σύντηξης [79].

Κατά την ωρίμανση του ισωματίου, η ιϊκή πρωτεάση αποχωρίζει το Pol πολυπεπτίδιο από το Gag και στη συνέχεια το πέπτει για να διαχωρίσει τις PR (p10), RT (p50), RNάση H (p15) και IN (p31). Οι διαχωρισμοί δεν είναι πάντα και όλοι αποτελεσματικοί: για παράδειγμα, περίπου 50% της RT παραμένει ενωμένο με την RNάση H σαν ένα πολυπεπτίδιο p65.

Η πρόδρομη Gag-Pol (Pr160) προέρχεται από μία -1 αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης κατά την οποία τα ριβοσώματα μεταπηδούν από το πλαίσιο ανάγνωσης του *gag* σε αυτό του *pol* με καθορισμένη συχνότητα και σε συγκεκριμένο σημείο του ιϊκού μεταγράφου [80], χωρίς διακοπή της μετάφρασης.

Η πρωτεάση (**PR, p10**) του HIV είναι μία ασπαρτυλ-πρωτεάση που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες 99 αμινοξέων και είναι το υπεύθυνο ένζυμο για την πρωτεολυτική επεξεργασία των ιϊκών πρόδρομων πρωτεϊνών Gag και Gag-Pol κατά την ωρίμανση του ισωματίου, σε ώριμες δομικές Gag και Pol πρωτεΐνες,

Η **RT**, μία Mg-απαιτητική RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, παράγει ένα γραμμικό dsDNA αντίγραφο από το διμερές ιϊκό ssRNA γονιδίωμα στο κυτταρόπλασμα του

μολυσμένου κυττάρου. Πλήρες αντίγραφο ιϊκού DNA συντίθεται μέσα σε έξι ώρες από την είσοδο του ιού στο κύτταρο, αν και μπορεί να παραμείνει χωρίς να ενσωματωθεί για αρκετό χρόνο.

Η κύρια λειτουργική δομή της RT είναι ετεροδιμερές των p65 και p50 [81].

Η **RNάση H** είναι νουκλεάση με ειδικότητα για την RNA αλυσίδα ενός RNA-DNA υβριδίου. Κωδικοποιεί γι' αυτήν μία μικρή περιοχή της RT συνδεδεμένη με την περιοχή της πολυμεράσης.

Η ιντεγκράση (**IN, p32**) μεσολαβεί στην ενσωμάτωση του DNA του HIV μέσα στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου, με τρεις διακριτές λειτουργίες [82]. Αρχικά, μία δραστηριότητα εξωνουκλεάσης που αποκόπτει δύο νουκλεοτίδια από κάθε 3' άκρο του γραμμικού ιϊκού DNA διμερούς. Στη συνέχεια, μία λειτουργία ενδονουκλεάσης διπλής έλικας η οποία κόβει το DNA του ξενιστή στο σημείο ενσωμάτωσης. Τελικά, μία δράση λιγκάσης που συνδέει τα δύο άκρα του προϊικού DNA με το κυτταρικό γονιδίωμα.

Env

Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Env (**gp160**) εκφράζεται από μονά ματισμένο mRNA. Συντίθεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο όπου η αλληλουχία TM κατευθύνει το σχηματισμό ολιγομερών συμπλεγμάτων, τα οποία μεταναστεύοντας μέσα από τη συσκευή Golgi υφίστανται γλυκοζυλίωση που είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα. Στη συσκευή Golgi οι αλληλουχίες SU (gp120) και TM (gp41) χωρίζονται σε δύο ανεξάρτητες οντότητες με τη δράση μίας κυτταρικής πρωτεάσης. Μόλις φτάσουν στη επιφάνεια του κυττάρου, οι ιϊκές γλυκοπρωτεΐνες είναι διαθέσιμες για «πακετάρισμα» καθώς τα βλαστώνοντα ισωμάτια προβάλλουν από το κύτταρο [83,84]. Η Env βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου σαν πολυμερές, πιθανότατα τριμερές [85].

Στην επιφανειακή **SU (gp120)** βρίσκεται η περιοχή αλληλεπίδρασης του ισωματίου με τον CD4 υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή [86-88]. Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της gp120 σε διαφορετικά στελέχη HIV, αποκάλυψε πέντε μη συνεχόμενες αγκύλες, γνωστές σαν V1-V5, που περιέχουν υπερμεταβλητές αλληλουχίες μεταξύ περισσότερο διατηρημένων περιοχών [89]. Η V3 αγκύλη δεν εμπλέκεται στη σύνδεση με το CD4: καθορίζει τον τροπισμό του ιού είτε προς T-λεμφοκυτταρικές σειρές ή προς πρωτογενή μακροφάγα, αφού αλληλουχίες της αλληλεπιδρούν με τους συνυποδοχείς του HIV (υποδοχείς χημειοκινών) και καθορίζουν εν μέρει την επιρρέπεια κυττάρων σε συγκεκριμένα στελέχη του ιού [90-92]. Αποτελεί επίσης τον κυριότερο επίτοπο έναντι του οποίου στρέφονται εξουδετερωτικά αντισώματα που είναι χαρακτηριστικά του τύπου του ιού και εμποδίζουν τη μόλυνση από αυτόν [93-95]. Διαπιστώθηκε ότι εκτός από την V3 και οι V1-V2 αγκύλες είναι εκτεθειμένες στην επιφάνεια του HIV (στόχοι για σύνδεση με αντισώματα) και έχουν επίσης ικανότητα ταχείας μετάλλαξης [96,97].

Η διαμεμβρανική **TM (gp41)** διαθέτει μία αμινοτελική περιοχή που διευκολύνει τη σύντηξη του ιϊκού περιβλήματος με τη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου [98]. Είναι υπεύθυνη για την τάση των μολυσμένων κυττάρων, που εκφράζουν Env πρωτεΐνη στην επιφάνειά τους, να σχηματίζουν συγκύτια με μη μολυσμένα CD4+ κύτταρα [99]. Φαίνεται επίσης ότι μεταβολές στο εξωτερικό τμήμα της gp41 ακυρώνουν τη διάχυση και μερικές φορές εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ενώ ακόμα παρεμποδίζουν τη σύνδεση εξουδετερωτικών αντισωμάτων που στρέφονται κατά της gp120 [100].

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα ρυθμιστικά γονίδια κωδικοποιούν για αντίστοιχα πρωτεϊνικά προϊόντα, απόλυτα απαραίτητα για την ιική αναπαραγωγή, που για τη δράση τους βασίζονται στην αναγνώριση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος, γνωστών σαν «responsive elements».

Tat

Η πρωτεΐνη **Tat (p16/p14)**, Μ.Β. 86 kD, κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο σε mRNA μήκους 2 kb και είναι διμερής όταν ενωθεί με ιόντα ψευδαργύρου. Οι δύο μορφές της, μήκους 72 και 101 αμινοξέων, μεταφράζονται από αρχικό πλήρως ματισμένο ή τελικό ανεπαρκώς ματισμένο mRNA του ιού, αντίστοιχα [101]. Αποτελεί ενεργοποιητή της μεταγραφής απόλυτα απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του HIV [102,103], δρώντας σε μεταγραφικό [104-106] και μετα-μεταγραφικό επίπεδο [104,107]. Δρα αφού συνδεθεί με μία σταθερή δομή φουρκέτας, γνωστή σαν TAR (transactivation response element) [108], που βρίσκεται στην 5' LTR του γονιδιώματος και στην αρχή όλων των mRNAs του HIV [109-112]. Αποτέλεσμα της σύνδεσης Tat-TAR είναι η ενεργοποίηση της έκφρασης όλων των ιικών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου και του *tat* (θετική ανατροφοδότηση) [113,114] και, η κατά 1000 τουλάχιστον φορές αύξηση της παραγωγής πρωτογενών ιικών μεταγράφων, που οδηγεί σε ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του HIV.

Έχει αποδειχθεί ότι η Tat ενεργοποιεί και την έκφραση ορισμένων κυτταρικών γονιδίων, όπως των TNF-β και TGF-β, ενώ καταστέλλει την έκφραση άλλων, όπως των bcl-2 και MIP-1a.

Παρά το γεγονός ότι η Tat πρωτεΐνη συσσωρεύεται στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων ανάλογα με το ρυθμό του ιικού πολλαπλασιασμού, η ίδια είναι μόνο ασθενώς ανοσογόνα και λίγα άτομα εμφανίζουν αντισώματα εναντίον της.

Rev

Είναι μία φωσφοπρωτεΐνη μεγέθους 13 kD που κωδικοποιείται από δύο εξόνια [115-117]. Προάγει τη μετάβαση από την αρχική (παραγωγή προϊόντων των ρυθμιστικών γονιδίων) στην όψιμη (παραγωγή δομικών πρωτεϊνών) φάση της έκφρασης των γονιδίων του HIV και συνεπώς τη μετάπτωση από τη λανθάνουσα στην ενεργό λοίμωξη [118,119]. Η Rev για να δράσει συνδέεται με μία πολύπλοκη δευτεροταγή δομή RNA, καλούμενη RRE (Rev response element), που βρίσκεται μέσα στο γονίδιο *env* [120-122].

Η αλληλεπίδραση Rev-RRE ενεργοποιεί την εξαγωγή των μη ματισμένων και ανεπαρκώς ματισμένων mRNAs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [122-125] ή τα αποδεσμεύει από το σύστημα ματίσματος του πυρήνα επιτρέποντας έτσι να συμβεί η μεταφορά τους εξ' αποκλεισμού [126]. Η ικανότητα της Rev να μειώνει το ρυθμό ματίσματος ιικού RNA προκαλεί ρύθμιση αρνητικής ανατροφοδότησης, με την οποία το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής ελέγχεται στενά [127]. Το RRE, λόγω του pattern του ματίσματος του HIV, βρίσκεται μόνο στα mRNAs που η έκφρασή τους ελέγχεται από τη Rev.

Η Rev πιστεύεται ότι υπάρχει σαν ομοτετραμερές σε διάλυμα [128].

Είναι ενδιαφέρον ότι αντι-Rev αντισώματα ανιχνεύονται κυρίως στα πρώτα στάδια της λοίμωξης, όταν η ιαιμία είναι εντονότερη [129].

ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Τα γονίδια *nef*, *vif*, *vpr* και *vpru* του HIV-1 κωδικοποιούν για τις λεγόμενες επικουρικές πρωτεΐνες του ιού. Ο HIV-2 περιέχει το γονίδιο *vpx* αντί του *vpru*.

Οι επικουρικές πρωτεΐνες δεν είναι απόλυτα απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του HIV σε όλα τα in vitro συστήματα, αλλά αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την αναπαραγωγή και την παθογένεια του ιού in vivo.

Nef

Το προϊόν του γονιδίου *nef* (ακρωνύμιο για negative factor), M.B. 27-35 kD, είναι η μεγαλύτερη από τις επικουρικές πρωτεΐνες του HIV και η πρώτη από αυτές που αθροίζεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στο κύτταρο μετά τη μόλυνση [119,130].

Η μυριστιλιωμένη κυτταροπλασματική αυτή πρωτεΐνη οφείλει το όνομά της σε αρχικές παρατηρήσεις που υποστήριζαν ότι κατέστρεφε τη μεταγραφική δραστηριότητα της LTR του HIV και ανέστρεφε τον πολλαπλασιασμό του [131,132], επιδρώντας στην NRE (negative regulatory element) περιοχή της LTR.

Αν και οι κυτταρικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για το κρίσιμο ρόλο της Nef στον πολλαπλασιασμό του HIV *in vivo* [133] δεν έχουν διαλευκανθεί [134], πολλές δράσεις της έχουν περιγραφεί *in vitro*.

Η Nef καταστέλλει την επιφανειακή έκφραση του μορίου CD4 [135,136] και της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) [137] στα μολυσμένα κύτταρα.

Η ίδια πρωτεΐνη καταστέλλει, αν και σε μικρότερο βαθμό, την επιφανειακή έκφραση μορίων MHC τάξης I στα μολυσμένα με HIV T λεμφοκύτταρα [138] και έτσι ίσως τα προστατεύει από κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) και NK κύτταρα [139,140]. Πρόσφατα ανακοινώθηκε ότι η Nef των HIV-2 και SIV επάγει την καταστολή του υποδοχέα του T κυττάρου (TCR) [141,142], ενώ η Nef του HIV-1 δεν έχει την ιδιότητα αυτή, παρά την ικανότητά της να οδηγεί σε ενίσχυση της έκφρασης FasL [143].

Η Nef αυξάνει τη μολυσματικότητα των ισωματίων του HIV [144-148] και είναι απαραίτητη για τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του ιού και την εξέλιξη της νόσου *in vivo* [149].

Επίσης η Nef επηρεάζει τις οδούς μεταβίβασης μηνύματος [150], οδηγώντας σε τροποποίηση του κυτταρικού περιβάλλοντος ώστε να διευκολύνεται η αναπαραγωγή και εξάπλωση του ιού.

Η καταστολή του CD4 και η επίδραση στη μολυσματικότητα είναι γενετικά διακριτές λειτουργίες της Nef. Έχει αναφερθεί ότι ελλείψεις στο γονίδιο *nef* συσχετίζονται με απουσία εξέλιξης της νόσου [151-154].

Αντισώματα έναντι της Nef ανιχνεύονται στους μισούς περίπου φορείς HIV, αλλά ο τίτλος τους σταδιακά μειώνεται μέχρι εξαφάνισης καθώς η νόσος εξελίσσεται.

Vif

Είναι μία πρωτεΐνη πλούσια σε τρυπτοφάνη, M.B. 23 kD, απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του HIV στα περιφερικά λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και ορισμένες κυτταρικές σειρές [155-158].

Φαίνεται ότι η δράση της εξαρτάται από κάποιον παράγοντα ή λειτουργία του κυττάρου, που η έκφρασή του ποικίλλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο [159]. Η Vif δρα σε όψιμα στάδια του κύκλου πολλαπλασιασμού του ιού για να παραχθούν ισωμάτια ικανά για παραγωγική μόλυνση.

Η Vif ενσωματώνεται στα ισωμάτια του HIV [160], το φαινόμενο αυτό όμως πιθανά δεν είναι ειδικό, γιατί η Vif ενσωματώνεται και σε ετερόλογους ρετροϊούς [161].

Η πρωτεΐνη Vif είναι ανοσογόνος σε μία μειοψηφία μολυσμένων ατόμων και ο τίτλος των αντισωμάτων εναντίον της μειώνεται όταν εμφανιστεί κλινικό AIDS.

Vpr

Είναι προϊόν γονιδίου που βρίσκεται μόνο στον HIV-1. Έχει M.B. 16 kD και είναι φωσφοπρωτεΐνη που εντοπίζεται κυρίως στις εσωτερικές μεμβράνες του κυττάρου. Εκφράζεται από το mRNA που κωδικοποιεί και για την Epr, αλλά μεταφράζεται σε επίπεδα 10 φορές χαμηλότερα από αυτήν γιατί το κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής της δεν είναι αποτελεσματικό [162].

Η δράση της αφορά στην καταστολή της έκφρασης του CD4 [163-165] και στην ενίσχυση της απελευθέρωσης ιοσωματίων από το μολυσμένο κύτταρο [166-168]. Οι δύο αυτές λειτουργίες διαχωρίζονται γενετικά [169].

Ορισμένα HIV-θετικά άτομα παράγουν αντισώματα εναντίον της Vru, συνήθως σε πολύ αρχικά στάδια της λοίμωξης ή σε τελικά στάδια της νόσου [170]. Η ανίχνευσή τους είναι απόδειξη της μόλυνσης από HIV-1, αφού Vru πρωτεΐνη δεν παράγεται από τον HIV-2.

Vpr

Έχει Μ.Β. 15 kD και βρίσκεται ενσωματωμένη στα ιοσωμάτια, καθένα από τα οποία περιέχει περίπου 100 αντίγραφα της [171].

Είναι απαραίτητη για τη μόλυνση μη διαιρούμενων κυττάρων από HIV (όπως τα διαφοροποιημένα μακροφάγα), λειτουργία που σχετίζεται με το ρόλο της στην εντόπιση του προϊικού συμπλέγματος στον πυρήνα [172-174]. Η Vpr συμμετέχει σ' αυτήν τη διαδικασία μαζί με τις πρωτεΐνες MA και IN του ιού.

Η Vpr προκαλεί σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 [175], παρεμποδίζοντας την είσοδο στη μίτωση [176,177]. Να σημειωθεί ότι κατά την G2 φάση η ιϊκή LTR είναι περισσότερο ενεργή [178]. Η Vpr φαίνεται ικανή να ενεργοποιεί σε μέτριο βαθμό την LTR του HIV, καθώς και ποικιλία κυτταρικών και ιϊκών υποκινητών.

Η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να επάγει ή να αναστέλλει την επαγόμενη από T κύτταρα απόπτωση, ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασής της [179,180].

Η Vpr εξαιρετικά διατηρημένη στα διαφορετικά στελέχη του HIV και μεταξύ HIV-1 και HIV-2, εκτός από μικρό τμήμα του αμινικού της άκρου που απουσιάζει από κάποιους ιούς.

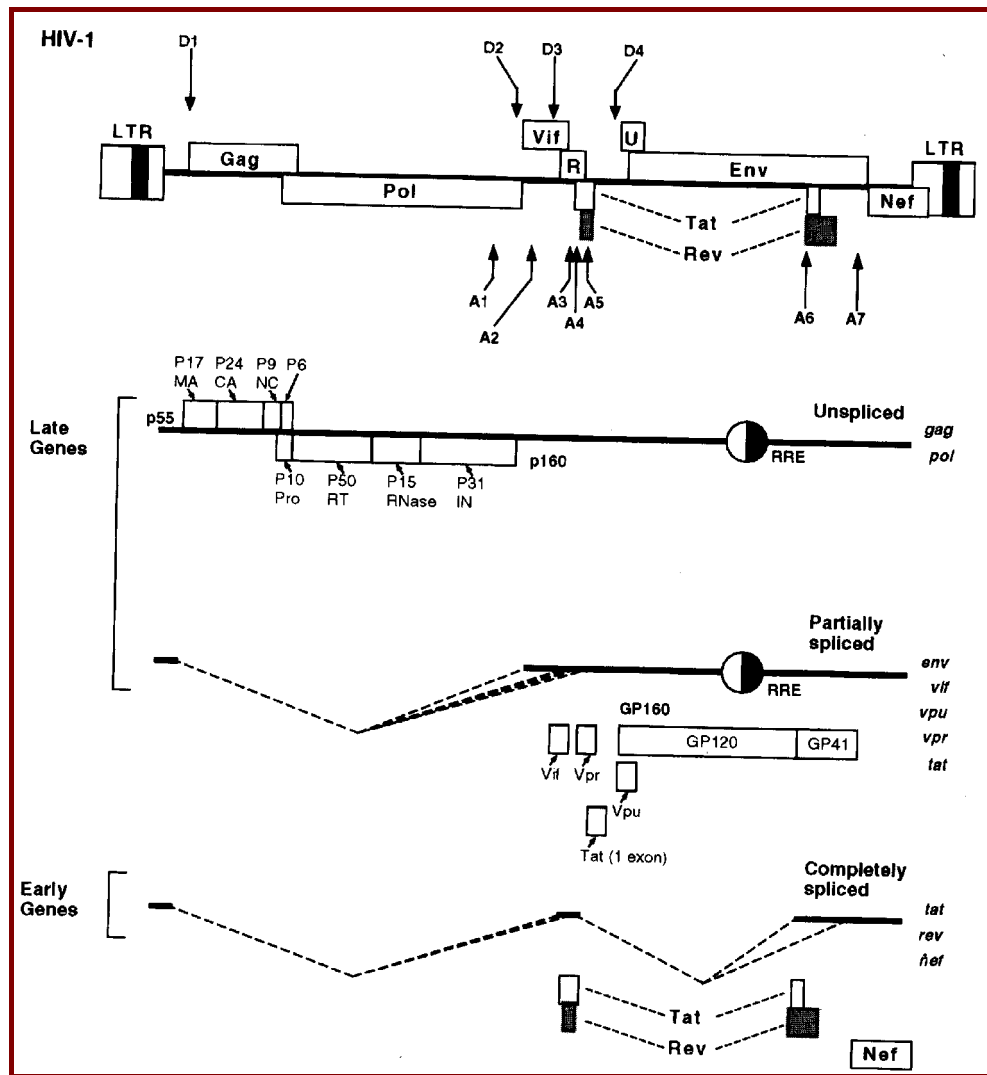
Αντισώματα εναντίον της ανιχνεύονται στους μισούς ασθενείς και μάλιστα αντιδρούν εξίσου καλά με Vpr αντιγόνα του HIV-1 και του HIV-2 [181].

Vpx

Είναι προϊόν γονιδίου που βρίσκεται μόνο στα μέλη της ομάδας HIV-2-SIVsm.

Η Vpx είναι μικρή πρωτεΐνη (14-16 kD) του ιοσωματίου, που πακετάρεται σ' αυτό μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την p6 περιοχή της Gag πρόδρομης πολυπρωτεΐνης [182].

Έχει κρίσιμο ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού σε μη διαιρούμενα κύτταρα. Όπως η Vpr, θεωρείται ότι και αυτή εντοπίζει το προϊικό σύμπλεγμα στον πυρήνα του μολυσμένου κυττάρου [183].



Σχήμα 6: έκφραση του γονιδιώματος του HIV-1. (The AIDS knowledge base, 3rd edition, 1999)

Στην κορυφή υπάρχει μία σχηματική παράσταση του γραμμικού προ-ϊικού γονιδιώματος με τις κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων να φαίνονται σαν τετράγωνα. Οι θέσεις-δότες σημείων ματίσματος (splice donor sites) χαρακτηρίζονται σαν D1-4 και οι θέσεις-δέκτες σημείων ματίσματος (splice acceptor sites) σαν A1-17.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι τρεις κύριες κατηγορίες ιικού RNA και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτές.

Τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* εκφράζονται σαν πρόδρομες πολυπρωτεΐνες που πέπτονται ώστε να παραχθούν οι ώριμες ιικές πρωτεΐνες.

Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται συνοπτικά τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων των HIV-1 και HIV-2 και οι κυριότερες δράσεις τους.

Γονίδιο	Πρωτεΐνη	Κύριες ιδιότητες/λειτουργίες
<i>gag</i>	MA (p17)	κωδικοποιεί για πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Pr55 καρσοφιλικό σήμα (μεταφορά προϊού στον πυρήνα), ρόλος στην εκβλάστηση των ισωματίων
	CA (p24)	κύριο συστατικό του πυρήνα, ισχυρό αντιγόνο του ιού
	p6	μεσολάβηση στην ενσωμάτωση της Vpr στα ισωμάτια
	NC (p9)	αναγνώριση του σήματος για «πακετάρισμα» στο ιικό RNA
<i>pol</i>	PR (p10)	κωδικοποιεί για πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Pr160 Gag-Pro-Pol πρωτεολυτική επεξεργασία των πρόδρομων Gag και Gag-Pro-Pol πολυπρωτεϊνών
	RT(p50/p65)	παραγωγή dsDNA αντιγράφου (προϊός) του ιικού ssRNA γονιδιώματος
	RNάση H (p15)	πέψη RNA αλυσίδας RNA-DNA υβριδίου
	IN (p32)	ενσωμάτωση προϊού στο κυτταρικό γονιδίωμα
<i>env</i>	SU (gp120)	κωδικοποιεί για πρόδρομη πολυπρωτεΐνη gp160, που πέπτεται από κυτταρικές πρωτεάσες στις ώριμες γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος περιέχει τις περιοχές αλληλεπίδρασης του HIV με τον υποδοχέα CD4 και τους συνυποδοχείς του και αποτελεί κύριο στόχο εξουδετερωτικών αντισωμάτων
	TM (gp41)	ρόλος στη σύντηξη μεμβρανών ιού-κυττάρου
<i>tat</i>	Tat (p16/14)	ισχυρή ενεργοποίηση μεταγραφής του ιού
<i>rev</i>	Rev (p19)	μεταφορά ιικού mRNA στο κυτταρόπλασμα και, έτσι, μετάβαση από το αρχικό (παραγωγή ρυθμιστικών πρωτεϊνών) στο όψιμο (παραγωγή δομικών πρωτεϊνών) στάδιο του ιικού πολλαπλασιασμού
<i>nef</i>	Nef (p27)	καταστολή επιφανειακής έκφρασης CD4, ενίσχυση της μολυσματικότητας
<i>vif</i>	Vif (p23)	ενίσχυση παραγωγικής μόλυνσης
<i>vpr</i>	Vpr (p16)	καταστολή της έκφρασης του CD4, ενίσχυση της εκβλάστησης ισωματίων από το κύτταρο. Βρίσκεται μόνο στον HIV-1.
<i>vpr</i>	Vpr (p10-15)	καρσοφιλική ιδιότητα, σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2, ασθενής ενεργοποίηση μεταγραφής
<i>vpx</i>	Vpx (p14-16)	καρσοφιλική ιδιότητα. Βρίσκεται μόνο στον HIV-2

3. Μορφολογία

Η υψηλής ευκρίνειας ηλεκτρονική μικροσκοπία αποκάλυψε το ισωμάτιο του HIV σαν δομή σφαιρική που περιέχει το νουκλεοκαψίδιο (σχήμα 7). Ο πλήρης ιός έχει διάμετρο περίπου 110 nm και αποτελείται από τρία βασικά συστατικά: το περίβλημα ή φάκελο, το RNA γονιδίωμα και τις δομικές πρωτεΐνες [184].

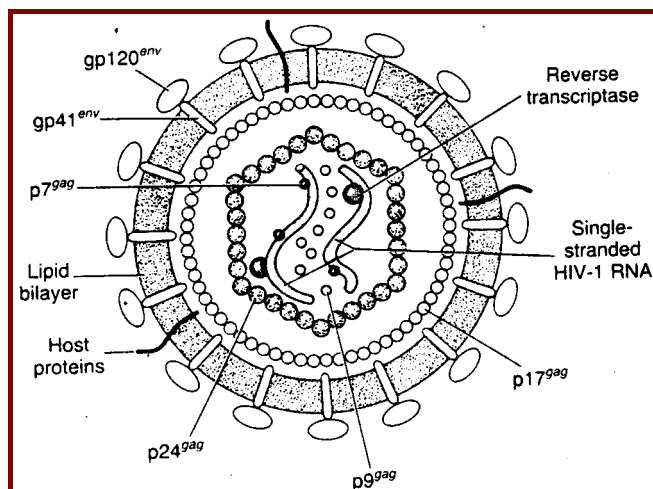
Το μολυσματικό ισωμάτιο περιβάλλεται από διλιπιδική στιβάδα, προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή, η οποία παρέχει περιορισμένη προστασία από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Στην εξωτερική της πλευρά βρίσκονται αγκυροβολημένες σε σχηματισμό κορυμών οι γλυκοπρωτεΐνες SU (surface, gp120) και TM (transmembrane, gp41) που επιτρέπουν τη σύνδεση και σύντηξη του ισωματίου με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή στα πρώτα στάδια της μόλυνσης. Το περίβλημα διαπερνούν επίσης πρωτεΐνες του ξενιστή, μεταξύ των οποίων και αντιγόνα ιστοσυμβατότητας τάξης I και II, που προσαρτώνται στο ισωμάτιο κατά την εκβλάστησή του από το κύτταρο [185].

Αμέσως κάτω από το ιικό περίβλημα βρίσκεται η μικρή μυριστιλιωμένη πρωτεΐνη του στρώματος MA, χαλαρά συνδεδεμένη με τη μεμβράνη. Διαδραματίζει ουσιαστικό, αλλά ελάχιστα εξακριβωμένο, ρόλο στα πρώτα βήματα του κύκλου πολλαπλασιασμού (μεταξύ εισόδου και ενσωμάτωσης).

Στο κέντρο του ισωματίου υπάρχει η δομή που περιγράφεται χαλαρά σαν πυρήνας (core). Η εξωτερική επιφάνεια του πυρήνα έχει σχήμα κωνικό και συντίθεται από την πρωτεΐνη του ιικού καψιδίου CA. Η CA είναι συνδεδεμένη με μικρά ποσά μίας πρωτεΐνης του ξενιστή, της κυκλοφιλίνης A (cypA) (1:10, cypA:CA), η οποία είναι σημαντική για τον παραγωγικό ιικό πολλαπλασιασμό.

Μέσα στο κωνικό καψίδιο υπάρχει όλος ο «εξοπλισμός» για τη σύνθεση του προϊκού DNA. Αυτός περιλαμβάνει δύο πανομοιότυπα αντίγραφα του RNA γονιδιώματος, δύο μόρια tRNA^{lys3} του ξενιστή για την έναρξη της σύνθεσης του DNA, την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου NC, συνδεδεμένη επιλεκτικά με το ιικό RNA και την ανάστροφη μεταγραφάση (RT). Η ενσωμάτωση του γραμμικού DNA προϊόντος στο γονιδίωμα του ξενιστή καταλύεται από την ιντεγκράση (IN). Μέσα στον πυρήνα υπάρχουν ακόμα η ιική πρωτεάση (PR), απαραίτητη για την ωρίμανση των καινούριων ισωματίων και οι πρωτεΐνες p6, Vif και Vpr [186]. Έχει προταθεί ότι και η Nef πρωτεΐνη ενσωματώνεται στα ισωμάτια του HIV.

Υπολογίζεται ότι ένα ρετροϊικό ισωμάτιο αποτελείται από 1-2% RNA, 35% λιπίδια και 65% πρωτεΐνες. Τα 2/3 της μάζας του RNA είναι το ιικό γονιδίωμα και το υπόλοιπο κυτταρικά tRNAs (περίπου 50 μόρια/ισωμάτιο), λίγα mRNAs και 5S ριβοσωμικά RNAs του ξενιστή.



Σχήμα 7: Ισωμάτιο HIV. (The Medical Management of AIDS, 5th edition)

4. Κύκλος πολλαπλασιασμού

Ο κύκλος πολλαπλασιασμού του HIV ακολουθεί γενικά το μοντέλο αναπαραγωγής των ιών με περίβλημα, όπως και των άλλων ρετροϊών [21]. Τα βήματα που είναι μοναδικά στον κύκλο ανάπτυξης των ρετροϊών είναι η ανάστροφη μεταγραφή και, κυρίως, η ενσωμάτωση, που καθιστούν τη λοίμωξη μόνιμη: «a retrovirus is forever». Τα βήματα του κύκλου αναπαραγωγής του ιού περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια και παρουσιάζονται στο σχήμα 8.

Ο ιός συνδέεται με το κύτταρο-στόχο μέσω ειδικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του ιικού περιβλήματος με τον υποδοχέα CD4 της πλασματικής μεμβράνης [βήμα 1].

Ο HIV, όπως και οι περισσότεροι ρετροϊοί, μολύνει κύτταρα με τρόπο ανεξάρτητο του pH, που είναι συμβατός με άμεση σύντηξη ιϊκής και κυτταρικής μεμβράνης. Μετά τη σύνδεση CD4-gp120, η σύντηξη των μεμβρανών ιού και κυττάρου, που διαμεσολαβείται από την ιϊκή διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη gp41 και από τους υποδοχείς των χημειοκινών CXCR4 ή CCR5, καταλήγει στη διείσδυση του ισοωματίου στο κυτταρόπλασμα ταυτόχρονα με την απώλεια του ιικού περιβλήματος [βήμα 2].

Σε ενεργοποιημένα και πολλαπλασιαζόμενα T λεμφοκύτταρα, ακολουθεί ανάστροφη μεταγραφή του ιικού RNA γονιδιώματος (που ακόμα περιέχεται μέσα σε σύμπλεγμα από μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες συνδεδεμένο με την ιϊκή RT) σε γραμμικό dsDNA (προϊός) [βήμα 3]. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο άλματα της ανάστροφης μεταγραφάσης από το 5' στο 3' άκρο του μορίου-υποστρώματος, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό αλληλουχιών που εντοπίζονται στα δύο άκρα του ιικού RNA. Οι αλληλουχίες αυτές εμφανίζονται ενωμένες η μία πίσω από την άλλη και στα δύο άκρα του ιικού DNA, σχηματίζοντας τις LTRs. Η ανάστροφη μεταγραφή αρχίζει στο κυτταρόπλασμα, αλλά το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης προϊικού DNA γίνεται μέσα στο πυρηνικό διαμέρισμα. Λόγω της ανακρίβειας της RT, η οποία δεν διαθέτει διορθωτική δράση 3'-5' εξωνουκλεάσης, υπολογίζεται ότι σε κάθε καινούριο αντίγραφο HIV ενσωματώνονται μέχρι και 10 λανθασμένες βάσεις.

Το προϊικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου το γραμμικό αντίγραφο του ιικού γονιδιώματος ενσωματώνεται στο χρωμοσωμικό DNA του ξενιστή με τη δράση της ιϊκής ιντεγκράσης (IN), η οποία αναγνωρίζει στα άκρα του προϊού τα καλούμενα σημεία att [βήμα 4].

Σε ηρεμούντα κύτταρα, όμως, τα γεγονότα αυτά εξελίσσονται ανεπαρκώς ή καθόλου. Ασυνήθιστο χαρακτηριστικό της HIV λοίμωξης αποτελεί η άθροιση στο μολυσμένο κύτταρο μεγάλου ποσού μη ενσωματωμένου ιικού DNA.

Με την ενσωμάτωση ο προϊός αποκτά τη γενετική σταθερότητα ενός κυτταρικού γονιδίου και η μεταγραφική του δραστηριότητα ρυθμίζεται αφενός από κυτταρικούς παράγοντες μεταγραφής, είτε διαρκώς εκφραζόμενους (π.χ. Sp1 και παράγοντες που συνδέονται με την ακολουθία TATA), είτε επαγωγίσιμους μετά από ενεργοποίηση (οικογένεια NF-κB) και αφετέρου από την ιϊκή Tat πρωτεΐνη [βήμα 5]. Ο έλεγχος της μεταγραφής εξαρτάται κυρίως από τις μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες LTRs.

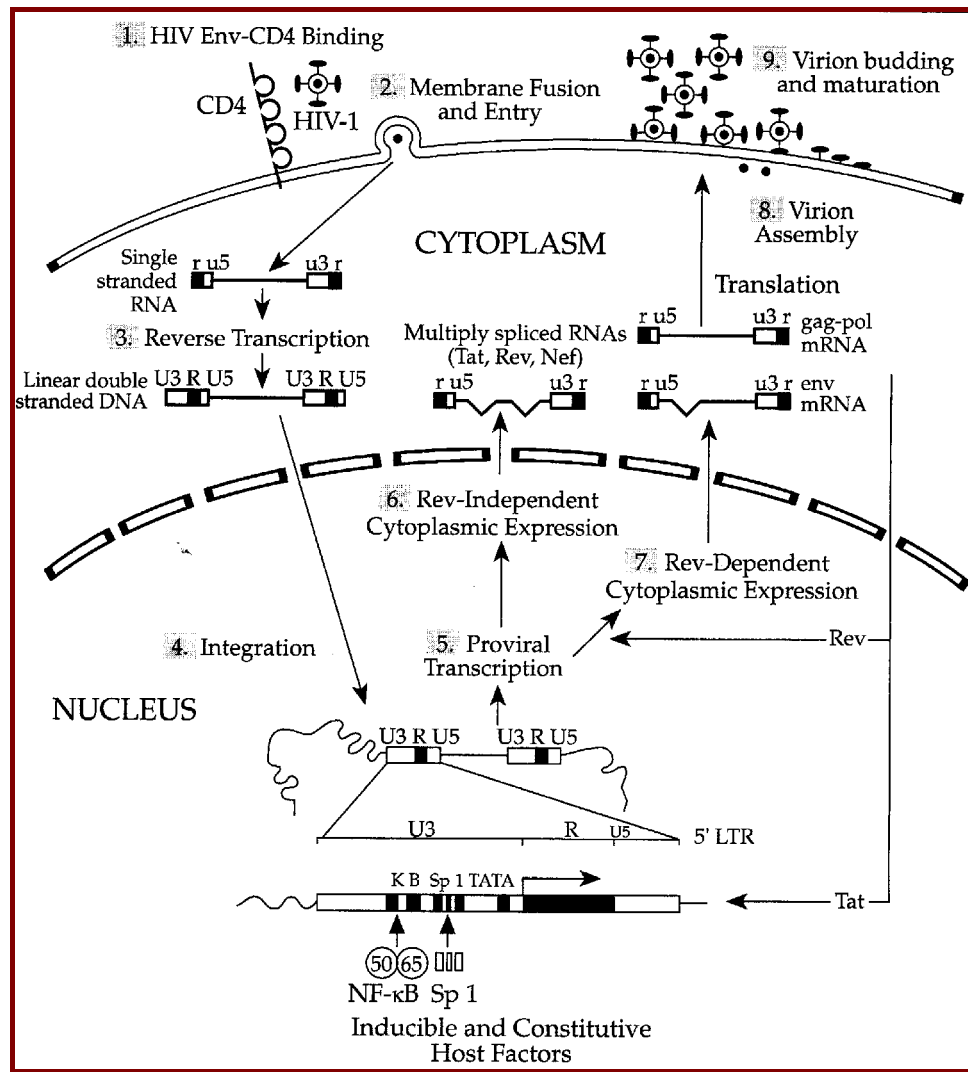
Μετά τη σύνθεση πλήρους μήκους ιικού RNA παράγεται μία περίπλοκη σειρά ιικών mRNAs με εναλλακτικούς τρόπους ματίσματος. Η σχετική έκφραση των διαφορετικών ειδών ιικού mRNA ελέγχεται από την πρωτεΐνη Rev: όταν το διαθέσιμο ποσό της Rev σε ένα μολυσμένο κύτταρο είναι περιορισμένο (αρχικά στάδια της μόλυνσης ή χαμηλά επίπεδα μεταγραφής, γενικά) μόνο τα πολλαπλά ματισμένα mRNA μετάγραφα, που κωδικοποιούν για τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, είναι διαθέσιμα στο κυτταρόπλασμα για μετάφραση [βήμα 6].

Όταν συγκεντρωθεί επαρκές ποσό Rev, εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα τα μονά ματισμένα (δομικές και ενζυμικές πρωτεΐνες) και μη ματισμένα (ιικό RNA γονιδίωμα) mRNAs και μπορεί να προχωρήσει η σύνθεση των δομικών πρωτεϊνών του ιού [βήμα 7]. Η μετάφραση των ιικών μηνυμάτων γίνεται πάνω στα κυτταρικά ριβοσώματα.

Τα προϊόντα της μετάφρασης, μαζί με τα πλήρη RNA γονιδιώματα, συγκεντρώνονται στην περιφέρεια του κυττάρου (όπου γίνεται η συναρμολόγηση των ισοωματίων) [βήμα 8] και προσαρτούν τις ιϊκές πρωτεΐνες του περιβλήματος κατά την

εκβλάστηση από την κυτταρική μεμβράνη. Φαίνεται ότι η Gag πρωτεΐνη, μόνη, συντονίζει το πακετάρισμα όλων των υπόλοιπων συστατικών του ισωματίου και είναι υπεύθυνη για τη διαδικασία απελευθέρωσης του ιού από το κύτταρο. Περιέχει τρεις μικρές περιοχές (M: membrane binding μέσα στη MA αλληλουχία, I: interaction στην NC περιοχή, L: late μέσα στην p6) που συνεργάζονται για το σκοπό αυτό. Η Gag συντονίζει το πακετάρισμα των Env γλυκοπρωτεϊνών μέσω αλληλεπίδρασης με την αλληλουχία MA, κατά την απελευθέρωση του ισωματίου. Τα προϊόντα του γονιδίου *pol* πακετάρονται μέσω αλληλεπίδρασης του Gag τμήματος της Gag-Pol πρόδρομης πρωτεΐνης με μόρια Gag. Το ιικό RNA γονιδίωμα πακετάρεται αλληλεπιδρώντας με την NC αλληλουχία, ενώ η Vpr πρωτεΐνη και η κυκλοφιλίνη με τις p6 και CA αλληλουχίες, αντίστοιχα.

Η απελευθέρωση συνοδεύεται ή ακολουθείται γρήγορα από πρωτεολυτική κατεργασία των ιικών Gag και Gag-Pol πολυπρωτεϊνών από την ιική πρωτεάση, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ώριμων μολυσματικών ισωματίων [βήμα 9]. Η πρόσληψη των πρωτεϊνών του περιβλήματος από τον ιό φαίνεται να είναι επιλεκτική διαδικασία, γιατί οι περισσότερες επιφανειακές πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή (με αξιοσημείωτη εξαίρεση τις HLA-DR και β2-μικροσφαιρίνη) εξαιρούνται από το ισωμάτιο. Σημαντικό ρόλο στην προσάρτηση έχει το ακραίο κυτταροπλασματικό τμήμα της Env πρωτεΐνης.



Σχήμα 8: Ο κύκλος πολλαπλασιασμού του HIV. (The AIDS knowledge base, 3rd edition, 1999)

5. Υποδοχείς και συνυποδοχείς

Υποδοχέας CD4

Από το 1984 είναι γνωστή η κυτταρική προτίμηση (τροπισμός) των HIVs και SIVs σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CD4, που βασίζεται κύρια στην υψηλής συγγένειας σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης SU (gp120) του ιϊκού περιβλήματος με την D1 περιοχή του μορίου CD4 [86,87,187-191].

Το CD4 εκφράζεται κύρια σε έναν υποπληθυσμό των T λεμφοκυττάρων (CD4+) και ορισμένα μακροφάγα, αλλά και σε ποικιλία αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και κυττάρων του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (μονοκύτταρα του αίματος, μακροφάγα των ιστών, δένδριτικά κύτταρα των λεμφοζιδίων των λεμφαδένων, κύτταρα Langerhans στο δέρμα, μικρογλοιακά και πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος).

Κατέχει κεντρική θέση στη γένεση ανοσολογικών απαντήσεων γιατί αποτελεί το φυσικό συνδέτη των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II.

Ο πολλαπλασιασμός του ιού ακολουθείται από εξαφάνιση ή μεγάλη ελάττωση έκφρασης του επιφανειακού CD4, που διαμεσολαβείται από αρκετές ιϊκές πρωτεΐνες (gp120, gp160, Vpr, Nef) σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού. Αυτό δυνητικά καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά σε επόμενη μόλυνση από HIV ή άλλους ιούς που χρησιμοποιούν το CD4 σαν πύλη εισόδου.

Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί σύνδεσης του ιού με κύτταρα περιλαμβάνουν τη σύνδεση ισοωματιών καλυμμένων από αντισώματα με τους Fc και C3 υποδοχείς των μακροφάγων και την υψηλής συγγένειας σύνδεση της gp120 με ένα γλυκολιπίδιο, το γαλακτοσυλ-κεραμίδιο, στην επιφάνεια κυτταρικών σειρών νευρογλοίας και νευροβλαστώματος και σε CD4-αρνητικά κύτταρα εντερικού επιθηλίου [192, 193].

Υποδοχείς χημειοκινών

Το 1996 ανακαλύφθηκε ότι οι απαραίτητοι συμπαράγοντες ή «υποδοχείς σύντηξης» για την είσοδο των HIV-1, HIV-2 και SIV σε κύτταρα που εκφράζουν CD4 είναι πέντε, τουλάχιστον, μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των χημειοκινών [91,92,194-196].

Οι χημειοκίνες αποτελούν ξεχωριστή ομάδα κυτταροκινών που αναγνωρίστηκε το 1992. Έχουν ισχυρή χημειοτακτική δράση πάνω σε επιλεγμένους λευκοκυτταρικούς πληθυσμούς και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια ανοσολογικών, φλεγμονωδών και αλλεργικών αντιδράσεων, αλλά και στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων και στην αγγειογένεση. Διακρίνονται δύο υποοικογένειες: α ή CXCR που κυρίως έλκουν ουδετερόφιλα (IL-8, SDF-1) και β ή CCR που ασκούν τη δράση τους στα μονοκύτταρα (RANTES, MIP-1α, MIP-1β).

Μετά τη σύνδεση του ιού με το CD4 πάνω στο κύτταρο στόχο, οι υποδοχείς των χημειοκινών αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Env και προκαλούν αλλαγές της στερεοδομής της που πιστεύεται ότι είναι απαραίτητες για τη σύντηξη των μεμβρανών του κυττάρου και του ιού [197-199] (σχήμα 9).

Εκτός των CCR5 και CXCR4, αρκετοί ακόμα υποδοχείς χημειοκινών και υποδοχείς για τους οποίους δεν έχει ακόμα ανακαλυφθεί η ουσία σύνδεσης (orphan receptors) [κύρια οι CCR3, CCR2b, STRL33/Bonzo/TYMSTR] χρησιμεύουν σαν συνυποδοχείς για κάποια πρωτογενή στελέχη HIV-1 [200-204].

Τροπισμός HIVs

Είναι γνωστό ότι τα στελέχη HIV εμφανίζουν τροπισμό είτε προς τα μακροφάγα [Μ-τρόπος ή NSI: non-syncytium inducing στελέχη] είτε προς τα T κύτταρα [Τ-τρόπος ή SI: syncytium inducing στελέχη] [205-209].

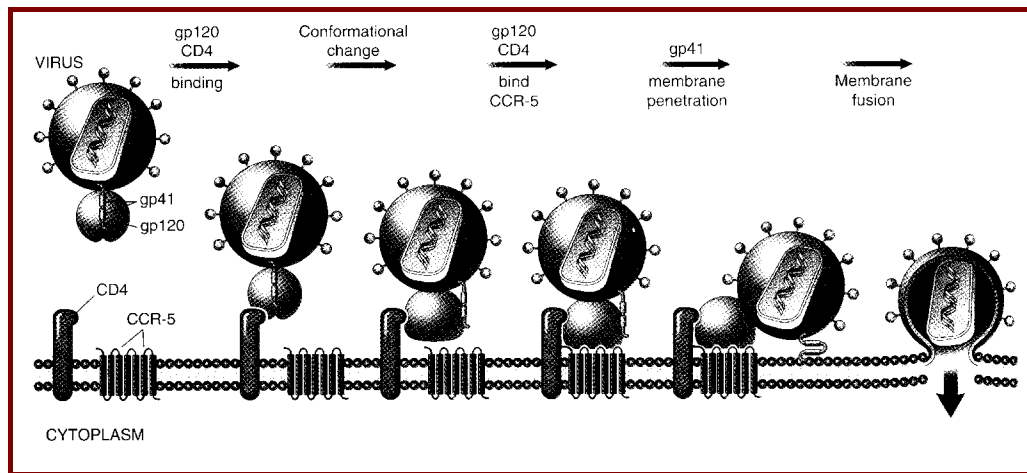
Η εκλεκτικότητα αυτή αντανακλά την κυτταρική κατανομή της έκφρασης συνυποδοχέων: οι Μ-τρόποι ιοί χρησιμοποιούν τον CCR5 (και, σπανιότερα, τον CCR3)

υποδοχέα των β-χημειοκινών, που εκφράζεται τόσο στα μονοκύτταρα όσο και στα Τ κύτταρα, ενώ οι Τ-τρόποι τον CXCR4 (fusin ή LESTR) υποδοχέα των α-χημειοκινών, που εκφράζεται στα Τ κύτταρα αλλά όχι στα μακροφάγα [210].

Είναι πιθανό ότι in vivo οι αλλαγές στον τροπισμό συμβαίνουν παράλληλα με τις αλλαγές στους συνυποδοχείς που χρησιμοποιεί ένα ιικό στέλεχος, σαν συνέπεια μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη Env [211]. Είναι ενδιαφέρον ότι η V3 αγκύλη της gp120 περιέχει τους καθοριστές για τη χρήση είτε του CXCR4 ή του CCR5, παρέχοντας μία μοριακή εξήγηση για τον διαφορετικό τροπισμό, ο οποίος ελέγχεται από αυτή την περιοχή της ιικής γλυκοπρωτεΐνης.

Αντοχή στη μόλυνση από HIV

Έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στα μόρια διαφόρων υποδοχέων των χημειοκινών (ccr5-Δ32, m303, CCR2b-64I, SDF1-3'A) που παρέχουν αντοχή στη λοίμωξη από HIV ή σχετίζονται με επιβραδυνόμενη πορεία της νόσου [212-215].



Σχήμα 9: Η μοριακή βάση της εισόδου του HIV στο κύτταρο-στόχο. Παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα CD4 και τον συνυποδοχέα CCR5. (Robbins Pathologic basis of disease, 6th edition, 1999)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: Η ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ HIV

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ: Η ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ HIV

1. Φυσική ιστορία και ανοσοπαθγένεια

Η πορεία της λοίμωξης από HIV (σχήμα 10) είναι καλύτερα κατανοητή σε πλαίσια αλληλεπίδρασης του ιού με το ανοσολογικό σύστημα. Διακρίνονται τρεις φάσεις που αντανακλούν τη δυναμική των αντιδράσεων μεταξύ ιού και ξενιστή [216]:

1. Η πρώιμη οξεία φάση αντιπροσωπεύει την αρχική απάντηση ενός ανοσοϊκανού ενήλικου ατόμου στη μόλυνση από HIV. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα παραγωγής ιού, αιμία (10^7 ιοσωμάτια/ml πλάσματος), απότομη παροδική μείωση των CD4+ κυττάρων και ευρεία διασπορά του ιού στο λεμφικό ιστό (ανεξάρτητα από τον τρόπο ενοφθαλμισμού). Η φάση αυτή, όμως, εύκολα ελέγχεται με την ανάπτυξη ειδικής αντιϊικής ανοσιακής απάντησης, που αποδεικνύεται από την ορομετατροπή και από την ανάπτυξη ειδικών για τον HIV CD8+ κυτταροτοξικών T κυττάρων (CTLs) [217,218].

Το ιικό φορτίο στο τέλος της οξείας φάσης μειώνεται κατακόρυφα και μετά από περίοδο διακυμάνσεων (περίπου 6 μήνες) σταθεροποιείται σε ένα επίπεδο αναφοράς (set-point) που σε κάθε άτομο παραμένει σχετικά σταθερό για αρκετά χρόνια. Αυτό το σταθερό επίπεδο αιμίας (steady-state) αποτελεί σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη του ρυθμού εξέλιξης της νόσου [219,220].

2. Η χρόνια φάση αντιπροσωπεύει ένα στάδιο σχετικού περιορισμού του ιού που συνδυάζεται με κλινικά «λανθάνουσα» λοίμωξη και μπορεί να διαρκέσει για χρόνια. Το ανοσολογικό σύστημα είναι σε μεγάλο βαθμό ακέραιο, αλλά υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η παραγωγή ιού, κυρίως στο λεμφικό ιστό, είναι συνεχής και ταχεία. Οι αντισωματικές και κυτταροτοξικές απαντήσεις έναντι του HIV είναι ισχυρές και διατηρούνται σε υψηλούς τίτλους για χρόνια, υποδεικνύοντας συχνό αντιγονικό ερεθισμό. Ο ιός απομονώνεται και/ή ανιχνεύεται από τα κύτταρα του περιφερικού αίματος στους περισσότερους ασθενείς. Συνήθως παρατηρείται προοδευτική μείωση των CD4+ T κυττάρων του περιφερικού αίματος και σταδιακή αύξηση του ιικού φορτίου.

Η ασυμπτωματική αυτή περίοδος είναι πολύ σύντομη ή απουσιάζει σε βρέφη που μολύνονται κατά τον τοκετό.

Ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται αποτελεσματική ιική αναπαραγωγή παρά τη φαινομενικά ισχυρή ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, είναι ίσως η σημαντικότερη αναπάντητη, μέχρι στιγμής, ερώτηση για την παθογένεια του HIV και των lenti-ιών γενικά. Αρκετές πιθανότητες έχουν προταθεί, χωρίς να αποκλείεται συνδυασμός τους:

α. Ο ιός μεταλλάσσεται γρήγορα και είναι ανεκτικός στις μεταλλάξεις, ώστε διαφεύγει τόσο από τα εξουδετερωτικά αντισώματα όσο και από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα.

β. Τουλάχιστον ένα ποσοστό του ιού πολλαπλασιάζεται σε ανοσολογικά ευνοούμενα σημεία. Τα μακροφάγα μπορεί να δρουν σαν «Δούρειος ίππος», περιορίζοντας την έκφραση του ιού και ταυτόχρονα διασπείροντάς τον.

γ. Ο ιός έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τον κάνουν σχετικά αόρατο για το ανοσολογικό σύστημα (μεγάλος αριθμός θέσεων γλυκοζυλίωσης και άλλα δομικά χαρακτηριστικά των Env πρωτεϊνών) και τον βοηθούν να αποφεύγει μία κυτταροτοξική απάντηση. Πιθανά, η έλλειψη επαρκούς λειτουργίας των CD4+ βοηθητικών κυττάρων και ο περίπλοκος κύκλος πολλαπλασιασμού να συνεισφέρουν στο πρόβλημα.

δ. Βλάβη στο ανοσολογικό σύστημα νωρίς, μπορεί να αποκλείει μία πλήρως προστατευτική απάντηση.

3. Το τελικό στάδιο χαρακτηρίζεται από κατάρρευση της άμυνας του ξενιστή, δραματική αύξηση των επιπέδων του ιού στο πλάσμα και κλινική νόσο. Πολλοί ενδογενείς και εξωγενείς μηχανισμοί πιστεύεται ότι δίνουν το έναυσμα για την έναρξη του κύκλου πολλαπλασιασμού του HIV, όμως το βασικότερο ρόλο στη ρύθμιση της ιικής έκφρασης έχει το πολύπλοκο ανοσορρυθμιστικό δίκτυο των κυτταροκινών, στο οποίο ο ιός φαίνεται να έχει προσαρμοστεί έτσι ώστε να το χρησιμοποιεί για ίδιον όφελος.

Χωρίς θεραπευτική αγωγή οι περισσότεροι ασθενείς με HIV λοίμωξη εμφανίζουν AIDS μετά από διάστημα 7-10 χρόνων. Εξαιρέσεις της τυπικής πορείας αποτελούν οι καλούμενοι μη εξελισσόμενοι ασθενείς (long-term nonprogressors) [221,222], δηλαδή τα HIV+ άτομα που παραμένουν ασυμπτωματικά για 10 ή περισσότερα χρόνια με σταθερό, σχεδόν φυσιολογικό αριθμό CD4+ κυττάρων και χαμηλά επίπεδα ιαίμιας στο πλάσμα και, από την αντίθετη πλευρά, οι καλούμενοι ταχέως εξελισσόμενοι (rapid progressors), στους οποίους η χρόνια φάση διαρκεί μόνο για 2-3 χρόνια μετά τη μόλυνση.

2. Ρόλος των λεμφοειδών οργάνων

Τα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα των ιστών διαφέρουν από του περιφερικού αίματος ως προς το επίπεδο ενεργοποίησης και διαφοροποίησης, το περιβάλλον των κυτταροκινών και την έκθεσή τους στον HIV. Η λεμφοκυτταρική δεξαμενή του σώματος βρίσκεται (98%) στα λεμφικά όργανα: λεμφαδένες, σπλήνα και λεμφικό ιστό του γαστρεντερικού (GALT).

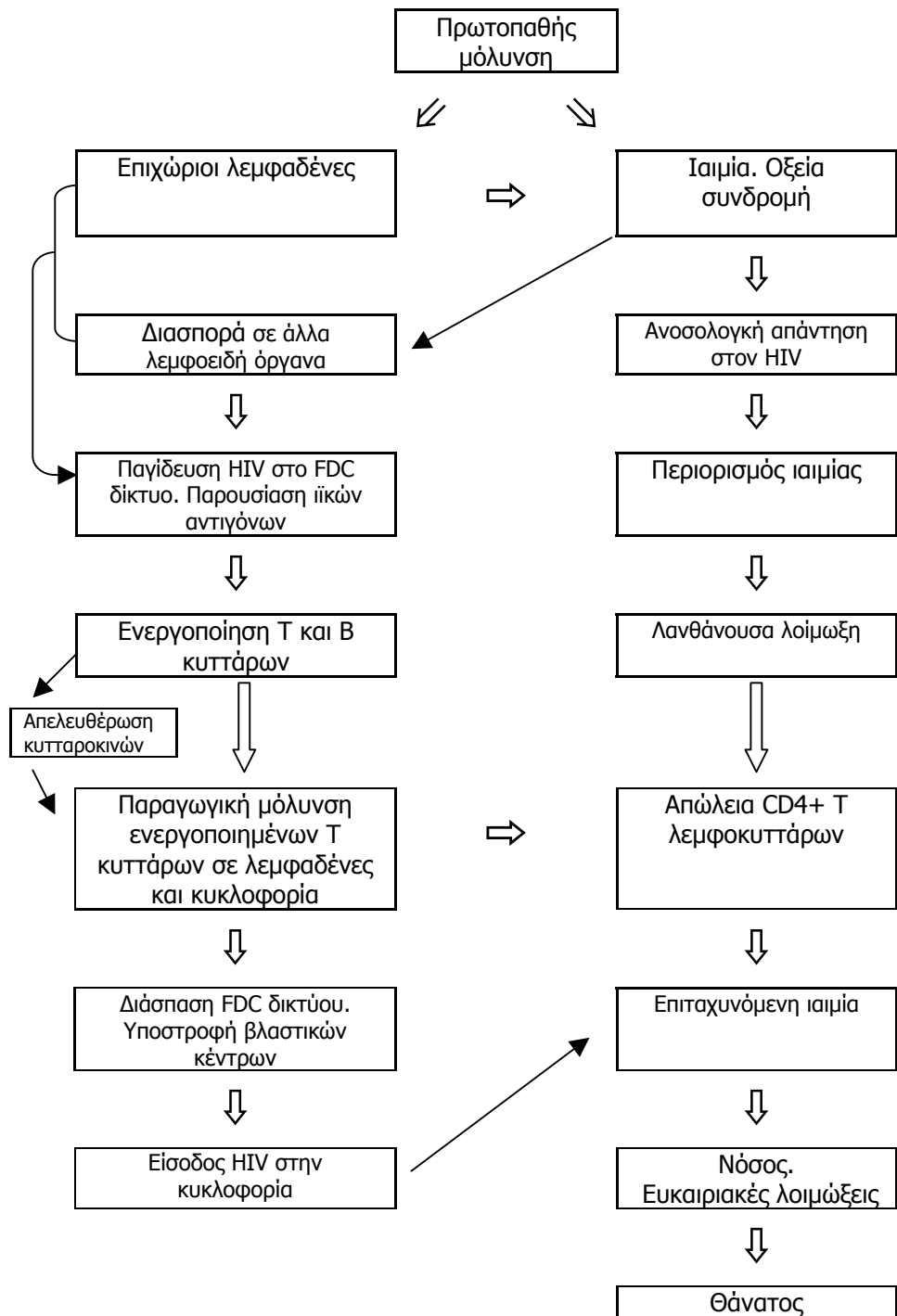
Η μείωση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων στο περιφερικό αίμα κατά την οξεία φάση της HIV λοίμωξης ίσως είναι αποτέλεσμα της ανακατανομής των κυττάρων στα λεμφικά όργανα, καθώς ο ξενιστής αναπτύσσει ανοσολογική απάντηση έναντι του ιού.

Αφού η λειτουργία των λεμφικών οργάνων είναι να φιλτράρουν και να παγιδεύουν παθογόνους μικροοργανισμούς και να τους παρουσιάζουν στα ανοσοϊκανά κύτταρα, η έντονη ιαίμια που ακολουθεί την πρωτοπαθή λοίμωξη οδηγεί υποθετικά σε ευρεία μόλυνση του λεμφικού ιστού από HIV.

Ο ιός βρίσκεται στο λεμφικό ιστό, κυρίως, με τη μορφή εξωκυττάρων ισωματίων που έχουν παγιδευτεί μέσα στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων. Τα ισωμάτια του HIV προσκολλώνται στις αποφυάδες των λεμφοζυδιακών δενδριτικών κυττάρων (FDCs) με αποτέλεσμα την επιστράτευση και ενεργοποίηση κυττάρων και την υπερπλασία των βλαστικών κέντρων, που αποτελούν στοιχεία της φυσιολογικής ανοσολογικής απάντησης προς ένα προσβάλλον παθογόνο. Αυτή η διαδικασία ενεργοποίησης καθιστά τα τοπικά βρισκόμενα και τα προστρέχοντα κύτταρα επιρρεπή στη μόλυνση από HIV και δεκτικά για πολλαπλασιασμό του ιού [51].

Οι λεμφαδένες στα ενδιάμεσα στάδια της νόσου (CD4+ T κύτταρα: 200-500 /μl) εμφανίζουν στοιχεία αποσύνθεσης και η αποτελεσματικότητα των FDCs στην παγίδευση αντιγόνων ελαττώνεται. Σε πιο προχωρημένη φάση (CD4+ T κύτταρα <200/μl), αυξάνει τόσο το ιικό φορτίο όσο και η έκφραση του HIV στα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η αλλαγή αυτή αντανακλά είτε αυξανόμενη ιική αναπαραγωγή είτε αδυναμία του λεμφικού συστήματος να περιορίσει το ποσό του ιού ή των μολυσμένων κυττάρων που φτάνουν στο περιφερικό αίμα [223].

Στα τελικά στάδια της νόσου η αρχιτεκτονική του λεμφικού ιστού είναι ουσιαστικά τελείως κατεστραμμένη, με ταυτόχρονη διάσπαση του FDC δικτύου και εξαφάνιση των FDCs. Ο προηγούμενος παγιδευμένος ιός μπορεί πια να εισέλθει στην κυκλοφορία και η αναλογία μολυσμένων κυττάρων στο περιφερικό αίμα και στα λεμφικά όργανα γίνεται σχεδόν ίση [224].



Σχήμα 10: σχηματικό διάγραμμα της εξέλιξης της λοίμωξης HIV, από την αρχική μόλυνση μέχρι την ανάπτυξη κλινικής νόσου και θάνατο. Στη δεξιά πλευρά φαίνονται οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την παρακολούθηση δεικτών στο αίμα των μολυσμένων ατόμων. Στην αριστερή πλευρά παρουσιάζεται συνοπτικά ο ρόλος των λεμφοειδών οργάνων στην εξέλιξη της νόσου.

3. Ανοσολογική απάντηση στον HIV

ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Ενώ η κυτταρική ανοσία είναι κρίσιμη για τον έλεγχο και την εξάλειψη πολλών ιογενών λοιμώξεων, τα αντισώματα (Abs) έχουν κεντρικό ρόλο στην πρόληψη της λοίμωξης.

Ισοσμάτια, μολυσμένα κύτταρα, ολιγομερισμένες και μονομερείς ιϊκές πρωτεΐνες, ιϊκά κατάλοιπα και όλα τα παραπάνω αντιγόνα σε σύμπλεγμα με αντίσωμα, έχουν ενοχοποιηθεί σαν δυνητικά ανοσογόνα σε άτομα μολυσμένα με HIV. Επιπλέον, όλα αυτά τα συστατικά του ιού φαίνεται ότι δρουν σαν φυσικά αντιγόνα και διεγείρουν ανοσιακή απάντηση.

Εξουδετερωτικά αντισώματα

Τα αντισώματα αυτά ορίζονται από την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τη μολυσματικότητα ενός ιού. Δρουν εμποδίζοντας τη σύνδεση του ιού με τον υποδοχέα του ή μπλοκάροντας κάποιο στάδιο μετά τη σύνδεση αυτή. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις για σημαντικό ρόλο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των lenti-ιών κατά το αρχικό, ασυμπτωματικό στάδιο της λοίμωξης.

Ο πρώτος στόχος (επίτοπος) εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του HIV που ανακαλύφθηκε (και ο καλύτερα καθορισμένος), είναι η αγκύλη V3 της επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης gp120 [225]. Εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της V3 συχνά αναγνωρίζουν γραμμικούς επιτόπους, αλλά κάποιοι επίτοποι μπορεί να είναι ασυνεχείς ή τρισδιάστατοι [226]. Εξαιτίας της μεγάλης μεταβλητότητας στην αλληλουχία της V3, τα αντισώματα εναντίον της είναι συνήθως ειδικά του τύπου ή του στελέχους [227].

Μία άλλη κατηγορία εξουδετερωτικών αντισωμάτων εμποδίζουν τη σύνδεση της gp120 με το CD4, αντιδρώντας με διάφορους ανεξάρτητους ή αλληλοκαλυπτόμενους επιτόπους πάνω στη gp120. Αντισώματα που αναγνωρίζουν καθοριστές στη σταθερή περιοχή 4 (C4) ανήκουν στην κατηγορία αυτή. Η μεγάλη πλειοψηφία τους δεν αναγνωρίζει γραμμικούς επιτόπους αλλά αντιδρά με περίπλοκους, ασυνεχείς ή τρισδιάστατους στόχους. Τα αντισώματα που μπλοκάρουν το CD4 έχουν συνήθως ευρύτερο φάσμα από τα αντι-V3 αντισώματα [228].

Έχουν επίσης αναγνωριστεί εξουδετερωτικά αντισώματα που αντιδρούν με επίτοπους οι οποίοι αποκαλύπτονται καλύτερα μετά τη σύνδεση της gp120 με το CD4 [229].

Περιγράφονται και άλλοι τύποι εξουδετερωτικών αντισωμάτων, όπως έναντι επιτόπων στις περιοχές V1,V2,V5,C2 και gp41 του HIV-1 και V1-V2,V4 και gp41 του HIV-2 [230].

Η μελέτη εξουδετερωτικών αντισωμάτων του HIV συναντά αρκετά προβλήματα και έχει προκαλέσει πολλές διαφωνίες. Τα πρωτογενή στελέχη του ιού είναι πολύ ανθεκτικότερα στην αδρανοποίηση από τα εργαστηριακά στελέχη που συνήθως χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες εξουδετέρωσης, γιατί στα δεύτερα οι περισσότεροι επίτοποι είναι πιο προσπελάσιμοι για τα αντισώματα [231,232].

Αντισώματα ικανά να εξουδετερώσουν πρωτογενή στελέχη HIV εμφανίζονται 2-6 μήνες μετά τη μόλυνση, μετά την ανάπτυξη ειδικών για τον ιό κυτταρολυτικών T λεμφοκυττάρων και δεσμευτικών αντισωμάτων [233,234].

Άλλοι τύποι αντισωματικής απάντησης

Αντισώματα που μπορούν να προκαλέσουν λύση μολυσμένων κυττάρων και ισοσμάτιων με μηχανισμό κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενης από αντίσωμα (ADC) με καθήλωση του συμπληρώματος, έχουν επίσης ανιχνευθεί στις λοιμώξεις από lenti-ιούς.

Κύτταρα μολυσμένα εκφράζουν ιικά αντιγόνα που επάγουν παραγωγή αντισωμάτων και αποτελούν στόχο τους με μηχανισμό κυτταρομεσολαβούμενης κυτταροτοξικότητας εξαρτώμενης από αντίσωμα (ADCC). Αναγνωρίζονται και θανατώνονται από ανοσοδραστικά κύτταρα, συνήθως φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK) ή μονοκύτταρα/μακροφάγα που φέρουν Fc υποδοχείς.

Παρεμβαίνοντα αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με ιοσωμάτια ή μολυσμένα κύτταρα και έτσι να αναστείλουν τη δράση εξουδετερωτικών αντισωμάτων.

Κυκλοφορούντα ανοσοσυμπλέγματα που περιέχουν πρωτεΐνες του HIV και ιοσωμάτια καλυμμένα από αντίσωμα μπορούν να ενισχύσουν τη λοίμωξη και η ενίσχυση διαμεσολαβείται από συμπλήρωμα ή Fc υποδοχείς. Το συμπλήρωμα ή ο Fc υποδοχέας μπορεί απλά να φέρουν συμπλέγματα ιού-αντισώματος κοντά στο μόριο CD4 για σύνδεση και είσοδο στο κύτταρο στόχο [235].

Επιπλέον, τα ανοσοσυμπλέγματα μπορεί να καταστείλουν κάποιες ανοσολογικές απαντήσεις και/ή να «επαναπροσανατολίσουν» την ανοσιακή απάντηση προς διαφορετικές και/ή λιγότερο ανοσογόνες περιοχές του ιού.

Πρόσφατα περιγράφηκε η παρουσία ειδικών για τον HIV IgA, αλλά όχι IgG, αντισωμάτων στον ορό, τα ούρα και τα κολπικά επιχρίσματα οροαρνητικών ατόμων που είχαν επανειλημμένα εκτεθεί σεξουαλικά στον ιό, σε συνδυασμό με συστηματική κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία [236,237]. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν την πιθανή σημασία της ανάπτυξης τοπικής αντισωματικής απάντησης στους βλεννογόνους μετά από ενοφθαλμισμό/εμβολιασμό.

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ

Οι ειδικές για ένα αντιγόνο κυτταρικές ανοσιακές απαντήσεις περιλαμβάνουν τις λειτουργίες των T λεμφοκυττάρων που 1) προκαλούν λύση των κυττάρων-στόχων που εκφράζουν ξένο αντιγόνο και 2) παρέχουν βοήθεια στα B και στα ανοσοδραστικά T κύτταρα.

Ενεργοποιημένα, ειδικά για τον HIV, κυτταρολυτικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) εμφανίζονται σε αρκετά μολυσμένα άτομα και μάλιστα η ένταση της απάντησης επιτρέπει την ανίχνευσή τους στο περιφερικό αίμα χωρίς in vitro διέγερση. Αν και ορισμένα CTLs έχουν φαινότυπο CD4+, η μεγάλη πλειοψηφία τους είναι CD4-CD8+. Σε ορισμένες μελέτες τα ειδικά για τον ιό CTLs αποτελούν μέχρι και το 2% του συνόλου των CD8+ T κυττάρων [238].

Η CD8+ CTL δραστηριότητα μπορεί να στρέφεται έναντι οποιουδήποτε πρωτεϊνικού προϊόντος που κωδικοποιείται από τον HIV. CD8+ CTLs με MHC περιορισμό βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο ασυμπτωματικό στάδιο της HIV λοίμωξης αλλά μειώνονται καθώς προχωρεί η νόσος. Επειδή η λειτουργία των CTLs εξαρτάται μερικά από τη βοήθεια που προσφέρουν τα CD4+ T κύτταρα (κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες κ.λ.π.), η μείωση της CTL δραστηριότητας μπορεί να σχετίζεται με την ελάττωση του αριθμού και της λειτουργικότητας των CD4+ λεμφοκυττάρων [239,240].

Δεν είναι γνωστό γιατί τα CTLs αποτυγχάνουν να ελέγξουν τη λοίμωξη από HIV. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι αλλαγές στην αλληλουχία επιτρέπουν στον ιό να ξεφεύγει από την απάντηση των CTLs [241]. Μερικές φορές, CTL επίτοποι παραμένουν στο ιικό γονιδίωμα παρά την παρουσία CTLs που στρέφονται εναντίον τους, πράγμα που σημαίνει ότι η κυτταρολυτική αντίδραση ίσως απλά να είναι ανεπαρκής ακόμα και αν δεν υπάρχει «απόδραση» από αυτήν [242].

Εκτός από την εμφάνιση μεταλλάξεων, η καταστολή των μορίων MHC τάξης I από τις ιικές πρωτεΐνες Tat, Vpr, Nef και η ενίσχυση της έκφρασης του συνδέτη του Fas (FasL) από την πρωτεΐνη Nef, προτάθηκαν σαν μηχανισμοί που βοηθούν τον HIV να αποφεύγει ειδικές για αυτόν CTL απαντήσεις [243,244].

Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν πιθανή σχέση μεταξύ ποιότητας και έκτασης της CTL απάντησης σε μολυσμένα άτομα και ρυθμού εξέλιξης της νόσου: υψηλότερα επίπεδα και ευρύτερο φάσμα CTL απάντησης συσχετίζονται με χαμηλότερο ιικό φορτίο και μεγαλύτερης διάρκειας λανθάνουσα περίοδο [221,245,246].

Ορισμένα ενεργοποιημένα CD8+ κύτταρα καταστέλλουν την αναπαραγωγή του HIV με μηχανισμό διαφορετικό από την κυτταρόλυση. Η δράση αυτή διαμεσολαβείται, μερικά, από κάποιο διαλυτό παράγοντα ή κυτταροκίνη [χημειοκίνες MIP-1α, MIP-1β και RANTES, IL-16, κυτταρικός αντι-ϊικός παράγοντας CAF (cellular antiviral factor)] που απελευθερώνεται από τα CD8+ κύτταρα και δεν έχει MHC περιορισμό [247-249].

Εκτός από την κυτταρολυτική δράση τους, τα CD8+ T κύτταρα φαίνεται ότι ασκούν αντι-ϊική δραστηριότητα και με κατασταλτικό μηχανισμό. Αυξημένη CD8+ T αντι-HIV δράση ανιχνεύεται σε μη εξελισσόμενους ασθενείς και συσχετίζεται χρονικά με περιορισμό της ιαιμίας κατά την πρωτοπαθή λοίμωξη [250,251].

Τα CD4+ T κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής αντισωμάτων, στην επαγωγή και διατήρηση των CTL απαντήσεων και στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και NK κυττάρων. Περιγράφονται αρκετά ζωηρές ειδικές CD4+ T κυτταρικές απαντήσεις έναντι του ιού σε μη εξελισσόμενους ασθενείς και σε άτομα που έλαβαν ισχυρή αντιρετροϊκή θεραπεία νωρίς, κατά τη διάρκεια της πρωτοπαθούς λοίμωξης [252].

4. Επιδημιολογία

Η νόσος έχει αναφερθεί σε περισσότερες από 193 χώρες παγκόσμια και η δεξαμενή των μολυσμένων ατόμων, ειδικά στην Αφρική και την Ασία είναι μεγάλη και διαρκώς επεκτείνεται.

Επιδημιολογικές μελέτες αναγνώρισαν πέντε κατηγορίες ενηλίκων σε κίνδυνο για μόλυνση από HIV:

- ◆ Οι ομοφυλόφιλοι ή αμφιφυλόφιλοι άνδρες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα, με διαφορά, αντιστοιχώντας στο 57% των περιπτώσεων που έχουν δηλωθεί. Στο ποσοστό αυτό περιλαμβάνεται και ένα 6% που ήταν παράλληλα και χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών.
- ◆ Οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (IVDUs), χωρίς προηγούμενο ιστορικό ομοφυλοφιλίας, αποτελούν τη δεύτερη μεγάλη ομάδα, αντιπροσωπεύοντας το 25% των ασθενών. Είναι η πλειοψηφία των περιπτώσεων μεταξύ των ετεροφυλόφιλων.
- ◆ Οι αιμορροφιλικοί, ιδιαίτερα εκείνοι που έλαβαν μεγάλες ποσότητες συμπυκνωμένου παράγοντα VIII πριν το 1985, φτάνουν το 0,8% των περιπτώσεων.
- ◆ Οι δέκτες μετάγγισης ολικού αίματος και παραγώγων που δεν είναι αιμορροφιλικοί αποτελούν το 1,2% των περιπτώσεων AIDS. Να σημειωθεί ότι και όργανα που ελήφθησαν από HIV-μολυσμένους δότες μπορούν να μεταδώσουν τη νόσο.
- ◆ Οι ετεροσεξουαλικοί σύντροφοι ατόμων που ανήκουν στις προαναφερθείσες ομάδες (κυρίως των IVDUs) συνιστούν το 10% των ασθενών.
- ◆ Σε ποσοστό περίπου 6% των περιπτώσεων δεν είναι δυνατόν να καθοριστούν οι παράγοντες κινδύνου.

Η επιδημιολογία του AIDS είναι τελείως διαφορετική σε παιδιά κάτω των 13 ετών και σχεδόν 2% του συνόλου των περιπτώσεων AIDS αφορούν τον παιδιατρικό πληθυσμό. Στην κατηγορία αυτή πάνω από το 90% των κρουσμάτων οφείλονται σε μετάδοση του ιού από τη μολυσμένη μητέρα στο παιδί και το υπόλοιπο 10% αποτελούν αιμορροφιλικά παιδιά που έλαβαν μεταγγίσεις μολυσμένου αίματος και παραγώγων πριν το 1985.

Είναι προφανές από τα παραπάνω ότι οι τρεις κυριότερες οδοί μετάδοσης του HIV είναι με σεξουαλική επαφή, παρεντερικό ενοφθαλμισμό και κάθετα από τη μολυσμένη

μητέρα στο νεογνό. Αυξημένη μεταδοτικότητα μπορεί να οφείλεται σε αυξημένο ιικό φορτίο του μολυσμένου ατόμου ή αυξημένη μολυσματικότητα του μεταδιδόμενου στελέχους ή και στα δύο [253,254].

1. Η σεξουαλική μετάδοση είναι αποδεδειγμένα ο κυρίαρχος τρόπος μόλυνσης παγκόσμια, υπεύθυνος για το 75% περίπου όλων των περιπτώσεων HIV λοίμωξης [255]. Στο δυτικό κόσμο η σεξουαλική μετάδοση αφορά κύρια ομοφυλόφιλους άνδρες που αποτελούν και τη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών. Ο ιός μεταδίδεται με το σπέρμα, τόσο μέσα στα λεμφοκύτταρα όσο και σαν ελεύθερα ισωμάτια.

Η μετάδοση με ετεροσεξουαλική επαφή είναι σε παγκόσμιο επίπεδο ο συχνότερος τρόπος εξάπλωσης του HIV, κυρίαρχος τρόπος μόλυνσης στην Ασία και την Αφρική και ραγδαία αυξανόμενος και στο δυτικό κόσμο. Αφορά κυρίως σεξουαλικές συντρόφους ναρκομανών. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που υποστηρίζουν τη μετάδοση του HIV από γυναίκα σε άνδρα [256] και ο κίνδυνος διαφέρει ανάλογα με το ιικό στέλεχος. Η σεξουαλική μετάδοση του ιού με οποιονδήποτε τρόπο υποβοηθείται από την συνύπαρξη άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων νοσημάτων, ειδικά εκείνων που προκαλούν εξελκώσεις στη γεννητική περιοχή.

2. Η παρεντερική μετάδοση αφορά τρεις κατηγορίες ατόμων: τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, τους αιμορροφιλικούς που αντιμετώπιστηκαν με συμπυκνωμένο παράγοντα VIII και τους τυχαίους λήπτες μετάγγισης.

Οι IVDUs κατέχουν κεντρική θέση στην επιδημία του AIDS γιατί αποτελούν το συνδετικό κρίκο στη μετάδοση της νόσου σε άλλους πληθυσμούς με σεξουαλική επαφή.

Η μετάδοση του HIV με μετάγγιση αίματος και παραγώγων έχει πρακτικά εξαλειφθεί σαν αποτέλεσμα του μαζικού ελέγχου του προσφερόμενου αίματος και πλάσματος για αντισώματα έναντι του ιού, της κατεργασίας των συμπυκνωμάτων παραγόντων πήξης με θέρμανση και οργανικούς διαλύτες/απορρυπαντικά και του ελέγχου των αιμοδοτών με βάση το ιστορικό τους. Ο πολύ μικρός υπολειμματικός κίνδυνος που υπάρχει αφορά πρόσφατα μολυσμένους οροαρνητικούς αιμοδότες [257] και μάλλον θα μειωθεί ακόμα περισσότερο στο μέλλον με χρήση μοριακών τεχνικών σε ρουτίνα.

3. Οι μολυσμένες με HIV μητέρες μπορούν να μεταδώσουν τον ιό στο παιδί τους με τρεις οδούς: 1) διαπλακουντιακή μόλυνση ενδομήτρια 2) κατά τον τοκετό 3) μετά τον τοκετό με το θηλασμό. Τα αναφερόμενα ποσοστά μετάδοσης κυμαίνονται από 7%-49% σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου. Για το δυτικό κόσμο το ποσοστό περιγεννητικής μετάδοσης είναι περίπου 25%. Αυξημένος κίνδυνος μετάδοσης σχετίζεται με υψηλό ιικό φορτίο της μητέρας, χαμηλό αριθμό CD4+ T κυττάρων και χοριοαμνιονίτιδα [258-262]. Περισσότερες από 90% των παιδιατρικών μολύνσεων συμβαίνουν στις αναπτυσσόμενες χώρες.

Πολυετείς μελέτες δείχνουν ότι η HIV λοίμωξη δεν μεταδίδεται με απλή κοινωνική επαφή στην οικογένεια, τον εργασιακό χώρο και το σχολείο. Δεν υπάρχουν πειστικά στοιχεία για μετάδοση από δήγματα εντόμων. Σχετικά με τη μετάδοση της νόσου σε ασχολούμενους με επαγγέλματα υγείας, υπάρχει διακριτός αλλά πολύ μικρός κίνδυνος. Μετά από τρύπημα με βελόνη ή έκθεση μη ακέραιου δέρματος σε μολυσμένο με τον ιό αίμα, ο κίνδυνος ορομετατροπής υπολογίζεται σε 0,3% περίπου [263], σε αντίθεση με την ηπατίτιδα Β που το 30% των ατόμων που εκτίθενται στον ιό από ατύχημα μολύνονται [264]. Η μετάδοση του AIDS από μολυσμένο λειτουργό υγείας σε ασθενή είναι πολύ σπάνια και μέχρι σήμερα μόνο μία περίπτωση ίσως εξηγείται με τον τρόπο αυτό: από οδοντίατρο σε ασθενή του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ HIV

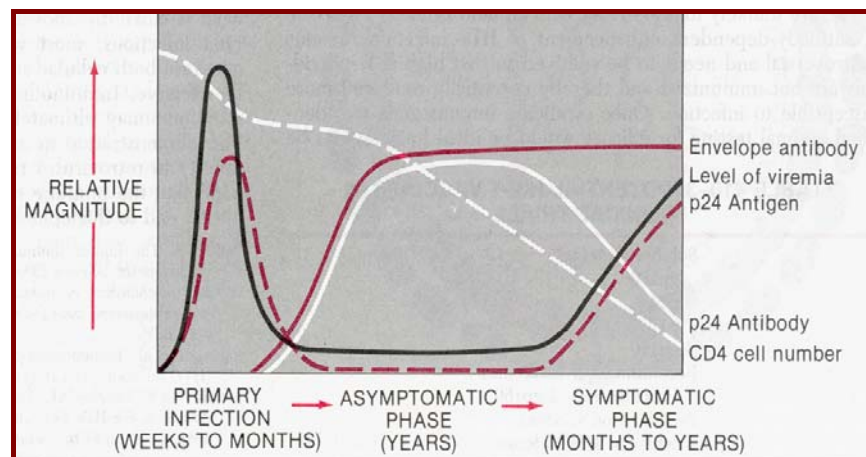
Σωρεία εργαστηριακών μεθόδων είναι σήμερα διαθέσιμες για το μαζικό έλεγχο του αίματος για HIV, τη διάγνωση και επιβεβαίωση της λοίμωξης και την παρακολούθηση τόσο της εξέλιξης της νόσου όσο και της θεραπευτικής αντιμετώπισής της. Οι μέθοδοι αυτές χωρίζονται σε εκείνες που: 1) ανιχνεύουν αντίσωμα 2) ανιχνεύουν αντιγόνο 3) επιτυγχάνουν απομόνωση του ιού με καλλιέργεια 4) ανιχνεύουν ιικό γενετικό υλικό και 5) εκτιμούν την ανοσολογική λειτουργία.

Μετά τη μόλυνση από HIV, η αλληλουχία των δεικτών για ανίχνευση της λοίμωξης, κατά χρονολογική σειρά εμφάνισης στον ορό, είναι: ιικό RNA, p24 αντιγόνο και αντι-HIV αντισώματα (σχήμα 11).

Μέσα σε δύο εβδομάδες από τη μόλυνση η ιαίμια αυξάνει εκθετικά και στη συνέχεια υποχωρεί μέχρι ένα σταθερό επίπεδο καθώς η ανοσολογική απάντηση ελέγχει τον ιικό πολλαπλασιασμό. Το χρονικό αυτό διάστημα, η ορολογική «περίοδος παραθύρου», χαρακτηρίζεται από οροαρνητικότητα, περιστασιακά ανιχνεύσιμη αντιγοναιμία, ιαίμια (μετρήσιμη με RNA) και μεταβλητά επίπεδα CD4+ λεμφοκυττάρων. Η ανίχνευση ειδικών έναντι του HIV αντισωμάτων σηματοδοτεί το τέλος του «παραθύρου» και χαρακτηρίζει το άτομο σαν οροθετικό. Καθώς η λοίμωξη προχωρεί προς πλήρες AIDS, το αντι-p24 αντίσωμα μειώνεται και το p24 αντιγόνο επανεμφανίζεται [265].

Με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την ορολογική διάγνωση της λοίμωξης HIV, ανίχνευση αντισωμάτων ήταν εφικτή [στα περισσότερα άτομα] 6-12 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Με τις νεότερες γενιές αντιδραστηρίων το διάστημα αυτό έχει μειωθεί σε 3-4 εβδομάδες [257,266]. Η ανίχνευση ειδικών αντι-HIV IgM αντισωμάτων δεν βοήθησε ιδιαίτερα στην πρώιμη διάγνωση, γιατί IgM απαντήσεις δεν αναπτύσσονται σταθερά στα πρώτα στάδια της HIV λοίμωξης [267].

Η «περίοδος παραθύρου» μειώνεται κατά αρκετές ημέρες με τεχνικές ανίχνευσης αντιγόνου και ακόμα περισσότερο με μεθόδους ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων. Η διάρκειά της, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, είναι σήμερα 2 εβδομάδες ή και λιγότερο αν υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής όλων των διαθέσιμων τεχνικών ελέγχου.



Σχήμα 11: Φυσική ιστορία της λοίμωξης HIV και δείκτες ανίχνευσής της. (Cecil Textbook of Medicine, 19th edition, 1992)

1. Ανίχνευση αντισωμάτων

Οι μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων μπορούν να διακριθούν σε
α) δοκιμασίες **μαζικού ή πρωτογενούς ελέγχου (screening)**, για εντοπισμό όλων των μολυσμένων ατόμων και
β) **επιβεβαιωτικές** δοκιμασίες, για ταυτοποίηση μόνο των ατόμων που είναι μολυσμένα και έχουν θετικό αποτέλεσμα στον πρωτογενή έλεγχο. Οι πρώτες έχουν μεγάλη ευαισθησία και συνεπώς δίνουν λίγα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, ενώ οι δεύτερες χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα και λίγα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η ορολογική διάγνωση προϋποθέτει την αναγνώριση των χρησιμοποιούμενων αντιγόνων από τα αντισώματα του ατόμου και τον επαρκή, χρονικά και ανοσολογικά, ανοσιακό ερεθισμό του ασθενούς. Ο ακριβής χρόνος ειδικής αντισωματικής απάντησης στη μόλυνση από HIV εξαρτάται από παράγοντες που περιλαμβάνουν ιδιαιτερότητες τόσο του ξενιστή όσο και του ιϊκού στελέχους.

Ανεξάρτητα από την επιλεγείσα μέθοδο πρωτογενούς ελέγχου, δείγμα που δίνει θετικό αποτέλεσμα επανελέγχεται εις διπλούν και ακολουθεί επανεξέταση με λήψη νέου δείγματος. Αν το δείγμα είναι κατ' επανάληψη θετικό ακολουθεί έλεγχος με επιβεβαιωτική μέθοδο.

Μετά την περιγραφή του HIV-2 το 1985, τα περισσότερα αντιδραστήρια επιτρέπουν τον προσδιορισμό αντισωμάτων έναντι και των δύο τύπων HIV μεμονωμένα ή ταυτόχρονα.

Μέθοδοι πρωτογενούς ελέγχου

Η ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) είναι ανοσοενζυμική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αντιγόνου ή αντισώματος, σε ετερογενή φάση. Αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τη συνολική ανίχνευση αντισωμάτων κατά τον πρωτογενή μαζικό έλεγχο, λόγω της εγγενούς υψηλής ευαισθησίας, σχετικά απλής μεθοδολογίας και καταλληλότητας για έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν σαν πηγή αντιγόνου πρωτεΐνες αδρανοποιημένου ιού, που είχε αναπτυχθεί σε κυτταρικές σειρές και ανιχνεύονταν μόνο IgG αντισώματα. Σήμερα τα αντιγόνα προέρχονται είτε από κυτταρολύματα μολυσμένων με HIV κυτταροκαλλιιεργειών είτε από πεπτίδια, που ή παρασκευάζονται συνθετικά ή λαμβάνονται από ανασυνδυασμένο DNA του ιού εκφρασμένο σε προκαρυωτικούς φορείς. Επιπλέον, με τα αντιδραστήρια 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς είναι δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση IgG και IgM αντισωμάτων έναντι των HIV-1 και HIV-2.

Η δημοφιλέστερη ELISA χρησιμοποιεί μη ανταγωνιστική έμμεση μέθοδο στην οποία αντιγόνα του HIV βρίσκονται επιστρωμένα σε βοθρίο μικροπλάκας 96 θέσεων ή προσκολλημένα σε πλαστικό σφαιρίδιο το οποίο τοποθετείται σε βοθρίο. Η δοκιμασία ξεκινά με την προσθήκη εξεταστέων ορών στα βοθρία και επώαση για καθορισμένο χρόνο, επαρκή για να συνδεθούν οποιαδήποτε ειδικά έναντι του HIV αντισώματα υπάρχουν στο δείγμα, ισχυρά και ειδικά, με τα καθηλωμένα αντιγόνα. Μετά από πλύση για την απομάκρυνση μη δεσμευμένων συστατικών του εξεταστέου ορού, προστίθεται αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη συζευγμένη με ένζυμο. Μετά από δεύτερη επώαση κατά την οποία το ενζυμικό σύζευγμα προσδένεται σε οποιοδήποτε αντι-HIV αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με τα αντιγόνα του βοθρίου, η μη συνδεδεμένη αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη απομακρύνεται με πλύση και προστίθεται κατάλληλο για το ένζυμο υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό (συνήθως άχρωμο) διασπάται σε ένα προϊόν με χρώμα, με ρυθμό που εξαρτάται από την ποσότητα του ενζύμου που έχει συνδεθεί στο βοθρίο. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη διαλύματος οξέος ή βάσης.

Η ποσότητα του ενζύμου είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντισώματος που υπάρχει στο δείγμα και, συνεπώς, ο ρυθμός ανάπτυξης χρώματος στο βοθρίο (που μετρείται φασματοφωτομετρικά σαν οπτική πυκνότητα [OD] του δείγματος), γίνεται

έμμεσο μέτρο της συγκέντρωσης αντισωμάτων στο δείγμα. Μαθηματικός υπολογισμός παρέχει την τιμή-ουδό ή κατώφλι (cutoff:CO) προς την οποία συγκρίνεται η OD του δείγματος για να καθοριστεί η αντισωματική κατάσταση του δείγματος. Δείγματα με τιμές OD/CO μεγαλύτερες του 1.0 (σε μη ανταγωνιστική ELISA) θεωρούνται θετικά. Αρκετές έμμεσες ELISA χρησιμοποιούν πολυσθενή συζεύγματα αντι-IgG και -IgM ώστε να αυξάνει η ευαισθησία για την ανίχνευση της μόλυνσης κατά την ορομετατροπή.

Η ανταγωνιστική δοκιμασία ELISA μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: 1. το σημασμένο αντίσωμα και το δείγμα τοποθετούνται συγχρόνως αν υπάρχουν αντισώματα έναντι διαφορετικών επιτόπων του αντιγόνου ή 2. το δείγμα τοποθετείται πρώτο και μετά τις πλύσεις προστίθεται το σημασμένο αντίσωμα. Το ειδικό έναντι του HIV αντίσωμα του δείγματος ανταγωνίζεται με αντι-HIV αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο για αντιγονικές θέσεις πάνω στη στερεή φάση. Με τη μέθοδο αυτή η ανάπτυξη χρώματος είναι αντίστροφα ανάλογη με τη συγκέντρωση αντισωμάτων στο υπό εξέταση δείγμα.

Με τη μη ανταγωνιστική διπλού αντισώματος ELISA (μέθοδος «sandwich»), ένα ένζυμο (αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση) συζευγμένο με αντιγόνο του HIV (παρόμοιο με το καθηλωμένο αντιγόνο της στερεής φάσης) επωάζεται με το εξεταστέο δείγμα: το αντίσωμα του δείγματος βρίσκεται μεταξύ δύο μορίων αντιγόνου, ενός καθηλωμένου στη στερεή φάση και ενός συζευγμένου με το ένζυμο. Η προσθήκη υποστρώματος οδηγεί στην ανάπτυξη χρώματος με ένταση ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος. Η συγκεκριμένη παραλλαγή είναι η πλέον ευαίσθητη μέθοδος πρωτογενούς ελέγχου γιατί παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης όλων των ισοτύπων αντισωμάτων (και των IgM). Μειονέκτημά της είναι ο σχετικά μεγάλος όγκος δείγματος που απαιτείται (150 μl), γιατί δυσκολεύει την επανάληψη της εξέτασης και τον έλεγχο νεογνών.

Οι παραλλαγές «sandwich» και ανταγωνιστικής ELISA, σε συνδυασμό με τα κεκαθαρμένα αντιγόνα που παρασκευάζονται με γενετική μηχανική, φτάνουν ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας μεγαλύτερα του 99,2 %.

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ELISA συνήθως αφορούν τις πρώτες 1-2 εβδομάδες μετά τη μόλυνση από HIV ή εμφανίζονται σε τελικά στάδια της νόσου όταν η παραγωγή αντισωμάτων είναι χαμηλή [268].

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν συσχετιστεί με αυτοάνοσες νόσους (παρουσία αντισωμάτων αντιπυρηνικών, αντιμιτοχονδριακών, έναντι λείων μυϊκών ινών ή τοιχωματικών κυττάρων, έναντι T κυττάρων), νεφρική ανεπάρκεια, κυστική ίνωση, ηπατικές νόσους, αιμοκάθαρση και εμβολιασμό για ηπατίτιδα B, λύσσα ή γρίπη [269-275]. Αντισώματα που προκαλούν διασταυρούμενες αντιδράσεις, όπως αντι-HLA τάξης II, οδηγούν σε ψευδώς θετικές τιμές ELISA συνήθως σε πολύτοκες γυναίκες και πολυμεταγγιζόμενα άτομα [276-278]. Ανίχνευση αντι-HIV αντισωμάτων παρατηρείται παροδικά και σε άτομα που έχουν εθελοντικά συμμετάσχει σε προγράμματα αξιολόγησης εμβολίων κατά του HIV, χωρίς αυτά να είναι μολυσμένα [279]. Πάντως, το φαινόμενο είναι σπάνιο και τα ψευδώς θετικά δείγματα συνήθως αναγνωρίζονται με περαιτέρω έλεγχο.

Αν και τα αποτελέσματα της ELISA αξιολογούνται σε γενικές γραμμές ποιοτικά, είτε σαν θετικά (πάνω από το κατώφλι που ορίζει η μέθοδος) είτε σαν αρνητικά, η ποσοτική εκτίμηση της αντιδραστικότητας σε ELISA επηρεάζει την προγνωστική αξία των αποτελεσμάτων: υψηλότερες τιμές έχουν μεγαλύτερη θετική προγνωστική αξία. Σχεδόν όλα τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν χαμηλού επιπέδου αντιδραστικότητα [280].

Οι λεγόμενες **«ταχείες» μέθοδοι** ανίχνευσης αντι-HIV αντισωμάτων αναπτύχθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και μπορούν να ολοκληρωθούν σε λιγότερο από 30 λεπτά. Περιλαμβάνουν ποικίλους συνδυασμούς αντιγόνων των HIV-1

και HIV-2, συζευγμένων με διαφορετικά υλικά μεταφοράς (solid-phase capture immunoassays, dot immunoblot assays, συγκόλληση με latex). Η εφαρμογή τους ενδείκνυται κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες που δεν διαθέτουν υλικοτεχνικό εξοπλισμό, αλλά και σε τμήματα επειγόντων περιστατικών, ιατρεία, μικρές αιμοδοσίες και σε ανάγκη επειγόντος ελέγχου για HIV (όπου συνιστάται η άμεση, εντός δύο ωρών, χορήγηση θεραπευτικής αγωγής μετά από έκθεση στον ιό) [281-285].

Αναφέρονται ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας εφάμιλλα με της ELISA και του Western blot, με ταυτόχρονη σημαντικότερη μείωση του συνολικού κόστους (της τάξης του 82%). Η χρήση τους συνιστάται όταν το όφελος ταχείας απάντησης υπερσκελίζει τον (μικρό) δυνητικό κίνδυνο ψευδώς θετικού αποτελέσματος.

Οι περισσότερες από αυτές τις ταχείες δοκιμασίες έχουν ενσωματωμένο μάρτυρα (αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη που παράγει χωριστή ένδειξη) που δείχνει αν εκτελέστηκαν σωστά. Επιπλέον, λόγω της πρόσφατης αναγνώρισης της ομάδας O του HIV-1, έχει κατασκευαστεί ταχεία μέθοδος τριών κηλίδων που παρέχει τη δυνατότητα διαφοροδιάγνωσης μεταξύ HIV-1 ομάδας M, HIV-1 ομάδας O και HIV-2.

Οι **«απλές» μέθοδοι** για έλεγχο HIV απαιτούν περισσότερο από 30 λεπτά για την εκτέλεσή τους, αλλά η διαδικασία εκτελείται εύκολα χωρίς μηχανικό εξοπλισμό. Στην κατηγορία υπάγονται μέθοδοι συγκόλλησης, όπου σωματίδια καλυμμένα με αντιγόνο (ερυθρά αιμοσφαίρια ή σωματίδια latex ή σωματίδια ζελατίνης) αντιδρούν με αντισώματα του ορού και σχηματίζονται ορατά σύμπλοκα [286, 287]. Με τη μέθοδο αυτή αναφέρονται πολύ χαμηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αντιδράσεων σε οροαρνητικούς αιμοδότες (0.1% vs. 0.2% με κοινή ELISA), ενώ τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα κυμαίνονται γύρω στο 1%.

Η χρησιμότητα της δοκιμασίας για μαζικό έλεγχο πληθυσμών χαμηλού κινδύνου παραμένει αβέβαιη.

Το 1994 το FDA ενέκρινε τη χρήση της πρώτης δοκιμασίας ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του HIV σε **οίελο**. Τα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας που αναφέρονται είναι μεγαλύτερα του 99.4% [288].

Υπάρχουν ακόμα αντιδραστήρια για ανίχνευση αντι-HIV αντισωμάτων στα **ούρα** (ELISA και Western blot). Για την ELISA τα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας που αναφέρονται είναι 99% και 94%, αντίστοιχα. Για το W. Blot οι αρχικές μελέτες δείχνουν υψηλά ποσοστά ευαισθησίας [289,290].

Επιβεβαιωτικές μέθοδοι

Οι περισσότεροι αλγόριθμοι ελέγχου απαιτούν τη χρήση ειδικών δοκιμασιών, όπως Western blot, έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA) ή ραδιοανοσοκαθίζηση (RIPA), για την επιβεβαίωση θετικών κατά τον πρωτογενή έλεγχο αποτελεσμάτων. Πρωταρχικός στόχος των εξαιρετικής ειδικότητας επιβεβαιωτικών δοκιμασιών είναι να εξασφαλιστεί ότι δεν θα χαρακτηριστούν λανθασμένα σαν φορείς HIV, μη μολυσμένα από τον ιό άτομα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα στον πρωτογενή έλεγχο.

Το **Western blot (WB)** είναι μέθοδος ανοσοαποτύπωσης που εφαρμόζεται για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών [291,292]. Η τεχνική επιτρέπει την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών ενός μίγματος μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους σε πήκτωμα και τη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία στη συνέχεια επωάζεται με ειδικά έναντι των αντιγόνων αντισώματα και, τέλος, με κατάλληλα σημασμένα αντι-ανοσοσφαιρίνη.

Είναι η ευρύτερα αποδεκτή επιβεβαιωτική δοκιμασία για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ρετροϊών. Συνοπτικά η μέθοδος περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

1. Γίνεται ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μίγματος κεκαθαμένων αντιγόνων του HIV σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία θειϊκού δωδεκυλικού νατρίου (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel). Στην ιδιότητα της πολυακρυλαμίδης σαν μοριακού διαχωριστικού μέσου προστίθεται η διπλή δράση του SDS στις πρωτεΐνες: προκαλεί αποδιάταξη και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο, με

αποτέλεσμα τα μόρια να μετακινούνται με ταχύτητα αντίστροφα ανάλογη του μοριακού τους βάρους.

2. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Κάθε φύλλο νιτροκυτταρίνης φέρει σε όλο του το πλάτος τις ίδιες πρωτεϊνικές ζώνες και κόβεται σε λεπτές επιμήκειες ταινίες, καθεμία από τις οποίες αποτελεί το ακριβές αποτύπωμα των ιικών πρωτεϊνών όπως έχουν διαχωριστεί στο πήκτωμα.

3. Εκτελείται ανοσολογική αντίδραση - ταυτοποίηση πάνω στη νιτροκυτταρίνη. Κάθε ταινία επωάζεται με αραιώση 1:50 ή 1:100 εξεταστέου δείγματος (ή μάρτυρα), οπότε αν υπάρχουν αντι-HIV αντισώματα, αυτά προσδένονται ισχυρά και ειδικά στις θέσεις που βρίσκονται τα αντίστοιχα αντιγόνα. Μετά από πλύσεις το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος αναγνωρίζεται από κατάλληλα σημασμένη αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη: στο σημείο αυτό η διαδικασία είναι παρεμφερής με οποιαδήποτε άλλη έμμεση ανοσομέθοδο. Ο ιχνηθέτης είναι συνήθως ένζυμο (υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), αλλά και ραδιοϊσότοπο ή χρυσός, που θα αντιδράσει με ειδικό άχρωμο υπόστρωμα ώστε να παραχθούν αδιάλυτες έγχρωμες ζώνες πάνω στην ταινία στα σημεία που υπάρχουν ανοσοσυμπλέγματα. Σύγκριση των ταινιών με την αντίστοιχη ενός θετικού μάρτυρα παρέχει ταυτοποίηση των αντισωμάτων που υπάρχουν σε κάθε δείγμα.

Το Western blot δεν απαιτεί ιδιαίτερα υψηλής συγγένειας αντισώματα λόγω της μεγάλης τοπικής συγκέντρωσης αντιγόνου στη νιτροκυτταρίνη. Η ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίζεται από το σύστημα ανίχνευσης: με ιχνηθέτη υπεροξειδάση 500 pg, με αλκαλική φωσφατάση 100-5 pg, με χρυσό 100-10 pg. Εκτός από τη συγγένεια των αντισωμάτων πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η φύση των επιτόπων που αναγνωρίζονται από αυτά: ανιχνεύονται κυρίως γραμμικοί επιτόποι, λόγω της μερικής μετουσίωσης του αντιγόνου κατά την ηλεκτροφόρηση και μεταφορά.

Η αντίδραση με θετικό για HIV δείγμα παρέχει σχέδιο (pattern) από ζώνες πάνω στην ταινία που είναι χαρακτηριστικό του ιού. Πολλές από τις ζώνες αυτές έχουν ταυτοποιηθεί σαν ειδικά προϊόντα γονιδίων του HIV. Τα αντιγόνα του HIV-1 διαχωρίζονται ως εξής, ξεκινώντας από το σημείο εκκίνησης: gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 και p15, όπου οι αριθμοί (x1000) υποδεικνύουν το μοριακό βάρος των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Μη ιικές πρωτεΐνες που προέρχονται από τα κύτταρα που καλλιεργήθηκε ο ιός μπορεί επίσης να βρίσκονται πάνω στη νιτροκυτταρίνη και να σχηματίζουν ζώνες σε διάφορα σημεία, κυρίως όμως στην περιοχή μεσαίων μοριακών βαρών (40000-60000), παρέχοντας μη ειδικές αντιδράσεις και δημιουργώντας έτσι προβλήματα στην αξιολόγηση.

Ανάλογα με τα συγκεκριμένα αντισώματα που υπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα, η αντίδραση με τα διαχωρισμένα αντιγονικά συστατικά παρέχει ένα διάγραμμα ζωνών, ο τύπος του οποίου (συνδυασμός και ένταση των ζωνών) καθορίζει αν το εξεταζόμενο άτομο θεωρείται θετικό για αντι-HIV αντισώματα.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του Western blot υπόκειται σε ορισμένα κριτήρια, που εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου καθώς συσχετίζονται ορολογικά, επιδημιολογικά και κλινικά δεδομένα και το αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται σαν θετικό, αρνητικό ή αδιευκρίνιστο. Οι περισσότεροι οργανισμοί ακολουθούν σήμερα τις οδηγίες του CDC, που απαιτούν την παρουσία αντισωμάτων έναντι τουλάχιστον δύο από τις ακόλουθες δομικές πρωτεΐνες του ιού: p24, gp41, gp120/160 για χαρακτηρισμό ενός δείγματος σαν θετικού [293]. Τα αναθεωρημένα αυτά κριτήρια διαφέρουν από παλαιότερες συστάσεις [294] στο ότι δεν απαιτείται η αντίδραση σε προϊόν τρίτου γονιδίου (δηλαδή p31 ή p65 πρωτεΐνες pol), ενώ αρκεί μόνη η αντίδραση σε πολλαπλά αντιγόνα env, για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα σαν θετικό. Έχουν ήδη εκφραστεί κάποιες επιφυλάξεις σε σχέση με τα ισχύοντα κριτήρια αξιολόγησης που περιγράφησαν παραπάνω, καθώς φαίνεται ότι άτομα χωρίς ιστορικό

κινδύνου για HIV λοίμωξη μπορεί να χαρακτηριστούν, εσφαλμένα, σαν οροθετικά [295-297].

Είναι ομόφωνα αποδεκτό ότι αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει απουσία οποιασδήποτε ζώνης. Δύο ομάδες, όμως, μεταξύ των οποίων η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ), δέχονται σαν αρνητικό αποτέλεσμα και την παρουσία ασθενούς p17 ζώνης [298].

Αδιευκρίνιστα χαρακτηρίζονται τα δείγματα που ενώ εμφανίζουν αντίδραση με ένα ή περισσότερα αντιγόνα, δεν πληρούν τα κριτήρια θετικού (ή αρνητικού) αποτελέσματος.

Το Western blot έχει αναφερόμενη ειδικότητα 97.8% [299]. Σφάλματα στην αξιολόγησή του συμβαίνουν από λανθασμένη σήμανση δείγματος, επιμόλυνση αρνητικού δείγματος από παρακείμενο θετικό, αντιλευκοκυτταρικά αντισώματα που αντιδρούν με πρωτεΐνες της κυτταρικής σειράς στην οποία αναπτύχθηκε ο ιός ή κακή αξιολόγηση των ζωνών [300-303]. Το ποσοστό αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων ποικίλλει ανάλογα με το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται, την επίπτωση της HIV λοίμωξης στον πληθυσμό που ελέγχεται και τα κριτήρια αξιολόγησης [302]. Το W. Blot είναι ελάχιστα χρήσιμο για μαζικό έλεγχο λόγω των συχνών (>2%) ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Ποσοστό 4-20% των ορών που είναι κατ' επανάληψη θετικοί με ELISA εμφανίζουν αδιευκρίνιστα αποτελέσματα στο W. Blot. Τα αίτια περιλαμβάνουν έλεγχο κατά τη διάρκεια του ορολογικού «παραθύρου», διασταυρούμενη αντίδραση οφειλόμενη σε λοίμωξη από HIV-2 [304,305], απώλεια των αντισωμάτων έναντι του πυρήνα σε προχωρημένο στάδιο της λοίμωξης, μόλυνση από μεταλλαγμένα στελέχη και μη ειδικές αντιδράσεις (σε λέμφωμα, πολλαπλή σκλήρυνση, ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών [306], ηπατική νόσο [307], υπεργαμμασφαιριναιμία, ή αυτοάνοσες διαταραχές [308,309]). Φαίνεται ότι υπάρχουν και υγιή άτομα με αντισώματα που δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με ειδικά του HIV-1 πεπτίδια ή ανασυνδυασμένα αντιγόνα: παραμένει άγνωστο αν αυτή η αντίδραση οφείλεται στην έκθεση σε παρεμφερείς ιικές πρωτεΐνες [310-312].

Συνήθως στα αδιευκρίνιστα W. blots ανιχνεύονται αντισώματα έναντι των gag πρωτεϊνών (ασθενείς ζώνες στις p17, p24, p55), χωρίς να αποκλείονται, λιγότερο συχνά, άλλες εικόνες. Ορισμένα από τα άτομα αυτά εμφανίζουν αργότερα ορομετατροπή, ενώ άλλα διατηρούν σταθερό το αδιευκρίνιστο μοτίβο για μεγάλα χρονικά διαστήματα (χρόνια), χωρίς ποτέ να εμφανίσουν ορομετατροπή (άρα μάλλον δεν είναι μολυσμένα, χωρίς να υπάρχει απόλυτη απάντηση για το φαινόμενο αυτό). Οι περισσότεροι ειδικοί συνιστούν τον επανέλεγχο των ατόμων με αδιευκρίνιστα αποτελέσματα μετά παρέλευση 1-6 μηνών και, όπου είναι δυνατόν, την ταυτόχρονη εξέταση του αρχικού δείγματος παράλληλα με το δεύτερο, ώστε να είναι δυνατή η άμεση σύγκρισή τους. Αν μετά πάροδο 6 μηνών το άτομο αρνητικοποιηθεί ή δεν υπάρχει εξέλιξη της εικόνας, η λοίμωξη από HIV ουσιαστικά αποκλείεται [299, 313]. Πρέπει να σημειωθεί ότι άτομα που έχουν εμβολιαστεί για HIV (π.χ. με την υπομονάδα gp160) μπορεί να θεωρηθούν, λανθασμένα, σαν θετικά λόγω αντίδρασης με πρωτεΐνες του περιβλήματος.

Επικουρικές τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και η καλλιέργεια του ιού, προσφέρουν πολύτιμη βοήθεια στη διαλεύκανση αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων.

Έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές γνωστές σαν «**ενισχυμένα**» ή «**τροποποιημένα**» **Western blots**, που στις ταινίες της νιτροκυτταρίνης περιλαμβάνουν εκτός από κυτταρόλυμα του HIV-1 και τεχνητά καθηλωμένα συνθετικά πεπτίδια του HIV-2 (gp36 ή gp41). Έτσι, παρέχουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των δύο τύπων του ιού. Τα κριτήρια θετικότητας καθορίζονται από τον κατασκευαστή.

Η **RIPA** ταυτοποιεί, όπως και το Western blot, τα αντισώματα έναντι των διαφόρων πρωτεϊνών του HIV. Επιτρέπει καλύτερη ανάλυση των μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνών του περιβλήματος από το W. blot και υπερέχει αυτού σε ευαισθησία και

ειδικότητα [314], αλλά μάλλον μειονεκτεί στην ανίχνευση πρώιμης αντισωματικής απάντησης προς τις p24 και gp41. Η εφαρμογή της περιορίζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια γιατί απαιτεί χρήση ραδιοϊσοτόπων και διατήρηση μολυσμένων με HIV κυτταρικών καλλιέργειών. Είναι χρήσιμη στην ανίχνευση χαμηλών τίτλων αντισώματος και τη διαλεύκανση αδιευκρίνιστων Western blots.

Μολυσμένες με HIV λεμφοκυτταρικές σειρές καλλιεργούνται παρουσία ραδιοσημασμένων αμινοξέων, τα οποία ενσωματώνονται στις ιϊκές πρωτεΐνες κατά την αναπαραγωγή του ιού. Ομογενοποίηση των μολυσμένων κυττάρων παρουσία απορρυπαντικού παρέχει κυτταρόλυμα που επώάζεται με τον υπό εξέταση ορό. Τα αντι-HIV αντισώματα του ορού αντιδρούν με τα ραδιοσημασμένα αντιγόνα και σχηματίζουν ανοσοσυμπλέγματα που απομακρύνονται μετά από επώαση με σφαιρίδια σεφαρόζης επικαλυμμένα με πρωτεΐνη A, η οποία συνδέεται με το Fc κλάσμα των ανοσοσφαιρινών. Τα σφαιρίδια διαχωρίζονται από το μίγμα με φυγοκέντρηση και τα ραδιενεργά σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος εκλύονται από τα σφαιρίδια με θέρμανση και διαλυτοποίηση σε απορρυπαντικό. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των ανοσοκαθιζημάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, που τα διαχωρίζει ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η έκθεση του πηκτώματος σε φωτογραφικό φιλμ (αυτοραδιογραφία) παρέχει ζώνες παρόμοιες με του Western blot και καθορίζει την ειδικότητα των αντισωμάτων έναντι των διαφόρων πρωτεϊνών του ιού.

Με τον ανοσοφθορισμό ανιχνεύονται αντιγόνα ή αντισώματα σε βιολογικά υλικά, με τη χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές. Με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού (**IFA**) μη σημασμένο αντίσωμα τοποθετείται πάνω στο υπόστρωμα που βρίσκεται το αντιγόνο και σχηματίζεται ανοσοσύμπλεγμα. Προστίθεται σημασμένο αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος (που τώρα δρα σαν αντιγόνο) και σχηματίζεται φθορίζον σύμπλεγμα που γίνεται ορατό σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Κυτταρικές σειρές μολυσμένες με HIV επιστρώνονται σε πλάκα μικροσκοπίου σαν μονοστιβάδα και επώάζονται με ορό ασθενούς για καθορισμένο χρόνο. Αντισώματα έναντι του HIV που περιέχονται στον ορό αντιδρούν με τα αντιγόνα του ιού που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και, μετά από πλύσεις, ανιχνεύονται με την προσθήκη αντιανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης σημασμένης με ισοθειοκυανική φλουορεσκαΐνη (FITC), ένα φθοριοχρώμα που ενεργοποιείται με υπεριώδη ακτινοβολία. Η αντίδραση γίνεται ορατή σε μικροσκόπιο φθορισμού και αξιολογούνται τόσο ο αριθμός των φθορίζοντων κυττάρων όσο και η ένταση και ο τύπος φθορισμού. Σαν αρνητικός μάρτυρας πρέπει να χρησιμοποιείται η ίδια μη μολυσμένη κυτταρική σειρά (για να μειωθεί η πιθανότητα μη ειδικού φθορισμού) και σαν θετικός μάρτυρας ορός από γνωστό οροθετικό άτομο.

Η μέθοδος μπορεί μερικές φορές να θέσει οριστική διάγνωση σε δείγματα με αδιευκρίνιστο Western blot και να ανιχνεύσει πρώιμη ορολογική αντίδραση έναντι του ιού (IgM αντισώματα) κατά την οξεία φάση της λοίμωξης [315-317].

Η ευαισθησία και η ειδικότητα του IFA θεωρούνται από τους περισσότερους ίσες ή και μεγαλύτερες από του Western blot. Βασικότερα μειονεκτήματα είναι η απαίτηση ακριβούς μικροσκοπίου και η υποκειμενικότητα στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Μία ακόμα εναλλακτική λύση στις επιβεβαιωτικές μεθόδους του κλασσικού W.B. και του IFA είναι η **ανοσοαποτύπωση κηλίδας/γραμμής** (dot/line blotting ή LIA), στην οποία ανασυνδυασμένα ή συνθετικά πεπτιδικά αντιγόνα ακινητοποιούνται πάνω σε ταινία νιτροκυτταρίνης. Η χρήση «τεχνητών» αντιγόνων μειώνει την παρουσία ουσιών προερχόμενων από την καλλιέργεια του ιού, που παρεμβαίνουν στην αξιολόγηση και μπορούν να δώσουν ψευδείς αντιδράσεις [318]. Η αξιοπιστία της LIA θεωρείται ίση με του Western blot.

Έλεγχος για HIV-2

● HIV-2 ενδημεί κυρίως σε περιοχές της Δ. Αφρικής, αλλά η επίπτωση και η κατανομή των κρουσμάτων που οφείλονται σε αυτόν επιβάλλουν τη χρήση μεθόδων

για την ανίχνευσή του. Τα αντιγόνα του HIV-2 είναι παρεμφερή με του HIV-1 με μικρές μόνο διαφορές στα μοριακά βάρη: οι Gag πρωτεΐνες του HIV-2 χαρακτηρίζονται σαν p56, p26, p16, οι Pol p68, p34 και οι γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος gp36 (ή gp41), gp140, gp105.

Όπως και για τον HIV-1, ο πρωτογενής έλεγχος για τον HIV-2 γίνεται με ELISA (σφαιρίδια ή μικροπλάκα) ή ταχείες ή απλές δοκιμασίες.

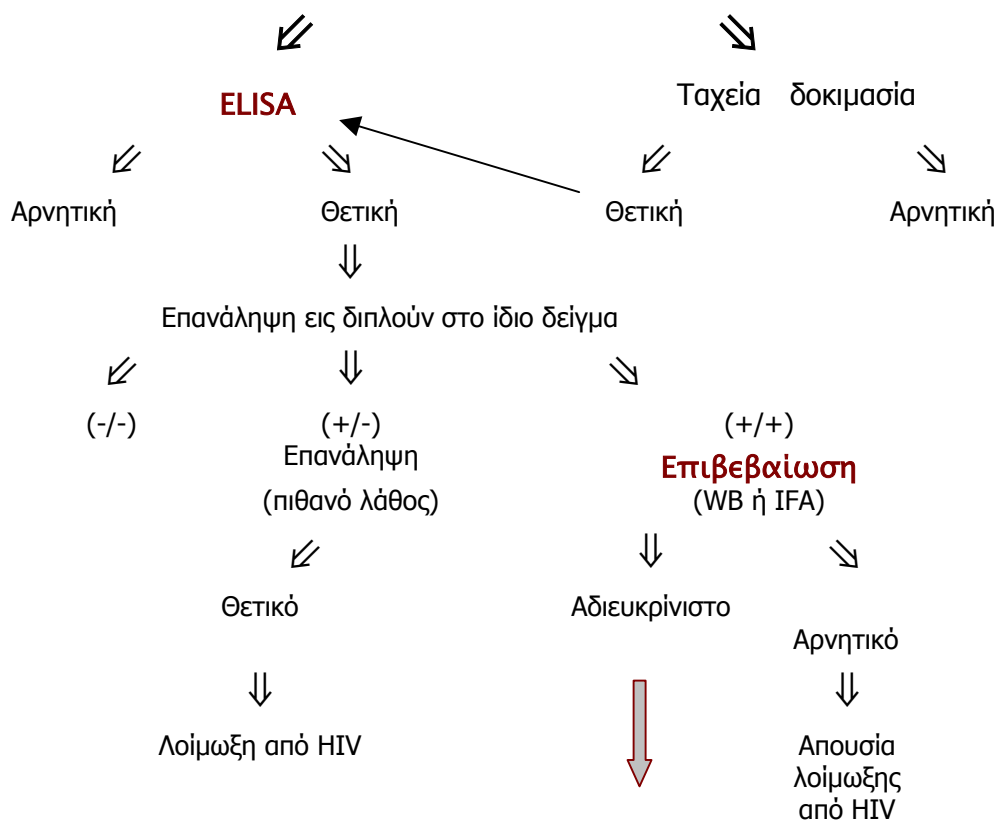
Οι επιβεβαιωτικές μέθοδοι για τον HIV-2 περιλαμβάνουν το Western blot και τη RIPA. Υπάρχουν επίσης ανοσοενζυμικές (ΕΙΑ) δοκιμασίες και μερικές ταχείες μέθοδοι οι οποίες χρησιμοποιούν χημικά συνθετικά πεπτίδια, ομόλογα μοναδικής ανοσογόνου περιοχής της αντίστοιχης διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης, που εμφανίζουν καλή συσχέτιση με το W.B. και τη RIPA στην αναγνώριση και ταυτοποίηση αντισωμάτων έναντι των HIV-1 και HIV-2. Αυτές οι δοκιμασίες είναι ακόμα χρήσιμες στην αναγνώριση δειγμάτων που αντιδρούν και με τους δύο ιούς.

Για την επιβεβαίωση HIV-2 μόλυνσης, οι περισσότεροι οργανισμοί που έχουν θεσπίσει κριτήρια για τη αξιολόγηση του HIV-2 W.B. θεωρούν απαραίτητη για θετικότητα την αντίδραση με τα αντιγόνα του περιβλήματος. Η ΠΟΥ απαιτεί αντίδραση με δύο τουλάχιστον αντιγόνα του περιβλήματος του HIV-2, ενώ άλλοι οργανισμοί απαιτούν αντίδραση με την p26 (gag) και την gp34 ή την gp105 (env).

Διαγνωστικά, οι λοιμώξεις από HIV-2 μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα. Συχνά παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον HIV-1 που συνηθέστερα οφείλονται σε αντι-gag ή αντι-pol αντισώματα, λόγω της μεγαλύτερης ομολογίας των δύο ιών στις περιοχές αυτές [305]. Με HIV-1 ELISA, τα θετικά για HIV-2 δείγματα μπορεί να εμφανίζουν υψηλές αρνητικές τιμές. Με Western blot μπορεί να δίνουν εικόνα αδιευκρίνιστη. Είναι λοιπόν απαραίτητο να αναγνωρίζονται τα ύποπτα δείγματα και να ελέγχονται με αντιδραστήρια κατάλληλα για τον HIV-2. Σήμερα είναι διαθέσιμα «μικτά» αντιδραστήρια για HIV-1/ HIV-2, πολύ μεγάλης ευαισθησίας, που χρησιμοποιούνται στον πρωτογενή έλεγχο για την ανίχνευση μόλυνσης και από τους δύο ιούς. Η διαφοροδιάγνωση, στη συνέχεια, μεταξύ HIV-1 και HIV-2 απαιτεί τη χρήση ELISA μεγάλης ειδικότητας (π.χ. βασιζόμενης σε συνθετικά πεπτίδια), Western blot, RIPA ή PCR.

Αν και περιγράφησαν αρκετές μέθοδοι για τον πρωτογενή έλεγχο και την επιβεβαίωση της μόλυνσης από HIV, τα περισσότερα Κέντρα Αναφοράς AIDS ακολουθούν έναν αλγόριθμο ελέγχου για την εργαστηριακή διάγνωση της μόλυνσης παρόμοιο με αυτόν που ενδεικτικά παρουσιάζεται στο σχήμα 12.

Πρωτογενής έλεγχος για HIV



Ενημέρωση ατόμου

Αν είναι υψηλού κινδύνου ή έχει συμπτώματα, συνιστάται μέτρηση **αντιγόνου p24** ή/και **PCR** ή/και **καλλιέργεια ιού**.

Διαφορετικά, επανάληψη ELISA και WB σε 1 μήνα με τον ίδιο αλγόριθμο.

Αδιευκρίνιστο WB ξανά



Επανάληψη ELISA και WB μετά από 2-6 μήνες, με τον ίδιο αλγόριθμο.

Αν και πάλι αδιευκρίνιστο WB: πιθανότατα δεν πρόκειται για λοίμωξη HIV.



Μέτρηση **αντιγόνου p24** ή/και **PCR** ή/και **καλλιέργεια ιού**.

Υψηλοί τίτλοι: οξεία λοίμωξη HIV.

Αρνητικά: απουσία λοίμωξης HIV.

Θετικά σε χαμηλό τίτλο: επανάληψη.

Σχήμα 12: αλγόριθμος ελέγχου για την εργαστηριακή διάγνωση της λοίμωξης HIV. (WB: Western blot, IFA: έμμεσος ανοσοφθορισμός, PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

2. Ανίχνευση αντιγόνου

Με τη δοκιμασία του αντιγόνου p24 προσδιορίζεται άμεσα στο αίμα η πρωτεΐνη p24 του καψιδίου (πυρήνα) του ιού, η οποία ανιχνεύεται πριν από την εμφάνιση αντισωμάτων έναντι του HIV κατά την οξεία φάση της λοίμωξης. Το p24 αντιγόνο εμφανίζεται νωρίς μετά τη μόλυνση λόγω του αρχικά εκρηκτικού ιικού πολλαπλασιασμού και συνδυάζεται με υψηλά επίπεδα ιαιμίας [319]. Αν και παροδικό, μπορεί να εμφανιστεί περίπου δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση και να διαρκέσει 3-5 μήνες. Με την ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του HIV, το αντιγόνο παύει να είναι ανιχνεύσιμο, πιθανότατα λόγω σχηματισμού συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος στο αίμα. Αρνητική δοκιμασία αντιγόνου δεν αποκλείει τη μόλυνση, αλλά όταν ανιχνευθεί, το p24 αντιγόνο έχει πολύ μεγάλη ειδικότητα για τη λοίμωξη.

Ο έλεγχος για αντιγόνο p24 είναι χρήσιμος σε:

1. Ανίχνευση πρόσφατης μόλυνσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις οξείας HIV λοίμωξης η διάγνωση είναι δυνατή πριν την ορομετατροπή, τόσο κλινικά όσο και εργαστηριακά και η δοκιμασία αντιγόνου προσφέρει σημαντική βοήθεια [320].
2. Έλεγχο αιμοδοτών. Στις αναπτυγμένες χώρες η μετάδοση του HIV με μετάγγιση αίματος συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, όταν ο δότης είναι οροαρνητικός. Στις ΗΠΑ η δοκιμασία p24 αντιγόνου εγκρίθηκε από το FDA για έλεγχο του αίματος και των παραγώγων του, καθώς και των λευκοκυττάρων και του πλάσματος που θα χρησιμοποιηθούν για μετάγγιση, από το 1995 [321]. Η δοκιμασία εκτελείται επιπλέον του ελέγχου αντισωμάτων.
3. Διάγνωση λοίμωξης σε νεογνά. Η απομόνωση HIV ή/και οι μέθοδοι ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων του, επέτρεψαν μεγαλύτερη από 90% πρόβλεψη της μόλυνσης μετά τον πρώτο μήνα της ζωής και κατά 97% πρόβλεψη στην ηλικία των 3 μηνών [322,323]. Η ανίχνευση p24 αντιγόνου στα νεογνά είναι λιγότερο ευαίσθητη (50-80%), αλλά επιτυγχάνει παρόμοια ευαισθησία από την ηλικία των 6 μηνών. Στη γέννηση, η συνδυασμένη χρήση p24 αντιγόνου, καλλιέργειας ιού και PCR επιτρέπει πρόβλεψη της μόλυνσης μόνο κατά 50%, αν και η ειδικότητα είναι 100% [324].
4. Παρακολούθηση πορείας νόσου και αντιρετροϊκής θεραπείας. Παλαιότερα, πριν γίνουν διαθέσιμες μέθοδοι μέτρησης ιικού φορτίου, η δοκιμασία αντιγόνου χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την παρακολούθηση της πορείας της HIV λοίμωξης. Σήμερα, αν και πολλοί κλινικοί προτιμούν το ιικό φορτίο, το αντιγόνο εξακολουθεί να προσφέρει πληροφορίες με πολύ χαμηλότερο κόστος και σε μικρότερο χρόνο. Επιμένουσα αντιγοναιμία έχει συσχετιστεί με ταχύτερη εξέλιξη της νόσου [325]. Αυξανόμενη τιμή αντιγόνου σε ασθενείς με ARC ή AIDS σχετίζεται με αυξανόμενο ιικό φορτίο και μειούμενα αντι-p24 αντισώματα.

Σημαντικό περιορισμό αποτελεί η έλλειψη ευαισθησίας της μεθόδου στον έλεγχο αίματος, τόσο επειδή χαμηλά επίπεδα αντιγόνου δύσκολα ανιχνεύονται, όσο και γιατί αντιγοναιμία εμφανίζεται μόνο παροδικά και σε διάφορα στάδια της νόσου [326,327]. Δεν είναι, επίσης, γνωστός ο βαθμός στον οποίο οι δοκιμασίες αντιγόνου μπορούν να ανιχνεύσουν p24 αντιγόνο από όλα τα στελέχη των HIV-1, HIV-2 και HIV-1 ομάδας O.

Το αντιγόνο p24 βρίσκεται στον ορό είτε σε ελεύθερη μορφή είτε δεσμευμένο από αντι-p24 αντισώματα. Η ελεύθερη πρωτεΐνη του ιού (p24) συνήθως μετρίεται με μη ανταγωνιστική ELISA διπλού αντισώματος. Η χρήση μονοκλωνικών αντι-p24 αντισωμάτων έχει αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου και ανιχνεύονται με αξιοπιστία επίπεδα αντιγόνου 7-10 pg/ml. Η ανίχνευση του συνδεδεμένου p24 απαιτεί διάσπαση του συμπλέγματος p24 αντιγόνου - αντι-p24 αντισώματος (κατεργασία με γλυκίνη ή επώαση σε χαμηλό pH ή καθίζηση των ανοσοσυμπλεγμάτων με πολυαιθυλενογλυκόλη) πριν την εκτέλεση της δοκιμασίας [328,329]. Η τροποποίηση αυτή, που επιτρέπει την ανίχνευση τόσο του ελεύθερου όσο και του συζευγμένου p24

αντιγόνου, υποστηρίζεται ότι αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου από 38% σε 59%, ιδιαίτερα στα ασυμπτωματικά άτομα [330].

Οι δοκιμασίες αντιγόνου p24 δίνουν μερικές φορές ψευδώς θετικές αντιδράσεις, που πιθανά οφείλονται σε διάφορες ουσίες και ανοσοσυμπλέγματα. Τα δείγματα που δίνουν θετικό αποτέλεσμα πρέπει να επιβεβαιώνονται με πιο ειδική μέθοδο και για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μία δοκιμασία εξουδετέρωσης που διατίθεται σαν συμπληρωματική της κλασσικής μεθόδου. Το δείγμα που υποθετικά περιέχει αντιγόνο επωάζεται με ανθρώπινο αντι-p24 αντίσωμα, οπότε αν υπάρχει αντιγόνο θα σχηματίσει σύμπλοκο με το εξουδετερωτικό αντίσωμα. Ακολουθεί η κλασσική δοκιμασία αντιγόνου στο προεπωασμένο και στο αρχικό δείγμα και συγκρίνονται οι οπτικές πυκνότητες των δύο. Για να θεωρηθεί δείγμα επιβεβαιωμένα θετικό για αντιγόνο, πρέπει η οπτική πυκνότητα μετά την εξουδετέρωση να μειωθεί τουλάχιστον κατά 50% συγκριτικά με αυτήν του μη εξουδετερωμένου δείγματος. Αν δεν συμβεί αυτός ο βαθμός αναστολής, το δείγμα χαρακτηρίζεται σαν αδιευκρίνιστο για αντιγόνο και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση με επανέλεγχο ή ανίχνευση RNA.

Η δοκιμασία αντιγόνου p24 είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευσή του σε υπερκείμενα καλλιέργειών ενοφθαλμισμένων με κύτταρα απόμων που είναι ύποπτα για HIV λοίμωξη. Αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την ανίχνευση παρουσίας ελεύθερου αντιγόνου σε καλλιέργεια και είναι πιο ευαίσθητη από τη δοκιμασία ανάστροφης μεταγραφάσης [331].

Δοκιμασία αντιγόνου μπορεί να εκτελεστεί και σε άλλα υγρά, εκτός από ορό και υπερκείμενα καλλιέργειών: π.χ. πολλοί ασθενείς με HIV άνοια και εγκεφαλοπάθεια έχουν ανιχνεύσιμο αντιγόνο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πιθανά λόγω ενεργού ιϊκού πολλαπλασιασμού στον εγκεφαλικό ιστό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα p24 αντιγόνου δεν συσχετίζονται ικανοποιητικά με το ιϊκό RNA στο πλάσμα, λόγω παρουσίας αντι-p24 αντισώματος και μη σχετιζόμενης με ισοβάτια p24 πρωτεΐνης [332].

3. Καλλιέργεια και απομόνωση ιού

Η τεχνική αυτή αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την καθιέρωση του HIV-1 σαν αιτίου του AIDS.

1. Βιώσιμα μονοπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) ασθενών μολυσμένων από HIV λαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση ολικού αίματος πάνω σε στιβάδα διαχωριστικού μέσου λεμφοκυττάρων: ο κυτταρικός πληθυσμός περιλαμβάνει μονοκύτταρα, CD4+ και CD8+ T λεμφοκύτταρα, B λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονείς (NK). Στο δείγμα των μονοπύρνων τα CD4+ κύτταρα είναι αυτά που κύρια περιέχουν τον ιό. Τα μολυσμένα μονοπύρνα διεγείρονται με κάποιο πολυκλωνικό μιτογόνο των T κυττάρων (π.χ. φυτοαιμοσυγκολλητίνη: PHA) και στη συνέχεια συγκαλλιεργούνται με διεγερμένα PBMCs φυσιολογικού ατόμου ή κάποια κυτταρική σειρά δεκτική στη μόλυνση από τον ιό. Στόχος της συγκαλλιέργειας είναι να επιτρέψει την ενίσχυση της μόλυνσης HIV *in vitro*, ώστε αυτή να ανιχνεύεται με διαδοχικές μετρήσεις δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) ή p24 αντιγόνου στο υπερκείμενο. Ελέγχεται επίσης ο σχηματισμός συγκυτίων (*in vitro* ένδειξη μόλυνσης HIV). Τέτοιου τύπου καλλιέργειες πρέπει να διατηρηθούν τουλάχιστον για 28 μέρες και τα υπερκείμενα να παρακολουθούνται κάθε δεύτερη ημέρα για μεγιστοποίηση της ευαισθησίας ανίχνευσης του HIV.

Μία συγκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται σαν «θετική» όταν τουλάχιστον δύο διαδοχικές μετρήσεις ανιχνεύουν παρουσία RT ή p24 αντιγόνου σε αυξανόμενο τίτλο, πάνω από προκαθορισμένη τιμή-ουδό. Εκτίμηση του βαθμού θετικότητας (π.χ. διάρκεια σε μέρες μέχρι την ανίχνευση θετικότητας, εμφάνιση και διαβάθμιση σχηματισμού συγκυτίων, μέγεθος θετικής απάντησης ανάλογα με τα επίπεδα p24 αντιγόνου ή δραστηριότητας RT) είναι δυνατή και μπορεί να έχει κάποια αξία σαν αδρός δείκτης του συνολικού ιϊκού φορτίου του ασθενούς.

Το ποσοστό των οροθετικών ατόμων που δίνουν θετική καλλιέργεια ποικίλλει ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου και τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της ανίχνευσης θετικής καλλιέργειας. Η απομόνωση του HIV με συγκαλλιέργεια PBMCs αποβαίνει θετική σε 95-99% των προσβεβλημένων ασθενών προχωρημένου σταδίου [287,333], το ποσοστό όμως αυτό είναι πολύ χαμηλό και ποικίλλει ευρέως σε άτομα με λιγότερο προχωρημένη νόσο. Τροποποιήσεις της τεχνικής, όπως προσθήκη αντισωμάτων έναντι της ιντερφερόνης-α ή επιλογή διάφορων κυτταρικών σειρών για συγκαλλιέργεια, μπορεί να αυξήσουν το ποσοστό θετικότητας. Φαίνεται, πάντως, ότι θετικό αποτέλεσμα καλλιέργειας πιθανά έχει κάποια (αρνητική) προγνωστική αξία για την εξέλιξη της λοίμωξης.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η απόλυτη ειδικότητά της. Δεν μπορεί όμως να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος ρουτίνας γιατί είναι μεγάλης χρονικής διάρκειας, ενώ παράλληλα απαιτεί ειδικά διαμορφωμένους χώρους υψηλής ασφάλειας, κατάλληλο υλικοτεχνικό εξοπλισμό και καταρτισμένο προσωπικό.

2. Πλάσμα ασθενούς φιλτράρεται για να απομακρυνθούν κυτταρικά κατάλοιπα και στη συνέχεια συγκαλλιεργείται με PHA-διεγερμένα μονοπύρρηνα περιφερικού αίματος φυσιολογικού δότη. Η καλλιέργεια παρακολουθείται για την εμφάνιση δραστηριότητας RT και p24 αντιγόνου για διάστημα 28 τουλάχιστον ημερών.

Η **ποσοτική καλλιέργεια** υπολογίζει το σχετικό ποσό ιού στο πλάσμα ή στα κύτταρα του περιφερικού αίματος [334] και χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ιικού φορτίου πριν γίνουν διαθέσιμες οι τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων.

1. Η ποσοτική καλλιέργεια πλάσματος για HIV υπολογίζει το ποσό ελεύθερου μολυσματικού ιού στο πλάσμα: διαδοχικές αραιώσεις πλάσματος ασθενούς σε πλήρες θρεπτικό υλικό καλλιέργειας επωάζονται με σταθερό αριθμό PHA-διεγερμένων PBMCs δότη σε μικροπλάκα ιστικής καλλιέργειας 96 θέσεων και το υπερκείμενο ελέγχεται για εμφάνιση μόλυνσης (παρουσία HIV p24 αντιγόνου) την 7^η και 14^η ημέρα [335, 336]. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε TCID₅₀ (50% της μολυσματικής δόσης για ιστική καλλιέργεια) /ml πλάσματος. Σαν τεχνική είναι επίπονη και όχι ιδιαίτερα ευαίσθητη και τα δείγματα συνήθως ελέγχονται εις διπλούν ή εις τετραπλούν. Όταν συγκρίνεται το ποσό καλλιεργήσιμου ιού με τα επίπεδα HIV RNA στο πλάσμα, παρατηρείται γενικά 100-10000 φορές περισσότερο RNA από ιό [337,338].

2. Η ποσοτική καλλιέργεια PBMCs υπολογίζει τον αριθμό των μολυσμένων κυττάρων στα λεμφομονοκύτταρα του αίματος [339]. Διαδοχικές αραιώσεις των κυττάρων του ασθενούς συγκαλλιεργούνται σε μειούμενες συγκεντρώσεις με σταθερό αριθμό PHA-διεγερμένων κυττάρων δότη [340] και το υπερκείμενο ελέγχεται για παρουσία p24 αντιγόνου. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε μολυσματικές μονάδες ανά εκατομμύριο μονοπύρρηνων κυττάρων.

4. Ανίχνευση ιϊκού γενετικού υλικού

Southern blot

Η μέθοδος βασίζεται στην απομόνωση γενωμικού DNA από τα κύτταρα των υπό εξέταση ατόμων, κατεργασία του με ειδικά ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες), ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης με τριχοειδική δράση. Ακολουθεί υβριδισμός με ραδιενεργά σημασμένα συμπληρωματικά μόρια DNA (cDNA ανιχνευτές), ομόλογα των διαφόρων γονιδίων του HIV και αυτοραδιογραφία.

Dot blot

Η μέθοδος παρέχει ταχύτερη εξακρίβωση της παρουσίας ιϊκού DNA ή RNA σε δείγματα απ' ό,τι το Southern blot. Γίνεται άμεση εναπόθεση του DNA ή RNA σε «κηλίδα» πάνω σε φύλλο νιτροκυτταρίνης μέσα σε ειδική συσκευή (slot blot). Το φίλτρο στη συνέχεια υβριδίζεται με ραδιοσημασμένους δείκτες.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η τεχνική επιτρέπει τη σύνθεση, *in vitro*, ενός τμήματος DNA-στόχου, που πολλαπλασιάζεται εκλεκτικά, ώστε να γίνει ευχερής η ανίχνευσή του (σχήμα 13). Ο αριθμός των αντιγράφων που θα προκύψουν εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης [341,342].

Ένα ζεύγος από συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 ζευγών βάσεων (bp), που ονομάζονται εκκινητικά μόρια (primers), σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι συμπληρωματικά με τις αλληλουχίες που οριοθετούν το DNA-στόχο, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση. Σαν DNA-στόχος συνήθως επιλέγονται καλά διατηρημένες περιοχές του ιικού γονιδιώματος. Η αντίδραση της PCR στο περιφερικό αίμα ατόμου ύποπτου ή διαγνωσμένου με HIV λοίμωξη ξεκινά με την απομόνωση γενωμικού DNA από τα μονοκύτταρα. Προστίθενται εκκινητικά μόρια συμπληρωματικά των άκρων της αλληλουχίας που ενδιαφέρει, μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση και δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με διαδοχικούς κύκλους που καθένας περιλαμβάνει τρία στάδια: στο πρώτο γίνεται θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο [θερμοκρασία 92-95°C, 30 sec] (denaturation), στο δεύτερο οι εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στα άκρα του DNA-στόχου [τυπικά σε θερμοκρασία 50-65°C, 1-2 min] (annealing) και στο τρίτο η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τον κάθε εκκινητή στο 3' άκρο του με την προσθήκη συμπληρωματικών βάσεων δεοξυριβονουκλεοτιδίων κατά μήκος της αλληλουχίας-στόχου [θερμοκρασία 70-78°C, 1-2 min] (extension).

Κάθε στάδιο διαρκεί 1-3 λεπτά και στο τέλος κάθε συμπληρωμένου κύκλου το ποσό του DNA της περιοχής που ενδιαφέρει διπλασιάζεται. Μετά από προκαθορισμένο (N) αριθμό κύκλων (συνήθως 25-40), το επιλεκτικά πολλαπλασιασμένο τμήμα του DNA βρίσκεται σε συγκέντρωση 2^N (ο ακριβής αριθμός εξαρτάται από την ακρίβεια της πολυμεράσης και την απόδοση της αντίδρασης).

Το κύριο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι δίκλωνο DNA που περιβάλλεται από τα εκκινητικά μόρια, τα 5' άκρα των οποίων αποτελούν και τα άκρα του προϊόντος της PCR. Είναι δυνατό να σχηματιστούν, στους πρώτους κύκλους, μακρύτερα μονόκλινα μόρια DNA που όμως δεν είναι ανιχνεύσιμα γιατί αποτελούν ελάχιστο ποσοστό του συνολικού προϊόντος της PCR.

Το τελικό βήμα της δοκιμασίας είναι ο χαρακτηρισμός του ενισχυμένου τμήματος, που συνήθως γίνεται με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό και υβριδισμό.

Κλειδί στην όλη διαδικασία είναι η θερμοάντοχη Taq πολυμεράση, μία DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* και διατηρεί την ενεργότητά της σε υψηλές θερμοκρασίες (ακόμα και στους 95°C επί 40 τουλάχιστον λεπτά).

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι και το ισχυρότερο σημείο της δηλ. η πολύ μεγάλη ευαισθησία της: με ραδιενεργό σήμανση ενός μορίου ανιχνευτή (probe) είναι δυνατό να ανιχνευτεί μέχρι και 1 pg DNA. Ακούσια επιμόλυνση των αντιδραστηρίων ή του DNA-στόχου ή και των δύο μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα [343]. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη σχολαστική τήρηση κανόνων για αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων και τη χρήση πολλαπλών μαρτύρων -αρνητικών και θετικών- κάθε φορά [344].

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό RNA, αφού πρώτα αυτό μετατραπεί σε συμπληρωματικό του DNA (cDNA) με τη δράση της ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) και στη συνέχεια εφαρμοστεί η καθαυτό PCR [345-347].

δραστηριότητα του ιού, η οποία αντανακλά την υποκείμενη εξέλιξη της νόσου στον ασθενή, συνήθως με ποσοτικοποίηση του ιικού RNA στο πλάσμα [334].

Η χρήση του όρου ιικό φορτίο [355] περιέχει μία καλυμμένη παραδοχή, που στηρίζεται σε ισχυρές ενδείξεις: ότι το ποσό του ιικού RNA στο πλάσμα παρέχει ακριβή αντίληψη της ιικής αναπαραγωγικής δραστηριότητας στο σύνολο του οργανισμού [51,52,356, 357].

Δείγμα εκλογής για μέτρηση ιικού φορτίου είναι ολικό αίμα που λαμβάνεται με αντιπηκτικό EDTA, ενώ αποδεκτά είναι και δείγματα που λαμβάνονται με αντιπηκτικό ACD (acid citrate dextrose) [358]. Η ηπαρίνη σαν αντιπηκτικό πρέπει να αποφεύγεται γιατί είναι αναστολέας της αντίδρασης πολυμεράσης [359] και η χρήση της μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανάκτηση και σταθερότητα ιικού RNA σε δοκιμασίες bDNA και NASBA. Ο ορός είναι ποιοτικά κατώτερος από οποιοδήποτε δείγμα με αντιπηκτικό λόγω σαφώς μειωμένης ανάκτησης RNA του HIV [360].

Οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ιικού φορτίου διακρίνονται σε δύο τύπους: ενίσχυσης σήματος και ενίσχυσης στόχου.

Στην **ενίσχυση σήματος**, πολλαπλασιάζεται το σήμα που εκπέμπει το νουκλεϊκό οξύ-στόχος με διαδοχικά βήματα υβριδισμού, παρέχοντας άμεσο ποσοτικό προσδιορισμό του αρχικού επιπέδου του στόχου. Αντίθετα, με την τεχνολογία **ενίσχυσης στόχου**, πρώτα ενισχύεται ενζυμικά το νουκλεϊκό οξύ-στόχος και στη συνέχεια τα προϊόντα της ενίσχυσης αυτής ποσοτικοποιούνται, παρέχοντας έμμεσα ένα μέτρο του αρχικού επιπέδου του στόχου.

Οι υπερευαίσθητες μέθοδοι μέτρησης ιικού φορτίου που χρησιμοποιούνται σήμερα ποσοτικοποιούν με ακρίβεια 50 αντίγραφα HIV RNA/ml.

Η ειδικότητα των μεθόδων ιικού φορτίου κυμαίνεται μεταξύ 95% και 98% [313,361]. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα (συχνότητα μέχρι 3%) οφείλονται σε υψηλό background του συστήματος ανίχνευσης σήματος ή σε επιμόλυνση των προϊόντων ενίσχυσης και μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένη διάγνωση αν χρησιμοποιηθούν ακατάλληλα [362,363]. Συνήθως, πάντως, οι τιμές στις περιπτώσεις αυτές είναι χαμηλές [364].

Πρέπει να γίνει απόλυτα σαφές ότι οι δοκιμασίες ιικού φορτίου δεν έχουν σχεδιαστεί σαν διαγνωστικές μέθοδοι για μαζικό έλεγχο ή επιβεβαίωση της λοίμωξης HIV και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αντί των ορολογικών μεθόδων που είναι ειδικές για τους σκοπούς αυτούς, έχουν ειδικότητα >99.7% και έχουν εκτενώς δοκιμαστεί σε οροαρνητικούς πληθυσμούς. Η αξιολόγηση χαμηλών θετικών τιμών (<15000 αντίγραφα/ml) σε δοκιμασίες ιικού φορτίου πρέπει να γίνεται με επιφύλαξη όταν αυτές εκτελούνται για διαγνωστικούς σκοπούς [280,365].

Μέθοδος διακλαδιζόμενου DNA (bDNA)

Είναι διαδικασία πολλαπλών υβριδισμών με τους οποίους αφενός δεσμεύεται το νουκλεϊκό οξύ-στόχος και αφετέρου πολλαπλασιάζεται το σήμα που αυτό μπορεί να εκπέμπει, ώστε να γίνει δυνατή η ανίχνευσή του (σχήμα 14).

Διπλά δείγματα 1 ml πλάσματος υπερφυγοκεντρώνται (23000xg) για να επιτευχθεί συγκέντρωση των ισωματιών. Τα ισωμάτια λύνονται με τη χρήση πρωτεολυτικών παραγόντων και απορρυπαντικών, ώστε να απελευθερωθεί το RNA του HIV.

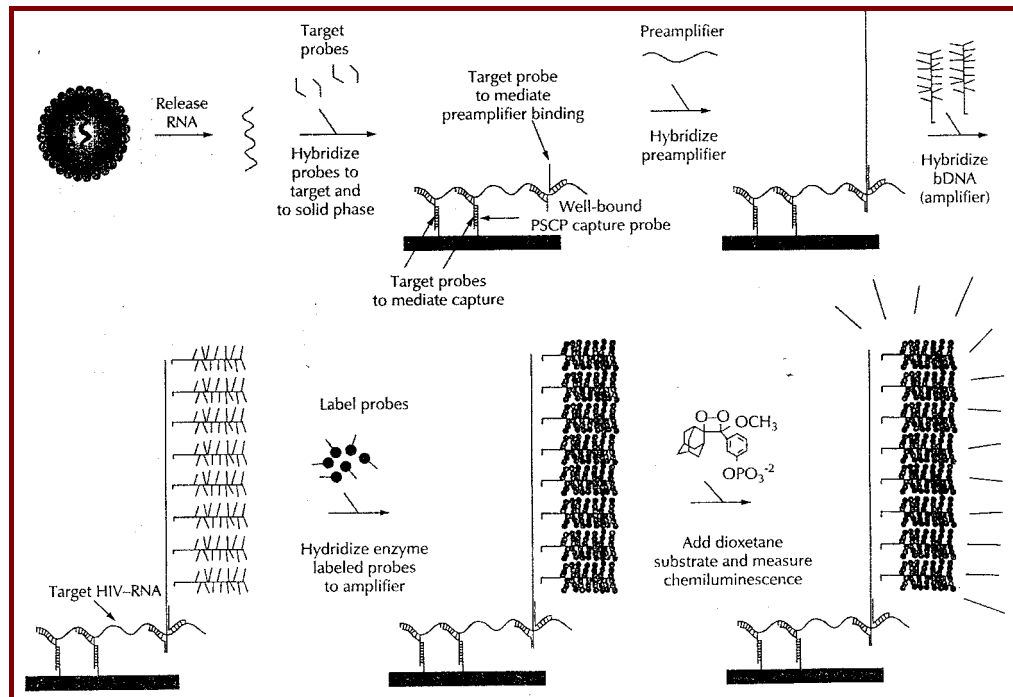
Τα δείγματα τοποθετούνται σε βοθρία μικροπλάκας 96 θέσεων επιστρωμένα με ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές δέσμευσης (capture probes). Το ιικό RNA «συλλαμβάνεται» στην επιφάνεια της μικροπλάκας με τη μεσολάβηση ανιχνευτών στόχου (target probes). Μία δεύτερη ομάδα ανιχνευτών στόχου υβριδίζεται με ένα μέρος της στο HIV RNA και με ένα άλλο σε ανιχνευτές-προπολλαπλασιαστές (preamplifier probes). Οι δύο ομάδες ανιχνευτών στόχου υβριδίζονται σε διαφορετικές

περιοχές του γονιδίου *pol* και, συνεπώς, η αντίδραση είναι πολύ ειδική μην επιτρέποντας τη σύνδεση με αλληλουχίες άλλες από το RNA-στόχο.

Οι προπολλαπλασιαστές υβριδίζονται με πολλαπλά μόρια bDNA, που είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια με 15 διακλαδώσεις. Κάθε κλαδί φέρει θέσεις πρόσδεσης ανιχνευτών συζευγμένων με αλκαλική φωσφατάση. Με την προσθήκη υποστρώματος της αλκαλικής φωσφατάσης παράγεται χημειοφωταυγές σήμα που ανιχνεύεται με λουμινόμετρο. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη με το ποσό HIV RNA που υπάρχει στο δείγμα και το οποίο υπολογίζεται από πρότυπη καμπύλη.

Το δυναμικό εύρος ανίχνευσης της μεθόδου είναι $50-500 \times 10^3$ ιικά ισοδύναμα/ml για τα αντιδραστήρια τρίτης γενιάς.

Η τεχνική bDNA είναι μέθοδος ενίσχυσης σήματος και επιτρέπει άμεσα τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού RNA. Αυτό την καθιστά ακριβέστερη από τις RT-PCR και NASBA [366-368]. Δεν υπόκειται σε κίνδυνο επιμολύνσεων και ανιχνεύει αξιόπιστα RNA των υποτύπων A-F του HIV-1. Μειονέκτημα είναι ότι απαιτεί μεγάλο όγκο δείγματος, που την καθιστά πρακτικά ανέφικτη σε ορισμένες περιπτώσεις (νεογνά, ENY).



Σχήμα 14: μέθοδος διακλαδιζόμενου DNA (bDNA)

Ποσοτική ανάστροφη μεταγραφική - PCR (RT-PCR)

Αποτελεί τεχνική ενίσχυσης στόχου και βασική αρχή της είναι η ταυτόχρονη ανάστροφη μεταγραφική και ο ποσοτικός προσδιορισμός δύο διαφορετικών αλληλουχιών παρόμοιου μήκους, με κοινές αλληλουχίες αναγνώρισης από τους εκκινητές, στο ίδιο σωληνάριο [369].

Το ιικό RNA απομονώνεται από το πλάσμα μετά από λύση των ισωματιών και μετά από καθίζηση και διαλυτοποίηση του ιζήματος, τοποθετείται σε μικροσωληνάριο για RT-PCR.

Οι εκκινητές ορίζουν αλληλουχία μέσα σε πολύ διατηρημένη περιοχή του γονιδίου *gag* και είναι σημασμένοι με βιοτίνη στο 5' άκρο τους, ώστε να είναι δυνατή η χρωμομετρική ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης.

Η ποσοτική εκτίμηση του ιϊκού RNA γίνεται με τη χρήση προτύπου ποσοτικοποίησης (QS): πρόκειται για συνθετικό RNA μόριο που περιέχει τις ίδιες θέσεις σύνδεσης εκκινητών με το RNA του HIV και παρέχει προϊόν ενίσχυσης ίδιου μήκους με το ιϊκό RNA-στόχο. Η περιοχή πρόσδεσης του ανιχνευτή έχει τροποποιηθεί, ώστε να είναι δυνατή η ανεξάρτητη ανίχνευση του προϊόντος ενίσχυσης του προτύπου στο τέλος της δοκιμασίας. Το πρότυπο ποσοτικοποίησης ενσωματώνεται σε κάθε δείγμα (μέσα στο διάλυμα λύσης) σε γνωστό αριθμό αντιγράφων, μεταφέρεται μαζί του σε όλα τα στάδια της δοκιμασίας και πολλαπλασιάζεται μαζί με το ιϊκό RNA. Τα επίπεδα του HIV RNA ενός δείγματος υπολογίζονται συγκρίνοντας το σήμα του HIV με το αντίστοιχο του προτύπου στο δείγμα αυτό. Ο μάρτυρας ποσοτικοποίησης αντισταθμίζει τυχόν ανεπάρκειες ή αναστολές κατά την απομόνωση RNA, την ανάστροφη μεταγραφή και την ενίσχυση και επιτρέπει με ακρίβεια τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA του ιού στα δείγματα.

Τα στάδια ανάστροφης μεταγραφής και PCR πραγματοποιούνται με τη χρήση ενός μόνο ενζύμου, της θερμοανθεκτικής ανασυνδυασμένης DNA πολυμεράσης του βακτηρίου *Thermus thermophilus* (*rTth pol*), που παρουσία Mn^{2+} και σε κατάλληλες ρυθμιστικές συνθήκες έχει ταυτόχρονα δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφής και DNA πολυμεράσης. Αυτό επιτρέπει την εκτέλεση των φάσεων RT-PCR μέσα στο ίδιο διάλυμα, που περιέχει το ένζυμο, τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) και τους εκκινητές.

Η θέρμανση του μείγματος σε 50-60⁰ C επιτρέπει την ειδική σύνδεση του antisense εκκινητή στο RNA του HIV-1 και του μάρτυρα ποσοτικοποίησης και η *rTth pol* (παρουσία Mn^{2+} και περίσσειας δεοξυνουκλεοτιδίων) επιμηκύνει τον συνδεδεμένο εκκινητή σχηματίζοντας μία DNA αλυσίδα (cDNA) συμπληρωματική του RNA στόχου.

Μετά την ανάστροφη μεταγραφή του ιϊκού RNA σε cDNA, θέρμανση του μείγματος της αντίδρασης σε 95⁰ C οδηγεί σε αποδιάταξη του RNA-cDNA υβριδίου και αποκάλυψη των θέσεων σύνδεσης των εκκινητών. Κατά την ψύξη του μείγματος μέχρι τους 52⁰ C ο sense εκκινητής συνδέεται ειδικά στην cDNA αλυσίδα και, καθώς η *rTth pol* επιμηκύνει τον εκκινητή, συντίθεται δεύτερη αλυσίδα DNA (72⁰ C) και έτσι ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της PCR με την απόδοση ενός dsDNA αντιγράφου της περιοχής που ενδιαφέρει και που ονομάζεται amplicon. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για καθορισμένο αριθμό κύκλων, που καθένας καταλήγει σε διπλασιασμό της ποσότητας του amplicon DNA, χωρίς να ενισχύεται ολόκληρο το γονιδίωμα του HIV-1.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR, τα προϊόντα της αντίδρασης (δύο amplicons) αποδιατάσσονται σε ssDNA. Διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος τοποθετούνται σε βοθρία μικροπλάκας 96 θέσεων καλυμμένα με ανιχνευτές ειδικούς για τον HIV ή το πρότυπο ποσοτικοποίησης, οπότε τα amplicons του HIV και του μάρτυρα δεσμεύονται στα αντίστοιχα βοθρία με υβριδισμό. Μετά από πλύση για την απομάκρυνση μη δεσμευμένου υλικού, προστίθεται σύζευγμα αβιδίνης-υπεροξειδάσης το οποίο συνδέεται στο σημασμένο με βιοτίνη amplicon που έχει υβριδιστεί με τον ειδικό ανιχνευτή. Μετά από δεύτερη πλύση ακολουθεί προσθήκη υποστρώματος που οξειδώνεται από την υπεροξειδάση σε έγχρωμο προϊόν. Η αντίδραση σταματά με ασθενές οξύ και μετρείται η οπτική πυκνότητα (OD) στα 450 nm.

Το ποσό του ιϊκού RNA σε κάθε δείγμα υπολογίζεται με μαθηματικό τύπο που λαμβάνει υπόψη την OD του HIV, την αραιώση, την OD του προτύπου ποσοτικοποίησης και τον αριθμό αντιγράφων του στο δείγμα.

Το εύρος ανίχνευσης της μεθόδου είναι 400-750x10³ αντίγραφα/ml για την κλασσική τεχνική και 50-750x10³ αντίγραφα/ml για την υπερευαίσθητη παραλλαγή της.

Πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ο μειωμένος κίνδυνος επιμολύνσεων με τη χρήση του ενζύμου UNG (uracil-N-glycosylase). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου

με στελέχη της ομάδας O δεν είναι εξακριβωμένη, ενώ αναφέρεται και πρόβλημα στην ισοδύναμη αναγνώριση ορισμένων υποτύπων, κυρίως του A.

Ποσοτική Ανταγωνιστική PCR (QC- PCR)

Είναι μία παραλλαγή της RT-PCR που αναπτύχθηκε για να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα προσαρμογής των δοκιμασιών PCR σε ποσοτικοποίηση [370, 371]. Ένα συνθετικό RNA μόριο-ανταγωνιστής ταυτόσημο με το στόχο που ενδιαφέρει, εκτός από μία απάλειψη, ποσοτικοποιείται μαζί με το HIV RNA του δείγματος, παρέχοντας ένα είδος «εσωτερικού» μάρτυρα. Αραιώσεις γνωστού αριθμού αντιγράφων του ανταγωνιστή (τουλάχιστον 4) προστίθενται σε όμοια δείγματα του υπό εξέταση πλάσματος και η ποσοτικοποίηση καθορίζεται από τα σχετικά ποσά των προϊόντων ενίσχυσης που προέρχονται από το δείγμα του ασθενούς και από το RNA-ανταγωνιστή. Επιτυγχάνεται έτσι αυξημένος έλεγχος των επιδράσεων που έχει στην ποσοτικοποίηση η αποτελεσματικότητα της απομόνωσης RNA, της ανάστροφης μεταγραφής και της ενίσχυσης κατά την αντίδραση της PCR. Επιπλέον, μπορεί να ελεγχθεί η ασταθής παρουσία αναστολέων της PCR που βρίσκονται σε δείγματα.

Η τεχνική έχει μεγάλη επαναληψιμότητα και έχει βοηθήσει ιδιαίτερα στην κατανόηση της φυσικής ιστορίας της λοίμωξης HIV, επειδή όμως είναι επίπονη και χρονοβόρα δεν χρησιμοποιείται ευρέως παρά μόνο σε εξειδικευμένα ερευνητικά εργαστήρια.

Μέθοδος άμεσου πολλαπλασιασμού του νουκλεϊκού οξέος-στόχου (NASBA)

Η NASBA είναι μία ακόμα μέθοδος ενίσχυσης στόχου [372]. Η τεχνολογία της επιτρέπει άμεσα την ενίσχυση αλληλουχιών ssRNA και η ενίσχυση αυτή γίνεται σε μία θερμοκρασία (41⁰ C), είναι δηλαδή ισοθερμική (σχήμα 15).

Νουκλεϊκά οξέα απομονώνονται από το πλάσμα και δεσμεύονται από σφαιρίδια οξινισμένου πυριτίου. Μετά από πλύσεις των σφαιριδίων και ξήρανση στους 56⁰ C γίνεται έκλυση των νουκλεϊκών οξέων με H₂O.

Το μείγμα αντίδρασης της NASBA περιλαμβάνει T7 RNA πολυμεράση, RNάση H και AMV (avian myeloblastosis virus) - RT, τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, δύο εκκινητές και κατάλληλους ρυθμιστικούς παράγοντες. Ο ένας εκκινητής (1) φέρει στο 5' άκρο του αλληλουχία-επαγωγέα που αναγνωρίζεται από την T7 RNA πολυμεράση, ενώ τμήμα του 3' άκρου του είναι συμπληρωματικό του 3' άκρου της αλληλουχίας στόχου. Ο δεύτερος εκκινητής (2) είναι μικρότερου μήκους και συμπληρωματικός του 5' άκρου της αλληλουχίας στόχου.

Κατά την καλούμενη «μη κυκλική» φάση της NASBA ο εκκινητής 1 υβριδίζεται στην αλληλουχία-στόχο και η AMV-RT χρησιμοποιεί τα διαθέσιμα δεοξυνουκλεοτίδια για να επιμηκύνει το 3' άκρο του εκκινητή σχηματίζοντας ένα antisense cDNA αντίγραφο του RNA εκμαγείου. Δημιουργείται έτσι ένα RNA-DNA υβρίδιο, του οποίου την RNA αλυσίδα υδρολύει η RNάση H, αφήνοντας μία μονή αλυσίδα DNA στην οποία συνδέεται ο εκκινητής 2. Η AMV-RT, με τη δράση της σαν DNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης, συνθέτει τη δεύτερη αλυσίδα sense DNA, κάνοντας δίκλωνο (και, άρα, μεταγραφικά ενεργό) το τμήμα του επαγωγέα. Η T7 RNA πολυμεράση μεταγράφει RNA αντίγραφα από τον επαγωγέα, παρέχοντας μέχρι και 100 αντίγραφα από κάθε μόριο υποστρώματος.

Κάθε νέο RNA μόριο είναι τώρα διαθέσιμο σαν εκμαγείο για την RT στην καλούμενη «κυκλική» φάση της NASBA. Σ' αυτήν ο εκκινητής 2 συνδέεται πρώτος με το υπόστρωμα και με τη δράση της RT επιμηκύνεται, δίνοντας γένεση σε ένα RNA-DNA υβρίδιο, όπως και προηγούμενα. Η RNάση H υδρολύει την RNA αλυσίδα, ο εκκινητής 1 συνδέεται στο μονόκλωνο DNA και η RT συνθέτει DNA, δημιουργώντας και πάλι έναν μεταγραφικά ενεργό επαγωγέα.

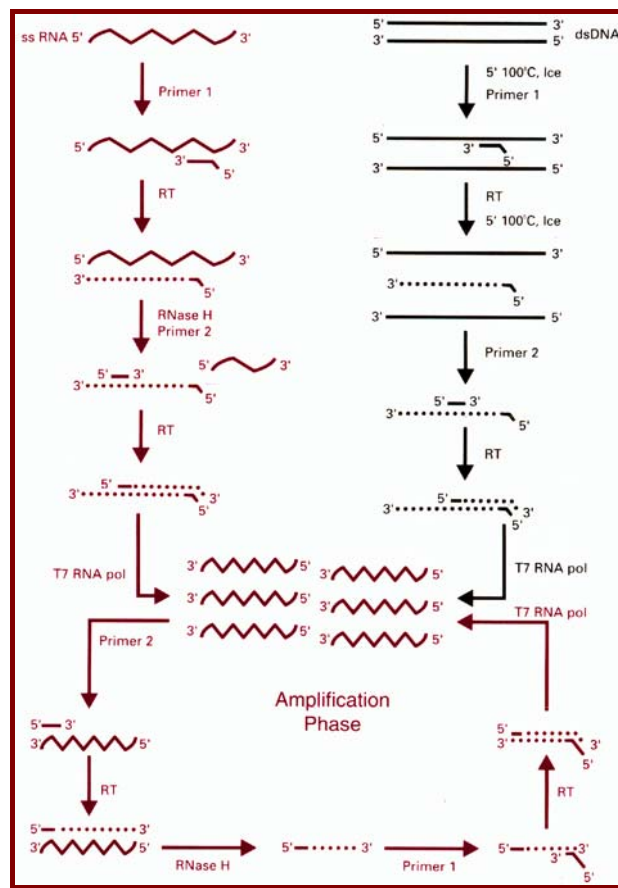
Στο τέλος της αντίδρασης συσσωρεύεται μεγάλο ποσό μονόκλωνου RNA και μικρά ποσά RNA-DNA υβριδίων και δίκλωνου DNA.

Αν η αντίδραση ξεκινήσει με DNA σαν υπόστρωμα (αντί RNA), απαιτούνται δύο βήματα θερμικής αποδιάταξης για να σχηματιστούν μονόκλινα DNA ενδιάμεσα, στα οποία θα προσδεθούν οι εκκινητές.

Και στη NASBA η ποσοτική μέτρηση του RNA βασίζεται στον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό εσωτερικών διακριτών RNA μορίων γνωστής συγκέντρωσης (Q-RNAs: Q_A, Q_B, Q_C). Τα συνθετικά αυτά μόρια προστίθενται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις [10⁴, 10³, 10² μόρια, αντίστοιχα] σε κάθε δείγμα (πριν την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος) και πολλαπλασιάζονται ταυτόχρονα με αυτό. Τα Q-RNAs διαφέρουν από το HIV RNA-στόχο σε λίγες βάσεις. Τα τέσσερα προϊόντα ενίσχυσης ανιχνεύονται ξεχωριστά με τη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων σημασμένων κατάλληλα για ηλεκτροχρημιοφωταύγεια. Το αρχικό ποσό του HIV RNA στο δείγμα υπολογίζεται από το λόγο του σήματος του ιϊκού RNA προς το σήμα των Q-RNAs. Εναλλακτικά, η ανίχνευση των ενισχυμένων RNAs μπορεί να γίνει με ELGA (enzyme linked gel assay).

Το εύρος ανίχνευσης της μεθόδου είναι 400-10⁷ αντίγραφα/ml.

Μειονεκτήματα είναι ο υπαρκτός κίνδυνος επιμολύνσεων και οι δυσκολίες στην ισοδύναμη αναγνώριση των υποτύπων του HIV-1.



Σχήμα 15: Μέθοδος άμεσου πολλαπλασιασμού του νουκλεϊκού οξέος-στόχου (NASBA)

Πολλά υποσχόμενη καινοτομία αποτελεί η **real-time PCR**, μία τροποποίηση της ποσοτικής PCR, στην οποία η συσσώρευση του προϊόντος της αντίδρασης μετρείται κινητικά [373]. Η ανίχνευση των προϊόντων επιτυγχάνεται μετά από κάθε κύκλο με φθορίζουσα ουσία που ενσωματώνεται στο προϊόν της PCR κατά τη διάρκεια της

αντίδρασης. Τα δεδομένα μεταφέρονται σε υπολογιστή και εμφανίζονται στην οθόνη, επιτρέποντας την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο.

Στον πίνακα που ακολουθεί περιγράφονται συνοπτικά οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες διαγνωστικές δοκιμασίες για τον έλεγχο λοίμωξης HIV.

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	ΣΧΟΛΙΑ
ELISA	Μαζικός πρωτογενής έλεγχος.	Ευαισθησία και ειδικότητα >99,2%. Αρνητική στη διάρκεια του «ορολογικού παραθύρου». Αδυναμία ταυτοποίησης αντισωμάτων.
«Ταχείες»	Ενημέρωση ατόμου αυθημερόν. Επείγουσα διάγνωση.	Ευαισθησία και ειδικότητα >99%. Σε θετικό αποτέλεσμα συνιστάται έλεγχος με κλασική ELISA και WB..
Western blot (WB)	Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη επιβεβαιωτική δοκιμασία.	Ευαισθησία 100%. Ειδικότητα 97,8%. 4-20% των θετικών με ELISA ορών δίνουν αδιευκρίνιστα αποτελέσματα.
RIPA	Επιβεβαιωτική μέθοδος. Ανίχνευση χαμηλών τίτλων αντισώματος και διαλεύκανση αδιευκρίνιστων WB.	Χρήση ραδιοισότοπων και μολυσμένων με HIV κυτταροκαλλιέργειών.
IFA	Επιβεβαιωτική μέθοδος. Ανίχνευση IgM αντισωμάτων και διαλεύκανση αδιευκρίνιστων WB.	Ευαισθησία και ειδικότητα ≥ από το WB. Απαιτήση ειδικού μικροσκοπίου. Υποκειμενικότητα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.
Συνθετικά πεπτιδία (LIA)	Επιβεβαιωτική μέθοδος.	Ευαισθησία και ειδικότητα παρόμοιες με του WB. Μικρότερο ποσοστό (από το WB) αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων.
Αντιγόνο p24	Διαγνωστική βοήθεια (πρόσφατη μόλυνση, έλεγχος νεογνών, πορεία νόσου?).	Έλλειψη ευαισθησίας. Ανίχνευση αντιγόνου σε ENY και υπερκείμενα καλλιέργειών.
Καλλιέργεια ιού	Διαγνωστική βοήθεια (πρόσφατη μόλυνση, αδιευκρίνιστα WB).	Υψηλή ειδικότητα, κυμαινόμενη και χαμηλή ευαισθησία (ανάλογα με το στάδιο της νόσου). Τεχνικά περίπλοκη.
PCR	Διαγνωστική βοήθεια (πρόσφατη μόλυνση, αδιευκρίνιστα WB, έλεγχος νεογνών).	Τεχνικά περίπλοκες. Κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (επιμόλυνση).
βDNA	Παρακολούθηση πορείας νόσου και θεραπείας.	Αδυναμία στην ισοδύναμη αναγνώριση των υποτύπων του ιού.
NASBA	Διαπίστωση ανθεκτικών σε αντι-ϊικά φάρμακα στελεχών HIV.	

5. Εκτίμηση ανοσολογικής λειτουργίας

Η μακρά διάρκεια του ασυμπτωματικού σταδίου στη HIV λοίμωξη (7-11 χρόνια) καθιστά απαραίτητη τη μέτρηση βασικών ανοσολογικών παραμέτρων, που έχουν προγνωστική αξία για την κλινική πορεία της νόσου και βοηθούν στη λήψη αποφάσεων για την έγκαιρη έναρξη αντι-ϊικής θεραπείας και χημειοπροφύλαξης έναντι ευκαιριακών λοιμώξεων. Ποικιλία παραμέτρων που έχουν κατά καιρούς προταθεί σαν προγνωστικοί δείκτες (διαλυτό CD8, IgA, ιντερφερόνη-α, διαλυτό CD16, TNFα, αντιγόνο και αντίσωμα gp120) δεν έχουν αξιολογηθεί επαρκώς σε συγκριτικές κλινικές μελέτες και ο μελλοντικός τους ρόλος παραμένει αβέβαιος.

Σε προοπτικές μελέτες βρέθηκαν να έχουν προγνωστική σημασία για την πορεία της λοίμωξης από HIV οι παρακάτω δείκτες [374,375]:

Η μέτρηση του αριθμού των **CD4+ Τ λεμφοκυττάρων** είναι ο βασικότερος προγνωστικός δείκτης της πορείας της νόσου, με παγκόσμια εφαρμογή [376]. Συσχετίζεται ισχυρά με τα στάδια της νόσου, έχει συμπεριληφθεί στον ορισμό του AIDS από το 1993 και έχει χρησιμοποιηθεί στις ενδείξεις για θεραπεία. Η βαρύτητα της ελάττωσης των CD4 κυττάρων μπορεί να εκτιμηθεί με την εκατοστιαία αναλογία τους, τον απόλυτο αριθμό τους ή το λόγο CD4/CD8: οι μετρήσεις συσχετίζονται μεταξύ τους και όλες έχουν προγνωστική σημασία. Ο αριθμός των CD4 κυττάρων παρουσιάζει διακυμάνσεις οφειλόμενες σε ημερήσιο ρυθμό [377] (διαφορές μέχρι 150-300 κύτταρα/mm³ μεταξύ ημέρας και νύκτας σε φυσιολογικά άτομα), σε stress και σε διάφορες λοιμώξεις. Μέθοδος εκλογής για τη μέτρηση των CD4+ κυττάρων είναι η κυτταρομετρία ροής [378].

Η παρουσία ανιχνεύσιμου **αντιγόνου p24** στον ορό HIV-θετικών ατόμων αντανακλά τον ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό και υποδηλώνει αυξημένη ιϊκή παραγωγή. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αντιγοναιμία παρατηρείται (κύρια) στην πρωτογενή μόλυνση πριν την εμφάνιση αντισωματικής απάντησης και σε τελικά στάδια της νόσου. Δεν είναι σαφές αν χαμηλός τίτλος p24 σημαίνει ελαττωμένη σύνθεση της πρωτεΐνης του ιού ή οφείλεται σε σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων με το αντίστοιχο αντίσωμα. Η επιμονή ή η επανεμφάνιση αντιγοναιμίας συσχετίζεται με ταχύτερη εξέλιξη της λοίμωξης και έχει χρησιμοποιηθεί σαν κριτήριο αποτελεσματικότητας της αντι-ιϊκής αγωγής, δεν αποτελεί όμως ευαίσθητο δείκτη και από πολλούς αμφισβητείται η κλινική της σημασία [379].

Η **νεοπερίνη** (6-D-ερυθρο-τριϋδροξυπροπυλπερίνη) είναι χαμηλού μοριακού βάρους πυραζινοπυριμιδινικό παράγωγο του μεταβολισμού της τριφωσφορικής γουανοσίνης και η αυξημένη παραγωγή της αντανακλά την κυτταρική ενεργοποίηση. Παράγεται κύρια από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα μετά την διέγερσή τους από IFN- γ , που εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα Τ λεμφοκύτταρα. Τα επίπεδα της στον ορό και τα ούρα φαίνεται να συσχετίζονται με το στάδιο της νόσου και με την πορεία της HIV λοίμωξης, ανεξάρτητα από τον αριθμό των CD4+ λεμφοκυττάρων [380]. Ο λόγος του απόλυτου αριθμού CD4+ κυττάρων/νεοπερίνη έχει επίσης προταθεί σαν δείκτης παρακολούθησης των ασθενών [381]. Δεν αποτελεί, πάντως, ειδικό δείκτη για την HIV λοίμωξη.

Η **β 2-μικροσφαιρίνη** είναι πεπτιδίο (11 kD) που αποτελεί την ελαφρά άλυσσο των μορίων τάξης I του MHC και βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των εμπύρηνων κυττάρων. Η παραγωγή της ελέγχεται από την IFN- γ , που επάγει την έκφραση των μορίων τάξης I του MHC. Τα επίπεδα της στον ορό αυξάνονται σε καταστάσεις που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό-ενεργοποίηση των μονοπύρηνων κυττάρων και/ή κυτταρική καταστροφή και αντανακλούν το ρυθμό ανακύκλωσης των λεμφοκυττάρων. Αύξηση των επιπέδων της (>3 mg/l) θεωρείται προγνωστικός δείκτης της εξέλιξης της HIV λοίμωξης, ανεξάρτητος του αριθμού των CD4+ λεμφοκυττάρων [382,383]. Στερείται όμως ειδικότητας και αμφισβητείται η κλινική χρησιμότητά της.

Τα ενεργοποιημένα μονοπύρηνια κύτταρα εκκρίνουν μία διαλυτή μορφή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2 (sIL-2R). Αυξημένα επίπεδα **sIL-2R** στον ορό έχουν περιγραφεί σε διάφορες νόσους, μεταξύ των οποίων και η λοίμωξη από HIV, χωρίς να έχει εξακριβωθεί η κυτταρική του προέλευση (πιθανολογείται η απελευθέρωσή του είτε από ενεργοποιημένα Τ κύτταρα είτε από διεγερμένα μακροφάγα ή και Β λεμφοκύτταρα). Υποστηρίζεται ότι η αύξηση του sIL-2R στον ορό εμφανίζει ισχυρή θετική συσχέτιση με το στάδιο της νόσου, ενώ συσχετίζεται αρνητικά με τον αριθμό των CD4+ κυττάρων [384,385].

Πρόσφατα άρχισαν να χρησιμοποιούνται σαν πιο ευαίσθητες παράμετροι πρόβλεψης της εξέλιξης της νόσου (προγνωστικοί δείκτες 2^{ης} γενιάς):

Ορισμένοι **δείκτες ενεργοποίησης των T κυττάρων**. Η ανάλυση των μορίων επιφανείας CD45RA και CD29/CD45RO, που χαρακτηρίζουν τα παρθένα και τα μνημονικά CD4 κύτταρα, αντίστοιχα, απέδειξε ότι τα μνημονικά κύτταρα ελαττώνονται πρώιμα, ενώ τα παρθένα σε προχωρημένα στάδια της HIV λοίμωξης.

Στα ασυμπτωματικά στάδια της νόσου παρατηρείται πρώιμη αύξηση των CD8+HLA-DR+ κυττάρων, ενώ στα τελικά στάδια είναι χαρακτηριστική η αύξηση των CD8+CD38+.

Η αύξηση του υποπληθυσμού CD8+CD45RO+CD38+ των ενεργοποιημένων μνημονικών CD8 κυττάρων φαίνεται να ακολουθεί την εξέλιξη της λοίμωξης σε AIDS [386].

Ο υποπληθυσμός CD8+CD28+ φαίνεται να παραμένει αυξημένος σε οροθετικά άτομα με μακρά επιβίωση, ενώ μειώνεται κατά την εξέλιξη προς νόσο.

Λειτουργικές δοκιμασίες των T λεμφοκυττάρων. Η βλαστική μεταμόρφωση των λεμφοκυττάρων σε απάντηση σε μη ειδικά μιτογόνα και αλλοαντιγόνα συνήθως διατηρείται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης HIV, ενώ η απάντηση σε ειδικά αναμνηστικά αντιγόνα είναι έντονα μειωμένη ή ανύπαρκτη από πολύ νωρίς [387, 388]. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί μετρήσεις της κυτταροτοξικότητας των T λεμφοκυττάρων. Οι μέθοδοι αυτές είναι χρονοβόρες και δαπανηρές σε σύγκριση με την φαινοτυπική ανάλυση και δεν προσφέρουν ιδιαίτερη βοήθεια στον κλινικό χειρισμό των ασθενών.

Από πολυπαραγοντικές μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι ο συνδυασμός επιπέδων **HIV RNA (ϊικό φορτίο)** και αριθμού **CD4+ T λεμφοκυττάρων**, που αντικατοπτρίζουν την έκταση αναδιπλασιασμού του ιού και την ανοσολογική κατάσταση του ατόμου, αντίστοιχα, είναι οι πλέον αξιόπιστοι ανεξάρτητοι δείκτες της πορείας της νόσου και της θεραπείας της [389-391].

Προβλήματα κατά τη διάγνωση της λοίμωξης HIV

Η διάγνωση της μόλυνσης από HIV-1 και -2 βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων στον ορό έναντι των ιών, με ορολογικές μεθόδους. Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA χρησιμοποιείται για τον πρωτογενή μαζικό έλεγχο δειγμάτων, ενώ το Western blot (WB) έχει αναδειχθεί σαν μέθοδος εκλογής για τον επιβεβαιωτικό έλεγχο. Για τα άτομα που μολύνονται από HIV, το χρονικό διάστημα από την επαφή με τον ιό μέχρι την ανάπτυξη ανιχνεύσιμου αντισώματος είναι άγνωστο. Η περίοδος αυτή κατά την οποία το άτομο είναι μολυσμένο (και δυνητικά μολυσματικό) αλλά οροαρνητικό για αντι-HIV αντισώματα ονομάζεται «ορολογικό παράθυρο». Η κρισιμότητα του συγκεκριμένου διαστήματος αποδεικνύεται από το γεγονός ότι πρακτικά όλες οι περιπτώσεις μετάδοσης HIV με αίμα και παράγωγα ή με μεταμόσχευση οργάνων/ιστών που έχουν υποστεί έλεγχο για αντι-HIV αντισώματα, ήταν αποτέλεσμα αιμοδοσίας από πρόσφατα μολυσμένα άτομα κατά την περίοδο αυτή [392, 393].

Το ορολογικό παράθυρο υπολογίζεται ότι έχει μέση διάρκεια μέχρι 45 ημέρες [393], ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των μολυσμένων ατόμων αναπτύσσουν αντι-HIV αντισώματα μέσα σε έξι μήνες από την έκθεση στον ιό [394]. Η ανίχνευση αντιγόνου p24 και μοριακές τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιούνται στη προσπάθεια μείωσης της διάρκειας του ορολογικού παραθύρου.

Στην πράξη διαπιστώνονται μερικές φορές οριακά αποτελέσματα στον πρωτογενή έλεγχο, που αφενός δυσκολεύουν την απόφαση για την καταλληλότητα του αίματος και αφετέρου δημιουργούν προβλήματα στην ενημέρωση του αιμοδότη.

Σοβαρό πρόβλημα διάγνωσης μπορεί να προκύψει όταν στην ELISA παρατηρούνται θετικές τιμές σε άτομα που δεν αναφέρουν παράγοντες κινδύνου για HIV λοίμωξη. Αν και αυτές οι περιπτώσεις συχνά χαρακτηρίζονται σαν ψευδώς θετικές, ο έλεγχος με Western blot αποκαλύπτει μερικές φορές την παρουσία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του ιού (συνήθως αντι-gag ή/και αντι-pol), χωρίς όμως να πληρούνται τα κριτήρια θετικότητας της μεθόδου. Το σχήμα αυτό (θετική/οριακή τιμή ELISA, αντι-gag/pol αντίδραση στο Western blot) μπορεί να υποδηλώνει αρχικά στάδια μόλυνσης από HIV [395], ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι η *gag-pol* περιοχή του ιού είναι ιδιαίτερα διατηρημένη κατά τη φυλογενετική εξέλιξη των ιών HIV. Παρατηρείται όμως, για άγνωστους λόγους, και σε μη μολυσμένα από HIV άτομα. Τέτοια άτομα χαρακτηρίζονται σαν αμφίβολα για μόλυνση από HIV και η εικόνα αυτή του Western blot σαν αδιευκρίνιστη.

Η διάρκεια του ορολογικού παραθύρου και η δυνατότητα απόδειξης HIV λοίμωξης με ερευνητικές μεθόδους ποικίλο διάστημα πριν την εμφανή ορομετατροπή (με όλες τις συνέπειες που αυτό θα μπορούσε να έχει) αποτελεί πεδίο αντικρουόμενων απόψεων στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε κάποιες περιπτώσεις ασυμπτωματικών οροαρνητικών ατόμων, έχει απομονωθεί HIV με καλλιέργεια ή έχουν αποκαλυφθεί ενσωματωμένες ιϊκές αλληλουχίες στο DNA των κυττάρων τους [396-401]. Άλλες ερευνητικές ομάδες, όμως, απέτυχαν να ανιχνεύσουν ιϊκές αλληλουχίες σε κύτταρα οροαρνητικών ατόμων σε κίνδυνο για HIV λοίμωξη [402].

Οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες μελέτες ασχολήθηκαν με άτομα που ανήκαν σε ομάδες υψηλού κινδύνου για HIV λοίμωξη. Η σημασία του αδιευκρίνιστου Western blot σε άτομα χωρίς αναγνωρίσιμους παράγοντες κινδύνου για HIV λοίμωξη, όπως είναι οι περισσότεροι αιμοδότες, παραμένει αμφιλεγόμενη.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου κατά τη διάρκεια του μαζικού πρωτογενούς ελέγχου για HIV, αναγνωρίστηκαν άτομα που έδιναν κατ' επανάληψη θετική/οριακή τιμή με ELISA. Η ανάλυση με Western blot αποκάλυψε σε κάποια από αυτά εικόνα αδιευκρίνιστη (παρουσία, κύρια, αντι-gag αντισωμάτων) που διατηρήθηκε αναλλοίωτη για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Τέθηκε λοιπόν το ερώτημα αν τα άτομα αυτά είναι όντως μολυσμένα με HIV-1 ή -2. Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε για να συγκεντρωθούν στοιχεία υπέρ ή κατά της πιθανότητας αυτής, χρησιμοποιώντας ανοσολογικές, ιολογικές και μοριακές προσεγγίσεις. Στην περίπτωση που οι ενδείξεις θα κατεύθυναν προς λανθάνουσα/εκτροπική μόλυνση από HIV, δεύτερος στόχος της μελέτης θα ήταν η προσπάθεια απομόνωσης και χαρακτηρισμού του ιού με τον οποίο τα προαναφερθέντα άτομα είναι μολυσμένα, ώστε να διευκρινιστεί αν πρόκειται για μεταλλαγμένο στέλεχος HIV ή κάποιον συγγενικό ιό.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΟ

Ασθενείς

Στο διάστημα 1986-1990 ελέγχθηκαν για λοίμωξη HIV στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου περίπου 67000 άτομα, που ήταν αιμοδότες, έγκυοι που προσήλθαν για προγεννητικό έλεγχο, εσωτερικοί ασθενείς, αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς της μονάδας τεχνητού νεφρού και εξωτερικοί ασθενείς.

Σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο που συμπληρώθηκε κανένας από τους αιμοδότες και τους αιμοκαθαιρόμενους δεν ανέφερε γνωστούς παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη HIV, όπως ομοφυλοφιλία ή αμφιφυλοφιλία, χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών ή προηγούμενες μεταγγίσεις (εκτός από 18 αιμοκαθαιρόμενους που είχαν λάβει μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων).

Ο πρωτογενής έλεγχος για μόλυνση από HIV-1 έγινε με δύο ανοσοενζυμικές μεθόδους: Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, ΗΠΑ) και Pasteur Diagnostics (Paris, Γαλλία). Ορολογικός έλεγχος για μόλυνση από HIV-2 έγινε χρησιμοποιώντας ELISA της Pasteur. Στην αρχή της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ELISAs πρώτης γενιάς, που σταδιακά αντικαταστάθηκαν από τα δεύτερης γενιάς αντιδραστήρια.

Όλοι οι οροί με θετικό ή οριακό αποτέλεσμα στην ELISA, ανεξάρτητα από το αντιδραστήριο, ελέγχθηκαν περαιτέρω με Western blot πρώτης γενιάς για HIV-1 και HIV-2 (LAV Blot-1 και -2, Pasteur Diagnostics) που ανιχνεύουν αντισώματα έναντι αποδιαταγμένων πρωτεϊνών των ιών.

Πενήντα οροί βρέθηκαν να εμφανίζουν κατ' επανάληψη θετική ή οριακή τιμή με μία τουλάχιστον από τις μεθόδους μαζικού ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν. Η ανάλυση με Western blot αποκάλυψε την παρουσία αντι-HIV αντισωμάτων, κύρια έναντι των πρωτεϊνών Gag, που δεν πληρούσαν τα κριτήρια θετικού ή αρνητικού αποτελέσματος. Οι οροί αυτοί χαρακτηρίστηκαν σαν «αδιευκρίνιστοι» και οι αντίστοιχες μονάδες αίματος καταστράφηκαν.

Τα ανωτέρω 50 άτομα αποτέλεσαν το αρχικό υλικό της παρούσας μελέτης, στην οποία συμμετείχαν και οι ερωτικοί σύντροφοι ορισμένων από τα εξεταζόμενα άτομα που δέχτηκαν να προσέλθουν για έλεγχο.

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αιμοδότες οροαρνητικοί για VDRL, HBsAg και HIV. Σαν θετικοί μάρτυρες, κυτταρικές σειρές μολυσμένες με HIV και φορείς και ασθενείς με λοίμωξη HIV (επιβεβαιωμένη με ELISA και Western blot).

Χημικά αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό

Τα κοινά χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τους οίκους Sigma Chemicals (St. Louis, MO, ΗΠΑ), Mallinckrodt (St. Louis, MO, ΗΠΑ), Merck (Hohenbrunn, Γερμανία), Serva (Heidelberg, Γερμανία), Gibco Inc (Grand Island, N.Y., ΗΠΑ).

Υλικά απομόνωσης και αύξησης κυττάρων

Το υλικό απομόνωσης λεμφοκυττάρων Ficoll-Paque Lymphocyte separation medium ήταν από την Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Σουηδία).

Το θρεπτικό υγρό Hanks' balanced salt solution (HBSS), το διάλυμα πυροσταφυλικού νατρίου και το PBS ήταν της Gibco Inc (Grand Island, N.Y., ΗΠΑ).

Το θρεπτικό μέσο RPMI-1640, ο ορός εμβρύου βοός (FCS), τα διαλύματα L-γλουταμίνης και αντιβιοτικών (πενικιλίνης, στρεπτομυκίνης) ήταν της Flow Lab. (Irvine, Σκωτία).

Η φυτοαιμοσυγκολλητίνη-P (PHA-P) ήταν της Difco Labs (St. Louis, MO, ΗΠΑ), η ανασυνδυασμένη IL-2 της Cetus (Rotterdam, Ολλανδία) και το PMA (phorbol myristate acetate) της Boehringer Mannheim (Mannheim, Γερμανία).

Ο πολυκλωνικός ορός έναντι της ιντερφερόνης-α (saif) ήταν από την Boehringer Mannheim και η βρωμιούχος εξαδιμεθρίνη (polybrene) από τη Sigma Chemicals.

Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκαν η λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310 και η προμονοκυτταρική σειρά U937.

Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα IOT3 (αντι-CD3), IOT4 (αντι-CD4), IOT8 (αντι-CD8) της Immunotech (Luminy, Γαλλία) και τα αντι-p24 και αντι-grp120 της Du Pont (Wilmington, DE, ΗΠΑ).

Οι προσημασμένες με FITC F(ab)₂ IgG κατσίκας έναντι ποντικού ήταν της Immunotech και της Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, ΗΠΑ.

Υλικά για την ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης

Η διθειοτριτόλη (DTT) και το oligo (dT)₁₂₋₁₈ ήταν από τη Sigma, το poly rA εκμαγείο για το ένζυμο και το DNA από σπέρμα ρέγγας από την Boehringer.

Το υγρό σπινθηρισμού ήταν από την Amersham (Buckinghamshire, Αγγλία).

Ένζυμα

Η πρωτεΐνάση K ήταν της Boehringer.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν και τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα (*Bgl*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I και *Pvu*II) ήταν από τη Pharmacia-LKB.

Η DNA-πολυμεράση I (τμήμα Klenow) ήταν της Pharmacia.

Η ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση ήταν της Perkin Elmer-Cetus (Foster City, CA, ΗΠΑ)

Η T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση ήταν από τη Pharmacia.

Ηλεκτροφορήσεις

Η αгарόζη ήταν από την Sigma.

Η ακρυλαμίδη ultra pure και το υπερθειικό αμμώνιο ήταν της Gibco, η δισ-ακρυλαμίδη της Pharmacia και το TEMED της Sigma.

Μεμβράνες πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης

Χρησιμοποιήθηκαν οι GeneScreen Plus της NEN-Du Pont (Boston, ΗΠΑ) και Hybond N της Amersham (Buckinghamshire, Αγγλία).

Ραδιοϊσότοπα

Η τριτιωμένη θυμιδίνη (^3H -TTP) ήταν της Amersham.

Τα διαλύματα των σημασμένων με ^{32}P σε α-θέση dATP και dCTP και το γ - ^{32}P -ATP, ήταν της NEN-Du Pont.

Ολιγονουκλεοτίδια

Τα μη ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια dGTP και dTTP και τα εξανουκλεοτίδια ήταν από τη Pharmacia-LKB (Uppsala, Σουηδία).

Τα εκκινητικά μόρια και οι ανιχνευτές για την PCR ήταν της Genset (Paris, Γαλλία).

Πρότυπα μοριακών βαρών

Οι μάρτυρες μοριακών βαρών λ *Hind*III/*Eco*RI, φX174*Hae*III, pBR328*Bgl*II/*Hinf*I ήταν από την NEN-Du Pont.

Υλικά υβριδοποίησης-αυτοραδιογραφίας

Η Sephadex G-50 ήταν της Pharmacia-LKB.

Η BSA (bovine serum albumin) ήταν από την Gibco.

Τα φωτογραφικά φιλμ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα X-Omat AR της Kodak (Rochester, ΗΠΑ).

Γενωμικοί κλώνοι

Οι γενωμικοί κλώνοι HXB2 του HIV-1 και ROD1.12 του HIV-2 σε όχημα κλωνοποίησης pUC18 ήταν προσφορά των F. Barre-Sinoussi και J. C. Chermann από το Ινστιτούτο Pasteur στο Παρίσι.

Πλαστικά

Τα πλαστικά σωληνάρια με κωνικό πυθμένα, τα τρυβλία Petri και οι καλλιεργητικές φλάσκες ήταν της Corning.

Τα φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.22 και 0.45 μm ήταν της Millipore Corporation, (Bedford, Mass, ΗΠΑ).

Συσκευές

Κλίβανος υγρός για κυτταροκαλλιέργειες της Forma Scientific.

Υπερφυγόκεντρος και ρότορες Sorvall RC28F της Du Pont.

Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και ηλεκτρομεταφοράς DNA από την LKB.

Συσκευή slot blot από την Bio-Rad.

Τράπεζα UV της Vilber Lurmat.

Μετρητής β-ακτινοβολίας MINAXIB (Packard, Canberra, Αυστραλία).

Φασματοφωτόμετρο της Beckman (Palo Alto, CA, ΗΠΑ).

Ο αυτόματος θερμοκυκλοποιητής ήταν της Perkin Elmer.

ΜΕΘΟΔΟΙ

1. α. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

Με φλεβοκέντηση λαμβάνονται 20-25 ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένη σύριγγα (1 ml ηπαρίνης ανά 20 ml αίματος) από οροαρνητικούς αιμοδότες, άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot και ασθενείς με λοίμωξη HIV.

Το αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο ισότονου διαλύματος NaCl 0.9%. Η αραιώση και όλη η διαδικασία απομόνωσης και καλλιέργειας κυττάρων που ακολουθεί, γίνονται σε στείρες συνθήκες μέσα σε ειδικές εστίες κάθετης νηματικής ροής και με τη χρήση στέρων υλικών (πλαστικά σωληνάρια και δοχεία, πιπέττες, θεραπευτικά υλικά κ.λ.π.).

Σε πλαστικό σωληνάριο 50 ml με κωνικό πυθμένα (Corning) τοποθετούνται 15 ml Ficoll-Paque (Lymphocyte separation medium, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Σουηδία) ειδικής πυκνότητας $d=1.077$ g/ml. Πάνω στην επιφάνεια της Ficoll τοποθετούνται 20-30 ml αραιωμένου αίματος, με προσοχή ώστε να μην αναμιχθούν καθόλου οι δύο φάσεις. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1500-1800 στροφές/λεπτό (rpm) για 30 λεπτά (min) σε $\theta. 10^{\circ}\text{C}$, που επιτρέπει τον διαχωρισμό των μονοπύρηνων από τα άλλα κύτταρα του αίματος.

Ο δακτύλιος των μονοπύρηνων, που βρίσκεται μεταξύ των στιβάδων πλάσματος-NaCl 0.9% (πάνω) και Ficoll (κάτω), αναρροφάται με πιπέττα και μεταφέρεται σε άλλο κωνικό σωληνάριο. Χρειάζεται προσοχή ώστε να αναρροφηθεί η μικρότερη δυνατή ποσότητα Ficoll που είναι τοξική για τα κύτταρα.

Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 1500 rpm για 10 min και, μετά από απόρριψη του υπερκείμενου, προστίθενται 15-20 ml θρεπτικού υλικού HBSS (Hanks' balanced salt solution, Gibco). Μετά από ανάδευση, επαναλαμβάνεται η πλύση των κυττάρων με HBSS. Τελικά το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 5 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού υγρού RPMI-1640 (Flow Lab., Irvine, Σκωτία) και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων και αραιώσή τους στην επιθυμητή συγκέντρωση. Τα κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια, ανοσοφθορισμό ή απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.

1. β. Απομόνωση μακροφάγων

Ποσότητα από το εναιώρημα μονοπύρηνων του περιφερικού αίματος σε πλήρες RPMI (10^6 κύτταρα/ml) επωάζεται μέσα σε τρυβλίο Petri (Corning) σε 37°C , 5% CO_2 , για 1-2 ώρες.

Τα μακροφάγα έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στην πλαστική επιφάνεια του Petri, απ' όπου αποκολλώνται μαλακά με ειδικό ξέστρο μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού και 3 εκπλύσεις του τρυβλίου με HBSS.

Το εναιώρημα των εμπλουτισμένων μακροφάγων μεταφέρεται σε κωνικό σωληνάριο και φυγοκεντρείται. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα κύτταρα μετρούνται και προστίθεται θρεπτικό υλικό μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση. Τα μακροφάγα χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια, ανοσοφθορισμό ή απομόνωση νουκλεϊκών οξέων.

2. α. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για φαινοτυπική μελέτη

Μονοπύρηνια του περιφερικού αίματος ($3-5 \times 10^5$) τοποθετούνται σε σωληνάρια όγκου 1.2 ml και φυγοκεντρώνται σε 2000 rpm για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.

Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 50 μl διαλύματος μονοκλωνικού αντισώματος σε PBS και επωάζεται για 20-30 min στους 4°C . Ακολουθούν 2-3 πλύσεις με 500 μl PBS+10% FCS για να απομακρυνθεί το μη δεσμευμένο αντίσωμα, με φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 3 min και απόρριψη του υπερκείμενου.

Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 80 μl διαλύματος πολυκλωνικού αντισώματος F(ab)_2 IgG κατσίκας έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού, προσημασμένου με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) και επωάζεται εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Οι προσημασμένες ανοσοσφαιρίνες αναγνωρίζουν τα αντισώματα και συνδέονται με αυτά.

Μετά από έκπλυση των κυττάρων 3 φορές όπως στο πρώτο στάδιο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20 μl διαλύματος 50% v/v γλυκερόλης (Sigma) σε PBS, τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα κάτω από καλυπτρίδα και παρατηρείται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus).

Το σύμπλοκο αντιγόνο-αντίσωμα-αντιανοσοσφαιρίνη+φθορίζουσα ουσία, μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος στο υπεριώδες, εκπέμπει μέσω του φθοριοχρώματος σε άλλο μήκος κύματος στο ορατό. Υπολογίζεται το ποσοστό των θετικών κυττάρων αφού μετρηθούν τουλάχιστον 200 κύτταρα ανά δοκιμασία.

Τα διαλύματα των αντισωμάτων παρασκευάζονται με αραιώσή τους σε PBS που περιέχει 10% v/v FCS, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (συνήθως 1:10).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα IOT3, IOT4 και IOT8 (Immunotech, Luminy, Γαλλία) που αναγνωρίζουν τα μόρια CD3, CD4 και CD8, αντίστοιχα. Οι προσημασμένες με FITC F(ab)_2 IgG κατσίκας έναντι ποντικού ήταν της ίδιας εταιρείας και της Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, ΗΠΑ.

2. β. Έμμεσος ανοσοφθορισμός για έλεγχο έκφρασης ιικών πρωτεϊνών

Με την ίδια τεχνική ελέγχθηκε η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών p24 και gp120 στην επιφάνεια μονοπύρηνων κυττάρων και εμπλουτισμένων μακροφάγων (φρέσκων ή από αλλαγή καλλιέργειας) ασθενών, αμφίβολων και οροαρνητικών μαρτύρων, καθώς και σε κυτταρικές σειρές που συγκαλλιεργήθηκαν με PBMCs αμφίβολων ατόμων, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα (Du Pont, Wilmington, DE, ΗΠΑ).

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται σε κάθε δοκιμασία κύτταρα που επωάζονται μόνο με το πολυκλωνικό-FITC αντίσωμα. Αν εμφανίσουν ποσοστό θετικότητας, τότε αυτό αφαιρείται από τα αντίστοιχα ποσοστά των κυττάρων με το εκάστοτε μονοκλωνικό αντίσωμα.

3. α. Καλλιέργεια κυττάρων

Μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs)

Η κυτταροκαλλιέργεια γίνεται μέσα σε καλλιεργητικές φλάσκες (Corning) σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C , με 95% ατμοσφαιρικό αέρα και 5% CO_2 , σε υγρό περιβάλλον (95% υγρασία).

Η συγκέντρωση των κυττάρων είναι 10^6 /ml θρεπτικού υγρού.

Σαν βασικό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται το RPMI-1640, στο οποίο προστίθενται:

1. ορός εμβρύου βοός 10% v/v (FCS, Flow). Προηγείται αδρανοποίηση του συμπληρώματος με θέρμανση στους 56° C για 20 min και διήθηση του ορού από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.2 μ m (Millipore Corporation, Bedford, Mass, ΗΠΑ).
2. L-γλουταμίνη 2mM (Flow)
3. πενικιλίνη 50 IU/ml (Flow)
4. στρεπτομυκίνη 50 μ g/ml (Flow) και
5. πυροσταφυλικό νάτριο 1% (Gibco)

Το θρεπτικό υλικό χαρακτηρίζεται σαν πλήρες ή εμπλουτισμένο RPMI.

Στην καλλιέργεια των PBMCs των οροαρνητικών αιμοδοτών προστίθενται φυτοαιμοσυγκολλητίνη-P $1^{\circ}/_{00}$ (PHA-P, Difco Labs, St. Louis, MO, ΗΠΑ) και ανασυνδυασμένη IL-2 40 μ /ml (Cetus, Rotterdam, Ολλανδία). Τα κύτταρα επωάζονται για 2-3 ημέρες, ώστε να διεγερθούν σε βλάστες (PHA-βλάστες). Η PHA-P είναι μιτογόνο των T κυτάρων, ενώ η IL-2 προκαλεί διέγερση της έκφρασης CD4 υποδοχέων.

Κυτταρικές σειρές

Οι δεκτικές στον HIV κυτταρικές σειρές CEM-A310 και U937 καλλιεργούνται σε πλήρες RPMI-1640 και σε συγκέντρωση 5×10^5 κύτταρα/ml.

Μακροφάγα

Τα μακροφάγα καλλιεργούνται σε πλήρες RPMI-1640, με την προσθήκη PMA 10 ng/ml (phorbol myristate acetate, Boehringer Mannheim, Mannheim, Γερμανία).

Κάθε 2-3 μέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας: μετά από φυγοκέντρηση σε 1500 rpm για 10 min σε θ. περιβάλλοντος (θ.π.) και πλύση με HBSS, γίνεται μέτρηση των κυττάρων και επαναδιάλυσή τους σε φρέσκο θρεπτικό υγρό μέχρι την αρχική συγκέντρωση.

3. β. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων

Η βιωσιμότητά των κυττάρων ελέγχεται με αραιώση 10 μ l κυτταρικού εναιωρήματος σε διάλυμα χρωστικής trypan blue 0.01% w/v σε PBS (phosphate buffered saline, Gibco), σε αναλογία 1:9. Τα ζωντανά κύτταρα καταμετρούνται σε πλακίδιο Mallassez.

3. γ. Απομόνωση ιού

Χρησιμοποιούνται μονοπύρνα ή/και μακροφάγα περιφερικού αίματος από άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot, που απομονώνονται με τους τρόπους που αναφέρθηκαν.

Τα PBMCs καλλιεργούνται σε συγκέντρωση 10^6 /ml πλήρους RPMI στο οποίο προστίθενται PHA-P $1^{\circ}/_{00}$ v/v, IL-2 40 μ /ml, πολυκλωνικός ορός έναντι της ιντερφερόνης- α (saif) 1% v/v (Boehringer) και βρωμιούχος εξαδιμεθρίνη (polybrene) 2 μ g/ml (Sigma) [11,403].

Ο saif εξουδετερώνει την ενδογενή ιντερφερόνη που εκκρίνεται από κύτταρα χρόνια μολυσμένα από κάποιον ιό, επιτρέποντας έτσι την αύξηση της παραγωγής του κατά πολύ (10-50 φορές). Το polybrene είναι πολυκατιόν που αλλάζει την πολικότητα της

κυτταρικής μεμβράνης κάνοντας ευκολότερη την προσέγγιση του ιού στο στόχο του, αφού τα δύο στοιχεία έχουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο.

Ανά 3ήμερο γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υγρού των κυτταροκαλλιεργειών με τον τρόπο που περιγράφηκε.

Το υπερκείμενο καταψύχεται στους -80°C σε κλάσματα (aliquots) του 1 ml για μελλοντική ανίχνευση p24 αντιγόνου, δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης και ιϊκού RNA με dot blot. Σε κάθε αλλαγή ελέγχεται η έκφραση των πρωτεϊνών p24 και gp120 του HIV στην επιφάνεια των κυττάρων με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Τα ζωντανά κύτταρα επανακαλλιεργούνται μαζί με ίσο αριθμό φρέσκων ΡΗΑ-βλαστών στην αρχική συγκέντρωση και με προσθήκη IL-2 και saif.

3. δ. In vitro μόλυνση κυττάρων

Σε 10^6 ΡΗΑ-βλάστες από οροαρνητικούς αιμοδότες (ή κύτταρα CEM-A310 ή U937) σε 1 ml πλήρους RPMI, προστίθεται υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων από άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot, polybrene 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ και saif 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες σε 37°C , έκπλυση των κυττάρων με RPMI και έλεγχος της βιωσιμότητας με trypan blue [11,403].

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υγρό σε συγκέντρωση $10^6/\text{ml}$ και τίθενται σε καλλιέργεια με την προσθήκη IL-2 και ΡΗΑ-Ρ.

Ανά 3ήμερο γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη ΡΗΑ-βλαστών, όπως περιγράφηκε.

4. Ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης (RT)

Η απόδειξη ύπαρξης RT είναι δυνατή, in vitro, από την ανίχνευση της δράσης της σαν DNA πολυμεράσης πάνω σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο [το oligo (dT)₁₂₋₁₈] παρουσία ενός εκμαγείου για το ένζυμο [το poly rA] και ενός ραδιοσημασμένου νουκλεοτιδίου (τριτωμένη τριφωσφορική θυμιδίνη: $^3\text{H-TTP}$). Αποτέλεσμα είναι η σύνθεση νουκλεϊκού οξέος που είναι ραδιενεργό λόγω της ενσωμάτωσης της τριτωμένης θυμιδίνης [404,405].

Κλάσματα 1 ml από ακυτταρικά υπερκείμενα καλλιέργειας υπερφυγοκεντρούνται σε 60000 rpm για 60 min (ρότορας SW 60). Η υπερφυγοκέντρωση επιτρέπει τη συγκέντρωση σε πελλέτα του ιού που ενδεχόμενα υπάρχει στο υγρό.

Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 μl διαλύματος NTE (NaCl 100mM, Tris 10mM pH 7.4, EDTA 1mM) -Triton X-100 0.1% (Sigma), σε $\theta. 4^{\circ}\text{C}$. Το Triton, μη ιοντικό απορρυπαντικό, οδηγεί σε λύση των ισωματιών για να απελευθερωθεί το ένζυμο.

Προστίθενται 40 μl ρυθμιστικού διαλύματος που πληρεί τις ιοντικές απαιτήσεις της ιϊκής ανάστροφης μεταγραφάσης:

0.5 μl από 0.5M MgCl_2

1 μl από 1M KCl

2.5 μl από 1M Tris, pH 7.8

2.5 μl από 20mM DTT (Sigma)

2.5 μl από 1 O.D./ml poly rA (Boehringer)

2.5 μl από 1 O.D./ml oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Sigma)

5 μl από 30 Ci/mmol $^3\text{H-TTP}$ (Amersham, Buckinghamshire, Αγγλία)

23.5 μl H_2O

Μετά από επώαση σε υδατόλουτρο 37°C με ανακίνηση για 1 ώρα, η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1 ml πυροφωσφορικού νατρίου (PPNA) 0.1M σε διάλυμα 5% τριχλωροξέικου οξέος (TCA).

Προστίθενται 200 µl νουκλεϊκού οξέος (από σπέρμα ρέγγας, Boehringer) και 3 ml διαλύματος TCA 20% για να καθιζήσουν τα προϊόντα που συντέθηκαν κατά την αντίδραση, με επώαση για 10 min στους 4°C.

Το ίζημα (νουκλεϊκό οξύ) λαμβάνεται μετά από φιλτράρισμα σε φίλτρο millipore διαμέτρου πόρων 0.45 µm (Millipore Corporation, Bedford, Mass, ΗΠΑ).

Μετά από 3 πλύσεις με TCA 5% και μία με διάλυμα αιθανόλης 70%, το φίλτρο ξηραίνεται σε 90°C για 10 min, εμβαπτίζεται σε 8 ml υγρού σπινθηρισμού (Amersham) και μετρείται η ραδιενέργεια (κρούσεις ανά λεπτό: cpm) σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Η ποσότητα της ραδιενέργειας είναι ανάλογη με το ποσό του ενζύμου στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

Σαν θετικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο καλλιέργειας μολυσμένων από HIV κυττάρων CEM-A310 (δραστικότητα RT περίπου 15000 cpm/ml).

Αρνητικοί μάρτυρες ήταν: το ίδιο υπερκείμενο μετά από αδρανοποίηση του ιού με θέρμανση στους 56°C για 1 ώρα και, ποσότητα 40 µl του μείγματος της RT στο οποίο προστίθενται 10 µl H₂O.

5. Εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων

5. α. Απομόνωση μεγαλομοριακού DNA

Μεγαλομοριακό DNA (γενωμικό) απομονώθηκε από μονοκύτταρα και εμπλουτισμένα μακροφάγα, με εκχύλιση με φαινόλη [406].

Τα κύτταρα (10-20x10⁶) μετά από φυγοκέντρηση επαναιωρούνται σε 1 ml/10⁷ κύτταρα φρέσκου διαλύματος TSE (Tris-HCl 20mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 100mM) στο οποίο προστίθενται 50 µl/ml διαλύματος θειϊκού δωδεκυλικού νατρίου 20% (SDS). Το SDS διασπά το κυτταρικό τοίχωμα ώστε να επιτευχθεί λύση των κυττάρων και αποχωρίζει τα νουκλεϊκά οξέα από σύμπλοκα με πρωτεΐνες.

Μετά από ήπια ανάδευση προστίθεται πρωτεϊνάση K (100 µg/ml, Boehringer) και το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 2 ώρες και στη συνέχεια στους 37°C για 12-16 ώρες.

Η πρωτεϊνάση K είναι μη ειδική σερίνη-πρωτεάση που αδρανοποιεί τις νουκλεάσες, διατηρεί τη δράση της σε μεγάλο εύρος pH, σε υψηλές συγκεντρώσεις SDS-EDTA-ουρίας και είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι τους 60°C περίπου). Χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων από τα κύτταρα.

Ακολουθεί σύντομη επώαση στους 65°C για επαναδιάλυση του SDS και εκχύλιση του DNA με SS-φαινόλη και χλωροφόρμιο, που απομακρύνουν τις πρωτεΐνες από υδατικά διαλύματα νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα της φαινόλης που χρησιμοποιείται είναι κορεσμένο σε 2M Tris-HCl pH 7.4 και περιέχει 0.1% v/v μερκαπτοαιθανόλη (για αποδιάταξη των πρωτεϊνών) και 0.05% w/v 8-υδροξυκινολίνη (αντιοξειδωτικός παράγοντας που χρωματίζει το φαινολικό διάλυμα κίτρινο).

Στο διάλυμα του DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης και μετά από ήπια ανάδευση (για να μην τραυματιστεί το γενωμικό DNA) ακολουθεί φυγοκέντρηση (12000xg, 10-15 min, θ. 4°C). Η ανώτερη υδατική στιβάδα που περιέχει το νουκλεϊκό οξύ μεταφέρεται σε άλλο σωληνάριο (χρησιμοποιώντας ρύγχος με πλατύ στόμιο), ενώ η φαινολική στιβάδα και η μεσόφαση απορρίπτονται.

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές με ίσο όγκο μείγματος φαινόλης-χλωροφορμίου 1:1 και ίσο όγκο χλωροφορμίου, αντίστοιχα.

Υπολογίζεται ο όγκος της υδατικής φάσης και προστίθενται διάλυμα 10% v/v οξικού νατρίου 3M pH 7.0 και διπλάσιος όγκος παγωμένης καθαρής (95%) αιθανόλης. Το γενωμικό DNA πρέπει να κατακρημνιστεί αμέσως και φαίνεται σαν άσπρη κλωστή.

Το σωληνάριο επωάζεται σε πάγο για 10 min και φυγοκεντρείται για 10 min σε 12000xg, θ. 4°C.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό, γίνονται δύο πλύσεις του DNA με 80% v/v αιθανόλη για απομάκρυνση του άλατος και μετά από ξήρανση στον αέρα το DNA διαλύεται πλήρως σε TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 0.1mM) ή σε H₂O (με επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες αν χρειαστεί) και φυλάσσεται στους 4°C.

5. β. Απομόνωση ιϊκού RNA

Κλάσματα από ακυτταρικά υπερκείμενα καλλιιεργειών υπερφυγοκεντρώνονται (45000 rpm, 30-40 min, θ. 4°C, ρότορας SW 60), ώστε να συγκεντρωθεί στο ίζημα ο ιός.

Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος TES (Tris-HCl 20mM pH 7.5, EDTA 0.1mM, NaCl 10mM).

Ακολουθεί εκχύλιση του ιϊκού RNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνισή του με 3M οξικό νάτριο (pH 6.0) και παγωμένη καθαρή αιθανόλη. Το μίγμα ανακινείται και παραμένει στους -80°C για 30 min.

Μετά από φυγοκέντρηση (10 min σε 12000xg, θ. 4°C) και απόρριψη του υπερκείμενου, γίνονται δύο εκπλύσεις του ιζήματος με 80% αιθανόλη και, μετά την απόρριψή της, το ίζημα (RNA) ξηραίνεται με φυγοκέντρηση 10 min σε κενό.

Τελικά το RNA διαλύεται σε H₂O (ή σε αιθανόλη 80%) και φυλάσσεται στους -20°C.

5. γ. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός διαλυμάτων νουκλεϊκών οξέων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm επειδή τα νουκλεοτίδια που συνθέτουν τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή με μέγιστο στα 260 nm [407].

Για DNA διαλύματα, όγκος 5 μl αραιώνεται σε 1 ml H₂O και μεταφέρεται σε κυβέττα quartz. Το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται με 1 ml H₂O και στη συνέχεια λαμβάνεται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm (A_{260}): η συγκέντρωση του νουκλεϊκού οξέος είναι το δεκαπλάσιο της απορρόφησης, σε μg/μl.

Η καθαρότητα του διαλύματος υπολογίζεται από το λόγο A_{260} / A_{280} (οι πρωτεΐνες απορροφούν στα 280 nm), που πρέπει να είναι κοντά στο 2 (1.8-2.0). Αν ο λόγος είναι μικρότερος του 1.6, ποσότητα πρωτεϊνών ή φαινόλης έχει παραμείνει στο διάλυμα και απαιτείται επανεκχύλιση του DNA.

Για RNA διαλύματα ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με αραιώση όγκου 4 μl δείγματος σε 1 ml H₂O.

Ο υπολογισμός του ποσού του DNA και RNA γίνεται με βάση το ότι οπτική πυκνότητα (OD) 1 στα 260 nm αντιστοιχεί σε 50 μg/ml δίκλωνου DNA και 40 μg/ml μονόκλωνου RNA.

6. α. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (REs)

Μία RE θα τεμαχίσει οποιοδήποτε μόριο δίκλωνου DNA σε μία σειρά θραυσμάτων που καλούνται θραύσματα πέψης. Συγκρίνοντας το μέγεθος των θραυσμάτων που προέρχονται από συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή μετά από κατεργασία με συνδυασμό διαφορετικών REs, μπορεί να σχεδιαστεί ένας χάρτης πέψης της περιοχής που να εμφανίζει την εντόπιση των σημείων αναγνώρισης (πέψης) σε σχέση με τα γειτονικά σημεία πέψης. Επειδή κάθε RE αναγνωρίζει μία διαφορετική μικρή αλληλουχία DNA, ο χάρτης πέψης αντανακλά την κατανομή συγκεκριμένων αλληλουχιών στην περιοχή:

συνεπώς, τμήματα DNA μπορούν να συγκριθούν χωρίς να χρειάζεται να προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική αλληλουχία τους.

Η δραστηριότητα των REs ορίζεται ως εξής: 1 u αντιστοιχεί στο ποσό του ενζύμου που πέπτει 1 μg δείγματος DNA (συνήθως βακτηριοφάγου λ) σε όλα τα σημεία αναγνώρισης μέσα σε 1 ώρα σε 37°C. Συνήθως χρησιμοποιούνται 2-3 u RE/μg DNA, γιατί η πραγματική δραστηριότητα του ενζύμου επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες (αριθμός θέσεων αναγνώρισης, καθαρότητα DNA, θερμοκρασία κ.λ.π.) [407].

Ποσότητα 10-15 μg μεγαλομοριακού DNA διαλυμένου σε TE μεταφέρεται σε σωληνάριο όγκου 1.5 ml και προστίθενται RE (2-5 u/μg DNA), ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και 10% v/v σπερμιδίνη για εκτύλιξη του γενωμικού DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι *Bgl*I, *Eco*RI, *Pvu*II, *Hind*III, και *Pst*I.

Το σωληνάριο επωάζεται σε 37°C για τουλάχιστον 2 ώρες (συνήθως 12 ώρες σε ξηρό κλίβανο) ώστε η πέψη του DNA στις θέσεις αναγνώρισης να είναι πλήρης: επιβεβαίωση γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε mini-πήκτωμα αγαρόζης.

Ακολουθεί κανονική ηλεκτροφόρηση του DNA σε αγαρόζη.

6. β. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαχωρίζει θραύσματα DNA ανάλογα με το μέγεθός τους: η απόσταση που διανύει ένα θραύσμα πάνω στο πήκτωμα είναι αντίστροφα ανάλογη με το λογάριθμο του μοριακού του βάρους. Το μέγεθός των θραυσμάτων υπολογίζεται σε σύγκριση με πρότυπα γνωστού μοριακού βάρους που ηλεκτροφορούνται παράλληλα, ανάλογα με την απόσταση μετακίνησης πάνω στο πήκτωμα. Αυτό επιτυγχάνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα άκρα του πήκτωματος, σε περιβάλλον που τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα. Ο προσδιορισμός της θέσης των DNA θραυσμάτων πάνω στην αγαρόζη γίνεται άμεσα με την προσθήκη ethidium bromide, που δεσμεύεται στην έλικα του DNA και φθορίζει σε υπεριώδες φως όταν διεγερθεί σε 250-310 nm.

Η περιεκτικότητα του πήκτωματος σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των νουκλεϊκών οξέων που θα διαχωριστούν. Κυμαίνεται από 0.5% w/v για θραύσματα μεγέθους 20-100 kb μέχρι 1.5% w/v για μεγέθη 0.2-2 kb.

Η τεχνική χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολύπλοκων DNAs (όπως το γενωμικό) και ακόλουθη μεταφορά κατά Southern [406,407].

Ετοιμάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (TBE 1X) που περιέχει Tris 50mM, H₃BO₃ 50mM και EDTA 1mM.

Παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης 1.2% ως εξής: μείγμα 3 gr αγαρόζης (Sigma) σε 300 ml TBE 1X θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Το διάλυμα κρυσταλλώνει στους 50-60°C σε υδατόλουτρο και μετά την προσθήκη 30 μl ethidium bromide (για να γίνει ορατό το DNA) αδειάζεται μέσα σε ειδικό πλαστικό οριζόντιο καλούπι, με προσοχή ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Κοντά στη μία άκρη τοποθετείται ειδική οδοντωτή μήτρα για τη δημιουργία θέσεων για τα δείγματα (πηγάδια) και το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία τουλάχιστον 20 min για να πήξει.

Η δεξαμενή της οριζόντιας συσκευής ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με 2 lt ρυθμιστικού διαλύματος και, αφού αφαιρεθεί η μήτρα, το πήκτωμα μεταφέρεται πάνω στην ειδική πλατφόρμα μέσα στη συσκευή.

Μετά την πέψη από τις REs, το DNA των δειγμάτων κατακρημνίζεται με αιθανόλη-οξικό νάτριο και παραμονή στους -80°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min, απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 500 μl αιθανόλη 80%. Το υπερκείμενο απορρίπτεται πάλι και τα σωληνάκια αφήνονται ανοικτά στους 56°C ώστε η αιθανόλη να εξατμιστεί πλήρως.

Το DNA κάθε δείγματος διαλύεται σε 80 μl TE και προστίθενται 20 μl loading buffer (6% κυανό της βρωμοφαινόλης). Μετά από επώαση σε 65°C για 10 min, ώστε να γίνει

αποδιάταξη του DNA και, αμέσως τοποθέτηση σε πάγο για να διατηρηθεί η αποδιάταξη, ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρωση για συγκέντρωση του ιζήματος και τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις στην πηκτή.

Παράλληλα ηλεκτροφορείται ένα πρότυπο μοριακών βαρών (για να είναι δυνατή η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους των ζωνών) και οι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες.

Η ηλεκτροφόρηση τρέχει σε τάση 15 V την πρώτη ώρα και 35-40 V για 12-16 ώρες, μέχρι να διανύσει η χρωστική το 80% του πηκτώματος. Το DNA μετακινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο.

Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται πάνω σε τράπεζα UV για να γίνει ορατός ο διαχωρισμός του DNA σε ζώνες και φωτογραφίζεται.

Πρότυπο μοριακών βαρών ήταν 5 μg (4 μl + 21 μl H₂O nanopure) από DNA βακτηριοφάγου λ μετά από πλήρη πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *Hind*III και *Eco*RI, που παρέχει θραύσματα μεγέθους 21,227 - 5,148 - 4,973 - 4,268 - 3,530 - 2,027 - 1,904 - 1,584 - 1,375 - 947 - 831 - 564 - 125 bp.

6. γ. Southern blot

Η τεχνική επιτρέπει την παθητική μεταφορά θραυσμάτων DNA ηλεκτροφορητικά διαχωρισμένων, από το πήκτωμα αгарόζης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μέθοδος μεταφοράς καλείται «blotting» (αποτύπωση), αφού οι ζώνες στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης αποτελούν το ακριβές αντίγραφο (αποτύπωμα) του αρχικού προτύπου στο πήκτωμα.

Συνοπτικά, το DNA αποδιατάσσεται και μεταφέρεται με τριχοειδική δράση μέσα σε διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι. Το μονόκλωνο DNA συνδέεται στη μεμβράνη και δεσμεύεται μη αναστρέψιμα με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία [407].

Μετά τη φωτογράφιση το πήκτωμα εκπλύνεται διαδοχικά και με ανάδευση σε 500 ml διαλυμάτων:

-depurination (HCl 0.2M) 2x10 min

-αποδιάταξης (NaOH 0.5M - NaCl 1.5M) 2x30 min

-εξουδετέρωσης (NaCl 1.5M - tris-HCl 2N pH 8.0) 2x30 min

Σε κάθε πλύση το διάλυμα αντικαθίσταται με φρέσκο και ανάμεσα στα διαλύματα το πήκτωμα εκπλύνεται με απεσταγμένο H₂O.

Το πρώτο διάλυμα (depurination) προκαλεί μερική υδρόλυση του DNA, που βοηθά στη μεταφορά μεγάλων θραυσμάτων. Με το δεύτερο διάλυμα γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο και, τελικά, η πλύση με το διάλυμα εξουδετέρωσης επαναφέρει το πήκτωμα σε πιο ουδέτερο pH.

Τελικά το πήκτωμα εκπλύνεται για 10 min στο διάλυμα μεταφοράς SSC (NaCl 3M, κιτρικό νάτριο 0.3M, pH 7.0).

Στις ακριβείς διαστάσεις του πηκτώματος (20x20) κόβονται μεμβράνη πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης (Hybond N, Amersham ή GeneScreen Plus, NEN-DuPont, Boston, ΗΠΑ) και 6 διηθητικά χαρτιά Whatman 3MM, ενώ ετοιμάζονται 2 ακόμα Whatman 3MM διαστάσεων 20x50.

Μέσα σε πλαστικό δοχείο τοποθετείται το διάλυμα μεταφοράς (περίπου 500 ml) και η μεμβράνη, 2 Whatman 20x20 και τα 2 Whatman 20x50 εμποτίζονται μ' αυτό.

Κάθετα πάνω στο δοχείο τοποθετείται γυάλινη πλάκα και πάνω σ' αυτήν στρώνονται τα μεγαλύτερα Whatman με τα άκρα τους μέσα στο διάλυμα για να χρησιμεύσουν σαν υδρόφιλη δίοδος του SSC. Δίνεται προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστούν καθόλου φυσαλίδες γιατί επηρεάζουν τη μεταφορά. Το πήκτωμα μεταφέρεται πάνω στη δίοδο με τα πηγάδια προς τα κάτω, ακριβώς πάνω του τοποθετείται η μεμβράνη και αφαιρούνται πάλι τυχόν φυσαλίδες. Πάνω στη μεμβράνη τοποθετούνται τα 2

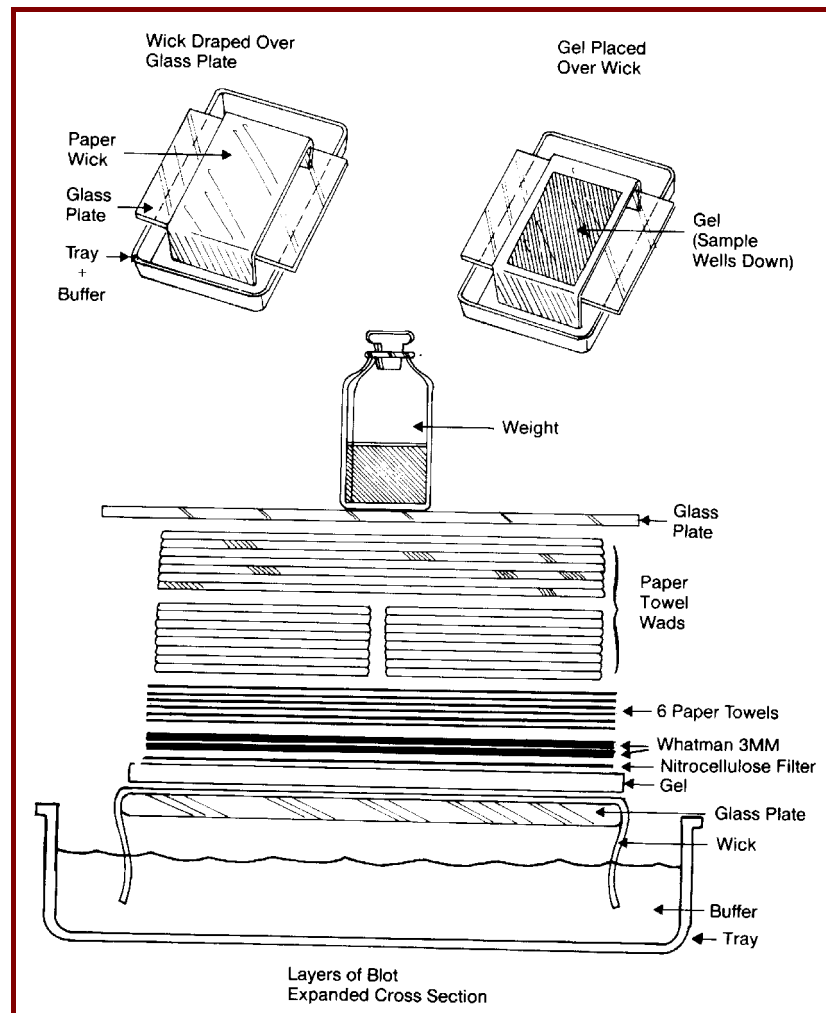
εμποτισμένα Whatman και στη συνέχεια τα υπόλοιπα και μία στήλη απορροφητικών χαρτιών.

Στην κορυφή μπαίνει μία γυάλινη πλάκα και πάνω της ένα βάρος (250 gr-1 kg) ώστε να ασκείται πίεση ομοιογενώς.

Το δοχείο καλύπτεται με Saran film για να μην εξατμίζεται το διάλυμα μεταφοράς και όλο το σύστημα αφήνεται για 12-16 ώρες ώσπου να ολοκληρωθεί η μεταφορά του DNA (σχήμα 16).

Μετά το τέλος της μεταφοράς η μεμβράνη εκπλύνεται με H_2O , αφήνεται περίπου 1 ώρα να στεγνώσει στον αέρα ανάμεσα σε δύο στεγνά Whatman και σημειώνονται πάνω της οι θέσεις των δειγμάτων. Στη συνέχεια εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (με την πλευρά του DNA προς την πηγή και σε απόσταση 15 cm από αυτήν) για 3-5 min για να μονιμοποιηθεί το DNA και φυλάσσεται για υβριδοποίηση.

Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης, στο οποίο προστίθεται ethidium bromide, για να ελεγχθεί αν η μεταφορά του DNA ήταν πλήρης (σε τράπεζα UV).



Σχήμα 16: Southern blot (Basic methods in Molecular Biology, 1986)

6. δ. Υβριδοποίηση μετά από σήμανση ανιχνευτή με τεχνική τυχαίας έναρξης [407]

ΠΡΟΪΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Το διάλυμα υβριδοποίησης [NaHPO_4 0.5M pH 7.0, SDS 7% w/v, BSA 1% w/v (bovine serum albumin, Gibco) και EDTA 1mM] προθερμαίνεται μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο στους 65°C σε ξηρό κλίβανο.

Η μεμβράνη εκπλύνεται με H_2O και βυθίζεται σε 50 ml φρέσκου διαλύματος υβριδοποίησης, όπου και παραμένει σε 65°C για 1 τουλάχιστον ώρα.

Η BSA δεσμεύει όλες τις μη ειδικές θέσεις του φίλτρου, ώστε ο cDNA ανιχνευτής να δεσμευτεί μόνο πάνω στο DNA, αν υπάρχει ομόλογή του αλληλουχία.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΥΧΑΙΑΣ ΕΝΑΡΞΗΣ (RANDOM PRIMING)

Η τεχνική χρησιμοποιείται κύρια για τη ραδιοσήμανση ανιχνευτών μικρού μοριακού βάρους, που λαμβάνονται με έκλυση από στήλη σεφαρόζης.

Ποσότητα 25-100 ng του cDNA ανιχνευτή σε 5 μl TE ή H_2O θερμαίνεται σε 95°C για 5 min σε σωληνάριο erpendorf (αποδιατάσσεται η διπλή έλικα του DNA) και αμέσως ψύχεται σε 0°C (διατηρείται η αποδιάταξη).

Προστίθενται 12 μl διαλύματος ολιγονουκλεοτιδίων που παρασκευάζεται με ανάμειξη των ακόλουθων διαλυμάτων σε αναλογία 25:25:7:

1. Heps-NaOH 1M pH 6.6
2. μη ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια dGTP, dTTP 100μM σε Tris-HCl 250mM pH 8.0, MgCl_2 25mM, β-μερκαπτοαιθανόλη 50mM (Pharmacia-LKB, Σουηδία)
3. εξανουκλεοτίδια 90μ/ml σε Tris-HCl 1mM pH 7.5, EDTA 1mM (Pharmacia)

Προστίθενται επίσης:

1 μl διαλύματος BSA 10% w/v

3 μl διαλύματος $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dATP 12.5μM (NEN-DuPont)

3 μl διαλύματος $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dCTP 12.5μM (NEN-DuPont) και

1-2 μl διαλύματος 5 u/μl DNA-πολυμεράσης I (τμήμα Klenow) (Pharmacia)

Το μείγμα επωάζεται για 30-60 min στους 37°C και η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 2 μl διαλύματος EDTA 0.5M pH 8.0, που διακόπτει τη δράση του ενζύμου.

Τα εξανουκλεοτίδια που περιέχονται στο διάλυμα υβριδίζονται με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες πάνω στις μονές αλυσίδες του ανιχνευτή και σχηματίζονται διπλές αλυσίδες μήκους 6 νουκλεοτιδίων, απαραίτητες για να δράσει η DNA πολυμεράση.

Το Klenow είναι μεγάλο τμήμα της DNA-πολυμεράσης I, που προκύπτει μετά από κόψιμο του ολοενζύμου από την πρωτεάση συμπτωτισίνη και ενώ διατηρεί την ιδιότητα έναρξης DNA σύνθεσης δεν έχει δράση 5' - 3' εξωνουκλεάσης.

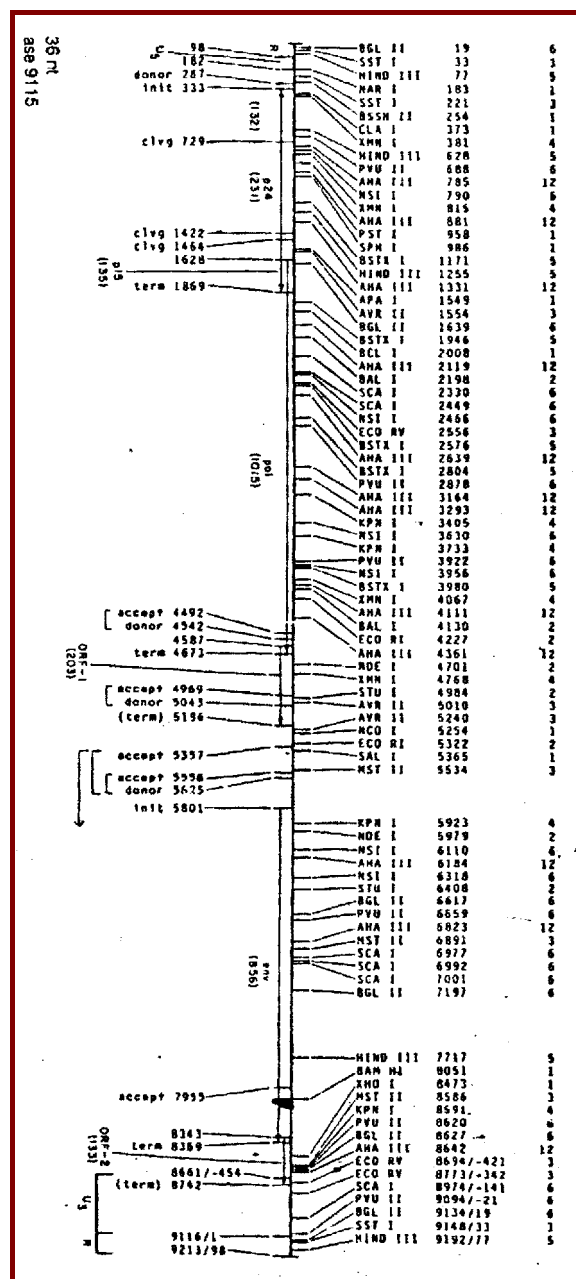
Χρησιμοποιώντας τα ελεύθερα νουκλεοτίδια, ραδιενεργά και μη, γεμίζει τα κενά στις αλυσίδες και έτσι προκύπτουν ραδιενεργά αντίγραφα του ανιχνευτή.

Λίγο πριν το τέλος της επώασης ετοιμάζεται στήλη χρωματογραφίας G-50 Sephadex με συμπίεση μέσα σε σύριγγα ισοουλίνης και φυγοκέντρωση (2000 rpm, 5 min, θ.π.). Το διάλυμα του ανιχνευτή συμπληρώνεται μέχρι τα 100 μl με αποστειρωμένο H₂O ή TE και στη συνέχεια διέρχεται από τη στήλη με φυγοκέντρωση κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με την προηγούμενη.

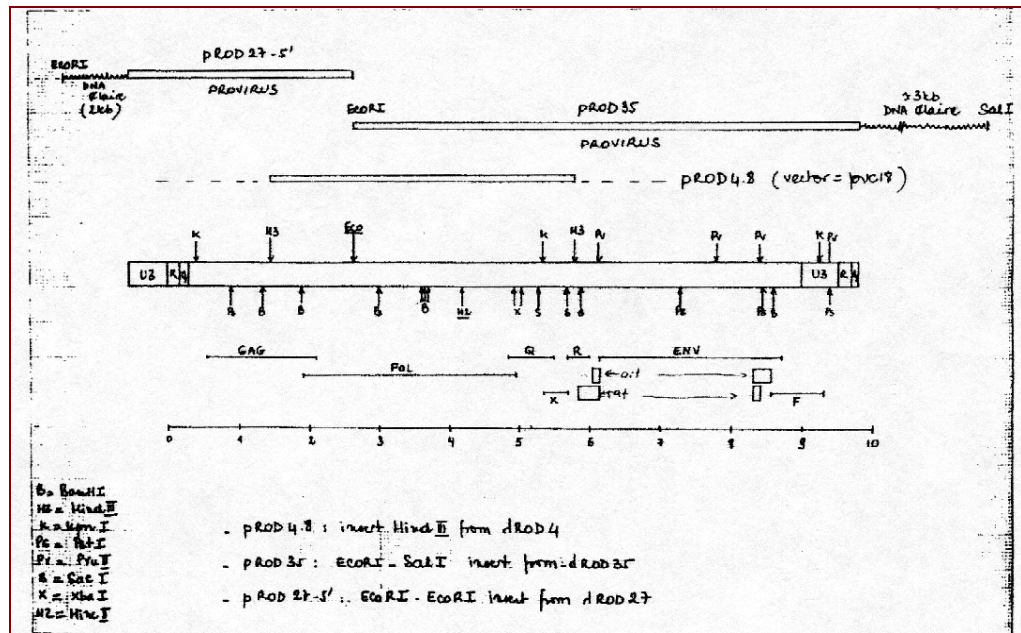
Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια κατακρατούνται στη στήλη, ενώ το DNA (ανιχνευτής) διέρχεται και συλλέγεται σε καθαρό erpendorf. Οι κρούσεις (cpm) μετρούνται με μετρητή β-ακτινοβολίας.

Σαν cDNA ανιχνευτές χρησιμοποιήσαμε:

- για τον HIV-1, τα θραύσματα του κλώνου HXB2 μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Pvu*II που έχει 6 θέσεις αναγνώρισης στο γονιδίωμα του στελέχους (εικόνα 1) και
- για τον HIV-2, τα *gag-pol* και *env* θραύσματα του κλώνου ROD1.12 μετά από πέψη με *Pst*I που έχει 5 θέσεις αναγνώρισης στο συγκεκριμένο γονιδίωμα (εικόνα 2).



Εικόνα 1: χάρτης πέψης του κλώνου HXB2 του HIV-1.



Εικόνα 2: χάρτης πέψης του κλώνου ROD1.12 του HIV-2.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Είναι διαδικασία με την οποία υβριδίζεται ένας ραδιοσημασμένος DNA ανιχνευτής σε θραύσματα DNA που μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης έχουν μεταφερθεί σε μεμβράνη.

Ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται (θέρμανση σε 95°C για 5 min και αμέσως ψύξη σε 0°C) και προστίθεται στο διάλυμα υβριδοποίησης, μέσα στο οποίο βρίσκεται η μεμβράνη, με καλή ανάδευση ώστε οι κρούσεις να είναι ομοιογενώς κατανομημένες. Ο όγκος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται συνήθως αντιστοιχεί σε 1-5x10⁷ cpm.

Η υβριδοποίηση γίνεται στους 65°C (συνθήκες υψηλής συγγένειας: high stringency), ώστε να απαιτείται μεγάλη ομολογία μεταξύ των DNA αλληλουχιών για να συνδεθούν και, διαρκεί 16-20 ώρες.

Οι μονές ραδιενεργές αλυσίδες του ανιχνευτή θα υβριδιστούν με ομόλογές τους αλληλουχίες, αν υπάρχουν, πάνω στο DNA των δειγμάτων της μεμβράνης.

ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Για να απομακρυνθεί η μη ειδική ραδιενέργεια, η μεμβράνη εκπλύνεται σε διάλυμα που περιέχει φωσφορικά 50mM pH 7.1, SDS 5% w/v και EDTA 1mM και έχει προθερμανθεί στους 65°C. Γίνονται 5 πλύσεις για 5-10 min, με ανάδευση σε θ.π. και, μία τελευταία στους 65°C.

Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει πάνω σε διηθητικά χαρτιά Whatman για περίπου 30 min. Τυλίγεται σε Saran film και ελέγχεται η ένταση και η κατανομή των κρούσεων με μετρητή β-ακτινοβολίας.

Στη συνέχεια εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (X-Omat AR, Kodak, Rochester, ΗΠΑ) μέσα σε ειδική κασέτα αυτοραδιογραφίας με δύο ενισχυτικά φίλτρα, στους -80°C, για 1-2 ημέρες (ανάλογα με την περιεκτικότητα του ανιχνευτή σε ραδιενέργεια).

Αν η μεμβράνη πρόκειται να επανυβριδοποιηθεί, εκπλύνεται σε διάλυμα φωσφορικών 10mM, SDS 0.1% w/v, EDTA 1mM στους 65°C για 15 min και φυλάσσεται μέσα σε Saran film.

6. ε. RNA/cDNA dot blot

Το διάλυμα του ιϊκού RNA τοποθετείται στους -80°C για 30 min, ώστε να καθιζήσει και στη συνέχεια φυγοκεντρείται (13000 rpm, 15 min, 4°C). Το υπερκείμενο (αιθανόλη) απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 20 μl φρέσκου διαλύματος αποιονισμένης φορμαμίδης-φορμαλδεΐδης (FF: φορμαμίδη 50% v/v, φορμαλδεΐδη 6% v/v), σε πάγο.

Για τον αποιονισμό της φορμαμίδης (Merck) προστίθενται σε α ml φορμαμίδης α/10 gr ιοντοανταλλακτικής ρητίνης AG 501-X8 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, ΗΠΑ), το μείγμα αναδεύεται ήπια σε 4°C για μισή ώρα, φιλτράρεται δύο φορές από φίλτρα Whatman N° 1 και φυλάσσεται σε κλάσματα στους -20°C.

Μετά από ανάδευση, γίνεται επώαση σε 65°C για 15 min και αμέσως μεταφορά σε 0°C, όπου το διάλυμα παραμένει για 2-3 min και προστίθενται 80 μl H₂O (διατηρημένο σε πάγο).

Εν τω μεταξύ ένα φύλλο φίλτρου Whatman 3MM και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβονται στις ακριβείς διαστάσεις της συσκευής slot blot (Bio-Rad) και εμβαπτίζονται σε διάλυμα που αποτελείται από 10 ml H₂O και 10 ml SSPE 20X (NaCl 3M, NaH₂PO₄ 0.2M, EDTA-Na₂ 0.02M). Το Whatman τοποθετείται πρώτο στη συσκευή, πάνω του η μεμβράνη και τελικά βιδώνεται το καπάκι, η συσκευή συνδέεται με πηγή κενού και οι θέσεις εναπόθεσης των δειγμάτων εκπλύνονται με 100 μl SSPE 20X.

Σε 10 μl δείγματος προστίθενται 200 μl διαλύματος NaOH 0.4N, EDTA 25mM που περιέχει κυανό της βρωμοφαινόλης και κάθε δείγμα εναποτίθεται σε μία θέση.

Οι θέσεις εναπόθεσης εκπλύνονται με 400 μl SSPE 20X σε κενό.

Η πηγή κενού αποσυνδέεται και η μεμβράνη αφαιρείται και αφήνεται να στεγνώσει ανάμεσα σε δύο Whatman.

Το RNA μονιμοποιείται με έκθεση της μεμβράνης σε υπεριώδη ακτινοβολία για 3-5 min και ακολουθεί υβριδοποίηση σε συνθήκες υψηλής συγγένειας (high stringency) με τον τρόπο που περιγράφηκε.

7. α. Ενίσχυση τμημάτων DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης εφαρμόστηκε για την ανίχνευση αλληλουχιών του HIV-1 σε εμπύρνα κύτταρα του περιφερικού αίματος [408].

Η PCR έγινε χρησιμοποιώντας kit εμπορίου [GeneAmp PCR] (Perkin Elmer, Foster City, CA, ΗΠΑ) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα αντιδραστήρια φυλάσσονται σε -20°C.

Σε ειδικό αποστειρωμένο σωληνάριο όγκου 0.5 ml (Perkin Elmer) τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά και με τελικό συνολικό όγκο 100 μl:

1. H₂O αποστειρωμένο μέσω φίλτρου με διάμετρο πόρων 0.22 μm, μετά κατεργασία με DEP
2. μείγμα PCR
3. δείγμα DNA 1 μg
4. ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση (Perkin Elmer-Cetus) 2.5 u

Το μείγμα της PCR αποτελείται από:

1. ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10X): Tris-HCl 100mM pH 8.3

KCl 500mM

MgCl₂ 15mM

ζελατίνη 0.1% w/v

2. 200 μM από κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

3. 100-120 ng από κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή (Genset, Paris, Γαλλία)

Η προετοιμασία γίνεται μέσα σε δοχείο με θρυμματισμένο πάγο.

Όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το ένζυμο, προαναμειγνύονται και γίνεται αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5 min. Το δείγμα τοποθετείται σε πάγο, προστίθεται η Taq πολυμεράση και το δείγμα επικαλύπτεται με 100 μl παραφινέλαιο (Sigma) για αποφυγή εξάτμισης.

Χρησιμοποιήσαμε 3 ζεύγη εκκινητικών μορίων, που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του HIV-1:

1. LAV-1: 5' -GGC AAA TGG TAC ATC AGG CCA TAT C-3' (θέση 751-775)

LAV-2: 5' -TCT GCA GCT TCC TCA TTG ATG GTC T-3' (θέση 940-964)

για το γονίδιο *gag*, με αναμενόμενο μήκος ενισχυμένου προϊόντος 213 bp.

2. SK32: 5' -ACC TGC CAC CTG TAG TAG-3' (θέση 4316-4333)

SK33: 5' -GCC ATA TTC CTG GAC TAC CAG-3' (θέση 4421-4401)

για το γονίδιο *pol*, με αναμενόμενο μήκος ενισχυμένου προϊόντος 104 bp.

3. SK68: 5' -AGC AGC AGG AAG CAC TAT GG-3' (θέση 7801-7820)

SK69: 5' -CCA GAC TAC TGT GAG TTG CAA -3' (θέση 7922-7942)

για το γονίδιο *env*, με αναμενόμενο μήκος ενισχυμένου προϊόντος 141 bp.

Τα σωληνάρια από τον πάγο τοποθετούνται αμέσως σε αυτόματο θερμοκυκλοποιητή (Perkin Elmer) που έχει προθερμανθεί στους 100°C και προγραμματίζεται για 35 κύκλους που αποτελούνται από τρία στάδια:

αποδιάταξης 94°C, 30 sec

σύνδεσης εκκινητών 55°C, 30 sec

επιμήκυνσης 72°C, 1 min

Το στάδιο αποδιάταξης του πρώτου κύκλου είχε συνολική διάρκεια 5 min για να εξασφαλιστεί ο πλήρης διαχωρισμός της διπλής έλικας του γενωμικού DNA και, κατά συνέπεια, μονόκλωνο DNA σαν υπόστρωμα για την αντίδραση της PCR.

Μετά την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου ακολούθησε ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης διάρκειας 10 min στους 72°C, για να συμπληρωθούν οι αλυσίδες των προϊόντων της ενίσχυσης.

Μετά το γονιδιακό πολλαπλασιασμό τα δείγματα συντηρούνται σε 4°C.

Η απομάκρυνση του παραφινέλαιου γίνεται με προσθήκη 100 μl χλωροφορμίου, έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 2 min: λαμβάνεται η ανώτερη φάση που περιέχει το DNA.

7. β. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης παρασκευάζεται με πολυμερισμό του μονομερούς της ακρυλαμίδης, σε συγκεντρώσεις από 2-20%.

Η δισ-ακρυλαμίδα είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος παράγοντας διασύνδεσης των αλυσίδων της ακρυλαμίδης για τη δημιουργία τρισδιάστατου πολυμερούς δικτύου. Επαγωγέας του πολυμερισμού είναι το υπερθειικό αμμώνιο (ισχυρός ενεργοποιητής

της έναρξης του πολυμερισμού), ενώ σαν καταλύτης λειτουργεί η TEMED [N,N,N',N'-τετραμεθυλενοδιαμίνη] (επιταχύνει και συντηρεί τον πολυμερισμό).

Η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδα χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μικρών θραυσμάτων DNA (50-2000 bp) και τον ακριβή προσδιορισμό του μήκους τους. Τα θραύσματα του DNA διαπερνούν δύο συνεχόμενα πηκτώματα: το πήκτωμα συμπύκνωσης αρχικά (για τη μείωση του όγκου του δείγματος) και το πήκτωμα διαχωρισμού στη συνέχεια, τα οποία διαφέρουν στην περιεκτικότητά τους σε ακρυλαμίδα [406,407].

Η περιεκτικότητα του πηκτώματος διαχωρισμού σε ακρυλαμίδα επιλέγεται ανάλογα με τα μοριακά βάρη των εξεταζόμενων θραυσμάτων.

Για διάλυμα ακρυλαμίδης 40% αναμιγνύονται 40 gr ακρυλαμίδης ultra pure (Gibco) και 1 gr δισ-ακρυλαμίδης (Pharmacia) σε συνολικό όγκο 100 ml H₂O, με ανάδευση κατά τη θέρμανση μέχρι 50°C. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στο ψυγείο.

Συναρμολογείται το σύστημα παρασκευής του πηκτώματος με τις πλάκες και τα spacers και επιβεβαιώνεται ότι ο ενδιάμεσος θάλαμος είναι υδατοστεγής.

Ετοιμάζεται πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8%, όγκου 30 ml, με την ανάμειξη 6 ml διαλύματος ακρυλαμίδης 40%, 1.5 ml TBE 10X και H₂O. Προστίθενται 48 μl TEMED (Sigma) και, τελευταία, 48 μl υπερθειικού αμμωνίου 25% (Gibco) αμέσως πριν την τοποθέτηση του μείγματος στο θάλαμο ηλεκτροφόρησης (για να μην ξεκινήσει ο πολυμερισμός) και το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί (15 min-1 ώρα).

Στη συνέχεια ετοιμάζεται το πήκτωμα συμπύκνωσης, από 20 ml πολυακρυλαμίδης 5%, με τον ίδιο τρόπο (2.5 ml ακρυλαμίδης 40%, 1 ml TBE 10X, H₂O, 32 μl TEMED, 32 μl υπερθειικού αμμωνίου) και τοποθετείται ακριβώς από πάνω και μέχρι να γεμίσει πλήρως ο θάλαμος ηλεκτροφόρησης. Αμέσως τοποθετείται οδοντωτή μήτρα για τη δημιουργία θέσεων για τα δείγματα και το πήκτωμα αφήνεται πάλι να πολυμεριστεί.

Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός αφαιρούνται το κατώτερο spacer και η μήτρα, το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και οι δεξαμενές της συσκευής γεμίζονται με 3 lt διαλύματος TBE 1X, μέχρι να καλυφθούν οι θέσεις των δειγμάτων. Αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες από το χώρο κάτω από την πηκτή.

Σε 25 μl προϊόντος της PCR προστίθενται 5 μl loading buffer (6% κυανό της βρωμοφαινόλης) και τα δείγματα τοποθετούνται με προσοχή στον πυθμένα των πηγαδιών με γυάλινη σύριγγα (Hamilton).

Τα δείγματα εναποτίθενται δύο φορές με την ίδια σειρά, αφού ενδιάμεσα μεσολαβήσουν δύο κενές θέσεις: στην πραγματικότητα, τελικά λαμβάνονται δύο όμοια πηκτώματα.

Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης 230 V (2-10 V/cm), οπότε τα αρνητικά φορτισμένα μόρια κινούνται προς την άνοδο (προς τα κάτω). Η ηλεκτροφόρηση συνεχίζεται μέχρι να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της ζώνης που ενδιαφέρει (περίπου 2-2.5 ώρες). Αδρά, σε πήκτωμα συγκέντρωσης 8% το κυανό της βρωμοφαινόλης μετακινείται μαζί με ζώνες DNA μεγέθους περίπου 50 (45-165) bp.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα κόβεται στο ύψος των κενών θέσεων. Το ένα κομμάτι μεταφέρεται σε πλαστικό δοχείο στο οποίο προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης και 50μl/l ethidium bromide για να χρωματιστεί το DNA (15 min στο σκοτάδι). Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές σε τράπεζα UV και φωτογραφίζονται. Το δεύτερο (όμοιο) κομμάτι χρησιμοποιείται για μεταφορά του DNA σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Πρότυπο μοριακών βαρών ήταν DNA του βακτηριοφάγου φX174 μετά από πλήρη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hae*III (φάσμα μεγεθών: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp) ή/και DNA του πλασμιδίου pBR328 μετά από πέψη με *Bgl*I-*Hinf* I (2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220, 154 bp).

7. γ. Μεταφορά του DNA σε μεμβράνη σε ηλεκτρικό πεδίο (electro-transfer)

Το πήκτωμα εκπλύνεται σε διάλυμα NaOH 0.2N, NaCl 0.6N για 30 min με ανάδευση, για να ανοίξει η διπλή έλικα του DNA. Ακολουθούν 2-3 δεκάλεπτες εκπλύσεις με H₂O απιονισμένο, μία με H₂O nanopure και μία τελευταία με TBE 1X, που είναι το διάλυμα μεταφοράς.

Εν τω μεταξύ εμβαπτίζονται σε TBE τα δύο αφρολέξ της συσκευής, δύο φύλλα χαρτιού Whatman και μία μεμβράνη πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης (GeneScreen ή Hybond N) κομμένη ακριβώς στις διαστάσεις του πηκτώματος.

Μετά τις πλύσεις το πήκτωμα μεταφέρεται πάνω σε γυάλινη πλάκα στον πάγκο και η μεμβράνη τοποθετείται πάνω του, με προσοχή ώστε να μην εγκλωβιστεί αέρας ανάμεσά τους. Πάνω στη μεμβράνη τοποθετούνται ένα Whatman, το ένα αφρολέξ και το πλαστικό πλέγμα της συσκευής στο οποίο θα συνδεθεί ο θετικός πόλος. Το σύστημα αναστρέφεται και, αφού αφαιρεθεί η γυάλινη πλάκα, τοποθετούνται πάνω στο πήκτωμα το δεύτερο Whatman, το δεύτερο αφρολέξ και το πλαστικό πλέγμα που θα αντιστοιχεί στον αρνητικό πόλο.

Το σύστημα βιδώνεται και τοποθετείται μέσα στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (LKB). Η δεξαμενή της συσκευής γεμίζεται με 5 lt διαλύματος TBE 1X και η συσκευή μεταφέρεται μέσα στο ψυγείο.

Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης περίπου 60V (0.5 A) για μισή ώρα, οπότε το DNA μεταφέρεται από τον αρνητικό (πήκτωμα) στον θετικό πόλο (νιτροκυτταρίνη) της συσκευής.

Το σύστημα αποσυναρμολογείται.

Το πήκτωμα χρωματίζεται με ethidium bromide για να διαπιστωθεί η επιτυχής μεταφορά του DNA και να συγκριθούν οι ζώνες των θραυσμάτων με τις αντίστοιχες των πρότυπων μοριακών βαρών.

Η μεμβράνη εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία για μονιμοποίηση του DNA, αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και φυλάσσεται ανάμεσα σε δύο Whatman μέχρι την υβριδοποίηση.

7. δ. Υβριδοποίηση μετά από σήμανση ανιχνευτή με τεχνική τελικής σήμανσης [407]

ΠΡΟΪΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ογκομετρικό κύλινδρο που περιέχει προθερμασμένο στους 50°C διάλυμα υβριδοποίησης. Το διάλυμα αποτελείται από φωσφορικά 0.5M pH 7.0, SDS 7% w/v, EDTA 1mM, BSA 1% w/v.

Ακολουθεί επώαση για μία τουλάχιστον ώρα στους 50°C.

ΣΗΜΑΝΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΕΛΙΚΗΣ ΣΗΜΑΝΣΗΣ (END-LABELING)

Η T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση είναι ένζυμο που μεταφέρει ειδικά το γ-³²P από το ATP σε μία 5' υδροξυλική ομάδα DNA ή RNA. Η αντίδραση χρησιμοποιείται για την τελική σήμανση (σήμανση άκρου) DNA και RNA μορίων (ολιγονουκλεοτιδίων, τμημάτων μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες, mRNA), αρκεί το μόριο να διαθέτει 5' OH. Οι συνθετικοί ανιχνευτές τυπικά έχουν την ιδιότητα αυτή.

Στα τοιχώματα σωληναρίου όγκου 1.5 ml αποτίθενται χωριστές σταγόνες (να μην εφάπτονται) από 1 μl (0.5 μg) cDNA ανιχνευτή, ρυθμιστικό διάλυμα της

πολυουκλεοτιδικής κινάσης (Tris 500mM pH 7.4, MgCl₂ 100mM, DTT 50mM) και 5 μ του ενζύμου.

Πίσω από ασπίδα Plexiglas προστίθενται 200 μ Ci γ -³²P-ATP και ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρωση (15 sec spin) για ανάμειξη. Αν ο όγκος είναι μικρότερος των 20 μ l συμπληρώνεται με H₂O.

Το μείγμα επωάζεται στους 37⁰C για 1-1.5 ώρα, μετά στους 65⁰C για 5 min για να αδρανοποιηθεί το ένζυμο και ακολουθεί γρήγορη φυγοκέντρωση για συγκέντρωση του μείγματος στον πυθμένα του σωληναρίου.

Στο διάστημα αυτό ετοιμάζεται στήλη G-50 Sephadex, μέσα από την οποία γίνεται έκλουση του μείγματος ώστε να κατακρατηθεί το μη ενσωματωμένο ³²P-ATP.

Τα μόρια-ανιχνευτές που χρησιμοποιήσαμε και που αντιστοιχούσαν σε κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων, ήταν:

1. Targ LAV: 5' -CAT TAT CAG AAG GAG CCA CCC CAC A-3' (θέση 853-877) (*gag*)
2. SK34: 5' -TAG TAG CCA GCT GTG ATA AAT GTC AGC TAA AAG GAG AAG CC-3' (θέση 4343-4383) (*pol*)
3. SK70: 5' -ACG GTA CAG GCC AGA CAA TTA TTG TCT GGT ATA GT-3' (θέση 7841-7875) (*env*)

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση σε 95⁰C για 5 min και αμέσως ψύξη σε 0⁰C.

Περίπου 20x10⁶ cpm του σημασμένου ανιχνευτή προστίθενται στο διάλυμα της προϋβριδοποίησης στο οποίο βρίσκεται βυθισμένη η μεμβράνη και γίνεται καλή ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή των κρούσεων.

Η υβριδοποίηση γίνεται στους 50⁰C και διαρκεί 16-20 ώρες.

ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η μεμβράνη εκπλύνεται σε διάλυμα που περιέχει φωσφορικά 40mM, NaCl 0.3M, SDS 5% w/v και EDTA 1mM. Γίνονται τρεις δεκάλεπτες πλύσεις στους 55⁰C με ανάδευση, για να απομακρυνθεί η μη ειδική ραδιενέργεια.

Η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει και εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ (X-Omat AR, Kodak) μέσα σε κασέτα αυτοραδιογραφίας και με ενισχυτικό φίλτρο, στους -80⁰C.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά αποτελέσματα πρωτογενούς ελέγχου και επιβεβαιωτικών δοκιμασιών

Στη διάρκεια της 5ετίας 1986-1990 ελέγχθηκαν για HIV λοίμωξη στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου 57810 αιμοδότες, 5380 έγκυοι που προσήλθαν για προγεννητικό έλεγχο, 1570 εσωτερικοί ασθενείς, 1990 εξωτερικοί ασθενείς, 155 χρόνιοι αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς της μονάδας τεχνητού νεφρού και 420 άτομα του προσωπικού του Νοσοκομείου (πίνακας 1).

Η ομάδα των αιμοδοτών περιελάμβανε 38240 άνδρες (μέση ηλικία 32 έτη, εύρος 17-57) και 19570 γυναίκες (μέση ηλικία 29 έτη, εύρος 20-53). Ολοι ήταν εθελοντές αιμοδότες: 2500 από αυτούς ήταν τακτικοί δότες και οι υπόλοιποι περιστασιακοί.

Την ομάδα των αιμοκαθαιρόμενων νεφροπαθών αποτελούσαν 96 άνδρες και 59 γυναίκες. Δεκαοκτώ από αυτούς (11 άνδρες και 7 γυναίκες, μέση ηλικία 42 έτη, εύρος 38-75) είχαν λάβει στο παρελθόν 4 κατά μέσο όρο (εύρος 2-10) μεταγγίσεις συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, αρνητικών για HIV με ανοσοενζυμική μέθοδο (ΕΙΑ).

Από τα 37 άτομα που προσήλθαν εθελοντικά για έλεγχο HIV (συμπεριλαμβάνονται στην ομάδα των εξωτερικών ασθενών), 10 ανέφεραν σεξουαλική συμπεριφορά «υψηλού κινδύνου».

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Έλεγχος για λοίμωξη HIV στην πενταετία 1986-1990

ΟΜΑΔΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ
Αιμοδότες	57810
Έγκυοι	5380
Εξωτερικοί ασθενείς	1990
Εσωτερικοί ασθενείς	1570
Χρόνιοι αιμοκαθαιρόμενοι	155
Προσωπικό	420
ΣΥΝΟΛΟ	67325

Στον πρωτογενή έλεγχο (ELISA), 222 από τα 67325 άτομα που ελέγχθηκαν εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα για HIV-1 και 58 για HIV-2. Επιπλέον, 71 και 11 άτομα έδωσαν οριακά αποτελέσματα, αντίστοιχα (πίνακας 2).

Η ανάλυση με Western blot των ορών που εμφάνισαν θετική/οριακή τιμή στην ELISA, επιβεβαίωσε 65 δείγματα σαν οροθετικά για HIV-1 και 12 σαν οροθετικά για HIV-2. Αδιευκρίνιστο αποτέλεσμα για τον HIV-1 διαπιστώθηκε σε 141 δείγματα και για τον HIV-2 σε 95 (πίνακας 2).

Μέχρι τις αρχές του 1990, τα ελάχιστα κριτήρια για το χαρακτηρισμό ενός Western blot σαν θετικού δεν είχαν αποκρυσταλλωθεί και τουλάχιστον τρία διαφορετικά σχήματα αξιολόγησης ήταν σε ευρεία χρήση [294,409].

Η ανησυχία για την πιθανότητα ψευδώς θετικών αντιδράσεων οδήγησε τις Αιμοδοσίες να χρησιμοποιούν τα κριτήρια του FDA, που απαιτούσαν την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι τουλάχιστον τριών γονιδιακών προϊόντων του HIV-1 για το χαρακτηρισμό ενός δείγματος σαν θετικού: μίας πρωτεΐνης του πυρήνα (p24), μίας γλυκοπρωτεΐνης του περιβλήματος (gp41 ή gp120/160) και μίας πρωτεΐνης του γονιδίου *pol* (p31 ή p65) [410]. Τα κριτήρια αυτά χρησιμοποιήσαμε και στη δική μας μελέτη.

Σαν αρνητικά θεωρήθηκαν τα δείγματα που ή δεν εμφάνιζαν καμία ζώνη στο Western blot ή εμφάνιζαν ζώνες που δεν αντιστοιχούσαν σε ιικά προϊόντα.

Οποιοσδήποτε συνδυασμός αντι-HIV αντισωμάτων διαφορετικός από τους προαναφερθέντες χαρακτηρίστηκε σαν αδιευκρίνιστος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Συνολικά αποτελέσματα ελέγχου για λοίμωξη HIV στην πενταετία 1986–1990

	ELISA HIV-1	ELISA HIV-2	WB HIV-1	WB HIV-2
ΘΕΤΙΚΑ %	222 (0.32)	58 (0.086)	65 (0.096)	12 (0.02)
ΟΡΙΑΚΑ %	71 (0.1)	11 (0.016)		
ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΑ %			141 (0.2)	95 (0.14)

ΣΥΝΟΛΟ ΕΛΕΓΧΘΕΝΤΩΝ: 67325

Ομάδα μελέτης

Το αρχικό υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 50 άτομα στα οποία ο πρωτογενής έλεγχος για HIV-1/2 έδωσε κατ' επανάληψη θετική ή οριακή τιμή με μία τουλάχιστον από τις μεθόδους ELISA που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ η ανάλυση με Western blot πρώτης γενιάς αποκάλυψε μη καταληκτική εικόνα. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων η αδιευκρίνιστη εικόνα αφορούσε την παρουσία αντι-gag αντισωμάτων στον ορό, σε διάφορους συνδυασμούς.

Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν σαν αμφίβολα για μόλυνση από HIV.

Από τα 50 αμφίβολα άτομα, οι 28 ήταν άνδρες και οι 22 γυναίκες (μέση ηλικία 35 και 32 έτη, αντίστοιχα).

Η ομάδα περιελάμβανε 32 περιστασιακούς αιμοδότες, 5 εγκύους, 1 ιερόδουλη, 5 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς (M.T.N.) και 7 άτομα που προσήλθαν οικιοθελώς για εξέταση για HIV. Από τα τελευταία και, σύμφωνα με το ιστορικό που έδωσαν, 1 ανήκε σε ομάδα με συμπεριφορά υψηλού κινδύνου για HIV λοίμωξη, ενώ οι υπόλοιποι 6 ήταν ετεροφυλόφιλοι με έντονη σεξουαλική ζωή.

Εικοσιτέσσερα από τα 50 «αδιευκρίνιστα» άτομα, τα οποία ανταποκρίθηκαν στην πρόσκληση για περαιτέρω έλεγχο μετά από ενημέρωση, συμπεριλήφθηκαν τελικά στη μελέτη (πίνακας 4): 17 αιμοδότες, 4 χρόνιοι αιμοκαθαιρόμενοι και 3 έγκυοι.

Στην ομάδα μελέτης προστέθηκαν οι ερωτικοί σύντροφοι ορισμένων από τους εξεταζόμενους, που ανταποκρίθηκαν στην πρόσκληση για έλεγχο.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα του πρωτογενούς και του επιβεβαιωτικού ελέγχου, κατά ομάδα, στα εξεταζόμενα άτομα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Συνοπτικά αποτελέσματα αρχικού ορολογικού ελέγχου στην ομάδα μελέτης

	ΑΙΜΟΔΟΤΕΣ n=17	MTN n=4	ΕΓΚΥΟΙ n=3	ΣΥΝΟΛΟ n=24
ELISA HIV-1 ΘΕΤΙΚΗ/ΟΡΙΑΚΗ	15	3	3	21
ELISA HIV-2 »	5	1	1	7
ELISA HIV-1 και -2 »	3	0	1	4
WB-1 ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΟ	17	4	3	24
WB-2 »	11	3	2	16
WB-1 και -2 »	11	3	2	16

n= αριθμός εξεταζόμενων ατόμων

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα δημογραφικά στοιχεία των ατόμων που αποτέλεσαν το υλικό της μελέτης, καθώς και τα αναλυτικά αποτελέσματα του πρωτογενούς ελέγχου και των επιβεβαιωτικών δοκιμασιών.

Απαραίτητες για την κατανόηση του πίνακα είναι οι παρακάτω διευκρινίσεις:

A = άνδρας, Γ = γυναίκα

ΑΜΔ = αιμοδότης, MTN = αιμοκαθαιρόμενος ασθενής

Για τις ELISA:

* Το κατώφλι (CO) της Pasteur είναι 0.300.

Το κατώφλι της Abbott υπολογίζεται σε κάθε τρέξιμο της εξέτασης (+CO: 0.096 και ±CO: 0.229).

± Σημαίνει αποτέλεσμα που κατατάσσεται στην καλούμενη «γκρίζα ζώνη» [\pm 10% της τιμής του κατωφλίου]. Στις Αιμοδοσίες, επειδή ο αριθμός των ορών που ελέγχονται ταυτόχρονα για HIV είναι μεγάλος και ο πληθυσμός που αντιπροσωπεύουν θεωρείται «χαμηλού κινδύνου» για τη συγκεκριμένη λοίμωξη, αν κάποια τιμή είναι μεν αρνητική αλλά πολύ υψηλότερη από των υπόλοιπων δειγμάτων συνήθως επανελέγχεται ακόμα και αν βρίσκεται κάπως χαμηλότερα από τη «γκρίζα ζώνη».

Για το Western blot:

Ασθ = ασθενής ζώνη μικρής έντασης.

± Σημαίνει ζώνη στην περιοχή κάποιας πρωτεΐνης του HIV, που όμως δεν είναι απόλυτα βέβαιο ότι είναι ιικής προέλευσης.

Στη RIBA: ± σημαίνει ζώνη έντασης <1+.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: αναλυτικά αποτελέσματα αρχικού ελέγχου στα άτομα της ομάδας μελέτης

A/α	ΟΜΑΔΑ	ELISA HIV-1		LAV blot-1 Pasteur	RIBA Ortho	ELISA HIV-2	LAV blot-2 Pasteur
		Pasteur	Abbott				
1.	A, ΑΜΔ, 35 ετών	+(0.535)*	-	p18,24,40,55	p24,31	-	p26 ασθ
2.	A, ΑΜΔ, 32 ετών	+(0.564)	-	p18,24,40,55	p24	+(0.533)*	p16, 26
3.	A, ΑΜΔ, 43 ετών	±(0.246)	-	p24,40,55	p24±	-	p26ασθ, gp105
4.	A, ΑΜΔ, 46 ετών	-	-	p18,24±	-	+(0.379)	p16,26,56
5.	Έγκυος, 26 ετών	+(0.945)	-	p18,40,55, gp41ασθ	-	-	-
6.	Γ, ΜΤΝ, 43 ετών	+(0.548)	-	p18,24,40,55	p24	-	-
7.	A, ΑΜΔ, 31 ετών	±(0.246)	-	p18,24,40,55,68	p24±	-	p26
8.	A, ΑΜΔ, 23 ετών	-	±(0.079) [†]	p18,24,55	-	-	-
9.	A, ΜΤΝ, 52 ετών	+(0.389)	-	p18,24,40,55	p24	-	p16,26 ασθ
10.	A, ΑΜΔ, 36 ετών	+(0.604)	-	p18,24,34,55	p24±,31	-	p26
11.	A, ΑΜΔ, 27 ετών	±(0.261)	-	p18,24,55	p24±	-	p16, 26
12.	Γ, ΑΜΔ, 58 ετών	+(0.492)	-	p18,24	-	-	-
13.	A, ΑΜΔ, 23 ετών	+(1.087)	-	p18,24,40,55	-	-	p16
14.	A, ΑΜΔ, 23 ετών	-	-	p18	-	±(0.208)	p16, 26
15.	A, ΑΜΔ, 36 ετών	-	+(0.256) [‡]	p18,24	-	-	-
16.	A, ΑΜΔ, 35 ετών	+(0.337)	-	p18,24,40	p24	-	-
17.	A, ΑΜΔ, 37 ετών	+(0.447)	-	p18,24	-	±(0.243)	p26
18.	A, ΑΜΔ, 48 ετών	+(0.353)	-	p18,24,40,55	p24	+(0.439)	p16, 26
19.	Γ, ΜΤΝ, 47 ετών	+(0.545)	-	p18,40,55	p24	-	p16
20.	A, ΜΤΝ, 45 ετών	-	-	p18,24±	-	+(0.419)	p26,36±,64
21.	Έγκυος, 22 ετών	-(0.121)	-	p18,24,55±	-	-	p16, 26
22.	Γ, ΑΜΔ, 43 ετών	±(0.290)	-	p34ασθ,68,gp120ασθ,gp160	-	-	-
23.	A, ΑΜΔ, 32 ετών	±(0.295)	-	p55	-	-	-
24.	Έγκυος, 28 ετών	+(0.393)	-	p24,40,55	p24	±(0.209)	p26

Δημογραφικά χαρακτηριστικά

Από τα 24 αμφίβολα άτομα που μελετήσαμε 17 (15 άνδρες, 2 γυναίκες) ήταν περιστασιακοί αιμοδότες, 4 (2 άνδρες, 2 γυναίκες) ήταν ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε αιμοκάθαρση και 3 ήταν έγκυοι που προσήλθαν για προγεννητικό έλεγχο ρουτίνας.

Από τα στοιχεία του ιστορικού που έδωσαν, κανένας δεν ανέφερε κάποιον από τους γνωστούς παράγοντες κινδύνου για HIV λοίμωξη (ομοφυλοφιλία ή αμφιφυλοφιλία, χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών, μεταγγίσεις αίματος ή παραγώγων).

Οι 4 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς δεν είχαν ποτέ λάβει μετάγγιση στο παρελθόν.

Η έγκυος α/α 21 συμπεριλήφθηκε στην ομάδα μελέτης γιατί η τιμή στην ELISA, αν και αρνητική, ήταν πολύ υψηλότερη από των υπόλοιπων δειγμάτων που ελέγχθηκαν την ίδια ημέρα και το αποτέλεσμα διατηρήθηκε στην επανάληψη της εξέτασης την επόμενη ημέρα. Επιπλέον, ο σύζυγός της (α/α 11) ήταν αιμοδότης με υψηλή αρνητική τιμή στην ELISA και αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot.

Στην κλινική εξέταση κανένα από τα άτομα της ομάδας μελέτης δεν παρουσίαζε συμπτώματα ενδεικτικά του AIDS ή του ARC (AIDS-related complex), ούτε και ανέφερε πρόσφατη συμπτωματολογία συμβατή με οξεία λοίμωξη HIV (ορομετατροπή).

Έλεγχος για HIV-1

Όπως είναι εμφανές από τον πίνακα 4, τα περισσότερα (21/24) από τα εξεταζόμενα άτομα (εκτός των α/α 4,14,20) εμφάνιζαν θετική ή οριακή ELISA για HIV-1 και μάλιστα, στην πλειοψηφία τους, με το ένα από τα δύο αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν (Pasteur).

Όλα τα άτομα της ομάδας μελέτης εμφάνιζαν αντισώματα στο Western blot έναντι των πρωτεϊνών Gag του HIV-1, εκτός από την αιμοδότη με α/α 22.

Σε τέσσερα άτομα διαπιστώθηκαν αντισώματα έναντι πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται και από τα γονίδια *pol* και *env* του ιού (α/α 5,7,10,22).

Έλεγχος για HIV-2

1. ELISA θετική/οριακή, WB αδιευκρίνιστο: 7 άτομα.

Υψηλή τιμή στην ELISA για HIV-2 παρατηρήθηκε σε επτά άτομα (πίνακες 3 και 4), από τα οποία τα τέσσερα είχαν και θετική ELISA για HIV-1. Στο Western blot για HIV-2 στις περιπτώσεις αυτές η αντίδραση στρεφόταν έναντι των πρωτεϊνών Gag (και Pol στον α/α 20) του ιού.

2. ELISA αρνητική, WB αδιευκρίνιστο: 9 άτομα.

Σε 9 ακόμα περιπτώσεις το Western blot για HIV-2 ήταν αδιευκρίνιστο με παρουσία αντι-gag αντισωμάτων, παρά το γεγονός ότι η αντίστοιχη ELISA ήταν αρνητική. Στον αιμοδότη α/α 3, μάλιστα, ανιχνεύθηκε και αντι-gp105 αντίδραση παρά την αρνητική ELISA και την απουσία αντι-Env αντισωμάτων τόσο στο Western blot πρώτης γενιάς για HIV-1 όσο και στα συνθετικά πεπτιδία Pepti-LAV.

Η αντι-HIV-2 αντίδραση στα άτομα αυτά θεωρήθηκε πιθανότατα διασταυρούμενη.

Αντιγόνο p24

Ο έλεγχος για παρουσία αντιγόνου p24 στον ορό με αντιδραστήριο του εμπορίου (capture ELISA, Abbott) που έγινε για να αποκλειστεί η περίπτωση πρόσφατης μόλυνσης από HIV (περίοδος ορολογικού παραθύρου), απέβη σε όλα τα άτομα της ομάδας μελέτης αρνητικός.

Έλεγχος για HTLV-I και -II

Έλεγχος έγινε και για παρουσία αντισωμάτων έναντι των ανθρώπινων ρετροϊών HTLV-I και -II στον ορό με ELISA (IAF Biochem, Montréal, PQ, Καναδάς), για να ελεγχθεί η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά.

Ομάδα ελέγχου

Αντίθετα, σε 14 άτομα με επιβεβαιωμένη HIV-1 λοίμωξη (σε διάφορα στάδια της νόσου) που χρησιμοποιήσαμε σαν ομάδα ελέγχου, τα αποτελέσματα της ELISA και του Western blot ήταν σαφώς θετικά, όπως και η αντίδραση σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του ιού (πίνακας 5, σχήμα 14).

Στα οροθετικά για HIV-1 άτομα παρατηρήθηκαν επίσης διασταυρούμενες αντιδράσεις προς τις πρωτεΐνες του HIV-2. Στην ELISA, 3/14 άτομα έδωσαν θετική τιμή (a/a 5,8,10) και ένα ακόμα, υψηλή αρνητική τιμή (a/a 13). Σύμφωνα με τα κριτήρια αξιολόγησης του Western blot πρώτης γενιάς, 3 άτομα εμφάνιζαν εικόνα θετική (a/a 10,12,13), 9 εικόνα αδιευκρίνιστη και μόνο 2 είχαν σαφώς αρνητικό αποτέλεσμα (a/a 3,11). Η πιθανότητα διπλής μόλυνσης στις περιπτώσεις με θετικό blot-2 ήταν μικρή, κρίνοντας από την τιμή της ELISA. Το μοναδικό άτομο με πολύ υψηλή τιμή στην ELISA για HIV-2 (a/a 5) δεν φαινόταν επίσης να έχει διπλή μόλυνση αφού το αντίστοιχο Western blot ήταν αδιευκρίνιστο, η πιθανότητα όμως δεν μπορούσε να αποκλειστεί.

Ο έλεγχος με συνθετικά πεπτίδια έναντι των πρωτεϊνών του περιβλήματος των δύο ιών (Pepti-LAV) που έγινε, διευκρίνισε ότι όλα τα άτομα της ομάδας μελέτης ήταν μολυσμένα μόνο με HIV-1.

Τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των οροθετικών ατόμων και τα αποτελέσματα του πρωτογενούς ελέγχου και του επιβεβαιωτικού Western blot (στη διάγνωση) παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Στον πίνακα ισχύουν οι διευκρινίσεις που δόθηκαν για τον πίνακα 4 και χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συντομεύσεις:

αμφι = αμφιφυλόφιλος, homo = ομοφυλόφιλος, IVDU = χρήστης ενδοφλέβιων ναρκωτικών, hemoph = αιμορροφιλικός.

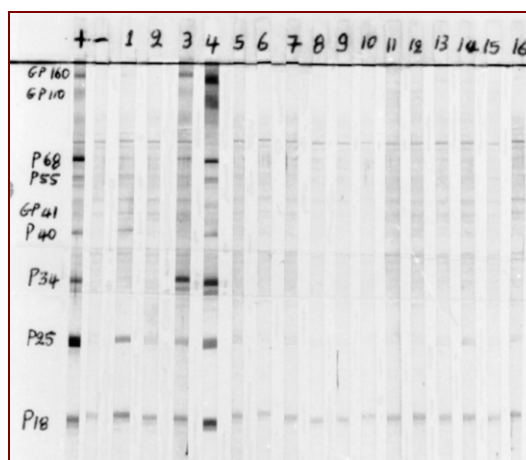
OF: overflow (πάνω από το ανώτερο όριο προσδιορισμού της μεθόδου).

†CO: 0.186, ‡CO: 0.133 = Κατώφλι της μεθόδου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: αναλυτικά αποτελέσματα αρχικού ελέγχου στα άτομα της ομάδας ελέγχου

Α/α	ΟΜΑΔΑ	ELISA HIV-1		LAV blot-1 Pasteur	ELISA HIV-2	LAV blot-2 Pasteur
		Pasteur	Abbott			
1.	A, αμφι, 30 ετών	2.749	>2.000	p18,24,31,40,55, gp41,120,160	-	p26 ασθ
2.	A, homo, 50 ετών	2.700	>2.000	p18,24,31,55,68, gp41,120,160	-	p26,36
3.	Γ, IVDU, 26 ετών	OF	>2.000	p24,31,55,68, gp41,120,160	-	-
4.	A, homo, 25 ετών	OF	>2.000	p24,31,55,68, gp41,120,160	-	p26
5.	A, homo, 16 ετών	OF	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp160	2.657	p16,26, gp140
6.	A, αμφι, 45 ετών	OF	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	p26
7.	A, homo, 30 ετών	1.800	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	p26
8.	A, homo, 20 ετών	1.100	1.150†	p18,24,34,40,55,68, gp160	+(0.400)	p16,26
9.	A, homo, 35 ετών	OF	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	p26
10.	A, αμφι, 20 ετών	2.882	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	+(0.511)	p16,26,36, gp140
11.	A, hemorph, 14 ετών	1957	>2.000	p16,18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	-
12.	A, homo, 38 ετών	2.585	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	p26,36,68, gp140
13.	A, homo, 24 ετών	1.799	>2.000	p18,24,34,40,55,68, gp160	±(0.250)	p26,36, gp105,140
14.	A, homo, 36 ετών	2.395	1.879‡	p18,24,34,40,55,68, gp41,120,160	-	p26,36

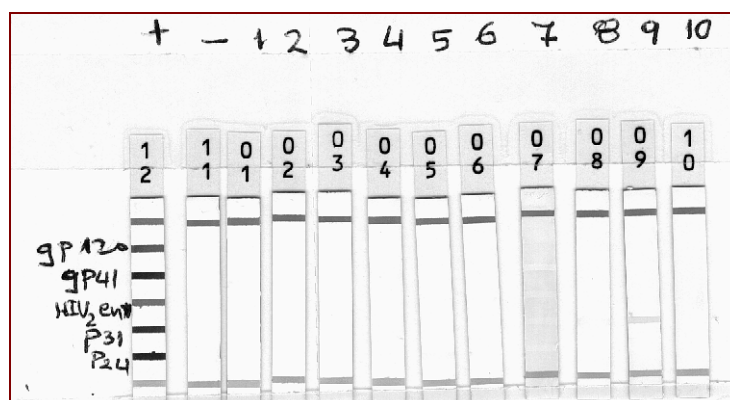
Στις εικόνες 3 και 4 (α,β) παρουσιάζονται επιβεβαιωτικές μέθοδοι ανοσοαποτύπωσης πρώτης γενιάς (Western blot) και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (RIBA).



Εικόνα 3: Western blot πρώτης γενιάς. +: θετικός μάρτυρας, -: αρνητικός μάρτυρας, 1,2,5-16: δείγματα με αδιευκρίνιστη εικόνα, 3,4: δείγματα θετικά



Εικόνα 4α: RIBA. +: θετικός μάρτυρας, -: αρνητικός μάρτυρας, 1-4,6-12,16: αρνητικά δείγματα, 13: δείγμα με αδιευκρίνιστη εικόνα (αντι-p24), 5,14,15: δείγματα θετικά



Εικόνα 4β: RIBA. +: θετικός μάρτυρας, -: αρνητικός μάρτυρας, 1-8,10: αρνητικά δείγματα, 9: δείγμα με αδιευκρίνιστη εικόνα (αντι-p31)

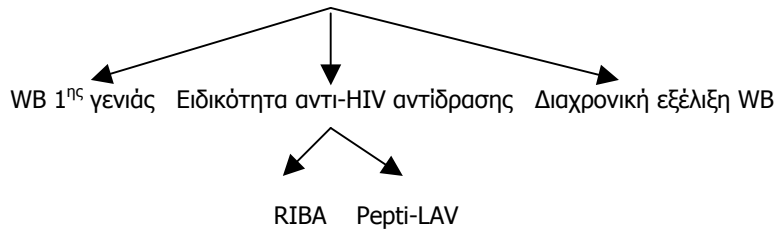
ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΑΜΦΙΒΟΛΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Τα αμφίβολα άτομα διερευνήθηκαν σύμφωνα με τον αλγόριθμο που παρουσιάζεται στη συνέχεια και είχε πέντε βασικές κατευθύνσεις: ορολογική - ιολογική - μοριακή διερεύνηση - μελέτη του φαινότυπου των λεμφοκυττάρων - ορολογική μελέτη των ερωτικών συντρόφων των εξεταζόμενων ατόμων.

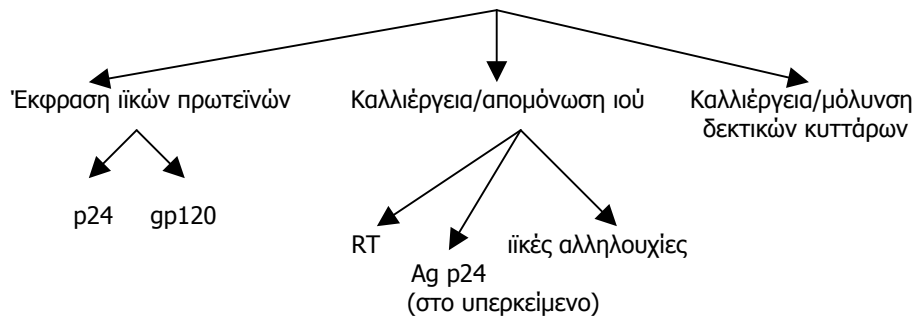
ELISA θετική/οριακή και Western blot (WB) αδιευκρίνιστο ⇒



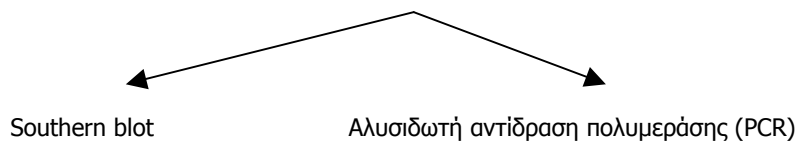
1. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



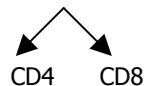
2. ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



4. ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ



5. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΡΩΤΙΚΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΩΝ

1. ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

1. Western blot πρώτης γενιάς

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, όλα τα άτομα της ομάδας μελέτης εμφάνιζαν αντισώματα στο Western blot έναντι του HIV-1 (ή/και του HIV-2), χωρίς να πληρούνται τα κριτήρια θετικότητας της μεθόδου (πίνακας 4).

Για τον HIV-1, η αντίδραση στρεφόταν βασικά έναντι των πρωτεϊνών Gag (p18, p24, p55). Εξαιρέση αποτελεί η αιμοδότης a/a 22 στην οποία διαπιστώθηκαν αντισώματα μόνο έναντι πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *pol* (p34,p68) και *env* (gp120, gp160) του ιού. Σε δύο αιμοδότες διαπιστώθηκε, εκτός των αντι-gag, και παρουσία αντισωμάτων έναντι της πολυμεράσης (p68) και ενδονουκλεάσης του HIV-1 (p34) [a/a 7,10] και σε μία έγκυο (a/a 5) έναντι της gp41 γλυκοπρωτεΐνης του περιβλήματος.

Στο Western blot για HIV-2 ανιχνεύθηκαν και πάλι αντι-gag αντισώματα (p16, p26, p56) σε 16 από τα 24 εξεταζόμενα άτομα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η παρουσία αντισωμάτων αντι-pol (p36, p64) και αντι-env (gp105) σε έναν αιμοκαθαιρόμενο ασθενή [a/a 20] και έναν αιμοδότη [a/a 4], αντίστοιχα (πίνακας 4).

2. Ειδικότητα της αντίδρασης έναντι των πρωτεϊνών του HIV

a. Με σκοπό να διευκρινιστεί αν η αντίδραση προς τις πρωτεΐνες του HIV που ανιχνεύθηκε με το Western blot πρώτης γενιάς ήταν ειδική, όλα τα άτομα της ομάδας μελέτης ελέγχθηκαν με **HIV1 /2 RIBA** (recombinant immunoblot assay [RIBA], Ortho, Raritan, NJ, ΗΠΑ). Η RIBA είναι μέθοδος ανοσοαποτύπωσης η οποία χρησιμοποιεί: 1) τέσσερα ανασυνδυασμένα αντιγόνα του HIV-1 (p24, p31, gp120, gp41) και 2) μία ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (p26) και ένα συνθετικό πεπτιδίο ομόλογο της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης (gp36) του περιβλήματος του HIV-2. Επίσης περιλαμβάνει δύο ζώνες ανθρώπινης IgG διαφορετικής έντασης (επίπεδο I και επίπεδο II) σαν εσωτερικούς μάρτυρες ελέγχου: το επίπεδο I ορίζεται αυθαίρετα να αντιστοιχεί σε ένταση 1+ και το II σε 3+. Ζώνη έντασης μικρότερης του 1+ χαρακτηρίζεται σαν ±.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρνητικό είναι ένα δείγμα αν δεν εμφανίζει ζώνες έντασης $\geq 1+$. Για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα σαν θετικό μόνο για HIV-1 απαιτείται αντίδραση $\geq 1+$ προς την gp41 και οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη του ιού και $< 1+$ αντίδραση προς την πρωτεΐνη του περιβλήματος του HIV-2. Ένα δείγμα είναι θετικό μόνο για HIV-2 αν εμφανίζει αντίδραση $\geq 1+$ προς την πρωτεΐνη του περιβλήματος του ιού και οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη του HIV-1, αλλά $< 1+$ αντίδραση προς την gp120 του HIV-1. Ένα δείγμα θεωρείται θετικό και για τους δύο ιούς αν διαπιστωθεί ταυτόχρονα αντίδραση $\geq 1+$ προς τις δύο γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος του HIV-1 (gp41 και gp120) και προς το πεπτιδίο που αντιστοιχεί στο περίβλημα του HIV-2. Οποιοδήποτε άλλο σχήμα παρουσίας αντισωμάτων χαρακτηρίζεται σαν αδιευκρίνιστο.

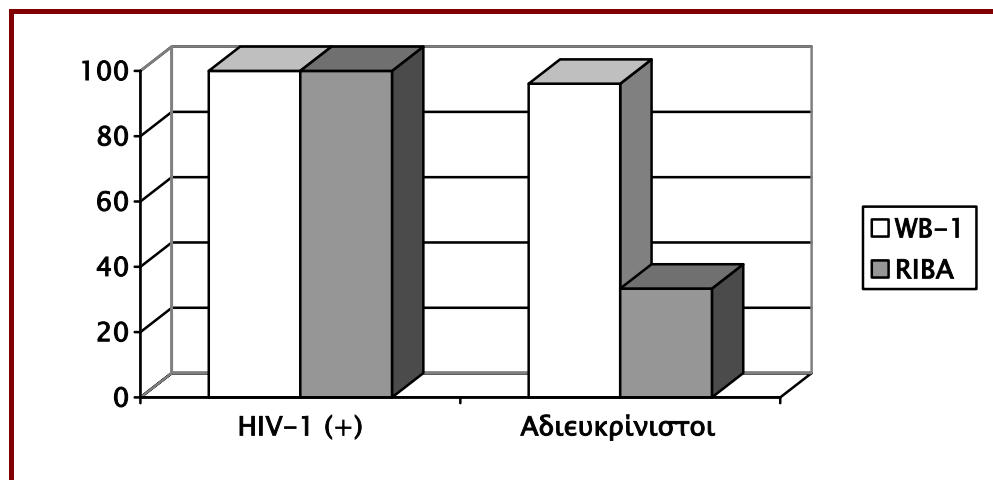
Σε περισσότερες από τις μισές από τις περιπτώσεις που μελετήσαμε (15/24, 62.5%) η ανοσοαποτύπωση με RIBA έδειξε ότι η αντίδραση προς τις ιικές πρωτεΐνες στο Western blot πρώτης γενιάς δεν ήταν ειδική (αρνητικό θεωρείται και το $p24 \pm$ αποτέλεσμα) (πίνακας 4).

Στις υπόλοιπες περιπτώσεις (37.5%) η αντίδραση προς τις Gag-Pol πρωτεΐνες (προς την p24 σε 8/24 άτομα, αλλά και προς την ενδονουκλεάση στα άτομα 1 και 10) διατηρείτο και με τη χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σαν αντιγόνων. Το γεγονός ότι δεν πληρούνταν τα κριτήρια θετικότητας της μεθόδου με την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών Env, σήμαινε ότι τα αποτελέσματα [αν και ειδικά] χαρακτηρίζονταν και πάλι σαν αδιευκρίνιστα, επιβάλλοντας τη χρήση πιο εξειδικευμένων τεχνικών για τη διαλεύκανσή τους (πίνακας 4, σχήμα 17).

β. Επιπλέον, έγινε ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των κωδικοποιούμενων από το γονίδιο *env* πρωτεϊνών των HIV-1 και -2 με ειδικά συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν σε μονοεπιτόπους των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών των δύο ιών (Pepti-LAV, Pasteur).

Το αποτέλεσμα ήταν σε όλες τις περιπτώσεις αρνητικό.

Η αδυναμία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών του περιβλήματος των δύο ιών με ομόλογά τους συνθετικά πεπτίδια, ήταν ένα ακόμα στοιχείο που μας απομάκρυνε από την υπόνοια της ορομετατροπής, αφού είναι γνωστό ότι η αντίδραση προς τις πρωτεΐνες αυτές εμφανίζεται πριν την ανάπτυξη άλλων αντισωμάτων.



Σχήμα 17: % ανίχνευση αντι-gag αντισωμάτων σε οροθετικά [HIV-1 (+)] και αμφίβολα άτομα με Western blot πρώτης γενιάς (WB-1) και με χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (RIBA).

3. Εξέλιξη της ορολογικής εικόνας

Φαινόταν λογικό να υποθέσουμε ότι αν κάποια από τα αμφίβολα άτομα ήταν όντως μολυσμένα με HIV, η ορολογική τους εικόνα θα εξελισσόταν μετά από κάποιο χρονικό διάστημα που, φυσιολογικά, δεν θα έπρεπε να υπερβαίνει τους έξι μήνες.

Κατεβλήθη, λοιπόν, προσπάθεια για προοπτική παρακολούθηση της εξέλιξης της ορολογικής εικόνας σε όσο το δυνατόν περισσότερα αμφίβολα άτομα και για διάστημα τουλάχιστον έξι μηνών, ώστε να εξαντληθούν όλα τα περιθώρια για την ανίχνευση πιθανής ορομετατροπής.

Δόθηκαν οδηγίες για προσέλευση και συλλογή δειγμάτων κάθε 3-6 μήνες στα εξεταζόμενα άτομα, ώστε αφενός να δοθεί η δυνατότητα καταγραφής της εξέλιξης της ELISA και του Western blot σε τακτά χρονικά διαστήματα και αφετέρου να χρησιμοποιηθούν και νεώτερα αντιδραστήρια που συνεχώς γίνονταν διαθέσιμα.

Αν και η συμμόρφωση δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής, μεταγενέστερα δείγματα ορού ελέγχθηκαν στην πλειοψηφία των ατόμων μετά από διάστημα 3-6 μηνών. Η απόπειρα, όμως, προοπτικής παρακολούθησης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα συνάντησε μεγάλες δυσκολίες.

Τα άτομα με α/α 11 (αιμοδότης) και 21 (έγκυος), που ήταν ζεύγος, δεν ανταποκρίθηκαν στη σύσταση για επανέλεγχο. Ο α/α 11 προσήλθε μόνο μία φορά για έλεγχο 1 μήνα μετά το αρχικό αδιευκρίνιστο αποτέλεσμα, ενώ η σύζυγός του προφανώς συνέχισε τον προγεννητικό έλεγχο σε άλλο Κέντρο.

ELISA

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, από τα 24 άτομα της ομάδας μελέτης, θετική/οριακή ELISA HIV-1 είχαν τα 21 και από αυτά 4 εμφάνιζαν θετική/οριακή τιμή και για τον HIV-2. Από τα υπόλοιπα τρία άτομα της ομάδας, τα δύο είχαν θετική και το ένα οριακή τιμή στην ELISA μόνο για HIV-2.

- 1.** Η ELISA αρνητικοποιήθηκε σε 14 από τα 22 εξεταζόμενα άτομα (64%) που προσήλθαν για επανέλεγχο, μετά από χρονικό διάστημα που κυμάνθηκε από 1-7 μήνες. Εξαιρέση αποτέλεσε ο αιμοδότης α/α 2, στον οποίο αρνητική τιμή στην ELISA διαπιστώθηκε 13 και 17 μήνες μετά τον έλεγχο του πρώτου δείγματος για τους HIV-1 και HIV-2, αντίστοιχα (πίνακας 6).
- 2.** Στα υπόλοιπα 8 άτομα (36%) η ELISA διατηρήθηκε θετική για διάστημα που κυμάνθηκε από 8 ημέρες μέχρι και 4 χρόνια (πίνακας 6).

Western blot

- 1.** Σε κανένα από τα άτομα της ομάδας μελέτης δεν παρατηρήθηκε εικόνα συμβατή με ορομετατροπή, είτε για HIV-1 είτε για HIV-2, στο διάστημα που παρακολουθήθηκαν (από 22 ημέρες έως 4 χρόνια).
- 2.** Στην πλειοψηφία των εξεταζόμενων ατόμων (18/22, 82%) η εικόνα του Western blot παρέμεινε αδιευκρίνιστη (πίνακας 6).
- 3.** Αρνητικοποίηση του Western blot [απουσία οποιασδήποτε ζώνης] παρατηρήθηκε σε 4 άτομα (4/22, 18%) μετά από διάστημα 3-14 μηνών (πίνακας 6).

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αρχικά και τελικά αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου των εξεταζόμενων ατόμων (τα άτομα με α/α 11 και 21 δεν συμπεριλαμβάνονται, αφού δεν υπήρχε διαθέσιμο δείγμα για επανέλεγχο).

ΑΜΔ: αιμοδότης, ΜΤΝ: μονάδα τεχνητού νεφρού, ΕΓΚ: έγκυος

+ : θετικό, - : αρνητικό, ± : οριακό

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αρχικά και τελικά αποτελέσματα της ELISA και του Western blot στα άτομα της ομάδας μελέτης

A/α	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ELISA HIV-1	LAV blot-1 Pasteur	ELISA HIV-2	LAV blot-2 Pasteur
1. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 15 μήνες	+ +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
2. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 17 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο -	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
3. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 12 μήνες	± -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο -
4. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 12 μήνες	- -	Αδιευκρίνιστο -	+ +	Αδιευκρίνιστο -
5. ΕΓΚ	1 ^ο δείγμα Μετά 14 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
6. ΜΤΝ	1 ^ο δείγμα Μετά 3 χρόνια	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
7. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 10 μήνες	± +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο -
8. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 10 μήνες	± -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
9. ΜΤΝ	1 ^ο δείγμα Μετά 3 χρόνια	+ +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
10. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 8 ημέρες	+ +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο -
12. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 3 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
13. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 7 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
14. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 2 μήνες	- -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	± -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
15. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 4 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο -	- -	- -
16. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 6 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
17. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 3 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο -	± -	Αδιευκρίνιστο -
18. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 4 χρόνια	+ +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	+ -	Αδιευκρίνιστο -
19. ΜΤΝ	1 ^ο δείγμα Μετά 20 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	Αδιευκρίνιστο -
20. ΜΤΝ	1 ^ο δείγμα Μετά 2 χρόνια	- -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	+ -	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο
22. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 2 μήνες	± +	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
23. ΑΜΔ	1 ^ο δείγμα Μετά 22 ημέρες	± ±	Αδιευκρίνιστο Αδιευκρίνιστο	- -	- -
24. ΕΓΚ	1 ^ο δείγμα Μετά 14 μήνες	+ -	Αδιευκρίνιστο -	± -	Αδιευκρίνιστο -

Στον πίνακα 7 η διαχρονική εξέλιξη της ορολογικής εικόνας στα άτομα της ομάδας μελέτης φαίνεται αναλυτικά και σχολιάζονται ορισμένα επιμέρους ευρήματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Διαχρονική εξέλιξη της ELISA και του Western blot στα άτομα της ομάδας μελέτης

A/α	ΗΜΕΡΟ-ΜΗΝΙΑ	ELISA HIV-1 Pasteur Abbott	LAV blot-1 Pasteur	ELISA HIV-2	LAV blot-2 Pasteur
1.	20-6-88 25-7-88 15-9-89	+(0.535)# +(0.508) +(0.500)	- - - p18,24,40,55 p24, 55 p18 ασθ	- - -	p26 ασθ p26 ασθ p16
2.	18-2-87 9-3-87 24-6-87 10-3-88 14-7-88	+(0.564) +(0.407) +(0.383) -(0.189) -(0.108)	- - - - - p18, 24, 40, 55 p18, 24 p18, 24 p18, 24, 40, 55 -	+(0.533) +(0.477) -	p16, 26 p26 p16, 26
3.	25-4-88 22-7-88 3-11-88 12-4-89	±(0.246) -(0.143) -(0.196) -(0.096)	- - - - p24, 40, 55 p24, 55 p24 p24	- - - -	p26ασθ, gp105 p26 ασθ - -
4.	15-7-87 20-6-88 25-7-88	- - -	- - - p18, 24±	+(0.379) +(0.309) +(0.395)	p16, 26, 56 p26 ασθ -
5.	11-7-89 26-7-89 8-9-89 1-12-89 17-9-90	+(0.949) +(0.654) +(1.291) +(1.160) -(0.024)	- - - - - p18,40,55,gp41ασθ p18, 55 p18, 40, 55 p18, 40, 55 p18	- - - - -	- - - - -
6.	2-4-87 15-5-87 20-7-87 30-6-88 10-11-88 30-3-89 4-7-89 8-5-90	+(0.548) ±(0.298) -(0.006) +(0.526) ±(0.270) +(0.756) +(1.360) -(0.193)	- - - - - - - - - p18, 24, 40, 55 p18, 24, 55 p18, 24, 55± p24, 40, 55 p24,40,55,gp160ασθ p24, 55 p24 p24	- - - - - - - - -	- - - - - - - -
7.	5-9-88 19-9-88 26-6-89	±(0.246) -(0.129) +(0.441)	- - - p18, 24, 40, 55, 68 p18 ασθ, 40 ασθ, 55 p24	- - -	p26 - -
8.	30-7-86 27-1-87 13-4-87 12-5-87	- - - - ±(0.079) ¹	- - - - - p18, 24, 55 p18, 24 p18, 24 p18, 24	- - - -	- - - -
9.	3-4-87 12-5-87 20-7-87 17-11-87 8-5-90	+(0.389) +(0.545) -(0.053) -(0.063) +(0.798)	- - - - - p18, 24, 40, 55 p18, 24, 40, 55 p18, 24, 40, 55 p18, 24, 40, 55 p24	- - - - -	p16, 26 ασθ p16, 26 p16, 26 p16, 26 ασθ p16 ασθ
10.	23-3-87 31-3-87	+(0.604) +(0.493)	- - p18, 24, 34, 55 p18, 24, 55	- -	p26 -
11.	2-4-87	±(0.261)	- p18, 24, 55	-	p16, 26
12.	27-10-86 27-1-87	+(0.492) ±(0.254)	- - p18, 24 p18, 24	- -	- -

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 (συνέχεια)

Α/α	ΗΜΕΡΟ- ΜΗΝΙΑ	ELISA HIV-1		LAV blot-1 Pasteur	ELISA HIV-2	LAV blot-2 Pasteur
		Pasteur	Abbott			
13.	26-2-87	+(1.087)	-	p18, 24, 40, 55	-	p16
	3-3-87	+(1.151)	-	p18, 24, 40, 55	-	-
	14-7-87	-(0.183)	-	p18, 24, 40, 55	-	-
	21-8-87	+(0.311)	-	p18, 24, 40, 55	-	p16
	15-9-87	-(0.176)	-	p18, 24, 40, 55	-	p16
14.	14-5-87	-	-	p18	±(0.208)	p16, 26
	17-7-87	-	-	p18, 25±	-	p16
15.	20-5-87	-	+(0.256) ²	p18, 24	-	-
	17-7-87	-	+(0.306) ³	p18, 24, 40±	-	-
	28-9-87	-	-(0.033) ⁴	-	-	-
16.	5-2-87	+(0.337)	-	p18, 24, 40	-	-
	12-2-87	+(0.363)	-	p18, 24, 40, 55±	-	-
	12-3-87	±(0.219)	-	p18, 24, 40, 55±	-	-
	27-7-87	-	-	p18, 24 ασθ	-	-
17.	14-5-87	+(0.447)	-	p18, 24	±(0.243)	p26
	18-5-87	±(0.223)	-	p18, 24±	+(0.442)	p26
	22-7-87	-	-	-	-	-
18.	18-5-87	+(0.353)	-	p18, 24, 40, 55	+(0.439)	p16, 26
	16-7-87	±(0.247)	-	p18, 24, 40, 55	+(0.517)	p16, 26
	7-6-91	+(0.476)	-	p24	-	-
19.	3-12-87	+(0.545)	-	p18, 40, 55	-	p16
	4-1-88	-	-	p24	-	-
	24-7-89	-	-	p24	-	-
20.	12-5-87	-	-	p18, 24±	+(0.419)	p26,36±,64
	4-1-88	-	-	p18, 55	-	p26 ασθ
	24-11-88	-	-	p18 ασθ	-(0.202)	p26
	21-4-89	-	-	p18 ασθ	-	p26 ασθ
21.	13-5-87	-(0.121)	-	p18, 24, 55±	-	p16, 26
22.	13-3-89	±(0.290)	-	p34ασθ,68,gp120ασθ,160	-	-
	11-5-89	+(0.459	+(0.382) ⁵	p34, gp160	-	-
23.	3-11-88	±(0.295)	-	p55	-	-
	25-11-88	±(0.282)	-	p18 ασθ, 55	-	-
24.	6-10-87	+(0.393)	-	p24, 40, 55	±(0.209)	p26
	14-10-87	±(0.270)	-	p24, 40, 55	-	p26
	11-1-88	+(0.543)	-	p24, 40, 55	+(0.369)	p26
	25-4-88	+(0.330)	-	p40 ασθ, 55 ασθ	±(0.209)	p26
	23-11-88	-(0.031)	-	-	-(0.021)	-

Και για τον πίνακα 7 ισχύουν οι διευκρινίσεις που σημειώνονται στον πίνακα 4.
 Κατώφλι της ELISA Abbott = ¹:0.096, ²:0.229, ³:0.209, ⁴: 0.189, ⁵:0.234.

ΣΧΟΛΙΑ

ELISA

Τα άτομα στα οποία η ELISA αρνητικοποιήθηκε ήταν 9 αιμοδότες, 2 έγκυοι και 3 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς.

Για τον HIV-1: από τα 19 άτομα που αρχικά είχαν θετική/οριακή τιμή και επανελέγχθηκαν, αρνητικοποιήθηκαν τα 12 (πίνακας 6).

Για τον HIV-2: από τα 7 άτομα που αρχικά είχαν θετική/οριακή τιμή και επανελέγχθηκαν, αρνητικοποιήθηκαν τα 6 (πίνακας 6).

1. Οι δύο έγκυοι που παρακολουθήσαμε συστηματικά (α/α 5,24) είχαν πρακτικά την ίδια εξέλιξη. Η ELISA παρέμεινε θετική στη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ενώ στον επανέλεγχο που έγινε 6 μήνες μετά τον τοκετό είχε αρνητικοποιηθεί και στις δύο γυναίκες και για τους δύο ιούς.

2. Ιδιαίτερο μοτίβο εξέλιξης, με εναλλαγή μεταξύ σαφώς θετικών και σαφώς αρνητικών τιμών, παρατηρήθηκε σε δύο (α/α 6,9) από τους τέσσερις ασθενείς της μονάδας τεχνητού νεφρού που μετείχαν στην ομάδα μελέτης.

Western blot

1. Στα περισσότερα από τα εξεταζόμενα άτομα (17/22: 12 αιμοδότες, 4 αιμοκαθαιρόμενοι, 1 έγκυος) η εικόνα του Western blot για HIV-1 παρέμεινε αδιευκρίνιστη, ενώ σε 5/22 αρνητικοποιήθηκε μετά από διάστημα 2-17 μηνών. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (13/17) παρατηρήθηκε προοδευτική απώλεια πρωτεϊνικών κλασμάτων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gag*, *pol* και *env*, χωρίς όμως ποτέ το Western blot να αρνητικοποιηθεί τελείως (πίνακας 6,7).

Η εικόνα του Western blot για HIV-2 παρέμεινε αδιευκρίνιστη σε 6/14 άτομα, ενώ απώλεια αντισωμάτων έναντι ιϊκών πρωτεϊνών (Gag και Pol) παρατηρήθηκε σε τρία από αυτά. Στα υπόλοιπα 8 άτομα το Western blot αρνητικοποιήθηκε μετά από διάστημα που κυμάνθηκε από λίγες ημέρες έως 14 μήνες (πίνακας 6,7).

2. Στα τρία άτομα που εμφάνιζαν ELISA θετική/οριακή μόνο για HIV-2 (α/α 4,14,20), το Western blot για HIV-1 είχε κοινή εικόνα που δεν παρατηρήθηκε σε άλλον εξεταζόμενο και εμφάνιζε αντισώματα έναντι μόνο της p18, ενώ η αντίδραση προς την p24 (α/α 4,20) ήταν αμφίβολη.

3. Ειδικά για την αιμοκαθαιρόμενη α/α 6, αξίζει να σημειωθεί ότι 19 μήνες μετά τον αρχικό έλεγχο εμφάνισε και αντι-gp160 αντισώματα (επιπλέον των p24,40,55 αντι-gag) στο Western blot, με τιμή ELISA στη «γκρίζα ζώνη». Με τα κριτήρια αξιολόγησης του CDC η εικόνα αυτή στο blot χαρακτηρίζεται σαν θετική για HIV-1. Το φαινόμενο αυτό ήταν παροδικό, καθώς σε επόμενο έλεγχο διαπιστώθηκε οροϋποστροφή (πίνακας 7).

Πλήρης ορολογική αρνητικοποίηση

1. Τελείως αρνητικό αποτέλεσμα στον ορολογικό έλεγχο για HIV-1 (ELISA και WB αρνητικά) διαπιστώθηκε σε 5 από τα 22 εξεταζόμενα άτομα που αρχικά παρουσίασαν θετικό ή αδιευκρίνιστο αποτέλεσμα με μία τουλάχιστον από τις δύο μεθόδους (πίνακες 6,7,8).

2. Αντίστοιχα, πλήρη ορολογική αρνητικοποίηση για τον HIV-2 εμφάνισαν 7 από 14 άτομα (πίνακες 6,7,8).

Τα συνολικά αποτελέσματα του τελικού ορολογικού ελέγχου των ατόμων της ομάδας μελέτης κατά κατηγορία (αιμοδότες, αιμοκαθαιρόμενοι, έγκυοι) δίνονται στον πίνακα 8 (τα άτομα με α/α 11 και 21 δεν συμπεριλαμβάνονται).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Συνοπτικά αποτελέσματα τελικού ορολογικού ελέγχου στην ομάδα μελέτης

Ορολογική εξέλιξη	Αιμοδότες n=16	MTN n=4	Έγκυοι n=2	Σύνολο n=22
<u>HIV-1</u>				
ELISA (-), WB (-)	4/16	0/4	1/2	5/22
ELISA (-), WB (±)	5/16	3/4	1/2	9/22
ELISA (+), WB (±)	5/16	1/4	0/2	6/22
ELISA (±), WB (±)	2/16	0/4	0/2	2/22
<u>HIV-2</u>				
ELISA (-), WB (-)	11/16	2/4	2/2	15/22
ELISA (-), WB (±)	4/16	2/4	0/2	6/22
ELISA (+), WB (-)	1/16	0/4	0/2	1/22
ELISA (+), WB (±)	0/16	0/4	0/2	0/22
<u>HIV-1 και -2</u>				
ELISA (-), WB (-)	2/16	0/4	1/2	3/22
ELISA (-), WB (±)	6/16	3/4	1/2	10/22
ELISA (+), WB (-)	1/16	0/4	0/2	1/22
ELISA (+), WB (±)	5/16	1/4	0/2	6/22
ELISA (±), WB (±)	2/16	0/4	0/2	2/22

n=αριθμός εξεταζόμενων ατόμων

Σχετικά με τον πίνακα 8 αξίζει να σχολιαστούν τα εξής σημεία:

1. Από τους 16 αιμοδότες της ομάδας μελέτης, στον τελευταίο ορολογικό έλεγχο είχαν αρνητική ELISA για HIV-1 και HIV-2 οι 8. Τα αντίστοιχα Western blots ήταν ταυτόχρονα αρνητικά μόνο στους 2.

Αυτό σημαίνει ότι αν δεν υπήρχε το ιστορικό του αρχικού αδιευκρίνιστου αποτελέσματος (οπότε δεν θα υπήρχε και λόγος να γίνει WB στα συγκεκριμένα 8 άτομα), οι 8 αυτοί αιμοδότες θα μπορούσαν επιτυχώς να δώσουν αίμα. Μετά το αποτέλεσμα της επιβεβαιωτικής μεθόδου, όμως, 6 από τα άτομα αυτά αποκλείονται από αιμοδότες και αυτό συμβαίνει παρά το γεγονός ότι είναι τελείως απίθανο να είναι μολυσμένοι από HIV (το διάστημα που έχει μεσολαβήσει από τον αρχικό έλεγχο είναι από 2 έως 17 μήνες), ενώ η μη καταληκτική εικόνα στο WB δεν συνδυάζεται με άλλο γνωστό πρόβλημα υγείας.

2. Και οι 4 αιμοκαθαιρόμενοι ασθενείς της μονάδας τεχνητού νεφρού εμφάνιζαν επίμονα αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot. Οι εναλλαγές μεταξύ αρνητικών και θετικών τιμών στην ELISA και η απουσία σταθερής εξέλιξης προς θετικότητα στο WB για διάστημα 2-3 ετών, πρακτικά απέκλειαν την πιθανότητα κλασσικής HIV λοίμωξης

στην ομάδα αυτή. Το γεγονός ότι κανένας από τους 4 δεν είχε λάβει μεταγγίσεις, δημιουργεί πρόβλημα στην ερμηνεία του φαινομένου.

3. Οι δύο έγκυοι που παρακολουθήσαμε είχαν πρακτικά την ίδια εξέλιξη. Σε όλη τη διάρκεια της κύησης η ELISA ήταν θετική (και μάλιστα με ιδιαίτερα υψηλές τιμές στη μία από τις δύο γυναίκες) και το Western blot σταθερά αδιευκρίνιστο. Μετά τον τοκετό η ELISA αρνητικοποιήθηκε και στις δύο, ενώ το WB (που και πάλι δεν θα γινόταν αν δεν υπήρχε το αρχικό αδιευκρίνιστο αποτέλεσμα) ήταν αρνητικό στη μία και εμφάνιζε μόνο p18 ζώνη στην άλλη. Ουσιαστικά, λοιπόν, και στην ομάδα αυτή η λοίμωξη από HIV αποκλείστηκε.

2. ΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Προκειμένου να διευκρινιστεί η πιθανότητα μόλυνσης των ατόμων με εικόνα αδιευκρίνιστη στο Western blot, ακολουθήθηκε ένας αλγόριθμος ιολογικής διερεύνησης χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές.

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο αυτό, ελέγχθηκε:

1. Έκφραση ιικών πρωτεϊνών

Με έμμεσο ανοσοφθορισμό, ελέγχθηκε η έκφραση των ιικών πρωτεϊνών p24 και gp120 στην επιφάνεια ολικών μονοπύρηνων κυττάρων και εμπλουτισμένων μακροφάγων των αδιευκρίνιστων ατόμων, χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα.

α. Σε 22 άτομα ελέγχθηκε η επιφανειακή έκφραση της πρωτεΐνης **p24** σε ολικά μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (**PBMCs**): η p24 ανιχνεύθηκε σε 8 περιπτώσεις (36%) και σε ποσοστό 3-22% των κυττάρων.

Στα ίδια άτομα έγινε έλεγχος και για έκφραση της **gp120**: η ιϊκή γλυκοπρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε 10 άτομα (45%) στα ολικά μονοπύρηννα κύτταρα, σε ποσοστό 2-16% των κυττάρων (πίνακες 9,10).

Σε 6 άτομα παρατηρήθηκε ταυτόχρονη έκφραση των δύο πρωτεϊνών του HIV στα ολικά μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος.

β. Σε 10 άτομα η μεμβρανική έκφραση των p24 και gp120 μελετήθηκε και σε εμπλουτισμένα μακροφάγα (**ΜΦ**). Σε 7 περιπτώσεις (70%) το αποτέλεσμα ήταν θετικό για την **p24** σε ποσοστό 4-17% των κυττάρων. Έκφραση της **gp120** παρατηρήθηκε σε 8 περιπτώσεις (80%) σε ποσοστό 2-16% των κυττάρων (πίνακες 9,10).

Σε 6 περιπτώσεις τα μακροφάγα ήταν θετικά και για τις δύο ιϊκές πρωτεΐνες ταυτόχρονα.

Σε ένα άτομο (α/α 22) τόσο η p24 όσο και η gp120 ανιχνεύθηκαν σε εμπλουτισμένα μακροφάγα (σε ποσοστό 6% και 9% των κυττάρων, αντίστοιχα), ενώ τα ολικά μονοπύρηννα κύτταρα ήταν αρνητικά για έκφραση ιικών πρωτεϊνών.

Λιγότερα από 1% των κυττάρων βρέθηκαν θετικά με τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα σε οροαρνητικούς αιμοδότες.

Τα αναλυτικά αποτελέσματα για κάθε εξεταζόμενο άτομο παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Τα συνολικά αποτελέσματα της επιφανειακής έκφρασης πρωτεϊνών του HIV σε μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος και σε εμπλουτισμένα μακροφάγα ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot, φαίνονται στον πίνακα 10.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: έκφραση ιϊκών πρωτεϊνών σε κύτταρα αδιευκρίνιστων ατόμων

Α/α	Θετικά PBMCs (%)		Θετικά ΜΦ (%)	
	p24	gp120	p24	gp120
1.	5	0	4	3
2.	10	3	9	11
3.	0	5	4	2
4.	3	2	8	5
5.	0	3	0	3
6.	22	16	17	16
7.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
8.	5	0	ΔΕ	ΔΕ
9.	1	13	ΔΕ	ΔΕ
10.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
11.	11	10	6	0
12.	8	2	ΔΕ	ΔΕ
13.	13	8	0	0
14.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
15.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
16.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
17.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
18.	0	4	0	5
19.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
20.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
21.	0	0	ΔΕ	ΔΕ
22.	0	0	6	9

ΔΕ: δεν έγινε

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επιφανειακής έκφρασης πρωτεϊνών του HIV σε κύτταρα αδιευκρίνιστων ατόμων

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	PBMCs		ΜΦ	
	n	ΘΕΤΙΚΑ (%)	n	ΘΕΤΙΚΑ (%)
p24	22	8 (36%)	10	7 (70%)
gp120	22	10 (45%)	10	8 (80%)
p24 + gp120	22	6 (27%)	10	6 (60%)

n: αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν

Στα οροθετικά άτομα της ομάδας ελέγχου, τα ολικά μονοπύρηνια κύτταρα εξέφραζαν ταυτόχρονα p24 και gp120 σε 13 από τους 14 εξετασθέντες (93%). Τα αντίστοιχα ποσοστά των θετικών κυττάρων ήταν 3-24% και 3-26%.

Σε ένα μόνο οροθετικό (ασυμπτωματικό) άτομο δεν ανιχνεύθηκε έκφραση ιικών πρωτεϊνών στα κύτταρα (πίνακες 11,12).

Όταν εξετάστηκαν εμπλουτισμένα μακροφάγα για έκφραση ιικών πρωτεϊνών, θετικό αποτέλεσμα βρέθηκε σε 9 άτομα (64%) για την p24 και σε 10 (71%) για την gp120. Τα ποσοστά θετικότητας των κυττάρων ήταν 4-11% και 3-12%, αντίστοιχα. Ταυτόχρονη έκφραση και των δύο πρωτεϊνών στα μακροφάγα ανιχνεύθηκε σε 9 άτομα (64%) (πίνακες 11, 12).

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: έκφραση ιικών πρωτεϊνών σε κύτταρα οροθετικών ατόμων

Α/α	% θετικών PBMCs		% θετικών ΜΦ	
	p24	gp120	p24	gp120
1.	11	21	7	5
2.	9	7	6	7
3.	21	25	10	8
4.	19	13	0	0
5.	6	5	5	4
6.	4	3	0	0
7.	24	26	11	12
8.	7	5	4	3
9.	3	3	8	7
10.	13	17	0	10
11.	18	15	0	0
12.	4	3	4	3
13.	19	20	5	12
14.	0	0	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα επιφανειακής έκφρασης πρωτεϊνών του HIV σε κύτταρα οροθετικών ατόμων

ΠΡΩΤΕΪΝΗ	PBMCs		ΜΦ	
	n	ΘΕΤΙΚΑ (%)	n	ΘΕΤΙΚΑ (%)
p24	14	13 (93%)	14	9 (64%)
gp120	14	13 (93%)	14	10 (71%)
p24 + gp120	14	13 (93%)	14	9 (64%)

n: αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν

2. Καλλιέργεια κυττάρων και απόπειρα απομόνωσης ιού

Διαπιστώσαμε, συνεπώς, ότι η αντίδραση έναντι των πρωτεϊνών Gag ήταν ειδική και παραμένουσα για μακρό χρονικό διάστημα, ενώ σε μερικές περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν στον ορό αντισώματα και έναντι των πρωτεϊνών των γονιδίων *pol* και *env*. Επιπλέον, τα κύτταρα ορισμένων από τα αδιευκρίνιστα άτομα εξέφραζαν ιϊκές πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους.

Τα δεδομένα όμως αυτά δεν ήταν επαρκή για κάποιο συμπέρασμα, αφού άτομα με συναφή αποτελέσματα στον πρωτογενή έλεγχο δεν είχαν αντίστοιχα θετικά ευρήματα, ενώ και αντίστροφα, τα άτομα με ενδείξεις μόλυνσης δεν αποτελούσαν ομοιογενή ομάδα.

Το επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια απομόνωσης HIV με καλλιέργεια.

Ολικά μονοπύρηνια κύτταρα ήταν διαθέσιμα σε 20 (α/α 1-20) από τα άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot. Αφού διεγέρθηκαν επί 3 ημέρες με PHA-P, τέθηκαν σε συγκαλλιέργεια με τη δεκτική στον HIV λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310, που εκφράζει CD4 υποδοχέα. Η συγκαλλιέργεια έγινε με την προσθήκη IL-2, saif και polybrene για ενίσχυση του ιϊκού πολλαπλασιασμού και διευκόλυνση της μόλυνσης υγιών κυττάρων από τον HIV.

Σε 7 (α/α 1-7) από τα εξεταζόμενα άτομα έγινε καλλιέργεια διαδοχικών δειγμάτων στη διάρκεια 3 ετών.

Τα υπερκείμενα που ελήφθησαν από τις ανά 3ήμερο αλλαγές του θεραπευτικού μέσου της κυτταροκαλλιέργειας καταψύχθηκαν σε κλάσματα του 1 ml στους -80°C και στη συνέχεια ελέγχθηκαν για ένδειξη παρουσίας HIV με δύο τρόπους: ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) και έλεγχο παρουσίας αντιγόνου p24 (Ag p24).

Σε κάθε αλλαγή έγινε επίσης έλεγχος για επιφανειακή έκφραση p24 και gp120 στα κύτταρα του ιζήματος.

Μία καλλιέργεια χαρακτηρίστηκε σαν θετική αν παρουσίαζε στο υπερκείμενο δραστηριότητα RT ή παραγωγή p24 αντιγόνου.

2α. Ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης (RT)

Κριτήριο ιϊκού πολλαπλασιασμού αποτέλεσε η ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης, πάνω από 5000 cpm/ml, στα υπερκείμενα των καλλιεργειών.

Δραστηριότητα Mg^{++} - εξαρτώμενης RT στις ιοντικές συνθήκες που απαιτεί το ένζυμο του HIV διαπιστώθηκε μόνο σε 3 από τα 20 άτομα που ελέγχθηκαν, σε χαμηλό τίτλο (πίνακας 13). Η παραγωγή ιού γινόταν εμφανής σχετικά αργά, μετά την ένατη ημέρα της καλλιέργειας, και είχε διάρκεια 3-4 ημερών.

2β. Ανίχνευση αντιγόνου p24 (Ag p24)

Η παραγωγή p24 αντιγόνου ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ELISA διπλού αντισώματος (Abbott). Όλα τα θετικά δείγματα επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια με συμπληρωματική δοκιμασία εξουδετέρωσης.

Θετικά θεωρήθηκαν τελικά τα δείγματα που εμφάνιζαν τιμές ίσες ή υψηλότερες του κατωφλίου με την κλασική μέθοδο και μεγαλύτερη από 50% μείωση της οπτικής πυκνότητας μετά την επώαση με το εξουδετερωτικό αντίσωμα.

Η ανίχνευση του p24 αντιγόνου απέβη θετική στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των 3 περιπτώσεων στις οποίες διαπιστώθηκε δραστηριότητα RT πάνω από 5000 cpm. Σε 4 ακόμα άτομα διαπιστώθηκε παραγωγή αντιγόνου στο υπερκείμενο της

καλλιέργειας, παρά το γεγονός ότι η δραστηριότητα της RT ήταν χαμηλότερη των 5000 cpm/ml (πίνακας 13).
Για τα άτομα με a/a 3 και 4, η τιμή του αντιγόνου ήταν ίση με αυτήν του κατωφλίου της μεθόδου και θεωρήθηκε αμφίβολη.

Όπως και στην περίπτωση της RT, η παραγωγή p24 στα υπερκείμενα των θετικών συγκαλλιιεργειών αποδείχθηκε μάλλον βραδεία (μετά τη 10^η ημέρα), παροδική (διάρκεια 2-4 ημέρες) και σχετικά χαμηλή, όπως συμπεραίνεται από τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του αντιγόνου σε αυτά (πίνακας 14).

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Θετικό αποτέλεσμα από τη συγκαλλιέργεια PBMCs ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot με την δεκτική στον HIV-1 λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

A/α	Ag p24 (pg/ml)	% θετικών p24	κυττάρων gp 120	ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ RT (cpm±SD) *‡
1.	83.3	13	14	6242 ± 426
2.	203.3	6	12	4563 ± 265
3.	62.5 †	ΔΕ	ΔΕ	2742 ± 165
4.	62.5 †	5	5	3976 ± 228
5.	83.3	0	0	4625 ± 135
6.	167.4	6	12	10813 ± 365
7.	264.5	12	13	5687 ± 438

*Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σαν μέση τιμή ± SD των cpm από τη μέτρηση τριών κλασμάτων του ίδιου δείγματος.

‡ Δραστηριότητα του ενζύμου πάνω από 5000 cpm/ml θεωρείται σαν θετικό αποτέλεσμα.

† CO: τιμή κατωφλίου (cutoff).

ΔΕ: δεν έγινε.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Παρουσία αντιγόνου p24‡ στα υπερκείμενα συγκαλλιέργειας κυττάρων CEM-A310 με PHA-P-διεγερμένα λεμφομονοκύτταρα ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot

A/α	Ημέρα συγκαλλιέργειας							
	3	6	9	12	15	18	21	24
1.	0	0	0	29	83.3	21	0	0
2.	0	0	24	203.3	186	29	0	0
5.	0	0	83.3	35.1	0	0	0	-
6.	0	0	0	167.4	28	0	0	0
7.	0	21	48.5	264.5	97.3	21	0	0

‡ σε pg/ml. Το κατώφλι της μεθόδου ήταν 62.5 pg/ml.

Σε αντίστοιχη απόπειρα απομόνωσης ιού από υπερκείμενα συγκαλλιέργειας μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος 20 οροθετικών ατόμων με κύτταρα CEM-A310, έγινε εμφανής η ετερογένεια της βιολογικής συμπεριφοράς των διαφόρων στελεχών του HIV.

Τα 20 άτομα περιελάμβαναν 11 ασυμπτωματικούς φορείς HIV-1, 2 ασθενείς με γενικευμένη λεμφαδενοπάθεια (PGL) και 7 ασθενείς με ARC/AIDS.

Απομόνωση του ιού (RT ή/και αντιγόνο θετικά) επιτεύχθηκε συνολικά σε 15/20 άτομα (75%) και, συγκεκριμένα, σε 7/11 οροθετικά ασυμπτωματικά άτομα, 2/2 ασθενείς με PGL και 6/7 ασθενείς με ARC/AIDS. Στις περιπτώσεις αυτές το p24 αντιγόνο κυμάνθηκε από 97-250 pg/ml και η RT από 2020-17171 cpm.

Πρώιμη απομόνωση του HIV παρατηρήθηκε σε έναν ασυμπτωματικό (ημέρα 8), τους δύο ασθενείς με PGL (ημέρα 4 και 7, αντίστοιχα) και τρεις ασθενείς με AIDS (ημέρα 5,6 και 8, αντίστοιχα).

2γ. Επιφανειακή έκφραση ιικών πρωτεϊνών

Εκτός από την ανίχνευση παρουσίας p24 αντιγόνου και δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης στο υπερκείμενο, τα κύτταρα των καλλιιεργειών ελέγχονταν σε κάθε αλλαγή του θεραπευτικού μέσου για την πιθανότητα επιφανειακής έκφρασης ιικών πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Σε όλα τα άτομα με θετική καλλιέργεια, πλην ενός (α/α 5), η μελέτη με έμμεσο ανοσοφθορισμό αποκάλυψε και μεμβρανική έκφραση των ιικών πρωτεϊνών p24 και gp120 στα κύτταρα της συγκαλλιέργειας, σε υψηλά ποσοστά στις περισσότερες περιπτώσεις (πίνακας 13).

Στα υπόλοιπα 13 άτομα της ομάδας μελέτης οι προσπάθειες απομόνωσης HIV με καλλιέργεια (συνολικά περισσότερες από 200 φορές) απέτυχε, αφού δεν έγινε δυνατή η ανίχνευση δραστηριότητας RT ή/και Ag p24.

Σε όλες τις περιπτώσεις πρόβλημα αποτέλεσε η αδυναμία διατήρησης των συγκαλλιιεργειών για αρκετό χρονικό διάστημα (περισσότερο από 18-20 ημέρες), γιατί παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό κυτταρικού θανάτου μετά την ένατη μέρα.

2δ. Προσπάθεια in vitro μόλυνσης κυττάρων

Επόμενη σκέψη ήταν να ελεγχθεί η δυνατότητα περάσματος του ιού από τις καλλιέργειες που είχαν στοιχεία θετικά για παρουσία HIV, σε άλλα δεκτικά κύτταρα.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ακυτταρικά υπερκείμενα των θετικών καλλιιεργειών (από τα άτομα με α/α 1,2,5,6,7) σε επανειλημμένες προσπάθειες μετάδοσης του ιού, παρουσία polybrene και saif.

Σαν στόχοι χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα CEM-A310 ή λεμφομονοκύτταρα φυσιολογικών ατόμων μετά από διέγερση με PHA-P και, σε ορισμένες περιπτώσεις (άτομα α/α 1-7), και η προ-μονοκυτταρική σειρά U937, η οποία εκφράζει τόσο CD4 όσο και Fc υποδοχείς.

Σκοπός της χρήσης διαφορετικών κυττάρων για συγκαλλιέργεια ήταν να προσφερθούν στον ιό περισσότεροι από ένας στόχοι, αφού είναι γνωστός ο διαφορετικός τροπισμός των στελεχών του HIV.

Παρά το γεγονός ότι οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν για αρκετό χρονικό διάστημα (μέχρι και 6 εβδομάδες) και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά κύτταρα-στόχοι, οι προσπάθειες μόλυνσης απέτυχαν, αφού σε καμία περίπτωση δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα RT ή/και παρουσία αντιγόνου p24 στα υπερκείμενα.

2ε. Ανίχνευση HIV-σχετικών αλληλουχιών σε υπερκείμενα καλλιέργειας

Τα δεδομένα από τις καλλιέργειες αφήνουν ανοικτή την υπόθεση της ύπαρξης ενός ρετροϊού με Mg⁺⁺-εξαρτώμενη ανάστροφη μεταγραφάση, ο οποίος πολλαπλασιάζεται με δυσκολία στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν και ο οποίος δεν μολύνει in vitro HIV-δεκτικά κύτταρα.

Η ανίχνευση Mg⁺⁺-εξαρτώμενης RT δραστηριότητας υποδηλώνει την παρουσία του ιού στα υπερκείμενα των καλλιεργείων. Ως εκ τούτου, κατεβλήθη απόπειρα ανίχνευσης ιϊκού RNA στα υπερκείμενα των καλλιεργείων των εξεταζόμενων ατόμων.

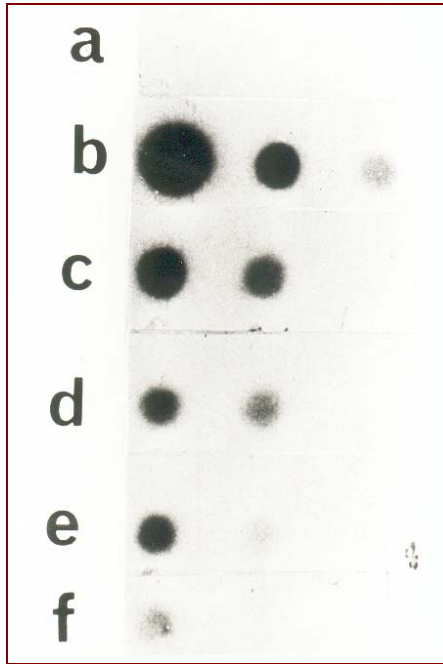
Αρχικά, μετά από λύση των πιθανών ισοωματίων και απομόνωση RNA από το υπερφυγοκεντρημένο ίζημα του υπερκείμενου των συγκαλλιεργείων, το νουκλειικό οξύ προσροφήθηκε σε μεμβράνη πλαστικοποιημένης νιτροκυτταρίνης σε συσκευή slot blot. Ακολούθησε υβριδοποίηση της μεμβράνης σε συνθήκες υψηλής συγγένειας (65°C) με τα *Bgl*II/*Eco*RI θραύσματα του γενωμικού κλώνου HXB2 του HIV-1 που αντιστοιχούν στις περιοχές *gag-pol*, *env* και *tat* μετά από σήμανση με ³²P και, τελικά, αυτοραδιογραφία.

Θετικό σήμα διαπιστώθηκε σε 8, 9 και 2 περιπτώσεις, αντίστοιχα (πίνακας 15).

Ταυτόχρονη αντίδραση με *gag-pol* και *env* cDNA δείκτες του HIV-1 παρατηρήθηκε σε 7 από τις 20 περιπτώσεις που εξετάστηκαν, ενώ δύο άτομα έδωσαν θετικό σήμα στον υβριδισμό και με τους 3 cDNA δείκτες του HIV-1 που χρησιμοποιήθηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Ανίχνευση HIV-1-σχετικών αλληλουχιών στο υπερκείμενο συγκαλλιεργείων PBMCs ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot με την δεκτική στον HIV λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

A/α	cDNA δείκτες HIV-1		
	<i>gag-pol</i>	<i>env</i>	<i>tat</i>
1.	-	-	-
2.	+	+	+
3.	-	-	-
4.	-	-	-
5.	-	-	-
6.	+	+	+
7.	+	-	-
8.	+	+	-
9.	+	+	-
10.	+	+	-
11.	-	-	-
12.	-	-	-
13.	+	+	-
14.	-	-	-
15.	-	-	-
16.	-	-	-
17.	-	-	-
18.	+	+	-
19.	-	+	-
20.	-	+	-



Εικόνα 5: αυτοραδιογραφία μετά από υβριδοποίηση του *gag-pol* θραύσματος του κλώνου HXB2 του HIV-1 με RNA απομονωμένο από το υπερκείμενο καλλιιεργειών, σε διαδοχικές υποδιπλάσιες αραιώσεις.

A: υπερκείμενο 3^{ης} ημέρας συγκαλλιέργειας διεγερμένων με PHA-P μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος οροαρνητικού αιμοδότη, με κύτταρα CEM-A310.

B: υπερκείμενο 6^{ης} ημέρας καλλιέργειας κυττάρων CEM-A310 μολυσμένων με HIV-1.

C-D-E-F: υπερκείμενα συγκαλλιέργειας μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot (α/α 2,6,7,9 αντίστοιχα) με κύτταρα CEM-A310 (ημέρα 12).

Παρά το γεγονός ότι η λοίμωξη από HIV-2 έχει περιορισμένη και συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή και ενώ δεν υπήρχαν στοιχεία από το ιστορικό των εξεταζόμενων ατόμων που να παραπέμπουν στην πιθανότητα αυτή, η εικόνα στον πρωτογενή έλεγχο και το Western blot δεν απέκλειε την παρουσία HIV-2. Επιχειρήθηκε λοιπόν και ανίχνευση αλληλουχιών HIV-2 στα υπερκείμενα των συγκαλλιιεργειών των αμφίβολων ατόμων, με την ίδια μεθοδολογία.

Σαν ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν θραύσματα του κλώνου ROD1.12 του HIV-2 που αντιστοιχούν στις περιοχές *gag-pol* και *env* του ιού, μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *Pst*I.

Σε τρία από τα ιζήματα που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε θετικό σήμα στον υβριδισμό με τον *gag-pol* cDNA δείκτη και σε δύο με ανιχνευτή το θραύσμα που αντιστοιχεί στην περιοχή *env* (πίνακας 16).

Ταυτόχρονα θετική αντίδραση για τις *gag-pol* και *env* περιοχές του HIV-2 παρατηρήθηκε σε 1 περίπτωση.

Τα συνολικά αποτελέσματα ανίχνευσης ιϊκού RNA (HIV-1 και HIV-2) στα υπερκείμενα συγκαλλιέργειας κυττάρων CEM-A310 με PHA-P - διεγερμένα λεμφομονοκύτταρα ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot παρουσιάζονται στον πίνακα 17.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Ανίχνευση HIV-2-σχετικών αλληλουχιών στο υπερκείμενο συγκαλλιεργείων PBMCs ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot με την δεκτική στον HIV λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

Α/α	cDNA δείκτες HIV-2	
	<i>gag-pol</i>	<i>env</i>
1.	-	-
2.	-	+
3.	-	-
4.	-	-
5.	-	-
6.	-	-
7.	-	-
8.	-	-
9.	+	-
10.	-	-
11.	-	-
12.	-	-
13.	+	+
14.	-	-
15.	-	-
16.	-	-
17.	-	-
18.	+	-
19.	-	-
20.	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Ανίχνευση HIV-1 και HIV-2-σχετικών αλληλουχιών στο υπερκείμενο συγκαλλιεργείων PBMCs ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot με την δεκτική στον HIV λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

cDNA ΔΕΙΚΤΗΣ	n	ΘΕΤΙΚΑ
HIV-1 <i>gag-pol</i>	20	8
HIV-1 <i>env</i>	20	9
HIV-1 <i>tat</i>	20	2
HIV-1 <i>gag-pol+env</i>	20	7
HIV-1 <i>gag-pol+env+tat</i>	20	2
HIV-2 <i>gag-pol</i>	20	3
HIV-2 <i>env</i>	20	2
HIV-2 <i>gag-pol+env</i>	20	1
HIV-1 <i>gag-pol+env</i> και HIV-2 <i>gag-pol</i>	20	2
HIV-1 <i>gag-pol+env+tat</i> και HIV-2 <i>env</i>	20	1
HIV-1 και HIV-2 <i>gag-pol+env</i>	20	1

n = αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν

Η ανίχνευση HIV-1 και HIV-2 - σχετικών αλληλουχιών ταυτόχρονα σε ορισμένα υπερκείμενα (α/α 2,9,13,18) υποδηλώνει την παρουσία ενός RNA ιού συγγενικού τόσο με τον HIV-1 όσο και με τον HIV-2 (πίνακας 17).

Επίσης, ο μειωμένος αριθμός των θετικών για *tat* αλληλουχίες δειγμάτων σε συνδυασμό με την βραδεία και χαμηλού τίτλου ιϊκή αναπαραγωγή που διαπιστώθηκε από την ανίχνευση αντιγόνου και δραστηριότητας RT, κατευθύνουν προς την ύπαρξη στελέχους με σημαντική μετάλλαξη στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος.

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα παραπάνω πειράματα υπερφυοκεντρημένα υπερκείμενα από συγκαλλιέργειες λεμφομονοκυττάρων περιφερικού αίματος οροαρνητικών αιμοδοτών με μη μολυσμένα κύτταρα CEM-A310.

Συνοψίζοντας

τα αποτελέσματα της προσπάθειας ανίχνευσης παρουσίας HIV στις καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος των αμφίβολων ατόμων είναι εμφανές ότι:

Αφενός, παρατηρήθηκε ετερογένεια των αποτελεσμάτων και

Αφετέρου, σε ορισμένα από τα εξεταζόμενα άτομα διαπιστώθηκαν ισχυρές ενδείξεις παρουσίας πολλαπλασιαζόμενου ρετροϊού που το γονιδίωμά του περιέχει αλληλουχίες ομόλογες γονιδίων των HIV-1 και HIV-2 (πίνακας 18).

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Ιολογική διερεύνηση ατόμων με αδιευκρίνιστο Western blot: Ενδείξεις παρουσίας HIV σε υπερκείμενα συγκαλλιέργειας PBMCs με την δεκτική στον HIV-1 λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

	Ag p24	RT	HIV-1			HIV-2	
			<i>gag-pol</i>	<i>env</i>	<i>tat</i>	<i>gag-pol</i>	<i>env</i>
1.	+	+	-	-	-	-	-
2.	+	-	+	+	+	-	+
3.	±	-	-	-	-	-	-
4.	±	-	-	-	-	-	-
5.	+	-	-	-	-	-	-
6.	+	+	+	+	+	-	-
7.	+	+	+	-	-	-	-
8.	-	-	+	+	-	-	-
9.	-	-	+	+	-	+	-
10.	-	-	+	+	-	-	-
11.	-	-	-	-	-	-	-
12.	-	-	-	-	-	-	-
13.	-	-	+	+	-	+	+
14.	-	-	-	-	-	-	-
15.	-	-	-	-	-	-	-
16.	-	-	-	-	-	-	-
17.	-	-	-	-	-	-	-
18.	-	-	+	+	-	+	-
19.	-	-	-	+	-	-	-
20.	-	-	-	+	-	-	-

±: κατώφλι της μεθόδου

gag-pol/env/tat HIV-1 και HIV-2: αντίστοιχες ιϊκές αλληλουχίες

Αντίστοιχη προσπάθεια ανίχνευσης RNA του HIV-1 έγινε και σε υπερκείμενα συγκαλλιεργείων μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος από 13 οροθετικά άτομα της ομάδας ελέγχου. Η υβριδοποίηση με τα *Bgl*II/*Eco*RI θραύσματα του κλώνου HXB2 έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα (πίνακας 19):

Ο αντίστοιχος της *gag-pol* περιοχής cDNA δείκτης υβριδίστηκε με τρία δείγματα,

Το *env* θραύσμα με 4 και

Ο *tat* δείκτης με 1.

Ήταν, συνεπώς, απόλυτα σαφές ότι η αδυναμία ανίχνευσης ιϊκού RNA στο υπερκείμενο καλλιέργειας κάποιου ατόμου, τουλάχιστον με τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, δεν σήμαινε και απουσία HIV λοίμωξης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 19: Ανίχνευση HIV-1 –σχετικών αλληλουχιών στο υπερκείμενο συγκαλλιεργείων PBMCs οροθετικών ατόμων με την δεκτική στον HIV λευχαιμική κυτταρική σειρά CEM-A310

Α/α	cDNA δείκτες HIV-1		
	<i>gag-pol</i>	<i>env</i>	<i>tat</i>
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	ΔΕ	ΔΕ	ΔΕ
4.	-	-	-
5.	-	-	-
6.	-	-	-
7.	-	+	-
8.	-	-	-
9.	-	-	-
10.	+	+	+
11.	+	+	-
12.	+	+	-
13.	-	-	-
14.	-	-	-

ΔΕ: δεν έγινε

3. ΜΕΛΕΤΗ ΑΜΦΙΒΟΛΩΝ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1α. Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-1 προϊόντος σε ολικά μονοπύρηννα κύτταρα με Southern blot

Είναι γνωστό από τη φυσική πορεία της HIV λοίμωξης ότι ο ιός μπορεί να παραμείνει ενσωματωμένος στο γονιδίωμα του ξενιστή σε DNA μορφή (προϊός) σε κατάσταση «λανθάνουσα», δηλαδή μεταγραφικά ανενεργός. Επιπλέον, ο αριθμός των κυττάρων του περιφερικού αίματος που είναι μολυσμένα κάθε στιγμή είναι μικρός. Στις περιπτώσεις αυτές είναι πιθανό μία καλλιέργεια να δώσει αρνητικό αποτέλεσμα και οι πρωτεΐνες του ιού να μην εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων.

Η ανίχνευση αλληλουχιών του ιού στο χρωμοσωμικό DNA του κυττάρου-ξενιστή, όμως, είναι ανεξάρτητη και από την παραγωγή αντισωμάτων ή μη έναντι των πρωτεϊνών του HIV και από την μεταγραφή ή μη του ιϊκού γονιδιώματος.

Η προσπάθειά μας εστιάστηκε λοιπόν στη συνέχεια, στην απόπειρα ανίχνευσης ενσωματωμένου HIV-1 προϊού στο DNA από εμπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος στα άτομα που συγκέντρωναν τις περισσότερες ενδείξεις μόλυνσης (α/α 1-10).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε αρχικά ήταν η υβριδοποίηση μετά από Southern blot, τεχνική που επιτρέπει την αναγνώριση αλληλουχιών στο ολικό ευκαρυωτικό DNA μετά από πέψη του με περιοριστικά ένζυμα.

Θετικοί μάρτυρες ήταν ο γενωμικός κλώνος HXB2 του HIV-1 μετά από πέψη με *PvuII* (μεγέθη 2737 - 2190 - 1961 - 1044 - 474 - 119 bp), καθώς και χρωμοσωμικό DNA από τρία οροθετικά για HIV άτομα μετά από πέψη με *BglII*, *EcoRI* και *PvuII* (α/α 1,4,14 της ομάδας ελέγχου).

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μεγαλομοριακού DNA από περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα πέντε υγιών αιμοδοτών (οροαρνητικών για VDRL, HBsAg και HIV) μετά από πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Σε καμία περίπτωση δεν αποκαλύφθηκε υβριδισμός κάποιου από τα *PvuII* θραύσματα του κλώνου HXB2 του HIV-1 με ομόλογες αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA των ολικών μονοπύρηννων κυττάρων των αμφίβολων ατόμων που εξετάστηκαν.

Αρνητικό ήταν επίσης το αποτέλεσμα στους οροαρνητικούς αιμοδοτές.

Από τα τρία άτομα της ομάδας ελέγχου, θετικό σήμα στην αυτοραδιογραφία παρατηρήθηκε σε δύο (α/α 1 και 4).

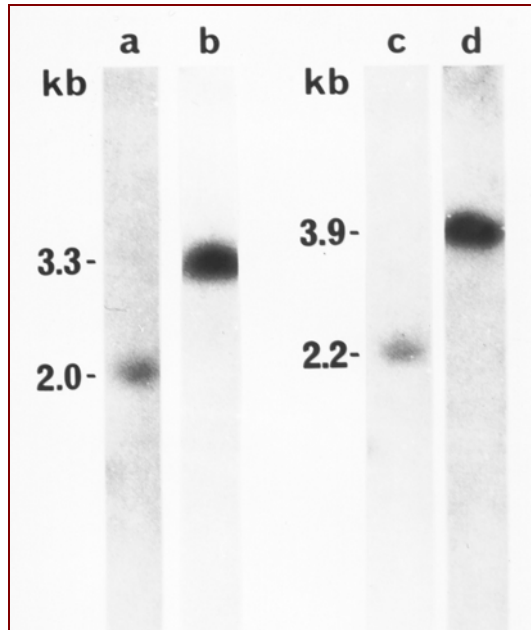
1β. Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-1 προϊού σε μακροφάγα με Southern blot

Σε 4 περιπτώσεις (α/α 1,2,5,6) έγινε απόπειρα ανίχνευσης ενσωματωμένου γονιδιώματος του HIV-1 και σε χρωμοσωμικό DNA από εμπλουτισμένα μακροφάγα, με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία.

Τα δείγματα α/α 1,5 και 6 ήταν αρνητικά.

Στο δείγμα του ατόμου α/α 2, το μεγέθους 1961 bp *PvuII* θραύσμα του γονιδίου *env* και το μεγέθους 2190 bp θραύσμα *gag-pol* του κλώνου HXB2 υβριδίζονταν με ομόλογες αλληλουχίες του κυτταρικού DNA. Το μέγεθος των υβριδιζόμενων περιοχών, όμως, ήταν αρκετά μεγαλύτερο από το αναμενόμενο: 3.3 kb για την περιοχή *env* και 3.9 kb για την περιοχή *gag-pol* (εικόνα 6).

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι HIV-σχετικές αλληλουχίες που υπήρχαν στο χρωμοσωμικό DNA των μακροφάγων του ατόμου αυτού είχαν υποστεί κάποια μετάλλαξη, αποτέλεσμα της οποίας ήταν η μετατόπιση των θέσεων αναγνώρισης του ενζύμου *PvuII* στο συγκεκριμένο γονιδίωμα συγκριτικά με το γονιδίωμα του κλώνου HXB2 του ιού.



Εικόνα 6: αυτοραδιογραφία μετά από Southern blot.

A και C: αναμενόμενο σήμα μεγέθους 2.0 και 2.2 kb για τις περιοχές *env* και *gag-pol*, αντίστοιχα, του κλώνου HXB2 του HIV-1 (θετικός μάρτυρας).

B και D: αλληλουχίες μεγέθους 3.3 και 3.9 kb, ομόλογες των περιοχών *env* και *gag-pol* του κλώνου HXB2, αντίστοιχα, ενσωματωμένες στο κυτταρικό DNA του αμφίβολου απόμου α/α 2.

1γ. Ανίχνευση ενσωματωμένου HIV-2 προϊόντος σε ολικά μονοπύρρηνα κύτταρα με Southern blot

Μετά τη διαπίστωση ότι αλληλουχίες συγγενικές του γονιδιώματος του HIV-2 είχαν ανιχνευτεί στο υπερκείμενο συγκαλλιέργειών σε ορισμένα από τα αμφίβολα άτομα (α/α 2,9,13,18), προχωρήσαμε σε αντίστοιχα πειράματα ανίχνευσης ενσωματωμένου προϊόντος HIV-2 με Southern blot, χρησιμοποιώντας σαν ανιχνευτές τα *Pst*I θραύσματα του κλώνου ROD1.12 του HIV-2 που αντιστοιχούν στις περιοχές *gag-pol* και *env* του ιού.

Ελέγχθηκαν 10 από τα αμφίβολα άτομα (α/α 1,2,3,4,7,8,9,10,13,18).

Θετικοί μάρτυρες ήταν ο γενωμικός κλώνος ROD1.12 του HIV-2 μετά από πέψη με *Pst*I, καθώς και χρωμοσωμικό DNA από τρία οροθετικά για HIV άτομα μετά από πέψη με *Bgl*II, *Eco*RI και *Pvu*II (α/α 5,10,13 της ομάδας ελέγχου, που εμφάνιζαν διασταυρούμενα θετικά αποτελέσματα για HIV-2 μόλυνση στον πρωτογενή έλεγχο). Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μεγαλομοριακού DNA από περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα πέντε υγιών αιμοδοτών (οροαρνητικών για VDRL, HBsAg και HIV) μετά από πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα.

Σε καμία περίπτωση δεν αποκαλύφθηκε υβριδισμός κάποιου από τα *Pst*I θραύσματα του κλώνου ROD1.12 του HIV-2 με ομόλογες αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA των αμφίβολων απόμων που εξετάστηκαν.

Αρνητικό ήταν επίσης το αποτέλεσμα και στα οροθετικά άτομα και στους οροαρνητικούς αιμοδότες.

2α. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε ολικά μονοπύρηννα κύτταρα

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των νουκλεϊκών οξέων, πριν την εποχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, γινόταν με τις τεχνικές Southern (για DNA) και Northern (για RNA) blotting, που έχουν ελάχιστο όριο ανίχνευσης ποσοτικού προσδιορισμού των μορίων στόχου από 10^4 έως 10^7 μόρια. Το αρνητικό αποτέλεσμα των αμφίβολων ατόμων στο Southern blot, συνεπώς, μπορούσε να εξηγηθεί με δύο τρόπους.

Η μία προφανής εκδοχή ήταν ότι απλά δεν υπήρχε ενσωματωμένος προϊός (HIV-1 ή -2) στο γονιδίωμα των εξεταζόμενων ατόμων. Αυτό όμως ερχόταν σε αντίθεση με τα αρνητικά ευρήματα όταν χρησιμοποιήθηκε DNA από επιβεβαιωμένα οροθετικούς ασθενείς.

Η δεύτερη πιθανότητα ήταν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει αλληλουχίες που υπάρχουν σε μικρό μόνο αριθμό των κυττάρων και σε λίγα (πιθανά ένα) αντίγραφα ανά κύτταρο. Η συγκεκριμένη αδυναμία ήταν γνωστό ότι υπήρχε όταν το Southern blot χρησιμοποιήθηκε στη διερεύνηση της HIV λοίμωξης από διάφορες ομάδες ερευνητών [411]. Το πρόβλημα αυτό γίνεται εντονότερο αν ληφθεί υπόψη και η ικανότητα ταχείας και συνεχούς μετάλλαξης του ιού.

Από το 1990 εφαρμόσαμε την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση αλληλουχιών του HIV-1 ενσωματωμένων στο DNA εμπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος. Είναι γνωστή η ιδιαίτερη εφαρμογή της PCR σε περιπτώσεις επιμένουσας αντισωματικής απάντησης που δεν είναι δυνατό να διαλευκανθούν οριστικά με Western blot. Επιπλέον, η ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει, θεωρητικά, την ανίχνευση ενός αντιγράφου προϊού σε 10^5 κύτταρα.

Ο γονιδιακός πολλαπλασιασμός εφαρμόστηκε σε δείγματα από 12 άτομα στα οποία ήταν διαθέσιμο μεγαλομοριακό DNA από ολικά μονοπύρηννα κύτταρα. Οκτώ άτομα με ορολογικά επιβεβαιωμένη HIV λοίμωξη αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες, μαζί με κύτταρα CEM-A310 μολυσμένα με HIV-1.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο να συμπεριληφθεί μεγάλος αριθμός επιβεβαιωμένα αρνητικών δειγμάτων στα πειράματα, για να διαπιστωθούν άμεσα τυχόν προβλήματα επιμολύνσεων που συχνά προκύπτουν λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της τεχνικής. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από ολικά μονοπύρηννα κύτταρα από 25 οροαρνητικούς για VDRL, HIV και HBsAg αιμοδότες και κύτταρα της σειράς CEM-A310.

Η PCR έγινε χρησιμοποιώντας 3 ζεύγη εκκινητικών μορίων, που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag* (LAV-1, LAV-2), *pol* (SK32, SK33) και *env* (SK68, SK69) του HIV-1 και τους αντίστοιχους ανιχνευτές. Είναι γνωστό ότι όσο περισσότερα ζεύγη εκκινητικών χρησιμοποιούνται (κατά προτίμηση από διαφορετικά γονίδια), τόσο υψηλότερο είναι το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου [412].

Τόσο στο πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με ethidium bromide, όσο και στο φιλμ της αυτοραδιογραφίας, ένα από τα 12 αμφίβολα άτομα βρέθηκε θετικό για το *gag* γονίδιο και δύο άλλα για το *pol*, ενώ δεν υπήρξε θετικό αποτέλεσμα για το γονίδιο *env* με τα ολιγονουκλεοτιδικά ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 20).

ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Ανίχνευση HIV-1 αλληλουχιών στο γονιδίωμα ολικών μονοπύρηνων κυττάρων (PBMCs) αμφίβωλων ατόμων με PCR, με εκκινητές που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του ιού

A/α	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
1.	-	-	ΔΕ
2.	-	-	-
3.	-	-	-
4.	-	-	-
5.	-	-	-
6.	-	+	-
7.	+	-	-
8.	-	-	-
9.	-	+	-
10.	-	-	-
11.	-	-	-
12.	-	-	-

ΔΕ: δεν έγινε

Στους 8 οροθετικούς ασθενείς της ομάδας ελέγχου η PCR έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: όλα τα άτομα ήταν θετικά για το γονίδιο *gag*,
4/8 έδωσαν θετικό σήμα για το γονίδιο *pol* και
6/8 έδωσαν θετικό σήμα για το γονίδιο *env*
με τα ολιγονουκλεοτιδικά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 21).

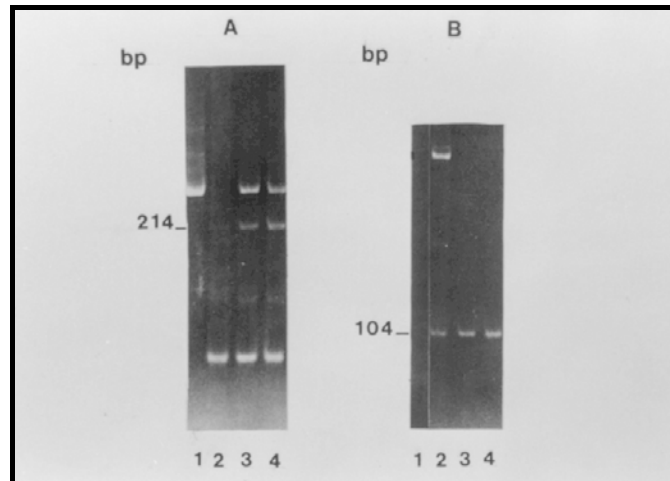
ΠΙΝΑΚΑΣ 21: Ανίχνευση HIV-1 αλληλουχιών στο γονιδίωμα ολικών μονοπύρηνων κυττάρων (PBMCs) οροθετικών ατόμων με PCR, με εκκινητές που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του ιού

A/α	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
1.	+	+	+
2.	+	-	-
4.	+	+	+
5.	+	-	-
6.	+	+	+
7.	+	+	+
8.	+	-	+
9.	+	-	+

Τα μολυσμένα με HIV-1 κύτταρα CEM-A310 έδωσαν σε όλα τα πειράματα θετικό σήμα, με ζώνη στη θέση του αναμενόμενου μεγέθους του προϊόντος ενίσχυσης.

Κανένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες δεν εμφάνισε θετικό σήμα με τους εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν.

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν εις διπλούν και όλα τα θετικά αποτελέσματα επαναλήφθηκαν για επαλήθευση, με τα ίδια ζεύγη εκκινητικών μορίων.



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά την PCR σε ολικά μονοπύρηνια κύτταρα με εκκινητικά μόρια αντίστοιχα των γονιδίων *gag* (A) και *pol* (B). A. 1: κύτταρα CEM-A310, 2: οροαρνητικός αιμοδότης, 3: άτομο α/α 7, 4: κύτταρα CEM-A310 μολυσμένα με HIV. Αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 214 bp. B. 1: οροαρνητικός αιμοδότης, 2: άτομο α/α 6, 3: άτομο α/α 9, 4: κύτταρα CEM-A310 μολυσμένα με HIV. Αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης 104 bp.

2β. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε μακροφάγα

Η διαπίστωση της παρουσίας αλληλουχιών που στο Southern blot υβριδίζουν με τα *gag-pol* και *env* θραύσματα του κλώνου HXB2 του HIV-1 στο γενωμικό DNA μακροφάγων του αμφίβολου ατόμου α/α 2 (ενώ τα ολικά μονοπύρηνια κύτταρα ήταν αρνητικά) μας οδήγησε να δοκιμάσουμε τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό και σε μακροφάγα, σε όσα από τα άτομα υπήρχε διαθέσιμο DNA.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ο υβριδισμός έγιναν όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω για τα ολικά μονοπύρηνια κύτταρα, σε DNA από εμπλουτισμένα μακροφάγα (ΜΦ) 8 ατόμων της ομάδας μελέτης. Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια ζεύγη εκκινητικών μορίων για τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του HIV-1 και οι αντίστοιχοι ανιχνευτές.

Θετικοί μάρτυρες ήταν κύτταρα CEM-A310 μολυσμένα με HIV-1 και DNA από μακροφάγα από τα οκτώ οροθετικά άτομα που αποτέλεσαν τους θετικούς μάρτυρες και στο γονιδιακό πολλαπλασιασμό σε ολικά μονοπύρηνια κύτταρα.

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα DNA από μακροφάγα 12 οροαρνητικών για VDRL, HIV και HBsAg αιμοδοτών και κύτταρα της σειράς CEM-A310.

Από την ομάδα των 8 αμφίβολου ατόμων, κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό για τα γονίδια *gag* και *env*, ενώ ένα βρέθηκε θετικό για το γονίδιο *pol* (πίνακας 22).

Τα μολυσμένα με HIV-1 κύτταρα CEM-A310 έδωσαν σε όλα τα πειράματα θετικό σήμα, με ζώνη στη θέση του αναμενόμενου μεγέθους του προϊόντος ενίσχυσης.

Κανένα από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες δεν εμφάνισε θετικό σήμα με τους εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22: Ανίχνευση HIV-1 αλληλουχιών στο γονιδίωμα μακροφάγων (ΜΦ) αμφίβωλων ατόμων με PCR, με εκκινητές που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του ιού

A/α	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
2.	-	-	-
3.	-	-	-
4.	-	-	-
5.	-	+	-
6.	-	-	-
7.	-	-	-
8.	-	-	-
9.	-	-	-

Στους 8 οροθετικούς ασθενείς της ομάδας ελέγχου η PCR έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: σε όλα τα άτομα διαπιστώθηκε θετικό σήμα για το γονίδιο *gag*, 5/8 έδωσαν θετικό σήμα για το γονίδιο *pol* και 6/8 για το γονίδιο *env*, με τα ολιγονουκλεοτιδικά ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 23).

ΠΙΝΑΚΑΣ 23: Ανίχνευση HIV-1 αλληλουχιών στο γονιδίωμα μακροφάγων (ΜΦ) οροθετικών ατόμων με PCR, με εκκινητές που αντιστοιχούν στα γονίδια *gag*, *pol* και *env* του ιού

A/α	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
1.	+	+	+
2.	+	-	-
4.	+	+	+
5.	+	-	+
6.	+	+	+
7.	+	+	+
8.	+	-	+
9.	+	+	-

Τα συνολικά αποτελέσματα από την ιολογική και μοριακή διερεύνηση παρουσίας HIV στα άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot που συγκέντρωναν τα περισσότερα στοιχεία πιθανής μόλυνσης, παρουσιάζονται στον πίνακα 24.

ΠΙΝΑΚΑΣ 24: Συνολικές ενδείξεις παρουσίας HIV σε άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot

A/α	Καλλιέργεια ιού#	Dot blot ¹	%θετικών p24	κυττάρων ² gp 120	Southern blot	PCR
1.	+ (Ag,RT)	-	13	14	-	-
2.	+ (Ag)	+(gag,env,tat)	6	12	+ (ΜΦ)	-
3.	±* (Ag)	-	ΔΕ	ΔΕ	-	-
4.	±* (Ag)	-	5	5	-	-
5.	+(Ag)	-	0	0	-	+(pοl, ΜΦ)
6.	+ (Ag,RT)	+(gag,env,tat)	6	12	-	+ (pοl)
7.	+ (Ag,RT)	+ (gag)	12	13	-	+ (gag)
8.	-	+ (gag,env)	0	0	-	-
9.	-	+ (gag,env)	0	0	-	+ (pοl)
10.	-	+ (gag,env)	0	0	-	-
11.	-	-	0	0	-	-
12.	-	-	0	0	-	-

Θετική χαρακτηρίστηκε μία καλλιέργεια αν εμφάνιζε στο υπερκείμενο δραστηριότητα RT>5000 cpm/ml ή/και παρουσία Ag p24.

*Τιμή Agp24 ίση με το κατώφλι της μεθόδου.

¹ Ανίχνευση HIV-σχετικών αλληλουχιών με dot blot στο υπερκείμενο της καλλιέργειας.

² Επιφανειακή έκφραση των ιικών πρωτεϊνών στα κύτταρα της καλλιέργειας.

ΜΦ: μακροφάγα.

ΔΕ: δεν έγινε

4. ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Με δεδομένο ότι κύριο χαρακτηριστικό της λοίμωξης από HIV είναι η μείωση του αριθμού των CD4+ Τ λεμφοκυττάρων και ότι αυτό μπορεί να παρατηρηθεί (παροδικά) στην οξεία φάση αμέσως μετά τη μόλυνση, εκτιμήσαμε τη σχέση CD4+/CD8+ στα περιφερικά Τ λεμφοκύτταρα των ύποπτων ατόμων σαν σχετικό δείκτη ανοσολογικής επάρκειας.

Ο έλεγχος έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Φυσιολογικά ο λόγος αυτός είναι περίπου 2, ενώ τυπικά σε ασθενείς με προχωρημένη HIV λοίμωξη εμφανίζεται μικρότερος του 1.

Πραγματικά, στα οροθετικά για HIV άτομα της ομάδας ελέγχου ο λόγος CD4/CD8 ήταν, όπως αναμενόταν, χαμηλός και κυμάνθηκε από 0.4-1.4 (πίνακας 26).

Σε 11 από τα 24 αμφίβολα άτομα που μελετήθηκαν ο λόγος CD4⁺/CD8⁺ ήταν <1.0.

Σε 7 ακόμα άτομα ήταν χαμηλότερος του φυσιολογικού και κυμαινόταν μεταξύ 1.05 και 1.13.

Στα υπόλοιπα άτομα ο λόγος ήταν μεγαλύτερος του 1.5 (εύρος 1.69-2.06), όπως και στους φυσιολογικούς μάρτυρες (πίνακας 25).

Ο απόλυτος αριθμός των CD4⁺ κυττάρων στα άτομα με μη καταληκτικό Western blot κυμαινόταν μεταξύ 424 και 1215/dL, ενώ στους φυσιολογικούς αιμοδότες μεταξύ 725 και 1493/dL.

Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν εθελοντές αιμοδότες, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου με τα άτομα της ομάδας μελέτης, οροαρνητικοί για HBsAg και HIV.

ΠΙΝΑΚΑΣ 25: φαινοτυπική ανάλυση T λεμφοκυττάρων στην ομάδα μελέτης

A/α	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4/CD8	Αξιολόγηση
1.	56	30	1.87	Φ
2.	62	64	0.97	↓↓
3.	36	20	1.8	Φ
4.	56	33	1.7	Φ
5.	53	29	1.8	Φ
6.	44	65	0.67	↓↓
7.	49	45	1.09	↓
8.	32	45	0.71	↓↓
9.	54	62	0.87	↓↓
10.	32	49	0.65	↓↓
11.	13	51	0.25	↓↓
12.	37	35	1.05	↓
13.	43	38	1.13	↓
14.	27	30	0.9	↓↓
15.	64	31	2.06	Φ
16.	59	53	1.11	↓
17.	22	23	0.95	↓↓
18.	29	21	1.38	Φ
19.	51	47	1.08	↓
20.	36	60	0.6	↓↓
21.	13	22	0.59	↓↓
22.	44	43	1.02	↓
23.	40	55	0.72	↓↓
24.	55	50	1.1	↓

Φ: φυσιολογικός (1.7-2.1), ↓: μειωμένος (1.05-1.13), ↓↓: πολύ μειωμένος (<1)

ΠΙΝΑΚΑΣ 26: φαينوτυπική ανάλυση T λεμφοκυττάρων στην ομάδα ελέγχου

A/α	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD4/CD8	Αξιολόγηση
1.	32	46	0.69	↓↓
2.	49	45	1.1	↓
3.	32	64	0.5	↓↓
4.	28	47	0.6	↓↓
5.	42	33	1.27	↓
6.	54	41	1.3	↓
7.	42	64	0.66	↓↓
8.	49	35	1.4	↓
9.	31	51	0.6	↓↓
10.	56	57	0.98	↓↓
11.	31	32	0.97	↓↓
12.	23	56	0.41	↓↓
13.	27	67	0.4	↓↓
14.	51	36	1.4	↓

Φ: φυσιολογικός (1.7-2.1), ↓: μειωμένος, ↓↓: πολύ μειωμένος (<1)

5. ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΕΡΩΤΙΚΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΩΝ ΑΜΦΙΒΟΛΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Ζητήθηκε από τα άτομα της ομάδας μελέτης να παραπέμψουν για HIV έλεγχο τους ερωτικούς συντρόφους τους. Αυτό έγινε λιγότερο με σκοπό να διευκρινιστεί αν κάποιος από αυτούς ήταν μολυσμένος από HIV (θεωρήθηκε απίθανο με τα στοιχεία που είχαμε από την ομάδα μελέτης) και περισσότερο για να έχουμε κάποια εικόνα της αντίδρασης στον πρωτογενή έλεγχο συγκριτικά με τα άτομα της ομάδας μελέτης.

Στην ομάδα αυτή κατατάσσεται ουσιαστικά και η έγκυος α/α 21, που ήταν σύζυγος αιμοδότη (α/α 11) με αδιευκρίνιστο Western blot.

Η πρόταση δεν έγινε στους αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς μετά από συνεννόηση με τη μονάδα τεχνητού νεφρού.

Συνολικά προσήλθαν για ορολογικό έλεγχο HIV 8 υγιή άτομα, 2 άνδρες και 6 γυναίκες. Οι 6 γυναίκες ήταν σύζυγοι των αιμοδοτών με α/α 3,8,11,13,17,18 και οι 2 άνδρες οι σύζυγοι των εγκύων με α/α 5 και 24. Κανένας παράγοντας κινδύνου για HIV λοίμωξη δεν αναγνωρίστηκε από το ιστορικό που έδωσαν. Το HBsAg και η VDRL ήταν αρνητικά σε όλους.

Η ELISA για HIV-1 (με αντιδραστήρια δύο εταιρειών) και HIV-2 έδωσε τελείως αρνητικά αποτελέσματα. Η μοναδική τιμή που, αν και σαφώς αρνητική, διέφερε από τις υπόλοιπες ήταν της εγκύου συζύγου του αιμοδότη με α/α 11, η οποία τελικά συμπεριλήφθηκε στην ομάδα μελέτης (πίνακας 27).

Ο έλεγχος με Western blot πρώτης γενιάς που ακολούθησε, αποκάλυψε την παρουσία αντι-gag αντισωμάτων σε 5 από τα 8 άτομα για τον HIV-1 και μόνο σε ένα για τον HIV-2.

Η αντίδραση στο blot του HIV-1 στρεφόταν βασικά έναντι των p18 (4/5) και p24 (3/5). Σε δύο άτομα υπήρχε πρωτεϊνική ζώνη στην περιοχή της p24 και σε ένα ακόμα στην περιοχή της p55 (η α/α 21 της ομάδας μελέτης), χωρίς όμως να είναι απόλυτα σίγουρο ότι ήταν ιϊκής προέλευσης (πίνακας 27).

Για τον HIV-2 το μοναδικό δείγμα με αδιευκρίνιστο blot ανήκε στην έγκυο με α/α 21 της ομάδα μελέτης.

Όλες αυτές οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονταν σαν μη ειδικές μετά τον έλεγχο με συνθετικά πεπτίδια (RIBA).

Τελικά, η εικόνα του Western blot στους ερωτικούς συντρόφους των αμφίβολων ατόμων δεν είχε κάποια εμφανή ομοιότητα με την αντίστοιχη των ατόμων της ομάδας μελέτης.

Το ποσοστό των αδιευκρίνιστων Western blots στους συντρόφους των αμφίβολων ατόμων ήταν, πάντως, υψηλό και μη αναμενόμενο με βάση τις αρνητικές τιμές του πρωτογενούς ελέγχου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Αναλυτικά αποτελέσματα πρωτογενούς ελέγχου και επιβεβαιωτικών δοκιμασιών σε ερωτικούς συντρόφους ατόμων με αμφίβολο W. blot

A/α	ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΝΤΡΟΦΟΥ	ELISA HIV-1 Pasteur Abbott	LAV blot-1	RIBA	ELISA HIV-2	LAV blot-2
1.	Γ, σύζυγος 3, 38 ετών	0.002	0.035	-	0.008	-
2.	A, σύζυγος 5, 32 ετών	0.040	0.024	-	0.039	-
3.	Γ, σύζυγος 8, 20 ετών	0.028	0.003	p24ασθ	0.004	-
4.	Γ, σύζυγος 11, 22 ετών	0.121	0.065	p18,24,55±	0.055	p16,26
5.	Γ, μνηστή 13, 19 ετών	0.006	0.034	p18,24±	0.005	-
6.	Γ, σύζυγος 17, 31 ετών	0.016	0.049	p18,24ασθ	0.005	-
7.	Γ, σύζυγος 18, 43 ετών	0.050	0.060	p18,24±	0.020	-
8.	A, σύζυγος 24, 38 ετών	0.024	0.046	-	0.033	-

Οι τιμές του κατωφλίου της ELISA Abbott ήταν κατά σειρά: 0.224, 0.280, 0.233, 0.246, 0.233, 0.215, 0.186, 0.204.

Ισχύουν οι διευκρινίσεις που δόθηκαν και για τον πίνακα 4.

Στον πίνακα 28 δίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα του πρωτογενούς ελέγχου στα άτομα της ομάδας μελέτης (με α/α του πίνακα 4) και στους ερωτικούς τους συντρόφους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Συγκριτικά αποτελέσματα πρωτογενούς ελέγχου και επιβεβαιωτικών δοκιμασιών στα άτομα της ομάδας μελέτης των οποίων ελέγχθηκαν οι ερωτικοί σύντροφοι

	ELISA HIV-1	ELISA HIV-2	LAV blot-1 Pasteur	LAV blot- 2 Pasteur	RIBA
1. α/α 3	±	-	± (p24,40,55)	± (p26ασθ)	-
Σύζυγος 3	-	-	-	-	-
2. α/α 5	+	-	± (p18,40,55,gp41ασθ)	-	-
Σύζυγος 5	-	-	-	-	-
3. α/α 8	±	-	± (p18,24,55)	-	-
Σύζυγος 8	-	-	± (p24ασθ)	-	-
4. α/α 11	±	-	± (p18,24,55)	± (p16,26)	-
Σύζυγος 11	±	-	± (p18,24,55±)	± (p16,26)	-
5. α/α 13	+	-	± (p18,24,40,55)	± (p16)	-
Σύζυγος 13	-	-	± (p18,24±)	-	-
6. α/α 17	+	±	± (p18,24)	± (p26)	-
Σύζυγος 17	-	-	± (p18,24ασθ)	-	-
7. α/α 18	+	+	± (p18,24,40,55)	± (p16,26)	p24
Σύζυγος 18	-	-	± (p18,24±)	-	-
8. α/α 24	+	-	± (p24,40,55)	± (p26)	p24
Σύζυγος 24	-	-	-	-	-

6. ΤΕΛΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Με την ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων όλων των δοκιμασιών που έγιναν για τη διερεύνηση παρουσίας HIV σε άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot στα οποία ο έλεγχος ολοκληρώθηκε, ο συγκεντρωτικός πίνακας (24) μετατρέπεται στον τελικό πίνακα 29.

ΠΙΝΑΚΑΣ 29: Συνολικές ενδείξεις παρουσίας HIV σε άτομα με αδιευκρίνιστο Western blot

A/α	Αντίδραση αντι-HIV	Καλλιέργεια ιού#	Dot blot [‡]	Southern blot	PCR	Εξέλιξη ELISA	Εξέλιξη W. blot	Λόγος CD4/CD8	Συμπέρασμα
1.	Ειδική	+ (Ag,RT)	-	-	-	+	±	Φ	Πιθανή μόλυνση
2.	Ειδική	+ (Ag)	+ (gag,env,tat)	+ (ΜΦ)	-	-	-	↓↓	Πιθανή μόλυνση
3.	Μη ειδική	±* (Ag)	-	-	-	-	±	Φ	Διασταυρούμενη αντίδραση
4.	Μη ειδική	±* (Ag)	-	-	-	-	-	Φ	Διασταυρούμενη αντίδραση
5.	Μη ειδική	+ (Ag)	-	-	+ (pol, ΜΦ)	-	±	Φ	Πιθανή μόλυνση
6.	Ειδική	+ (Ag,RT)	+ (gag,env,tat)	-	+ (pol)	-	±	↓↓	Πιθανή μόλυνση
7.	Μη ειδική	+ (Ag,RT)	+ (gag)	-	+ (gag)	+	±	↓	Πιθανή μόλυνση
8.	Μη ειδική	-	+ (gag,env)	-	-	-	±	↓↓	Άγνωστο
9.	Ειδική	-	+ (gag,env)	-	+ (pol)	+	±	↓↓	Πιθανή μόλυνση
10.	Ειδική	-	+ (gag,env)	-	-	+	±	↓↓	Πιθανή μόλυνση
11.	Μη ειδική	-	-	ΔΕ	-	ΔΕ	ΔΕ	↓↓	Διασταυρούμενη αντίδραση
12.	Μη ειδική	-	-	ΔΕ	-	±	±	↓	Διασταυρούμενη αντίδραση

Θετική χαρακτηρίστηκε μία καλλιέργεια αν εμφάνιζε στο υπερκείμενο δραστηριότητα RT>5000 cpm/ml ή/και παρουσία Agr24

* Τιμή Agr24 ίση με το κατώφλι της μεθόδου

‡ Ανίχνευση αντίστοιχων HIV-σχετικών αλληλουχιών με dot blot στο υπερκείμενο της καλλιέργειας

ΔΕ: δεν έγινε

Ο αιμοδότης α/α 1:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 4 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο Western blot (WB) πρώτης γενιάς.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν φυσιολογικός (1.86).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντίδραση προς την p24 και την ενδονουκλεάση p31 ήταν ειδική. Η ELISA διατηρήθηκε θετική και το WB αδιευκρίνιστο, παρά την απώλεια πρωτεϊνικών κλασμάτων, για διάστημα 15 μηνών.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες (p24 και gp120) σε χαμηλά ποσοστά. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης και παρουσία αντιγόνου p24, ενώ δεν ανιχνεύθηκε ιικό RNA.

Μοριακή διερεύνηση: Δεν ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA με μοριακές τεχνικές (Southern blot και PCR).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Παρατηρείται ειδική και επιμένουσα αντι-gag/pol αντίδραση στον ορό και παρουσία, στην καλλιέργεια, ρετροϊού που πολλαπλασιάζεται στις ίδιες συνθήκες με τους HIVs και που το γονιδίωμά του διαφέρει σημαντικά από των κλασικών HIVs.

Ο αιμοδότης α/α 2:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA (HIV-1 και HIV-2) και παρουσία αντισωμάτων έναντι 4 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB πρώτης γενιάς.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν χαμηλός (0.98).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντίδραση προς την p24 ήταν ειδική. Η ELISA (HIV-1 και HIV-2) και το WB για HIV-1 αρνητικοποιήθηκαν μετά από περίπου 1.5 χρόνο ενώ το WB για HIV-2 παρέμεινε αδιευκρίνιστο.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε παρουσία αντιγόνου p24 και αλληλουχιών που ήταν ομόλογες γονιδίων του HIV-1 (*gag-pol*, *env*, *tat*) και του HIV-2 (*env*), ενώ δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης.

Μοριακή διερεύνηση: Σε DNA από μακροφάγα ανιχνεύθηκαν με Southern blot αλληλουχίες ομόλογες των περιοχών *gag-pol* και *env* του κλώνου HXB2 του HIV-1, μεγέθους μεγαλύτερου από το αναμενόμενο. Δεν ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες ενσωματωμένες στο χρωμοσωμικό DNA με PCR.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Παρά την ορολογική αρνητικοποίηση το άτομο εμφανίζει ειδική αντι-gag αντίδραση, ενώ στην καλλιέργεια ανιχνεύεται ιός που το γονιδίωμά του έχει εμφανή ομολογία με δομικά και ρυθμιστικά γονίδια των κλασικών HIVs. Επιπλέον, ανιχνεύονται στο χρωμοσωμικό DNA του ατόμου ενσωματωμένες αλληλουχίες ομόλογες του HIV-1, αλλά εμφανώς μεταλλαγμένες.

Ο αιμοδότης α/α 3:

Αρχικά εμφάνιζε υψηλό αρνητικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB πρώτης γενιάς, καθώς και αντι-env αντισώματα στο WB για HIV-2.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν φυσιολογικός (1.8).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA, Pepti-LAV) έδειξε ότι η αντι-HIV-1/2 αντίδραση ήταν μη ειδική. Η ELISA αρνητικοποιήθηκε, όπως και το WB HIV-2, ενώ το WB HIV-1 παρέμεινε αδιευκρίνιστο (αντι-p24) για 1 χρόνο, με σταδιακή απώλεια πρωτεϊνικών κλασμάτων.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες (p24 και gp120) σε χαμηλά ποσοστά. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε οριακή

τιμή για παρουσία αντιγόνου p24, ενώ δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης ούτε και ιϊκό RNA.

Μοριακή διερεύνηση: Δεν ανιχνεύθηκαν ιϊκές αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA με μοριακές τεχνικές (Southern blot και PCR).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η επιμένουσα, μη ειδική, αντι-HIV-1/2 αντισωματική απάντηση είναι πιθανότατα αποτέλεσμα διασταυρούμενης αντίδρασης, αφού δεν προέκυψε κάποιο στοιχείο από την ιολογική και μοριακή διερεύνηση που να θέτει σοβαρά την υπόνοια μόλυνσης από ιό σχετικό με τους HIVs.

Ο αιμοδότης α/α 4:

Αρχικά είχε πρακτικά αρνητικό αποτέλεσμα στον έλεγχο για HIV-1, όμως εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA HIV-2 και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag στο αντίστοιχο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν φυσιολογικός (1.69).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιϊκών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντι-gag αντίδραση ήταν μη ειδική. Η ELISA για HIV-2 παρέμεινε θετική για ένα χρόνο, ενώ το WB αρνητικοποιήθηκε.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν ιϊκές πρωτεΐνες (p24 και gp120) σε χαμηλά ποσοστά. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε μόνο οριακή τιμή για παρουσία αντιγόνου p24.

Μοριακή διερεύνηση: Δεν ανιχνεύθηκαν ιϊκές αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA με μοριακές τεχνικές (Southern blot και PCR).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Ισχύει ότι και για τον αιμοδότη α/α 3. Η επίμονα θετική, σε χαμηλό τίτλο, τιμή στην ELISA HIV-2 είναι πιθανότατα διασταυρούμενη αντίδραση.

Η έγκυος α/α 5:

Αρχικά εμφάνιζε πολύ υψηλή τιμή στην ELISA που διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag και της gp41 του HIV-1 στο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν φυσιολογικός (1.8).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιϊκών πρωτεϊνών (RIBA, Pertin-LAV) έδειξε ότι η αντι-HIV-1 αντίδραση δεν ήταν ειδική. Η ELISA αρνητικοποιήθηκε μετά τον τοκετό αλλά το WB, παρά την απώλεια των περισσότερων πρωτεϊνικών κλασμάτων, παρέμεινε αδιευκρίνιστο.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα εξέφραζαν μόνο gp120 σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε παρουσία αντιγόνου p24.

Μοριακή διερεύνηση: Με PCR ανιχνεύθηκαν ιϊκές αλληλουχίες ομόλογες του γονιδίου *pol* του HIV-1 ενσωματωμένες στο DNA από μακροφάγα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η διαπίστωση μη ειδικής αντι-gag/env αντίδρασης στη διάρκεια της κύησης η οποία πρακτικά υποχώρησε μετά τον τοκετό και η ανίχνευση μόνο αντιγόνου p24 (σε χαμηλό τίτλο) στην καλλιέργεια, θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διασταυρούμενη αντίδραση. Η παρουσία, όμως, αλληλουχιών ομόλογων με την περιοχή *pol* του HIV-1 ενσωματωμένων στο χρωμοσωμικό DNA, αφήνει ανοικτή την πιθανότητα ύπαρξης ιού συγγενικού με τους HIVs.

Η αιμοκαθαιρόμενη ασθενής α/α 6:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 4 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν σαφώς μειωμένος (0.67).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιϊκών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντίδραση προς την p24 ήταν ειδική. Περίπου 1.5 χρόνο μετά τον αρχικό έλεγχο η ασθενής εμφάνισε και αντι-gp160 αντισώματα (επιπλέον των αντι-gag) στο WB,

αλλά το φαινόμενο ήταν παροδικό καθώς σε επόμενο έλεγχο διαπιστώθηκε ορούποστροφή. Τελικά, μετά πάροδο τριετίας και μετά από εναλλαγές μεταξύ υψηλών θετικών και σαφώς αρνητικών τιμών, η ELISA αρνητικοποιήθηκε αλλά η αντι-p24 αντίδραση στο WB διατηρήθηκε.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα της ασθενούς εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες σε ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης, παρουσία αντιγόνου p24 και ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες που υβριδίζονταν και με τα τρία θραύσματα του κλώνου HXB2 του HIV-1 (*gag-pol*, *env*, *tat*) που χρησιμοποιήθηκαν σαν ανιχνευτές στο dot-blot.

Μοριακή διερεύνηση: Με PCR ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες ομόλογες του γονιδίου *pol* ενσωματωμένες στο DNA των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η συγκεκριμένη ασθενής εμφανίζει ειδική αντι-gag αντίδραση που παραμένει για χρόνια, ενώ στην καλλιέργεια ανιχνεύεται πολλαπλασιαζόμενος ρετροϊός που το γονιδίωμά του έχει εμφανή ομολογία με δομικά και ρυθμιστικά γονίδια του HIV-1. Επιπλέον, ανιχνεύονται στο χρωμοσωμικό DNA του ατόμου ενσωματωμένες αλληλουχίες ομόλογες του γονιδίου *pol* του HIV-1. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν σαφώς την παρουσία ιού σχετικού με τον κλασσικό HIV-1.

Ο αιμοδότης α/α 7:

Αρχικά εμφάνιζε υψηλό αρνητικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 4 πρωτεϊνών gag και της πολυμεράσης του HIV-1 στο WB πρώτης γενιάς.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν χαμηλότερος του φυσιολογικού (1.08).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντίδραση προς τις gag-pol πρωτεΐνες δεν ήταν ειδική. Η ELISA διατηρήθηκε θετική και το WB αδιευκρίνιστο (αντι-p24), παρά την απώλεια πρωτεϊνικών κλασμάτων, για διάστημα 10 μηνών.

Ιολογική διερεύνηση: Δεν διαπιστώθηκε μεμβρανική έκφραση ιικών πρωτεϊνών στα κύτταρα. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας διαπιστώθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης, παρουσία αντιγόνου p24 και ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες ομόλογες της *gag-pol* περιοχής του HIV-1.

Μοριακή διερεύνηση: Με PCR ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες ομόλογες του γονιδίου *gag* ενσωματωμένες στο DNA των μονοπύρηνων κυττάρων.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Στον αιμοδότη αυτόν παρατηρείται επιμένουσα, αλλά μη ειδική, αντι-gag/pol αντίδραση και παρουσία πολλαπλασιαζόμενου ρετροϊού στην καλλιέργεια, με εμφανή ομολογία με τον HIV-1. Επιπλέον, η ανίχνευση ενσωματωμένων στο χρωμοσωμικό DNA αλληλουχιών ομόλογων της διατηρημένης *gag* περιοχής του HIV-1, κατευθύνει προς την παρουσία ιού σχετικού με τους κλασσικούς HIVs.

Ο αιμοδότης α/α 8:

Αρχικά εμφάνιζε υψηλό αρνητικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν χαμηλός (0.71).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντι-gag αντίδραση ήταν μη ειδική. Μετά από 6 μήνες η ELISA είχε αρνητικοποιηθεί, αλλά το WB παρέμεινε αδιευκρίνιστο (αντι-p24) για 1 χρόνο.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν μόνο p24 σε χαμηλό ποσοστό. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας δεν διαπιστώθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης ούτε παρουσία αντιγόνου p24, ενώ ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες ομόλογες των γονιδίων *gag-pol* και *env* του HIV-1 με dot blot.

Μοριακή διερεύνηση: Δεν ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA με μοριακές τεχνικές (Southern blot και PCR).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Διαπιστώνεται μη ειδική αντι-gag αντίδραση στον ορό. Το αρνητικό αποτέλεσμα στην καλλιέργεια (με κριτήρια τη δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης και την παρουσία αντιγόνου p24) σε συνδυασμό με την ανίχνευση στο υπερκείμενο αλληλουχιών ομόλογων με δύο γονίδια του HIV-1, είναι δύσκολο να εκτιμηθούν.

Ο αιμοκαθαίρομενος ασθενής α/α 9:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 4 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB πρώτης γενιάς.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν χαμηλός (0.87).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντι-p24 αντίδραση ήταν ειδική. Τέσσερις μήνες αργότερα η ELISA αρνητικοποιήθηκε, αλλά ήταν πάλι θετική μετά από 3 χρόνια. Το WB διατηρήθηκε αδιευκρίνιστο σε όλο αυτό το διάστημα, με παραμονή τελικά μόνο του αντι-p24 κλάσματος.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν μόνο gp120 σε υψηλό ποσοστό. Στο υπερκείμενο της καλλιέργειας δεν διαπιστώθηκε δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης ούτε παρουσία αντιγόνου p24, ενώ ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες ομόλογες των γονιδίων *gag-pol* των HIV-1 και HIV-2 και *env* του HIV-1 με dot blot.

Μοριακή διερεύνηση: Με την PCR ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες ομόλογες του γονιδίου *pol* του HIV-1 στο χρωμοσωμικό DNA.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η ειδική και παραμένουσα για μακρό διάστημα αντι-gag αντίδραση, η αδυναμία απομόνωσης ιού με τις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε και η ανίχνευση, τόσο στο υπερκείμενο της καλλιέργειας όσο και στο χρωμοσωμικό DNA του ατόμου, αλληλουχιών ομόλογων με γονίδια των HIV-1 και HIV-2, κατευθύνουν στην παρουσία ιού που σχετίζεται στενά με τους HIVs.

Ο αιμοδότης α/α 10:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag και της ενδονουκλεάσης (p34) του HIV-1 στο WB πρώτης γενιάς.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν πολύ χαμηλός (0.65).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντίδραση έναντι της ενδονουκλεάσης ήταν ειδική. Μετά από 10 ημέρες η ELISA ήταν ακόμη θετική, δεν δόθηκε όμως η ευκαιρία επανελέγχου αργότερα. Το WB παρέμεινε αδιευκρίνιστο με απώλεια του p34 κλάσματος.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου δεν εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες. Η καλλιέργεια ήταν αρνητική, ενώ στο υπερκείμενο ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες ομόλογες των γονιδίων *gag-pol* και *env* του HIV-1.

Μοριακή διερεύνηση: Δεν ανιχνεύθηκαν ιικές αλληλουχίες στο χρωμοσωμικό DNA με μοριακές τεχνικές (Southern blot και PCR).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η ειδική αντι-gag/pol αντίδραση, η αδυναμία απομόνωσης ιού με καλλιέργεια και η ανίχνευση στο υπερκείμενο της καλλιέργειας αλληλουχιών ομόλογων με τα δομικά γονίδια του HIV-1, κατευθύνουν στην παρουσία ιού συγγενικού με τους HIVs.

Ο αιμοδότης α/α 11:

Αρχικά εμφάνιζε υψηλό αρνητικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 3 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν εντυπωσιακά χαμηλός (0.25).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντι-gag αντίδραση δεν ήταν ειδική. Η ορολογική εξέλιξη του ατόμου δεν είναι γνωστή, αφού αρνήθηκε να προσέλθει για επανέλεγχο.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου ήταν αρνητικά για έκφραση p24 και gp120. Η καλλιέργεια ήταν τελείως αρνητική.

Μοριακή διερεύνηση: Southern blot δεν έγινε στο συγκεκριμένο άτομο, ενώ η PCR ήταν αρνητική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Η μη ειδική αντι-HIV-1 αντισωματική απάντηση φαίνεται να είναι αποτέλεσμα διασταυρούμενης αντίδρασης, αφού δεν προέκυψε κανένα στοιχείο από την ιολογική και μοριακή διερεύνηση που να θέτει σοβαρά την υπόνοια μόλυνσης από ιό σχετικό με τους HIVs.

Η αιμοδότης α/α 12:

Αρχικά εμφάνιζε θετικό αποτέλεσμα στην ELISA και παρουσία αντισωμάτων έναντι 2 πρωτεϊνών gag του HIV-1 στο WB.

Φαινότυπος λεμφοκυττάρων: Ο λόγος CD4/CD8 ήταν χαμηλός (1.05).

Ορολογική διερεύνηση: Η χρήση ανασυνδυασμένων ιικών πρωτεϊνών (RIBA) έδειξε ότι η αντι-gag αντίδραση ήταν μη ειδική. Μετά παρέλευση 3 μηνών η ELISA ήταν οριακή και το WB αμετάβλητο.

Ιολογική διερεύνηση: Τα κύτταρα του ατόμου εξέφραζαν ιικές πρωτεΐνες σε χαμηλό ποσοστό. Η καλλιέργεια ήταν τελείως αρνητική.

Μοριακή διερεύνηση: Southern blot δεν έγινε στο συγκεκριμένο άτομο, ενώ η PCR ήταν αρνητική.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ: Όπως και για τον αιμοδότη α/α 11, η μη ειδική αντι-HIV-1 αντίδραση είναι πιθανότατα διασταυρούμενη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καθώς δεν υπάρχει ακόμα διαθέσιμη αποτελεσματική θεραπεία, η διάγνωση της λοίμωξης από HIV εξακολουθεί να αποτελεί πρόβλημα με σοβαρές, εφ' όρου ζωής, συνέπειες για το μολυσμένο άτομο. Οι διαγνωστικές διαδικασίες επιβάλλεται να είναι λεπτομερείς, εκμεταλλευόμενες όλες τις διαθέσιμες τεχνολογικές εξελίξεις. Ταυτόχρονα, όμως, είναι απαραίτητο να υπάρχει σε βάθος γνώση και κατανόηση των περιορισμών που συνοδεύουν την κάθε μία από αυτές.

Επίπτωση λοίμωξης HIV

Η δήλωση των κρουσμάτων AIDS αποτελεί τον κυριότερο τρόπο παρακολούθησης της λοίμωξης HIV στις χώρες του Δυτικού κόσμου. Στην Ελλάδα η καταγραφή τους ξεκίνησε το 1984 και είναι ανώνυμη, απόρρητη και υποχρεωτική. Το ποσοστό πληρότητας των δεδομένων στη χώρα μας είναι υψηλό και εκτιμάται ότι φτάνει το 80-90%, λόγω της δωρεάν χορήγησης αντιρετρο-ϊικών φαρμάκων. Από το 1998 ξεκίνησε και η δήλωση των οροθετικών για HIV ατόμων, αφού θεωρήθηκε αναγκαία η επέκταση του επιδημιολογικού συστήματος ώστε να συλλεχθούν πληροφορίες για τις πιο πρόσφατες μολύνσεις και να είναι πληρέστερη η παρακολούθηση της επιδημίας. Για τα προηγούμενα χρόνια (από το 1983) έγινε προσπάθεια αναδρομικής συλλογής των στοιχείων, αλλά μόνο τα δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας θεωρούνται αξιολογήσιμα σε ότι αφορά την πορεία της λοίμωξης HIV στην Ελλάδα.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων (Κ.Ε.Ε.Λ.) του Υπουργείου Υγείας και Πρόνοιας, ο αριθμός των δηλωθέντων HIV-οροθετικών ατόμων (συμπεριλαμβανόμενων των κρουσμάτων AIDS) στην πενταετία 1986-1990 είναι 678. Όπως προκύπτει από τα συνολικά αποτελέσματα ελέγχου για HIV λοίμωξη του Κέντρου Αναφοράς AIDS Κρήτης στην πενταετία αυτή, 65 (9.6%) από τα παραπάνω άτομα διαγνώστηκαν στην Κρήτη, ποσοστό υπερβολικά υψηλό αναλογικά με τον πληθυσμό του νησιού.

Η επίπτωση της λοίμωξης HIV στην Κρήτη για τη συγκεκριμένη πενταετία φαίνεται να είναι, με βάση τα στοιχεία μας, 0.096% σε σύνολο 67325 ατόμων που ελέγχθηκαν. Το ποσοστό αυτό είναι παραπλανητικό σε ότι αφορά τον Κρητικό πληθυσμό, για δύο λόγους:

- στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ελέγχθηκαν στο Κέντρο Αναφοράς AIDS Κρήτης αρκετοί επιλεγμένοι οροί που εστάλησαν από διάφορα Νοσοκομεία της χώρας για επιβεβαίωση, μετά από θετικό αποτέλεσμα στον πρωτογενή έλεγχο.
- άτομα που ανήκαν σε ομάδες με συμπεριφορά υψηλού κινδύνου και προέρχονταν από άλλες περιοχές της Ελλάδας, παρουσιάστηκαν για έλεγχο και παρακολουθούνταν θεραπευτικά στην Κρήτη.

Συνεπώς, η φαινομενικά υψηλή συχνότητα λοίμωξης HIV που παρατηρήθηκε στην πενταετία 1986-1990 δεν αφορά πραγματικά τον Κρητικό πληθυσμό, γεγονός που αποδείχθηκε τα επόμενα χρόνια.

Από μία συστηματική πολυκεντρική μελέτη που έγινε σε 7 Κέντρα Αιμοδοσίας της Αττικής στο ίδιο χρονικό διάστημα (1985-1990) και αφορούσε την επίπτωση της λοίμωξης HIV στον ελληνικό αιμοδοτικό πληθυσμό, φαίνεται ότι το ποσοστό θετικότητας κυμαινόταν περί το 0.02% (0.012% το 1985-0.025% το 1987) [453].

Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη βασίζονται στον έλεγχο μίας ομάδας ατόμων που θεωρητικά είχαν μικρό κίνδυνο μόλυνσης από HIV.

Τα άτομα που επελέγησαν λόγω αδιευκρίνιστου Western blot κατά τον έλεγχο του προς μετάγγιση αίματος ήταν 17 εθελοντές περιστασιακοί αιμοδότες και το ερωτηματολόγιο που συμπληρώθηκε από όλους, σαν ρουτίνα, δεν αποκάλυψε εμφανείς παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από HIV. Δεν μπορεί βέβαια να αποκλειστεί η πιθανότητα κάποια άτομα σε υψηλό κίνδυνο για μόλυνση από HIV να επιλέγουν την αιμοδοσία σαν τρόπο ελέγχου για τη λοίμωξη, αντί να παρουσιαστούν σε Κέντρο Αναφοράς AIDS, για καθαρά κοινωνικούς λόγους.

Οι 3 έγκυοι που ελέγχθηκαν για HIV λοίμωξη σε πλαίσια προγραμματισμένου προγεννητικού ελέγχου, ήταν επίσης άτομα με αρνητικό ιστορικό για κίνδυνο HIV λοίμωξης.

Το ίδιο ισχύει και για τους 4 αιμοκαθαιρόμενους ασθενείς της Μονάδας Τεχνητού Νεφρού, κανένας από τους οποίους δεν είχε λάβει μετάγγιση αίματος ή παραγώγων στο παρελθόν.

Στη δική μας μελέτη ο πρωτογενής έλεγχος για HIV λοίμωξη έγινε με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA, με αντιδραστήρια πρώτης και δεύτερης γενιάς.

Τα άτομα της ομάδας μελέτης επελέγησαν αρχικά με βάση το αποτέλεσμα του πρωτογενούς ελέγχου, που ήταν επαναλαμβανόμενα θετική ή οριακή τιμή με ένα τουλάχιστον από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Το πρόβλημα που συχνά αποδίδεται στις ELISAs πρώτης γενιάς είναι η κάπως χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τα νεώτερα αντιδραστήρια, που όμως δεν επηρέαζε την επιλογή των εξεταζόμενων ατόμων.

Τα αδιευκρίνιστα Western blots εντοπίστηκαν με αντιδραστήρια πρώτης γενιάς, που χρησιμοποιούν κυτταρόλυμα ιού σαν αντιγόνο. Το γεγονός αυτό είναι γνωστό ότι οδηγεί μερικές φορές σε μη ειδικές αντιδράσεις που αποδίδονται στην παρουσία αντισωμάτων στον ορό που αναγνωρίζουν αντιγόνα της κυτταρικής σειράς στην οποία καλλιιεργήθηκε ο ιός.

Με δεδομένο ότι κάθε τεχνική έχει τα αδύνατα σημεία και τους περιορισμούς της, επιχειρήθηκε ανάλυση των εξεταζόμενων ατόμων με πολλαπλές προσεγγίσεις: έλεγχος της ειδικότητας της αντι-HIV αντίδρασης, παρακολούθηση της διαχρονικής εξέλιξης της ορολογικής εικόνας, ιολογική διερεύνηση με καλλιέργεια κυττάρων και προσπάθεια απομόνωσης και μετάδοσης του πιθανού ιού, ανίχνευση ενσωματωμένων ιικών αλληλουχιών στο DNA των αμφίβολων ατόμων με μοριακές τεχνικές, φαινοτυπική ανάλυση των T λεμφοκυττάρων, ορολογική διερεύνηση των ερωτικών συντρόφων των εξεταζόμενων.

1. Ειδικότητα της αντι-HIV αντίδρασης.

Σε ποσοστό 37% (9/24 εξεταζόμενα άτομα) οι ελεγχόμενοι οροί αντιδρούσαν με ανασυνδυασμένη p24 ή/και p31 πρωτεΐνη, που χρησιμοποιούνται σαν αντιγόνα σε μεθόδους ανοσοαποτύπωσης δεύτερης γενιάς (RIBA). Το συμπέρασμα είναι ότι η αντίδραση που παρατηρείται στο Western blot πρώτης γενιάς είναι ειδική σε κάποια αμφίβολα άτομα και οι επίτοποι που τα συγκεκριμένα αντισώματα αναγνωρίζουν είναι ταυτόσημοι ή πολύ παρεμφερείς με αντίστοιχους των gag-pol πρωτεϊνών του HIV-1.

Αντίθετα, η αδυναμία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι των γλυκοπρωτεϊνών του περιβλήματος των HIV-1 και HIV-2, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και συνθετικά πεπτιδία σαν αντιγόνα (RIBA, Pepti-LAV), πιθανότατα σημαίνει πραγματική απουσία ανάπτυξης αντι-επν αντισωμάτων.

2. Ορολογική εξέλιξη.

Κανένα από τα άτομα της ομάδας μελέτης δεν εμφάνισε ορομετατροπή για διάστημα που κυμαινόταν από 2 μήνες μέχρι και 4 χρόνια. Επίσης, κανένας εξεταζόμενος δεν ανέφερε ούτε παρουσίασε συμπτώματα συμβατά με ορομετατροπή ή νόσο από HIV στο διάστημα παρακολούθησης.

Παροδική εμφάνιση εικόνας συμβατής με ορομετατροπή στο Western blot, σύμφωνα με τα τότε κριτήρια του CDC, παρατηρήθηκε σε μία αιμοκαθαιρόμενη ασθενή που ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και, συνοδευόταν από υψηλή αρνητική τιμή στην ELISA. Μετά από 5 μήνες, η εικόνα του Western blot είχε πάλι υποστραφεί σε αδιευκρίνιστη, ενώ η ELISA ήταν σαφώς θετική.

3. Επιφανειακή έκφραση ιϊκών πρωτεϊνών στα κύτταρα.

Σε ορισμένα άτομα τα ολικά μονοπύρρηνα κύτταρα και τα μακροφάγα του περιφερικού αίματος εμφάνιζαν μεμβρανική έκφραση ιϊκών πρωτεϊνών, όπως έχει περιγραφεί στην τυπική λοίμωξη από HIV. Σε 35-45% από τις 22 περιπτώσεις που μελετήθηκαν τα PBMCs εξέφραζαν στην επιφάνειά τους, σε ποικίλο ποσοστό, πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gag* (p24) και *env* (gp120) του HIV, όπως αποκαλύφθηκε με έμμεσο ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα μονοκλωνικά αντισώματα. Το ίδιο διαπιστώθηκε και σε 70-80% των περιπτώσεων στις οποίες μελετήθηκαν εμπλουτισμένα ΜΦ.

Παρόλο που σε κάποια άτομα διαπιστώθηκαν ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά έκφρασης (μέχρι 2-3%), που εύκολα θα μπορούσαν να αποδοθούν στην υποκειμενικότητα της μεθόδου, παρόμοιες θετικότητες όμως βρέθηκαν και σε αποδεδειγμένα οροθετικούς για HIV λοίμωξη ασθενείς. Κατά συνέπεια, τα δεδομένα αυτά συνηγορούν υπέρ της έκφρασης στη μεμβράνη των κυττάρων πρωτεϊνών που παρουσιάζουν επιτόπους που αναγνωρίζονται ειδικά από μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των p24 και gp120 του HIV.

4. Καλλιέργεια/απομόνωση ιού.

Πειράματα συγκαλλιέργειας ολικών μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος των αμφίβολων ατόμων με τη δεκτική στον HIV κυτταρική λευχαιμική σειρά CEM-A310, αποκάλυψαν ενδείξεις παραγωγής ιού σε επτά άτομα, όπως εκτιμήθηκε με την ανίχνευση δραστηριότητας ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) ή/και παρουσίας p24 αντιγόνου στο υπερκείμενο. Η ιϊκή παραγωγή, όμως, ήταν μικρής διάρκειας και χαμηλού τίτλου. Επιπλέον, διαπιστώθηκε έκφραση των πρωτεϊνών p24 και gp120 του HIV στην επιφάνεια των κυττάρων της συγκαλλιέργειας, μετά από σήμανσή τους με μονοκλωνικά αντισώματα και έμμεσο ανοσοφθορισμό.

Στο ίζημα από τα υπερφυγοκεντρημένα υπερκείμενα της συγκαλλιέργειας ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες που υβριδίζονταν με θραύσματα του κλώνου HXB2 του HIV-1, ομόλογα των γονιδίων *gag-pol* (8/20 άτομα), *env* (9/20) και *tat* (2/20), του ιού, αλλά και με θραύσματα *gag-pol* (3/20) και *env* (2/20) του κλώνου ROD1.12 του HIV-2.

Είναι γνωστό ότι η καλλιέργεια συχνά αποτυγχάνει στην απομόνωση του HIV ακόμα και σε επιβεβαιωμένα οροθετικά άτομα, ειδικά αν ο πολλαπλασιασμός του ιού διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.

Στη δική μας περίπτωση, η αδυναμία ανίχνευσης σημαντικών επιπέδων δραστηριότητας Mg²⁺-εξαρτώμενης RT στα υπερκείμενα, παρά την ταυτόχρονη παρουσία αντιγόνου p24 και HIV-1-σχετικών αλληλουχιών, μπορεί να αποδοθεί σε πολύ χαμηλή αναπαραγωγή ιού ή σε ανεπάρκεια του πολλαπλασιασμού του λόγω γενετικών μεταλλάξεων. Συμβατή με την υπόθεση αυτή είναι η διαπίστωση μικρού αριθμού θετικών για *tat* αλληλουχίες δειγμάτων, εύρημα που κατευθύνει προς την ύπαρξη στελέχους με σημαντική μετάλλαξη στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος, που αποτελεί ισχυρότατο ενεργοποιητή της μεταγραφής του HIV. Επειδή τα πειράματα προσαρμόστηκαν στις συνθήκες πολλαπλασιασμού των HIVs, είναι επίσης πιθανό ο ιός που ανιχνεύεται να απαιτεί συνθήκες καλλιέργειας διαφορετικές για άριστη αναπαραγωγή.

Η ταυτόχρονη ανίχνευση σε ορισμένα υπερκείμενα αλληλουχιών ομόλογων με διαφορετικά γονίδια των HIV-1 και HIV-2, θα μπορούσε θεωρητικά να σημαίνει διπλή μόλυνση ή διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ τους λόγω μόλυνσης από τον έναν

(πιθανότερα τον HIV-1). Λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των ευρημάτων, όμως, είναι πολύ πιθανότερο να υποδηλώνει την παρουσία ενός RNA ιού συγγενικού με τους HIVs, αλλά διαφορετικό. Δύσκολα το φαινόμενο μπορεί να θεωρηθεί σαν μη ειδικό και να αποδοθεί στην απελευθέρωση κατά τον κυτταρικό θάνατο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που υβριδίζονται μη ειδικά με ιικά θραύσματα λόγω τυχαίας νουκλεοτιδικής ομολογίας, γιατί η ταυτόχρονη ανίχνευση αλληλουχιών από διαφορετικά δομικά γονίδια αποδυναμώνει σαφώς το επιχείρημα αυτό.

5. Καλλιέργεια/μετάδοση ιού.

Επανελλημμένες απόπειρες μετάδοσης του πιθανού ιού σε κύτταρα δεκτικά στη μόλυνση από HIV, όπως η λευχαιμική σειρά CEM-A310 και τα διεγερμένα με PHA-P φυσιολογικά λεμφομονοκύτταρα, απέτυχαν.

Αν ο υποθετικός ιός είναι σχετικός με τους κλασσικούς HIVs, η αποτυχία αυτή μπορεί να οφείλεται στα κύτταρα-στόχους που χρησιμοποιήσαμε ή σε τεχνικά προβλήματα, αλλά ενδεχόμενα υποδεικνύει ότι η αναπαραγωγική και μολυσματική ικανότητα του στελέχους είναι περιορισμένη. Στην περίπτωση αυτή η αδυναμία μόλυνσης δεκτικών κυττάρων ίσως αντανακλά σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις, όπως έχει ήδη ανακοινωθεί [413].

Αντίθετα, ο υποθετικός μολυσματικός παράγοντας μπορεί να μην σχετίζεται με τους HIVs και να απαιτεί σημαντικά διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας από τις χρησιμοποιούμενες για αυτούς.

6. Ανίχνευση ενσωματωμένων ιικών αλληλουχιών με Southern blot.

Ανάλυση με Southern blot του DNA από μακροφάγα ενός ατόμου αποκάλυψε την ύπαρξη αλληλουχιών που υβριδίζονταν με ειδικούς *gag-pol* και *env* cDNA δείκτες του HIV-1. Οι διαφορές μεγέθους που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις ενσωματωμένες αλληλουχίες και τα ομόλογά τους *gag-pol* και *env* θραύσματα του κλώνου HXB2 του HIV-1 υποδηλώνουν ότι οι δύο ιοί δεν είναι πανομοιότυποι. Οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν στην καλά τεκμηριωμένη γενετική πολυμορφία των HIVs ή στην παρουσία ιού που, αν και γονιδιακά παραπλήσιος, εμφανίζει σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις σε σύγκριση με τα άγρια στελέχη HIV-1.

Η αδυναμία διαπίστωσης ενσωματωμένου προϊού στα ολικά μονοπύρρηνα κύτταρα του ίδιου ατόμου, αλλά και στις άλλες περιπτώσεις που μελετήθηκαν με τη μέθοδο του Southern blot, ίσως αντανακλά συνδυασμό της χαμηλής ευαισθησίας της συγκεκριμένης μεθόδου στην ανίχνευση αλληλουχιών που βρίσκονται στο κυτταρικό γονιδίωμα σε λίγα αντίγραφα και του μικρού αριθμού μολυσμένων κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, το μεμονωμένο εύρημα σε συγκεκριμένο κυτταρικό υποπληθυσμό ενός ατόμου, μπορεί να σημαίνει τροπισμό του ιού προς τα κύτταρα αυτά ή να είναι τυχαίο γεγονός που οφείλεται σε υβριδισμό κυτταρικών αλληλουχιών που παρουσιάζουν νουκλεοτιδική ομολογία με ιικά θραύσματα. Και πάλι, η ταυτόχρονη αντίδραση με cDNA δείκτες αντιπροσωπευτικούς δύο γονιδίων προκαλεί επιφύλαξη στην ερμηνεία του ευρήματος σαν τυχαίου.

7. Ανίχνευση ενσωματωμένων ιικών αλληλουχιών με PCR.

Από το 1990, η άμεση ανίχνευση ενσωματωμένου ιικού υλικού στο DNA των εξεταζόμενων ατόμων έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), τεχνική που ξεπερνά τα προβλήματα χαμηλής ευαισθησίας του Southern blot.

Στο χρωμοσωμικό DNA από ολικά μονοπύρρηνα κύτταρα δύο ατόμων και σε DNA από μακροφάγα ενός τρίτου ατόμου, που είχαν θετική καλλιέργεια, διαπιστώθηκε η παρουσία *gag* ή *pol* ενσωματωμένου υλικού. Ενσωματωμένες *pol* αλληλουχίες διαπιστώθηκαν και στα ολικά μονοπύρρηνα κύτταρα ενός αιμοκαθαιρόμενου ασθενούς που δεν είχε θετικά ευρήματα στην καλλιέργεια.

Το γεγονός ότι σε κανένα από τα 12 αμφίβολα άτομα που ελέγχθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα ενσωματωμένες αλληλουχίες ομόλογες τουλάχιστον δύο

γονιδίων (σε αντίθεση με αντίστοιχα πειράματα σε οροθετικά άτομα), ίσως οφείλεται στα συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν [φαινόμενο αρκετά συχνό], ή στην παρουσία ιού γενετικά συγγενούς αλλά διαφορετικού από τους HIVs. Η αποτυχία ανίχνευσης αλληλουχιών ομόλογων του γονιδίου *env* μπορεί και πάλι να αποδοθεί στο ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήσαμε, αφού επιπλέον είναι γνωστό ότι η περιοχή του περιβλήματος εμφανίζει τη μικρότερη νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ διαφορετικών στελεχών και τη μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων, χωρίς να αποκλείεται η παρουσία συγγενικού με τους HIVs ιού.

8. Φαινοτυπική ανάλυση λεμφοκυττάρων.

Τα αποτελέσματα της φαινοτυπικής ανάλυσης των T λεμφοκυττάρων έδειξαν σημαντικά μειωμένο λόγο CD4/CD8 σε αρκετά από τα άτομα της ομάδας μελέτης (18/24). Το εύρημα αυτό συναντάται πολύ συχνά στη λοίμωξη από HIV, χωρίς βέβαια να είναι ειδικό.

Σε συνδυασμό, όμως, και με την παραγωγή αντισωμάτων που ανιχνεύονται με την αντιδραστικότητα στην ELISA και την αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot, υποδεικνύει ότι σε κάποια από τα εξεταζόμενα άτομα ίσως υπάρχει λανθάνουσα αλλά ενεργός λοίμωξη, με σαφή επίδραση στο ανοσολογικό σύστημα, παρόμοια με αυτή που προκαλούν οι HIVs.

9. Ορολογική διερεύνηση ερωτικών συντρόφων.

Από τους 8 μόνιμους ερωτικούς συντρόφους αμφίβολου ατόμων που μελετήθηκαν, κανένας δεν ήταν οροθετικός για HIV.

Με κριτήριο το αποτέλεσμα του πρωτογενούς ελέγχου, σε κανένα από τα άτομα αυτά δεν θα είχε προχωρήσει ο έλεγχος ρουτίνας σε Western blot (η μοναδική πιθανή εξαίρεση ενσωματώθηκε στην ομάδα μελέτης). Παράδοξα, στην πλειοψηφία τους τα συγκεκριμένα άτομα εμφάνιζαν αδιευκρίνιστο Western blot. Η αντίδραση που ανιχνεύθηκε στρεφόταν, και στην περίπτωση αυτή, έναντι πρωτεϊνών του πυρήνα (p18 και p24).

Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι αν κάποιος λοιμογόνος παράγοντας είναι υπεύθυνος για τον τύπο αυτό αντίδρασης που διαπιστώνεται με αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot, ίσως είναι (σεξουαλικά) μεταδιδόμενος.

Υποθέσεις

Από τα αποτελέσματα της μελέτης είναι εμφανές ότι τα αμφίβουλα άτομα που ελέγξαμε, αφενός δεν παρουσιάζουν κλασική μορφή λοίμωξης από HIV και αφετέρου δεν αποτελούν ομοιογενή ομάδα.

A) Στο μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζόμενων ατόμων η παρουσία αντι-HIV (πρακτικά αντι-gag) αντισωμάτων στο Western blot πρώτης γενιάς σχεδόν σίγουρα αντιπροσωπεύει μία διασταυρούμενη αντίδραση, αφού αποδείχθηκε μη ειδική και δεν διαπιστώθηκαν ενδείξεις μόλυνσης από HIV ή σχετικό ιό με την ιολογική και μοριακή διερεύνηση. Το αίτιο του φαινομένου δεν είναι με βεβαιότητα γνωστό. Η αντίδραση αυτή μπορεί να οφείλεται σε αντιγόνα της κυτταρικής σειράς που καλλιεργήθηκε ο ιός και τα οποία αναγνωρίζονται από αντισώματα στον ορό ή σε έκθεση του ατόμου σε (άγνωστα) αντιγόνα παρεμφερή με τις ιικές πρωτεΐνες.

B) Αντίθετα, σε κάποια άτομα η αντίδραση έναντι πρωτεϊνών του HIV αποδείχθηκε ειδική με τη χρήση συνθετικών πεπτιδίων και προέκυψαν στοιχεία που υποδεικνύουν την παρουσία πολλαπλασιαζόμενου ρετροϊού, όμως η σχέση του με τους HIVs παραμένει αδιευκρίνιστη. Στις περιπτώσεις αυτές τρεις τουλάχιστον υποθέσεις μπορούν να γίνουν για την ερμηνεία του φαινομένου.

1. Ο ιός που ανιχνεύεται είναι σχετικός με την ομάδα των κλασικών HIVs, αλλά γενετικά τροποποιημένος.

Υπέρ της παρουσίας HIV-σχετικού ιού είναι η ταυτόχρονη ανίχνευση σε υπερκείμενα καλλιιεργειών αντιγόνου p24, δραστηριότητας Mg⁺⁺-εξαρτώμενης ανάστροφης μεταγραφάσης (RT) και ιϊκού RNA που παρουσιάζει ομολογία με διαφορετικά δομικά και ρυθμιστικά γονίδια των HIVs, καθώς και η έκφραση στην επιφάνεια των κυττάρων του περιφερικού αίματος των πρωτεϊνών p24 και gp120 του HIV. Η βραδεία, μικρής διάρκειας και χαμηλού τίτλου παραγωγή ιού που ανιχνεύθηκε σε μειοψηφία των εξεταζόμενων ατόμων, όμως, πιθανά υποδεικνύει ανεπάρκεια του πολλαπλασιασμού του, οφειλόμενη δυνητικά σε μεταλλάξεις σε κάποιες περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί και η αδυναμία μόλυνσης κυττάρων δεκτικών στη μόλυνση από HIV, αφού ο ιός που ανιχνεύεται φαίνεται να μην είναι ιδιαίτερα μολυσματικός. Η ανίχνευση με PCR ενσωματωμένων στο χρωμοσωμικό DNA αλληλουχιών ομόλογων με ένα μόνο γονίδιο του HIV-1 και η διαπίστωση με Southern blot ενσωματωμένων αλλά τροποποιημένων ιϊκών αλληλουχιών σε ένα άτομο, κατευθύνουν, επίσης, ισχυρά προς την παρουσία HIV-σχετικού ρετροϊού με σημαντικές μεταλλάξεις στο γονιδίωμά του.

2. Εναλλακτικά, ο ιός που ανιχνεύεται σε ορισμένα άτομα ίσως είναι διαφορετικός από τους HIVs, εμφανίζει όμως γονιδιακή ομολογία με αυτούς.

Η παρουσία σε υπερκείμενα καλλιιεργειών αλληλουχιών ομόλογων με δομικά και ρυθμιστικά γονίδια των HIVs χωρίς ενδείξεις ιϊκού πολλαπλασιασμού HIV-σχετικού ιού, υποδεικνύουν ιό που απαιτεί διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας από αυτές που χρησιμοποιήσαμε και που ήταν προσαρμοσμένες στους HIVs, αλλά που ταυτόχρονα έχει ομολογία με τους κλασσικούς HIVs σε σημαντικό τμήμα του γονιδιώματος. Επιπλέον, η ανίχνευση ενσωματωμένων στο χρωμοσωμικό DNA ιϊκών αλληλουχιών μόνο σε μειοψηφία των εξεταζόμενων ατόμων και, μάλιστα, η παρουσία διατηρημένων *gag* αλληλουχιών σε μόνο ένα άτομο, υποδηλώνουν ιό που αν και γονιδιακά παραπλήσιος εμφανίζει σημαντικές διαφορές από τα κλασσικά στελέχη HIV-1. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και η αποτυχία μετάδοσης του πιθανού ιού σε κύτταρα αποδεδειγμένα δεκτικά στη μόλυνση από HIV, που κατευθύνει σε ιό που απαιτεί σημαντικά διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας από αυτές που χρησιμοποιούνται για τους HIVs.

3. Η λοίμωξη είναι εκτρωτική από μεταλλαγμένα στελέχη HIV ή σχετικό με τους HIVs ιό.

Η έκθεση σε ένα λοιμογόνο οργανισμό δεν οδηγεί πάντα σε αποτελεσματική μόλυνση, γιατί η επιτυχής μόλυνση προκύπτει από συνδυασμό γεγονότων.

Η εκτρωτική μόλυνση ηρεμώντων κυττάρων λόγω ελλιπούς ανάστροφης μεταγραφής του ιϊκού RNA, θα μπορούσε με τις μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε, να οδηγήσει σε σποραδικά επιτυχείς απόπειρες απομόνωσης ιού ή θετικά αποτελέσματα με PCR. Σε κάθε χρονική στιγμή, μικρός μόνο αριθμός CD4+ κυττάρων του περιφερικού αίματος βρίσκεται σε διαδικασία διαίρεσης. Επιπλέον, απαιτείται επαρκές ιϊκό φορτίο για την αποτελεσματική μόλυνση των κυττάρων αυτών, ώστε να επιτευχθεί ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο κυτταρικό γονιδίωμα. Η εδραίωση της λοίμωξης προϋποθέτει ακόμα ότι τα μολυσμένα κύτταρα θα διαφύγουν την κάθαρση από το ανοσολογικό σύστημα. Στην αντίθετη περίπτωση το άτομο δεν έχει επιτυχώς μολυνθεί μετά την επαφή του με τον ιό, ενώ η καλλιέργεια και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης θα ανιχνεύσουν στοιχεία παρουσίας του. Αυτό, βέβαια, σημαίνει επίσης ότι το άτομο δύσκολα μπορεί να μεταδώσει τον ιό.

Το σημαντικότερο πρακτικό πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε στη διεξαγωγή της μελέτης ήταν η συμμόρφωση των εξεταζόμενων ατόμων για τακτική παρακολούθησή τους. Η αμφιβολία που προκαλεί το άκουσμα «αδιευκρίνιστων» αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με την έντονα αρνητική και συχνά επιθετική τοποθέτηση στο θέμα πιθανής μόλυνσης με HIV ήταν σχεδόν αδύνατο να ξεπεραστούν.

Έτσι, δεν ήταν πάντοτε δυνατό να γίνει απόλυτη συσχέτιση των ευρημάτων κάθε δοκιμασίας στον ίδιο ασθενή.

Η απόπειρα μακροχρόνιας παρακολούθησης με σκοπό να διευκρινιστούν πιθανά αίτια για την παρουσία επίμονα αδιευκρίνιστης εικόνας στο Western blot, αλλά και για την αρνητικοποίησή της, δεν απέδωσε.

Η απουσία ορολογικής εξέλιξης προς θετικότητα, αν και ουσιαστικά απέκλειε τη λοίμωξη από HIV, δεν ήταν επαρκής για να καθυστερήσει τα αμφίβολα άτομα, αφού παρέμενε το «στίγμα» αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων με όλες τις συνέπειές του.

Παρά την εμπειρία σχεδόν 15 χρόνων στο μαζικό έλεγχο με Western blot, δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί τα αίτια που προκαλούν την εμφάνιση αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων. Πολλαπλοί παράγοντες έχουν κατά καιρούς ενοχοποιηθεί, χωρίς κανέναν να επαρκεί για την εξήγηση του φαινομένου σε υγιή άτομα. Η πολυσυζητημένη παρουσία HLA αντισωμάτων στο εκχύλισμα ιού που χρησιμοποιείται για την παρασκευή αντιδραστηρίων Western blot [310,414], δεν μπορεί να ερμηνεύσει τις αντιδράσεις που παρατηρούνται σε μη μολυσμένα άτομα και αφορούν ειδικά για τον HIV συνθετικά πεπτιδία ή ανασυνδυασμένα αντιγόνα [311,414,415]. Το αν η αντίδραση αυτή οφείλεται σε έκθεση των ατόμων σε παρόμοιες πρωτεΐνες κάποιων ιών, σχετικών ή μη με τους HIVs, παραμένει αναπάντητο ερώτημα.

Ακόμα και αν με βάση τα παραπάνω δεδομένα δεχτεί κανείς ότι άτομα με επίμονα άτυπες εικόνες στο Western blot και θετικά ευρήματα στην καλλιέργεια ή/και το γονιδιακό πολλαπλασιασμό δεν είναι μολυσμένα από κλασικό στέλεχος HIV, καμία ικανοποιητική εξήγηση αυτών των αποτελεσμάτων δεν έχει προταθεί.

Ένα ακόμα στοιχείο που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη είναι η ασύλληπτη ικανότητα μεταλλάξεων και, κυρίως, ανασυνδυασμών μεταξύ στελεχών των HIVs, η οποία συνεχώς παίρνει μεγαλύτερες διαστάσεις με την ανακάλυψη καινούριων ανασυνδυασμένων μορφών. Η ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων στην ισότιμη ανίχνευση του ευρύτατου φάσματος των μορφών των HIVs είναι άγνωστη, συνεπώς απαιτείται συνεχής επαγρύπνηση για την ανάδυση νέων μορφών και την τροποποίηση των διαγνωστικών δοκιμασιών όπου αυτές αποδεικνύονται ανεπαρκείς [416,417].

Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος 94CY032 από την Κύπρο χαρακτηρίστηκε αρχικά σαν πρωτότυπο για τον υπότυπο I της ομάδας M με βάση αλληλουχίες της gp120. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του γονιδιώματος, όμως, αποκάλυψε ότι ο συγκεκριμένος ιός είναι ένα περίπλοκο μωσαϊκό από διάφορους υπότυπους, μεταξύ των οποίων και οι A και G [418, 419]. Δύο παρόμοιοι ιοί περιγράφησαν από άσχετα μεταξύ τους, επιδημιολογικά, άτομα στην Ελλάδα [420]. Οι ιοί αυτοί χαρακτηρίζονται σήμερα σαν CRF04-cpx [56].

Αν οι διάφορες ομάδες, υπότυποι και ανασυνδυασμένες μορφές του HIV-1 έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά, όσον αφορά την ικανότητα μετάδοσης και την πορεία της νόσου, δεν είναι ακόμα γνωστό. Η έκταση της γενετικής απόκλισης μεταξύ των υπότυπων και, πολύ περισσότερο, των ομάδων, είναι υπερεπαρκής για να προκαλέσει τέτοιες διαφορές και ήδη υπάρχουν κάποιες ενδείξεις. Η συγκέντρωση στοιχείων από σωστά σχεδιασμένες in vivo μελέτες, όμως, είναι πιθανό να καθυστερήσει [421].

Οι διαγνωστικές δοκιμασίες, τα αντι-ρετροϊικά φάρμακα και τα εμβόλια έχουν, μέχρι τώρα, βασιστεί κύρια στον υπότυπο B και απαιτείται στενή παρακολούθηση της μοριακής επιδημιολογίας του HIV-1 ώστε ο ρόλος και οι συνέπειες των ανασυνδυασμών στις βιολογικές ιδιότητες του ιού να αξιολογηθούν σωστά και έγκαιρα.

Προβλήματα αδιευκρίνιστων αποτελεσμάτων για την Αιμοδοσία – Δημόσια Υγεία

Στις αναπτυγμένες χώρες η κατάσταση που επικρατεί σχετικά με τη μετάδοση μολυσματικών παραγόντων με μετάγγιση, χαρακτηρίζεται από το εξής οξύμωρο: αφενός υπάρχει πλέον απαίτηση για απόλυτη ασφάλεια από λοιμώξεις που μεταδίδονται με το αίμα και τα παράγωγά του και, αφετέρου, θεωρείται δεδομένο ότι η μετάγγιση με μηδενικό κίνδυνο είναι μάλλον ανέφικτος στόχος.

Υπάρχει ένα περίπλοκο σύστημα μέτρων για τη διασφάλιση ασφαλούς μετάγγισης. Οι ευαίσθητες μέθοδοι μαζικού ελέγχου είναι ένας τέτοιος παράγοντας, όπως και η λεπτομερής εκπαίδευση των αιμοδοτών, οι αυστηρές διαδικασίες ελέγχου, επιλογής και απόρριψης δοτών, η μετά την αιμοδοσία απομόνωση των προς μετάγγιση προϊόντων, οι διαδικασίες αδρανοποίησης μολυσματικών παραγόντων, η εντόπιση και ενημέρωση του δότη όταν συμβαίνει μετάδοση κάποιου μολυσματικού παράγοντα.

Σε ότι αφορά τον κίνδυνο μετάδοσης HIV με μετάγγιση, κύρια απειλή είναι η αιμοδοσία στη διάρκεια του «ορολογικού παραθύρου» της λοίμωξης. Το διάστημα αυτό με τις σήμερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους ελέγχου υπολογίζεται σε 22 ημέρες, ενώ με χρήση τεχνικών γονιδιακής ενίσχυσης (GAT) πιστεύεται ότι θα μειωθεί περαιτέρω κατά 11 ημέρες [257]. Ο κίνδυνος μετάδοσης του ιού με μετάγγιση είναι πολύ χαμηλός και υπολογίζεται σε 1/677000 μονάδες αίματος [422]. Σε τακτικούς αιμοδότες, ο πραγματικός υπολειπόμενος κίνδυνος μετάδοσης χωρίς έλεγχο του αίματος με PCR είναι περίπου $1/1-2 \times 10^6$ [423].

Κατά τον πρωτογενή έλεγχο ρουτίνας για HIV στον αιμοδοτικό πληθυσμό διαπιστώνονται μερικές φορές οριακά αποτελέσματα, τόσο στην ELISA όσο και στο Western blot. Το δίλημμα που προκύπτει στα Κέντρα Αιμοδοσίας από τέτοια δείγματα παραμένει σημαντικό, αφού έχει σοβαρές επιπτώσεις τόσο για την ενημέρωση του αιμοδότη όσο και για την καταλληλότητα του προσφερόμενου αίματος.

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Επιτροπής Αιμοδοσίας του Συμβουλίου της Ευρώπης, (Ιανουάριος 1998):

«- Σε όλους τους αιμοδότες πρέπει να παρέχεται ακριβής και βασιζόμενη σε πρόσφατα δεδομένα ενημέρωση σχετικά με τη μετάδοση του HIV και το AIDS, ώστε άτομα που επιδίδονται σε σεξουαλική ή άλλη συμπεριφορά που τα εκθέτει σε δυνητικά επικίνδυνες πηγές να απέχουν από αιμοδοσία.

- Μονάδες αίματος και παραγώγων που εμφανίζουν κατ' επανάληψη τιμές θετικές στον έλεγχο για HIV δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς.

- Όλοι οι αιμοδότες που βρίσκονται να έχουν επιβεβαιωμένα θετικό αποτέλεσμα για HIV λοίμωξη πρέπει να πληροφορούνται, στα πλαίσια πλήρους ενημέρωσης, ότι δεν πρέπει στο μέλλον να προσφέρουν αίμα.

- Αιμοδότες που εμφανίζουν κατ' επανάληψη θετική τιμή σε κάποιον εργαστηριακό δείκτη HIV λοίμωξης, που όμως δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με ασφάλεια, πρέπει να ενημερώνονται σύμφωνα με τον αλγόριθμο ελέγχου κάθε κράτους.»

Το πρόβλημα συνήθως αφορά οριακά θετικές τιμές στην ELISA, σε άτομα που δεν αναφέρουν παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη HIV, και μη καταληκτική εικόνα με παρουσία αντι-gag ή/και αντι-pol αντισωμάτων στον έλεγχο με Western blot. Τέτοια άτομα χαρακτηρίζονται σαν αμφίβολα για λοίμωξη HIV. Το σχήμα αυτό μπορεί να παραμείνει αμετάβλητο για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Μόνο σε μικρό ποσοστό τέτοιων ατόμων, πάντως, μπορεί να αποδειχθεί με βεβαιότητα η παρουσία HIV λοίμωξης [402,424-428].

Είναι γνωστό ότι η *gag-pol* περιοχή είναι ιδιαίτερα διατηρημένη κατά τη φυλογενετική εξέλιξη των ιών HIV και η θετική/οριακή τιμή ELISA σε συνδυασμό με αδιευκρίνιστο (αντι-gag/pol) Western blot μπορεί να υποδηλώνει αρχικά στάδια μόλυνσης από HIV [395].

Η κρισιμότητα του «ορολογικού παραθύρου» αποδεικνύεται από το γεγονός ότι πρακτικά όλες οι περιπτώσεις μετάδοσης HIV με αίμα ή παράγωγα που έχουν υποστεί έλεγχο για αντι-HIV αντισώματα, ήταν αποτέλεσμα αιμοδοσίας από πρόσφατα μολυσμένα άτομα κατά την περίοδο αυτή. Συνεπώς, σε αμφίβολα άτομα επιβάλλεται λεπτομερής έλεγχος ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα HIV λοίμωξης.

Βιβλιογραφικά δεδομένα

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι σε σπάνιες περιπτώσεις ατόμων, που έχουν παράγοντες κινδύνου για HIV λοίμωξη, η περίοδος ορομετατροπής μπορεί να παραταθεί [396-400,429-432]. Στα άτομα αυτά επιτεύχθηκε απομόνωση του ιού ή/και ανίχνευση ενσωματωμένων ιικών αλληλουχιών στο DNA των κυττάρων τους, αρκετούς μήνες πριν το Western blot γίνει διαγνωστικό.

Καθώς άλλες ερευνητικές ομάδες δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν τους παραπάνω ισχυρισμούς [394,402,426,435], τα δεδομένα σχετικά με την ανοσολογικά «σιωπηλή» περίοδο σε άτομα υψηλού κινδύνου είναι αντικρουόμενα. Οι Sheppard et al. [434], χρησιμοποιώντας τεχνική απομόνωσης ιού και τυφλή ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) σε δύο εργαστήρια, απέτυχαν να βρουν ενδείξεις HIV μόλυνσης σε οροαρνητικούς ομοφυλόφιλους και απέδωσαν την αντι-gag αντίδραση σε διασταυρούμενη αντίδραση με πρωτεΐνες μη ιϊκής προέλευσης. Επιπλέον, οι Phair et al. [395] ανακοίνωσαν ότι η εικόνα του αδιευκρίνιστου Western blot (παρουσία αντι-gag/ροί αντισωμάτων) σε ομοφυλόφιλους μπορούσε να συσχετιστεί με επακόλουθη ορομετατροπή μόνο αν συνυπήρχε με θετικό αποτέλεσμα σε ανοσοενζυμική μέθοδο.

Σε άτομα μολυσμένα με HIV, ασυμπτωματικά ή με πλήρες AIDS ή AIDS-related complex, έχει διαπιστωθεί απώλεια αντι-HIV αντισωμάτων και ταυτόχρονη ανίχνευση ενσωματωμένων ιικών αλληλουχιών στο DNA με PCR [433,436].

Παρόλο που είναι δύσκολο να εξηγήσει κανείς τις ασυμβατότητες αυτές, τα κριτήρια επιλογής που κάθε ερευνητική ομάδα χρησιμοποιεί για τον πληθυσμό που ελέγχει δεν είναι πάντα εμφανή ούτε συμπίπτουν.

Οι μελέτες που επικεντρώνονται σε άτομα υψηλού κινδύνου ενδεχόμενα είναι προκατειλημμένες, γιατί τέτοιοι ασθενείς έχουν πολλαπλές ευκαιρίες να μολυνθούν από διαφορετικά στελέχη HIV (έστω και με χαμηλό ιικό φορτίο), και άρα η πιθανότητα μόλυνσης με λοιμογόνο στέλεχος που θα οδηγήσει σε ορομετατροπή είναι μεγαλύτερη. Εναλλακτικά, δεν μπορούν να αποκλειστούν μεθοδολογικές διαφορές στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε κάθε πρωτόκολλο.

Αιμοδοτές

Αν και το αδιευκρίνιστο Western blot συσχετίστηκε με ορομετατροπή μετά από κάποιο χρονικό διάστημα σε ορισμένους ομοφυλόφιλους με συμπεριφορά υψηλού κινδύνου, η σημασία του σε άτομα χαμηλού κινδύνου που αναγνωρίζονται συνήθως κατά τον έλεγχο ρουτίνας σε αιμοδοτές, παραμένει αμφιλεγόμενη.

Σε μία προοπτική μελέτη από τους Jackson et al. [312], αιμοδοτές με αδιευκρίνιστο Western blot επανελέγχθηκαν 5-7 χρόνια μετά το αρχικό μη καταληκτικό αποτέλεσμα. Χρησιμοποιώντας μία ευαίσθητη τεχνική PCR για ανίχνευση ενσωματωμένων στο DNA *gag* αλληλουχιών, κανένα από τα εξεταζόμενα άτομα δεν βρέθηκε να έχει ενδείξεις μόλυνσης από HIV. Ενώ η ELISA είχε αρνητικοποιηθεί σε πολλά από τα άτομα (47%), ποσοστό 85% εξακολουθούσε να εμφανίζει αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot με παρουσία αντι-gag/ροί αντισωμάτων. Σε κανένα όμως δεν διαπιστώθηκε ορολογική εξέλιξη σε θετικό Western blot και κανένας από τους αιμοδοτές δεν εμφάνιζε συμπτώματα ανοσοανεπάρκειας.

Είναι γενικά αποδεκτό πια ότι η απουσία εξέλιξης της εικόνας του Western blot σε διάστημα έξι μηνών αρκεί, πρακτικά, για να χαρακτηριστούν τα αμφίβολα άτομα σαν οροαρνητικά για HIV λοίμωξη.

Η παρακολούθηση ληπτών αίματος και παραγώγων, από δότες με αδιευκρίνιστο Western blot για HIV-1 που επέμενε για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών, δεν αποκάλυψε σε καμία περίπτωση τη μετάδοση HIV-1 [300,437].

Πρέπει να σημειωθεί ότι 12-20% όλων των προς μετάγγιση παραγώγων αίματος που είναι αρνητικά για αντισώματα έναντι του HIV με ELISA, θα βρεθούν αδιευκρίνιστα με Western blot που χρησιμοποιεί κυτταρόλυμα ιού σαν αντιγόνο [300,414]. Παρά το γεγονός αυτό, όμως, δεν προκύπτει εμφανές πρόβλημα ενώ εκατομμύρια τέτοια παράγωγα έχουν μεταγγιστεί από το 1985 που ξεκίνησε ο προμεταγγισιακός έλεγχος για HIV.

Τα παραπάνω στοιχεία οδήγησαν ορισμένους να προτείνουν την επανένταξη αμφίβολων αιμοδοτών στον αιμοδοτικό πληθυσμό, αν αυτοί εμφανίζουν αρνητικό αποτέλεσμα με ανοσοενζυμική μέθοδο νεώτερης γενιάς για HIV-1/2, παρά την παρουσία αδιευκρίνιστου Western blot [312].

Αιμοκαθαιρόμενοι

Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση αποτελούν ομάδα στην οποία επιβάλλεται έλεγχος για HIV λοίμωξη [438]. Παρά την έκθεση των ασθενών σε παράγωγα αίματος και μηχανήματα αιμοκάθαρσης, το ποσοστό οροθετικότητας για HIV στο συγκεκριμένο υποπληθυσμό είναι μικρό [439,440]. Η αυξημένη επίπτωση θετικών αποτελεσμάτων με ELISA, αποδείχθηκε με Western blot και μακρόχρονη παρακολούθηση ότι οφείλεται σε ψευδώς θετικές αντιδράσεις [439,441].

Σε ουραιμικούς ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση έχει αναφερθεί η παρουσία κυκλοφορούντων ανοσοσυμπλεγμάτων και ρευματοειδών παραγόντων [442], που είναι γνωστό ότι συσχετίζονται με αδιευκρίνιστες εικόνες στο Western blot [443,444]. Σε ορισμένους αιμοκαθαιρόμενους περιγράφεται επίσης η παρουσία ποικίλων αυτοαντισωμάτων έναντι κυττάρων και κυτταρικών προϊόντων (ερυθρά αιμοσφαίρια, λεμφοκύτταρα, φωσφολιπίδια, κυτταροσκελετικά στοιχεία, ιντερλευκίνες -1α και -6). Πιθανά αίτια της παραγωγής αυτοαντισωμάτων περιλαμβάνουν αλλοαντιγόνα από μεταγγίσεις [445], την ίδια τη διαδικασία αιμοκάθαρσης [446] και πολυκλωνική ενεργοποίηση. Αντισώματα HLA τάξης II που προκαλούν ψευδώς θετικές αντιδράσεις στον έλεγχο για HIV έχουν αποδοθεί σε αντιγόνα της κυτταρικής σειράς H-9 [447]. Οι Arnow et al απέδειξαν την παρουσία αντισωμάτων έναντι H-9 αντιγόνων σε χρόνια αιμοκαθαιρόμενους με ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην ELISA και τα αντισώματα αυτά πιθανά επάγονται από μεταγγίσεις [276,448].

Μελέτη από το Ισραήλ [449] σε 520 αιμοκαθαιρόμενους από 5 νοσοκομεία διαπίστωσε θετική για HIV ELISA σε 9% των ασθενών. Οι μισοί είχαν αδιευκρίνιστη αντι-gag εικόνα στο Western blot, ενώ μόνο ένα άτομο αποδείχτηκε πραγματικά οροθετικό. Στη διάρκεια 5ετούς παρακολούθησης, κανένα από τα εξεταζόμενα άτομα δεν εμφάνισε ορομετατροπή. Τα αδιευκρίνιστα αποτελέσματα φαινόταν να συσχετίζονται με αντιγόνα μεταμόσχευσης ή/και αυτοαντισώματα στους ασθενείς. Φαίνεται ότι υπάρχει σχέση μεταξύ χρόνιας νεφρικής νόσου - αιμοκάθαρσης και ανοσολογικής δυσλειτουργίας που οδηγεί σε παραγωγή αυτοαντισωμάτων που προκαλούν αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot.

Έγκυοι

Η εμφάνιση ψευδώς θετικών ή αδιευκρίνιστων αντιδράσεων σε έγκυες κατά τον έλεγχο για HIV, μπορεί να αποδοθεί σε αντισώματα έναντι κυτταρικών πρωτεϊνών που παράγονται λόγω αλλοανοσοποίησης κατά την εγκυμοσύνη.

Ψευδώς θετικά αποτελέσματα με ανοσοενζυμικές μεθόδους, σε πολύτοκες γυναίκες, έχουν συσχετιστεί με την παρουσία HLA-DR4 αντισωμάτων [276,447], η παρατήρηση όμως αυτή δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους [302].

Αναφέρεται επίσης DNA ομολογία μεταξύ της gp41 του HIV-1 και της ανθρώπινης β1 περιοχής [450]. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί ενδεχόμενα την ασθενή αντι-gp41 ζώνη που διαπιστώθηκε παροδικά σε μία από τις εγκύους της ομάδας μελέτης, όμως η

βασική αντίδραση στρεφόταν έναντι των πρωτεϊνών του πυρήνα, τόσο στη δική μας μελέτη όσο και σε άλλες [302].

Ολοένα και μεγαλύτερος αριθμός εγκύων ελέγχονται σήμερα για HIV λοίμωξη και αν η εγκυμοσύνη αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αδιευκρίνιστων εικόνων στο Western blot, είναι απαραίτητο να σχεδιαστούν γρήγορα αλγόριθμοι ελέγχου και ενημέρωσης. Με τον τρόπο αυτό θα αποφευχθεί περιττή ανησυχία σε μία φάση ήδη φορτισμένη συναισθηματικά και θα καθοριστεί με ασφάλεια η κατάσταση της μητέρας και του εμβρύου σχετικά με τη λοίμωξη από HIV.

PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) βρέθηκε στο προσκήνιο σαν διαγνωστική δοκιμασία στην HIV λοίμωξη, εν μέρει επειδή αρκετές αναφορές υπέδειξαν ότι διάστημα μηνών ή ετών μπορεί να μεσολαβήσει μεταξύ της μόλυνσης από τον ιό και της εμφάνισης αντισωμάτων στον ορό, που μπορούσαν να ανιχνευθούν με ELISA και Western blot.

Επειδή η τεχνική επιτρέπει την άμεση ενίσχυση του DNA του ενσωματωμένου προιού χωρίς να εξαρτάται από την παραγωγή αντισωμάτων, αποτελεί ελκυστική εναλλακτική λύση στις καθιερωμένες μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων. Ο κλινικός ρόλος της, όμως, στη διάγνωση της HIV λοίμωξης είναι κάπως αβέβαιος γιατί ακόλουθες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν την ύπαρξη μακρών «ορολογικών παραθύρων». Η εκτίμηση της διαγνωστικής ακρίβειας της μεθόδου είναι δύσκολη, γιατί δεν υπάρχει κατάλληλη δοκιμασία αναφοράς προς την οποία να συγκριθεί.

Μία μετα-ανάλυση [361] που είχε σαν σκοπό να αξιολογήσει την αξιοπιστία των επιστημονικών δεδομένων για τη διαγνωστική ακρίβεια της PCR και να χαρακτηρίσει την ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου στην ανίχνευση ενσωματωμένου προιού αναλύοντας τις διαθέσιμες μελέτες 6 ετών, κατέληξε σε δύο βασικά συμπεράσματα: Το ποσοστό των ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων ήταν υπερβολικά υψηλό για να δικαιολογηθεί ευρύτερος ρόλος της PCR είτε στον έλεγχο ρουτίνας είτε στην επιβεβαίωση της διάγνωσης της HIV λοίμωξης. Επιπλέον, δεν υπήρχαν ενδείξεις ότι η απόδοση της μεθόδου βελτιώθηκε με το χρόνο.

Συνεπώς, η βασική της χρήση περιορίζεται σε περιπτώσεις που ο κλασσικός έλεγχος αντισωμάτων καταλήγει σε αδιευκρίνιστα αποτελέσματα.

Ακόμα και με τη χρήση νεώτερων εκλεπτυσμένων αντιδραστηρίων για RNA PCR, που περιλαμβάνουν ποικίλους εσωτερικούς μάρτυρες για τον έλεγχο σωστής εκτέλεσης της δοκιμασίας, προκύπτουν χαμηλά (ψευδώς) θετικά αποτελέσματα [280,451].

Προβληματισμοί – Προοπτικές

Η δραματική μείωση του κινδύνου μετάδοσης ιών με μετάγγιση την τελευταία εικοσαετία οφείλεται εν μέρει στη βελτίωση του εργαστηριακού ελέγχου του αίματος. Ο υπολειπόμενος κίνδυνος, σήμερα, υπολογίζεται σε 1/50000 έως 1/700000 ανά μονάδα αίματος για τους κύριους ιογενείς παράγοντες (HBV, HCV, HIV) και αποδίδεται σε τέσσερις πηγές: αιμοδοσία κατά την περίοδο του ορολογικού παραθύρου (προ-ορομετατροπή), μεταλλαγμένα ιικά στελέχη, άτυπη ορομετατροπή και τεχνικά λάθη.

- Τα μεταλλαγμένα ιικά στελέχη (όπως η ομάδα O του HIV-1) υπάρχουν, αλλά το ποσοστό τους (εκτός από τις ενδημικές περιοχές) είναι ελάχιστο, ιδιαίτερα στον αιμοδοτικό πληθυσμό.

- Η υπόθεση της άτυπης ή ελλιπούς ανοσιακής απάντησης («ανοσοσιωπηρή» μόλυνση) τείνει να απορριφθεί. Παρά τις ανησυχητικές ανακοινώσεις στα τέλη της δεκαετίας του 1980 για υψηλά ποσοστά θετικής καλλιέργειας ή/και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε οροαρνητικά άτομα, συνεχιζόμενες μεγάλες μελέτες σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου και αρχικά αποτελέσματα από το μαζικό έλεγχο αιμοδοτών με τεχνικές γονιδιακού πολλαπλασιασμού υποδεικνύουν ότι οι περιπτώσεις αυτές είναι σπάνιες και ελάχιστα συνεισφέρουν στο συνολικό κίνδυνο από μετάγγιση.

- Σφάλματα μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε βήμα της διαδικασίας ελέγχου δειγμάτων και δεν περιορίζονται σε τεχνικά λάθη κατά την εκτέλεση κάποιας δοκιμασίας. Φαίνεται ότι δεν είναι συχνά και αποκτούν σημασία μόνο αν αφορούν οροθετικό δείγμα.

- Για τον HIV, τουλάχιστον 90% του κινδύνου μετάδοσης με μετάγγιση αποδίδεται σε αιμοδοσία κατά την περίοδο πριν την ορομετατροπή. Το μέσο χρονικό διάστημα από τη μόλυνση μέχρι την ανάπτυξη διαγνωστικής αντισωματικής απάντησης υπολογίζεται σε 40 ημέρες, όμως σε 5% περίπου των περιπτώσεων η ορομετατροπή εμφανίζεται μετά την πάροδο εξαμήνου. Στα άτομα με παρατεταμένη διάρκεια ορολογικού παραθύρου, ο έλεγχος διαδοχικών δειγμάτων πριν την ορομετατροπή ήταν σταθερά αρνητικός με δοκιμασία αντιγόνου p24 και PCR, μέχρι λίγες εβδομάδες πριν την εμφάνιση αντισωμάτων. Συνεπώς δεν δημιουργείται σοβαρό πρόβλημα σε ότι αφορά την ασφάλεια της μετάγγισης, αφού η καθυστερημένη ορομετατροπή φαίνεται να οφείλεται με μακρά φάση «έκλειψης» με αργή διασπορά του ιού και η ανάπτυξη ιαμίας συνδυάζεται πάντα με ταχεία επακόλουθη ορομετατροπή [452].

Παρά την πιθανότητα σχετικά περιορισμένης ωφέλειας με υψηλό κόστος, είναι πιθανό ότι οι προσπάθειες περαιτέρω μείωσης του κινδύνου μετάδοσης λοιμώξεων με τη μετάγγιση θα συνεχίσουν να κλιμακώνονται στο μέλλον. Τεχνικές μοριακής ενίσχυσης (PCR, LCR, NASBA, TMA) για την ανίχνευση φορέων ιών, που τώρα χρησιμοποιούνται σε pools πλάσματος, αναμένεται να εισαχθούν για έλεγχο ρουτίνας μικρών δεξαμενών (mini-pools) και στη συνέχεια προϊόντων από κάθε αιμοδότη χωριστά. Η αποτελεσματικότητά τέτοιου μαζικού ελέγχου εξαρτάται από την επίπτωση της λοίμωξης στον πληθυσμό και από τη διάρκεια του ορολογικού παραθύρου της.

Καθώς οι ιοί μπορούν να διαφεύγουν από την ανοσολογική απάντηση με περιορισμό της γονιδιακής έκφρασης και επειδή ακόμα και η μοριακή ενίσχυση έχει περιορισμένη ευαισθησία στην ανίχνευση ιών, οι τεχνικές αδρανοποίησης ιών σε παράγωγα αίματος (φωτοχημική αδρανοποίηση) ίσως προσφέρουν μία επιπλέον γραμμή άμυνας.

Η συνεχής επιδημιολογική επαγρύπνηση στον αιμοδοτικό πληθυσμό για νοσήματα που μεταδίδονται με το αίμα, είναι απαραίτητη για τον έλεγχο της ασφάλειας του αίματος και των παραγώγων του.

Η πιο σημαντική εκκρεμότητα στα άτομα με μη καταληκτικά αποτελέσματα αφορά την πιθανή σχέση του φαινομένου με την ανάπτυξη συγκεκριμένης παθολογίας, μεταγενέστερα.

Ο προσεκτικός σχεδιασμός προοπτικών μελετών για στενή και μακροχρόνια ορολογική, επιδημιολογική, ιολογική και κλινική παρακολούθηση τέτοιων ατόμων είναι απαραίτητος, ώστε να γίνει κατανοητή η σημασία και οι συνέπειες του φαινομένου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου για λοίμωξη HIV, ορισμένα άτομα εμφανίζουν επίμονα αδιευκρίνιστη εικόνα στο Western blot, σε συνδυασμό με χαμηλή θετική τιμή στην ELISA.

- 1.** Στο μεγαλύτερο ποσοστό, ο συνδυασμός αυτός φαίνεται να οφείλεται σε μη ειδική διασταυρούμενη αντίδραση προς άγνωστα αντιγόνα.
- 2.** Σε κάποια άτομα όμως, η αντι-HIV αντίδραση είναι ειδική. Στις περιπτώσεις αυτές διαπιστώθηκαν ιολογικές και μοριακές ενδείξεις παρουσίας πολλαπλασιαζόμενου ρετροϊού, που έχει κάποια κοινά μοριακά χαρακτηριστικά με τους κλασσικούς HIVs.
- 3.** Ανοικτές παραμένουν οι πιθανότητες να πρόκειται για: 1. ιό σχετικό με τους HIVs, 2. ιό μη σχετιζόμενο με τους HIVs που όμως εμφανίζει γονιδιακή ομολογία με αυτούς ή τέλος, 3. εκτρωτική μόλυνση με κλασσικό ιό HIV.
- 4.** Σε κάθε περίπτωση, τα μη καταληκτικά αποτελέσματα στον πρωτογενή έλεγχο για λοίμωξη HIV δεν φαίνεται να συνδυάζονται με συγκεκριμένη παθολογία για σημαντικό χρονικό διάστημα, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί με βεβαιότητα μία τέτοια πιθανότητα στο μέλλον.
- 5.** Το πρόβλημα που τα αδιευκρίνιστα αποτελέσματα δημιουργούν στο χώρο της Αιμοδοσίας παραμένει άλυτο. Κανένας ορισμός «αποδεκτού κινδύνου» μετάδοσης μολυσματικού παράγοντα με μετάγγιση δεν είναι επαρκής και η ανάγκη απομάκρυνσης οποιουδήποτε δυνητικά επικίνδυνου αιμοδότη έχει οδηγήσει στην απώλεια σημαντικού αριθμού υγιών δοτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Pneumocystis carinii pneumonia*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1981: Los Angeles. p. p250.
2. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. *N Engl J Med*, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
3. *Kaposi's sarcoma and pneumocystis carinii pneumonia among homosexual men*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1981. p. p305.
4. Masur, H., et al., *An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction*. *N Engl J Med*, 1981. **305**(24): p. 1431-8.
5. *Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1982. p. p366.
6. Daly, H.M. and G.L. Scott, *Fatal AIDS in a haemophiliac in the UK*. *Lancet*, 1983. **2**(8360): p. 1190.
7. *Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1982. p. p353.
8. Masur, H., et al., *Opportunistic infection in previously healthy women. Initial manifestations of a community-acquired cellular immunodeficiency*. *Ann Intern Med*, 1982. **97**(4): p. 533-9.
9. *Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1982. p. p508.
10. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
11. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. *Science*, 1984. **224**(4648): p. 500-3.
12. Popovic, M., et al., *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS*. *Science*, 1984. **224**(4648): p. 497-500.
13. Levy, J.A., et al., *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS*. *Science*, 1984. **225**(4664): p. 840-2.
14. Coffin, J., et al., *Letter*. *Science*, 1986. **232**: p. p697.
15. Coffin, J., et al., *What to call the AIDS virus?* *Nature*, 1986. **321**: p. p10.
16. Clavel, F., et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. *Science*, 1986. **233**(4761): p. 343-6.
17. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 1999. **397**: p. 436-441.
18. Hirsch, V., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. *Nature*, 1989. **339**: p. 389-392.
19. Gao, F., et al., *Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa*. *Nature*, 1992. **358**(6386): p. 495-9.
20. Coffin, J., *Structure and classification of retroviruses*, in *The retroviridae*, J.A. Levy, Editor. 1992, Plenum Press: New York. p. p19.
21. Coffin, J., *Retroviridae and their replication*, in *Virology*, F. B.N. and e. al., Editors. 1996, Raven Press: New York. p. p1767.
22. Teich, N., *Taxonomy of retroviruses*, in *RNA Tumor Viruses*, R.A. Weiss, et al., Editors. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory: New York. p. p25.
23. Temin, H.M., *Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts*. *Mol Biol Evol*, 1985. **2**(6): p. 455-68.

24. Rogers, J.H., *The origin and evolution of retroposons*. Int Rev Cytol, 1985. **93**: p. 187-279.
25. Mason, W.S., J.M. Taylor, and R. Hull, *Retroid virus genome replication*. Adv Virus Res, 1987. **32**: p. 35-96.
26. Baltimore, D., *Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome*. Cell, 1985. **40**(3): p. 481-2.
27. Smit, A.F., *The origin of interspersed repeats in the human genome*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(6): p. 743-8.
28. Wilkinson, D.A., D.L. Mager, and J.A. Leong, *Endogenous human retroviruses*. The Retroviridae, ed. J.A. Levy. 1994, New York: Plenum Press. p 465.
29. Vallee, H. and H. Carri, *Sur la nature infectieuse de l' anemie du cheval*. Compt Rend Acad Sci, 1904. **139**: p. p1239.
30. Temin, H.M. and S. Mizutani, *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. 1970. Biotechnology, 1992. **24**: p. 51-6.
31. Baltimore, D., *Viral RNA-dependent DNA polymerase*. 1970. Biotechnology, 1992. **24**: p. 3-5.
32. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
33. Poiesz, B.J., et al., *Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia*. Nature, 1981. **294**(5838): p. 268-71.
34. Kuefler, P.R. and P.A. Bunn, Jr., *Adult T cell leukaemia/lymphoma*. Clin Haematol, 1986. **15**(3): p. 695-726.
35. Gessain, A., et al., *Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis*. Lancet, 1985. **2**(8452): p. 407-10.
36. Kalyanaraman, V.S., et al., *A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia*. Science, 1982. **218**(4572): p. 571-3.
37. Alizon, M., et al., *Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 757-60.
38. Hahn, B.H., et al., *Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 166-9.
39. Luciw, P.A., et al., *Molecular cloning of AIDS-associated retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 760-3.
40. Ratner, L., et al., *Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III*. Nature, 1985. **313**(6000): p. 277-84.
41. Wain-Hobson, S., et al., *Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV*. Cell, 1985. **40**(1): p. 9-17.
42. Sanchez-Pescador, R., et al., *Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)*. Science, 1985. **227**(4686): p. 484-92.
43. Feng, Y.X., et al., *Multiple regions of Harvey sarcoma virus RNA can dimerize in vitro*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2486-90.
44. Varmus, H.E., *Form and function of retroviral proviruses*. Science, 1982. **216**(4548): p. 812-20.
45. Kozak, M., *Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(2): p. 857-72.
46. Benn, S., et al., *Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire*. Science, 1985. **230**(4728): p. 949-51.
47. Goodenow, M., et al., *HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989. **2**(4): p. 344-52.
48. Hahn, B.H., et al., *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications*. Science, 2000. **287**: p. 607-614.
49. Preston, B.D., B.J. Poiesz, and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1988. **242**: p. 1168-1171.
50. Coffin, J.M., *Genetic diversity and evolution of retroviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 143-64.

51. Wei, X., et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 117-22.
52. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
53. Hu, W.S. and H.M. Temin, *Retroviral recombination and reverse transcription*. Science, 1990. **250**: p. 1227-1233.
54. Sharp, P.M., et al., *Origins and diversity of human immunodeficiency viruses*. AIDS, 1994. **8**: p. S27-S42.
55. Robertson, D.L., et al., *Recombination in HIV-1*. Nature, 1999. **374**: p. 124-126.
56. Robertson, D.L., et al., *HIV-1 subtype and recombinant nomenclature proposal*. Science, 2000. **288**: p. 55-57.
57. Loussert-Ajaka, I., et al., *Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5640-9.
58. Loussert-Ajaka, I., et al., *HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV-1 subtype O infected patients*. Lancet, 1994. **343**(8910): p. 1393-4.
59. Constantine, N.T., et al., *Diagnostic challenges for rapid human immunodeficiency virus assays. Performance using HIV-1 group O, HIV-1 group M, and HIV-2 samples*. J Hum Virol, 1997. **1**(1): p. 45-51.
60. Peeters, M., et al., *Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7368-75.
61. Simon, F., et al., *Identification of a new HIV-1 distinct from group M and group O*. Nat Med, 1998. **4**: p. 1032-1037.
62. Guyader, M., et al., *Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2*. Nature, 1987. **326**(6114): p. 662-9.
63. Gao, F., et al., *Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7433-47.
64. Van der Loeff, M. and P. Aaby, *Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2*. AIDS, 1999. **13** (suppl A): p. S69-S84.
65. De Cock, K.M., et al., *Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic*. JAMA, 1993. **270**: p. 2083-2086.
66. Marlink, R., et al., *Reduced rates of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1*. Science, 1994. **265**: p. 1587-1590.
67. Gallay, P., et al., *HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase*. Cell, 1995. **83**(4): p. 569-76.
68. Bukrinsky, M.I., et al., *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 666-9.
69. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman, *Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle*. Embo J, 1992. **11**(8): p. 3053-8.
70. Bryant, M.L., et al., *Replication of human immunodeficiency virus 1 and Moloney murine leukemia virus is inhibited by different heteroatom-containing analogs of myristic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(22): p. 8655-9.
71. Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, *Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 359-62.
72. Thali, M., et al., *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 363-5.
73. Franke, E.K. and J. Luban, *Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction*. Virology, 1996. **222**(1): p. 279-82.
74. Harrison, G.P. and A.M. Lever, *The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4144-53.
75. Poznansky, M., et al., *Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector*. J Virol, 1991. **65**(1): p. 532-6.

76. Lapadat-Tapolsky, M., et al., *Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(4): p. 831-9.
77. Zack, J.A., et al., *HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure*. Cell, 1990. **61**(2): p. 213-22.
78. Paxton, W., R.I. Connor, and N.R. Landau, *Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis*. J Virol, 1993. **67**(12): p. 7229-37.
79. Jacks, T., et al., *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression*. Nature, 1988. **331**(6153): p. 280-3.
80. Parkin, N.T., M. Chamorro, and H.E. Varmus, *Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5147-51.
81. Kohlstaedt, L.A., et al., *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science, 1992. **256**(5065): p. 1783-90.
82. Bushman, F.D., T. Fujiwara, and R. Craigie, *Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro*. Science, 1990. **249**(4976): p. 1555-8.
83. Einfeld, D., *Maturation and assembly of retroviral glycoproteins*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 133-76.
84. Swanstrom, R. and J. Wills, *Retroviral gene expression: II. Synthesis, processing and assembly of viral proteins.*, in *Retroviruses*, J. Coffin, S. Hughes, and H. Varmus, Editors. 1997: Cold Spring Harbor, NY.
85. Bernstein, H.B., et al., *Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 2745-50.
86. Landau, N.R., M. Warton, and D.R. Littman, *The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 159-62.
87. Capon, D.J. and R.H. Ward, *The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 649-78.
88. Weiss, R.A., *Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry*, in *The retroviridae*, J.A. Levy, Editor. 1993, Plenum Press: New York. p. 1-108.
89. Modrow, S., et al., *Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions*. J Virol, 1987. **61**(2): p. 570-8.
90. Hwang, S.S., et al., *Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1*. Science, 1991. **253**(5015): p. 71-4.
91. Deng, H., et al., *Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 661-6.
92. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
93. Moore, J.P. and P.L. Nara, *The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection*. Aids, 1991. **5**(Suppl 2): p. S21-33.
94. Hwang, S.S., et al., *Identification of envelope V3 loop as the major determinant of CD4 neutralization sensitivity of HIV-1*. Science, 1992. **257**(5069): p. 535-7.
95. Kliks, S.C., et al., *V3 variability can influence the ability of an antibody to neutralize or enhance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11518-22.
96. Fung, M.S., et al., *Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of human immunodeficiency virus type 1 gp120*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 848-56.
97. Moore, J.P., et al., *Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 469-84.
98. Levy, J.A., *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiol Rev, 1993. **57**(1): p. 183-289.
99. Camerini, D. and B. Seed, *A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site*. Cell, 1990. **60**(5): p. 747-54.

100. Bergeron, L., N. Sullivan, and J. Sodroski, *Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2389-97.
101. Ruben, S., et al., *Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein*. J Virol, 1989. **63**(1): p. 1-8.
102. Dayton, A.I., et al., *The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication*. Cell, 1986. **44**(6): p. 941-7.
103. Fisher, A.G., et al., *The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication*. Nature, 1986. **320**(6060): p. 367-71.
104. Rosen, C.A., J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine, *Location of cis-acting regulatory sequences in the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(19): p. 6502-6.
105. Sodroski, J., et al., *Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat*. Science, 1985. **227**(4683): p. 171-3.
106. Kao, S.Y., et al., *Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product*. Nature, 1987. **330**(6147): p. 489-93.
107. Rosen, C.A., et al., *Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T-lymphotropic virus type III*. Nature, 1986. **319**(6054): p. 555-9.
108. Dingwall, C., et al., *Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(18): p. 6925-9.
109. Feng, S. and E.C. Holland, *HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar*. Nature, 1988. **334**(6178): p. 165-7.
110. Sharp, P.A. and R.A. Marciniak, *HIV TAR: an RNA enhancer?* Cell, 1989. **59**(2): p. 229-30.
111. Pavlakis, G.N. and B.K. Felber, *Regulation of expression of human immunodeficiency virus*. New Biol, 1990. **2**(1): p. 20-31.
112. Roy, S., et al., *A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation*. Genes Dev, 1990. **4**(8): p. 1365-73.
113. Arya, S.K., et al., *Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III)*. Science, 1985. **229**(4708): p. 69-73.
114. Sodroski, J., et al., *Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III*. Science, 1985. **229**(4708): p. 74-7.
115. Feinberg, M.B., et al., *HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA*. Cell, 1986. **46**(6): p. 807-17.
116. Sodroski, J., et al., *A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication*. Nature, 1986. **321**(6068): p. 412-7.
117. Cullen, B.R., et al., *Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product*. J Virol, 1988. **62**(7): p. 2498-501.
118. Malim, M.H., et al., *Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes*. Nature, 1988. **335**(6186): p. 181-3.
119. Kim, S.Y., et al., *Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3708-13.
120. Daly, T.J., et al., *Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro*. Nature, 1989. **342**(6251): p. 816-9.
121. Zapp, M.L. and M.R. Green, *Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein*. Nature, 1989. **342**(6250): p. 714-6.
122. Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-7.
123. Terwilliger, E., et al., *The art gene product of human immunodeficiency virus is required for replication*. J Virol, 1988. **62**(2): p. 655-8.
124. Bogerd, H.P., et al., *Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins*. Cell, 1995. **82**(3): p. 485-94.
125. Fritz, C.C., M.L. Zapp, and M.R. Green, *A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev*. Nature, 1995. **376**(6540): p. 530-3.

126. Chang, D.D. and P.A. Sharp, *Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites*. Cell, 1989. **59**(5): p. 789-95.
127. Felber, B.K., C.M. Drysdale, and G.N. Pavlakis, *Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein*. J Virol, 1990. **64**(8): p. 3734-41.
128. Zapp, M.L., et al., *Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7734-8.
129. Chou, M.J., et al., *Antibody responses in early human immunodeficiency virus type 1 infection in hemophiliacs*. J Infect Dis, 1988. **157**(4): p. 805-11.
130. Greene, W.C., *Regulation of HIV-1 gene expression*. Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 453-75.
131. Ahmad, N. and S. Venkatesan, *Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR*. Science, 1988. **241**(4872): p. 1481-5.
132. Niederman, T.M., B.J. Thielan, and L. Ratner, *Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1128-32.
133. Cullen, B.R., *HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell*. Cell, 1998. **93**: p. 685-692.
134. Cullen, B.R., *AIDS. The positive effect of the negative factor*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 698-9.
135. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Downregulation of cell surface CD4 by nef*. Res Virol, 1992. **143**(1): p. 52-5.
136. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-64.
137. Luria, S., I. Chambers, and P. Berg, *Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(12): p. 5326-30.
138. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 338-42.
139. Johnson, R.P., *Upregulation of Fas ligand by simian immunodeficiency virus - a nef-arious mechanism of immune evasion?* J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 1-5.
140. Collins, K.L., et al., *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.
141. Howe, A.Y., J.U. Jung, and R.C. Desrosiers, *Zeta chain of the T-cell receptor interacts with nef of simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 2*. J Virol, 1998. **72**: p. 9827-9834.
142. Schaefer, T.M., et al., *The T-cell receptor zeta chain contains two homologous domains with which simian immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation*. J Virol, 2000. **74**: p. 3273-3283.
143. Xu, X.N., et al., *Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T-cell receptor zeta chain*. J Exp Med, 1999. **189**: p. 1489-1496.
144. de Ronde, A., et al., *Natural HIV-1 NEF accelerates virus replication in primary human lymphocytes*. Virology, 1992. **188**(1): p. 391-5.
145. Miller, M.D., et al., *The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 101-13.
146. Chowers, M.Y., et al., *Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2906-14.
147. Rhee, S.S. and J.W. Marsh, *HIV-1 Nef activity in murine T cells. CD4 modulation and positive enhancement*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5128-34.
148. Miller, M.D., et al., *Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 579-84.
149. Cullen, B.R. and W.C. Greene, *Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1*. Virology, 1990. **178**(1): p. 1-5.

150. Renkema, H.G. and K. Saksela, *Interactions of HIV-1 Nef with cellular signal transducing proteins*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D268-D283.
151. Kestler, H.W., 3rd, et al., *Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS*. Cell, 1991. **65**(4): p. 651-62.
152. Jamieson, B.D., et al., *Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for in vivo replication and pathogenicity*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3478-85.
153. Kirchhoff, F., et al., *Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 228-32.
154. Deacon, N.J., et al., *Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients*. Science, 1995. **270**(5238): p. 988-91.
155. Sodroski, J., et al., *Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions*. Science, 1986. **231**(4745): p. 1549-53.
156. Strebel, K., et al., *The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity*. Nature, 1987. **328**(6132): p. 728-30.
157. Fisher, A.G., et al., *The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro*. Science, 1987. **237**(4817): p. 888-93.
158. von Schwedler, U., et al., *Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4945-55.
159. Madani, N. and D. Kabat, *An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein*. J Virol, 1998. **72**: p. 10251-10255.
160. Liu, H., et al., *The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7630-8.
161. Camaur, D. and D. Trono, *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6106-11.
162. Schwartz, S., et al., *Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5448-56.
163. Willey, R.L., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7193-200.
164. Bour, S., U. Schubert, and K. Strebel, *The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation*. J Virol, 1995. **69**(3): p. 1510-20.
165. Yao, X.J., et al., *Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity*. Virology, 1995. **209**(2): p. 615-23.
166. Klimkait, T., et al., *The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 621-9.
167. Gottlinger, H.G., et al., *Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7381-5.
168. Cohen, E.A., R.A. Subbramanian, and H.G. Gottlinger, *Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **214**: p. 219-35.
169. Schubert, U., et al., *The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 809-19.
170. Matsuda, Z., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6968-72.
171. Cohen, E.A., et al., *Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein*. J Virol, 1990. **64**(6): p. 3097-9.
172. Bukrinsky, M.I., et al., *Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6580-4.
173. Heinzinger, N.K., et al., *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7311-5.
174. Emerman, M., *HIV-1, Vpr and the cell cycle*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1096-103.

175. Jowett, J.B., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle.* J Virol, 1995. **69**(10): p. 6304-13.
176. Re, F., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B.* J Virol, 1995. **69**(11): p. 6859-64.
177. He, J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.* J Virol, 1995. **69**(11): p. 6705-11.
178. Goh, W.C., et al., *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo.* Nat Med, 1998. **4**(1): p. 65-71.
179. Piller, S.C., et al., *The amino-terminal region of Vpr from HIV-1 forms ion channels and kills neurons.* J Virol, 1999. **73**: p. 4230-4238.
180. Jacotot, E., et al., *The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore.* J Exp Med, 2000. **191**: p. 33-46.
181. Yu, X.F., et al., *Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein.* J Virol, 1990. **64**(11): p. 5688-93.
182. Pancio, H.A. and L. Ratner, *Human immunodeficiency virus type 2 Vpx-Gag interaction.* J Virol, 1998. **72**: p. 5271-5275.
183. Pancio, H.A., N. Van der Heyden, and L. Ratner, *The C-terminal proline-rich tail of HIV-2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells.* J Virol, 2000. **74**: p. 6162-6167.
184. Gelderblom, H.R., et al., *Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.* Virology, 1987. **156**(1): p. 171-6.
185. Henderson, L.E., et al., *Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III.* J Virol, 1987. **61**(2): p. 629-32.
186. Garnier, L., J.B. Bowzard, and J.W. Wills, *Recent advances and remaining problems in HIV assembly.* Aids, 1998. **12**(Suppl A): p. S5-16.
187. Dalgleish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.* Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
188. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.* Nature, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
189. McDougal, J.S., et al., *Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule.* Science, 1986. **231**(4736): p. 382-5.
190. Maddon, P.J., et al., *The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain.* Cell, 1986. **47**(3): p. 333-48.
191. Fauci, A.S., *The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis.* Science, 1988. **239**(4840): p. 617-22.
192. Homsy, J., et al., *The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells.* Science, 1989. **244**(4910): p. 1357-60.
193. Long, D., et al., *Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp120 binding to liposomes containing galactosylceramide.* J Virol, 1994. **68**(9): p. 5890-8.
194. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates.* Cell, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
195. Doranz, B.J., et al., *A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors.* Cell, 1996. **85**(7): p. 1149-58.
196. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.* Science, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
197. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5.* Nature, 1996. **384**(6605): p. 179-83.
198. Trkola, A., et al., *CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5.* Nature, 1996. **384**(6605): p. 184-7.
199. Lapham, C.K., et al., *Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines.* Science, 1996. **274**(5287): p. 602-5.
200. Deng, H.K., et al., *Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses.* Nature, 1997. **388**(6639): p. 296-300.

201. Liao, F., et al., *STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1.* J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 2015-23.
202. Loetscher, M., et al., *TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function.* Curr Biol, 1997. **7**(9): p. 652-60.
203. Farzan, M., et al., *Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection.* J Exp Med, 1997. **186**(3): p. 405-11.
204. Rucker, J., et al., *Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses.* J Virol, 1997. **71**(12): p. 8999-9007.
205. Tersmette, M., et al., *Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex.* J Virol, 1988. **62**(6): p. 2026-32.
206. Tersmette, M., et al., *Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality.* Lancet, 1989. **1**(8645): p. 983-5.
207. Roos, M.T., et al., *Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.* J Infect Dis, 1992. **165**(3): p. 427-32.
208. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyto-tropic to T-cell-tropic virus population.* J Virol, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
209. Zhu, T., et al., *Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection.* Science, 1993. **261**(5125): p. 1179-81.
210. Connor, R.I., et al., *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals.* J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 621-8.
211. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
212. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression.* Nat Med, 1996. **2**(11): p. 1240-3.
213. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.* Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
214. Rana, S., et al., *Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation.* J Virol, 1997. **71**(4): p. 3219-27.
215. Michael, N.L., et al., *The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression.* Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1160-2.
216. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, *New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.* N Engl J Med, 1993. **328**(5): p. 327-35.
217. Schacker, T., et al., *Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection.* Ann Intern Med, 1996. **125**(4): p. 257-64.
218. Musey, L., et al., *Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1997. **337**(18): p. 1267-74.
219. Mellors, J.W., et al., *Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.* Science, 1996. **272**(5265): p. 1167-70.
220. Saag, M.S., *Use of HIV viral load in clinical practice: back to the future.* Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 983-5.
221. Pantaleo, G., et al., *Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection.* N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 209-16.
222. Cao, Y., et al., *Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 201-8.

223. Pantaleo, G., et al., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. *Nature*, 1993. **362**(6418): p. 355-8.
224. Embretson, J., et al., *Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS*. *Nature*, 1993. **362**(6418): p. 359-62.
225. Haynes, B.F., *Immune responses to HIV infection*, in *AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention 3rd edition*, V.T.J. De Vita and e. al., Editors. 1992, Lippincott, J.B.: Philadelphia. p. 77-86.
226. Steimer, K.S., et al., *Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120*. *Science*, 1991. **254**(5028): p. 105-8.
227. Warren, R.Q., et al., *Examination of sera from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals for antibodies reactive with peptides corresponding to the principal neutralizing determinant of HIV-1 gp120 and for in vitro neutralizing activity*. *J Virol*, 1992. **66**(9): p. 5210-5.
228. Thali, M., et al., *Characterization of a discontinuous human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human monoclonal antibody*. *J Virol*, 1991. **65**(11): p. 6188-93.
229. Sattentau, Q.J. and J.P. Moore, *Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding*. *J Exp Med*, 1991. **174**(2): p. 407-15.
230. Nixon, D.F., et al., *Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV*. *Immunology*, 1992. **76**(4): p. 515-34.
231. Moore, J.P. and D.D. Ho, *HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells*. *AIDS*, 1995. **9 (suppl A)**: p. S117-S136.
232. Sattentau, Q.J., *Neutralization of HIV-1 by antibody*. *Curr Opin Immunol*, 1996. **8**(4): p. 540-5.
233. Moore, J.P., et al., *Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1*. *J Virol*, 1994. **68**(8): p. 5142-5155.
234. Koup, R.A., et al., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. *J Virol*, 1994. **68**(7): p. 4650-5.
235. Montefiori, D.C., et al., *Complement-mediated, infection-enhancing antibodies in plasma from vaccinated macaques before and after inoculation with live simian immunodeficiency virus*. *J Virol*, 1990. **64**(10): p. 5223-5.
236. Mazzoli, S., et al., *HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals*. *Nat Med*, 1997. **3**: p. 1250-1257.
237. Mazzoli, S., et al., *HIV-specific IgA and HIV neutralizing activity in the serum of exposed seronegative partners of HIV-seropositive persons*. *J Infect Dis*, 1999. **180**: p. 871-875.
238. Ogg, G.S., et al., *Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA*. *Science*, 1998. **279**(5359): p. 2103-6.
239. Phillips, R.E., et al., *Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition*. *Nature*, 1991. **354**(6353): p. 453-9.
240. Klenerman, P., et al., *Cytotoxic T lymphocytes and viral turnover in HIV type 1 infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(26): p. 15323-8.
241. Nowak, M.A., et al., *Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections*. *Nature*, 1995. **375**(6532): p. 606-11.
242. Bevan, M.J. and T.J. Braciale, *Why can't cytotoxic T cells handle HIV?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(13): p. 5765-7.
243. Badley, A.D., et al., *Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes*. *J Virol*, 1996. **70**(1): p. 199-206.
244. Xu, X.N., et al., *Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells*. *J Exp Med*, 1997. **186**(1): p. 7-16.

245. Pantaleo, G., et al., *The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 254-8.
246. Greenough, T.C., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo*. J Infect Dis, 1997. **176**(1): p. 118-25.
247. Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells*. Science, 1995. **270**(5243): p. 1811-5.
248. Levy, J.A., C.E. Mackewicz, and E. Barker, *Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells*. Immunol Today, 1996. **17**(5): p. 217-24.
249. Mackewicz, C.E., E. Barker, and J.A. Levy, *Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1393-5.
250. Landay, A.L., C.E. Mackewicz, and J.A. Levy, *An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status*. Clin Immunol Immunopathol, 1993. **69**(1): p. 106-16.
251. Mackewicz, C.E., et al., *Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection*. Lancet, 1994. **344**(8938): p. 1671-3.
252. Rosenberg, E.S., et al., *Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia*. Science, 1997. **278**(5342): p. 1447-50.
253. O'Brien, T., N. Shaffer, and H. Jaffe, *Acquisition and transmission of HIV-1*, in *The Medical Management of AIDS*, A. Sande and P. Volberding, Editors. 1992, WB Saunders Co: Philadelphia. p. p3.
254. Jacquez, J.A., et al., *Role of the primary infection in epidemics of HIV infection in gay cohorts*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1994. **7**(11): p. 1169-84.
255. Royce, R.A. and e. al., *Sexual transmission of HIV*. N Engl J Med, 1997. **336**: p. p1072.
256. Buehler, J., et al., *Current trends in the epidemiology of HIV/AIDS*, in *The Medical Management of AIDS*, A. Sande and P. Volberding, Editors. 1995, WB Saundres Co: Philadelphia.
257. Schreiber, G.B., et al., *The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1685-90.
258. St Louis, M.E., et al., *Risk for perinatal HIV-1 transmission according to maternal immunologic, virologic, and placental factors*. Jama, 1993. **269**(22): p. 2853-9.
259. Connor, E.M., et al., *Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group*. N Engl J Med, 1994. **331**(18): p. 1173-80.
260. Rogers, M.F. and H.W. Jaffe, *Reducing the risk of maternal-infant transmission of HIV: a door is opened*. N Engl J Med, 1994. **331**(18): p. 1222-3.
261. Newell, M.L. and D.M. Gibb, *A risk-benefit assessment of zidovudine in the prevention of perinatal HIV transmission*. Drug Saf, 1995. **12**(4): p. 274-82.
262. Wiznia, A.A., G. Lambert, and S. Pavlakis, *Pediatric HIV infection*. Med Clin North Am, 1996. **80**(6): p. 1309-36.
263. Cardo, D.M., et al., *A case-control study of HIV seroconversion in health care workers after percutaneous exposure. Centers for Disease Control and Prevention Needlestick Surveillance Group*. N Engl J Med, 1997. **337**(21): p. 1485-90.
264. Gerberding, J.L., et al., *Risk of transmitting the human immunodeficiency virus, cytomegalovirus, and hepatitis B virus to health care workers exposed to patients with AIDS and AIDS-related conditions*. J Infect Dis, 1987. **156**(1): p. 1-8.
265. Schupbach, J., et al., *Antibodies to HTLV-III in Swiss patients with AIDS and pre-AIDS and in groups at risk for AIDS*. N Engl J Med, 1985. **312**(5): p. 265-70.
266. Lackritz, E.M., et al., *Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States*. N Engl J Med, 1995. **333**(26): p. 1721-5.

267. Spector, S.A., et al., *The antiviral effect of zidovudine and ribavirin in clinical trials and the use of p24 antigen levels as a virologic marker.* J Infect Dis, 1989. **159**(5): p. 822-8.
268. *Diagnostic tests for HIV.* Med Lett Drugs Ther, 1997. **39**: p. 81-83.
269. Smith, D.M., et al., *False-positive enzyme-linked immunosorbent assay reactions for antibody to human immunodeficiency virus in a population of midwestern patients with congenital bleeding disorders.* Transfusion, 1987. **27**(1): p. 112.
270. Meyer, K.B. and S.G. Pauker, *Screening for HIV: can we afford the false positive rate?* N Engl J Med, 1987. **317**(4): p. 238-41.
271. Schwartz, J.S., P.E. Dans, and B.P. Kinosian, *Human immunodeficiency virus test evaluation, performance, and use. Proposals to make good tests better.* Jama, 1988. **259**(17): p. 2574-9.
272. Kvinesdal, B. and N.S. Pedersen, *False-positive HIV antibody tests in RPR-reactive patients.* Jama, 1988. **260**(7): p. 923-4.
273. Schleupner, C.J., *Diagnostic tests for HIV-1 infection,* in *Principles and Practice of Infectious Diseases, Update 1,* G.L. Mandell, R.G. Douglas, and J.E. Bennett, Editors. 1989, Churchill Livingstone: New York. p. p3.
274. Mac Kenzie, W.R., et al., *Multiple false-positive serologic tests for HIV, HTLV-1, and hepatitis C following influenza vaccination, 1991.* Jama, 1992. **268**(8): p. 1015-7.
275. Proffitt, M.R. and B. Yen-Lieberman, *Laboratory diagnosis of human immunodeficiency virus infection.* Infect Dis Clin North Am, 1993. **7**(2): p. 203-19.
276. Kuhl, P., S. Seidl, and G. Holzberger, *HLA DR4 antibodies cause positive HTLV-III antibody ELISA results.* Lancet, 1985. **1**(8439): p. 1222-3.
277. Ameglio, F., et al., *Antibodies reactive with nonpolymorphic epitopes on HLA molecules interfere in screening tests for the human immunodeficiency virus.* J Infect Dis, 1987. **156**(6): p. 1034-5.
278. Blanton, M., et al., *HLA antibodies in blood donors with reactive screening tests for antibody to the immunodeficiency virus.* Transfusion, 1987. **27**(1): p. 118-9.
279. Sheon, A.R., et al., *Preventing discrimination against volunteers in prophylactic HIV vaccine trials: lessons from a phase II trial.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **19**: p. 519-526.
280. Mylonakis, E., et al., *Report of a false-positive HIV test result and the potential use of additional tests in establishing HIV serostatus.* Arch Intern Med, 2000. **160**(15): p. 2386-8.
281. Mitchell, S.W., et al., *Field evaluation of alternative HIV testing strategy with a rapid immunobinding assay and an agglutination assay.* Lancet, 1991. **337**(8753): p. 1328-31.
282. Malone, J.D., et al., *Comparative evaluation of six rapid serological tests for HIV-1 antibody.* J Acquir Immune Defic Syndr, 1993. **6**(2): p. 115-9.
283. Kassler, W.J., et al., *Performance of a rapid, on-site human immunodeficiency virus antibody assay in a public health setting.* J Clin Microbiol, 1995. **33**(11): p. 2899-902.
284. Spielberg, F. and W.J. Kassler, *Rapid testing for HIV antibody: a technology whose time has come.* Ann Intern Med, 1996. **125**(6): p. 509-11.
285. *HIV counseling and testing using rapid tests, Update,* in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report.* 1998. p. 211-215.
286. Kemp, B.E., et al., *Autologous red cell agglutination assay for HIV-1 antibodies: simplified test with whole blood.* Science, 1988. **241**(4871): p. 1352-4.
287. Davey, R.T., Jr. and H.C. Lane, *Laboratory methods in the diagnosis and prognostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1.* Rev Infect Dis, 1990. **12**(5): p. 912-30.
288. Gallo, D., et al., *Evaluation of a system using oral mucosal transudate for HIV-1 antibody screening and confirmatory testing.* OraSure HIV Clinical Trials Group. Jama, 1997. **277**(3): p. 254-8.
289. Desai, S., H. Bates, and F.J. Michalski, *Detection of antibody to HIV-1 in urine.* Lancet, 1991. **337**(8734): p. 183-4.
290. Urnovitz, H.B., et al., *Urine antibody tests: new insights into the dynamics of HIV-1 infection.* Clin Chem, 1999. **45**(9): p. 1602-13.

291. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
292. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
293. *Revised Recommendations for the Prevention of HIV Transmission by Blood and Blood Products*. 1992, Food and Drug Administration: Bethesda, Md: Center for Biologics Evaluation and Research.
294. *Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of HIV-1 infections*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1989. p. 1-7.
295. Healy, D.S. and W.V. Bolton, *Apparent HIV-1 glycoprotein reactivity on western blot in uninfected blood donors*. AIDS, 1993. **7**: p. 655-658.
296. Sayre, K.R., et al., *False-positive human immunodeficiency virus type 1 western blot tests in noninfected blood donors*. Transfusion, 1996. **36**(1): p. 45-52.
297. Kleinman, S., et al., *False-positive HIV-1 test results in a low-risk screening setting of voluntary blood donation*. JAMA, 1998. **280**(12): p. 1080-1085.
298. Constantine, N.T., *HIV antibody testing*, in *The AIDS Knowledge Base, 3rd edition*, P.T. Cohen, M.A. Sande, and P. Volberding, Editors. 1999, Lippincott Williams and Wilkins: San Francisco, CA.
299. *Update: serologic testing for HIV-1 antibody - US 1988 and 1989*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1990. p. 380-383.
300. Genesca, J., et al., *What do western blot indeterminate patterns for human immunodeficiency virus mean in EIA-negative blood donors?* Lancet, 1989. **2**(8670): p. 1023-5.
301. Celum, C.L., et al., *Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 western blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation*. J Infect Dis, 1991. **164**(4): p. 656-64.
302. Celum, C.L., et al., *Risk factors for repeatedly reactive HIV-1 EIA and indeterminate western blots. A population-based case-control study*. Arch Intern Med, 1994. **154**(10): p. 1129-37.
303. Elliot, B.C., M. Rogers, and J.D. Rich, *Indeterminate results of HIV testing: explanation and clinical management*. Med Health R I, 1996. **79**(10): p. 360-2.
304. *Update: HIV-2 infection - United States*, in *CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1989. p. 572-580.
305. De Cock, K.M., et al., *Cross-reactivity on Western blots in HIV-1 and HIV-2 infections*. AIDS, 1991. **5**: p. 859-860.
306. Moore, J., E.J. Cone, and S. Alexander, *HTLV-III seropositivity in 1971-1972 parenteral drug abusers: a case of false positives or evidence of viral exposure?* N Engl J Med, 1986. **314**: p. 1387-1388.
307. Mendenhall, C.L., et al., *False-positive tests for HTLV-III antibodies in alcoholic patients with hepatitis*. N Engl J Med, 1986. **314**: p. 921-922.
308. Ranki, A., E. Johansson, and K. Krohn, *Interpretation of antibodies reacting solely with human retroviral core proteins*. N Engl J Med, 1988. **318**: p. 448-449.
309. Talal, N., et al., *Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 1990. **33**: p. 774-781.
310. Drabick, J.J. and J.R. Baker, Jr., *HLA antigen contamination of commercial Western blot strips for detecting human immunodeficiency virus*. J Infect Dis, 1989. **159**(2): p. 357-8.
311. Blomberg, J., et al., *Identification of regions of HIV-1 p24 reactive with sera which give "indeterminate" results in electrophoretic immunoblots with the help of long synthetic peptides*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1990. **6**(12): p. 1363-72.
312. Jackson, J.B., et al., *Long-term follow-up of blood donors with indeterminate human immunodeficiency virus type 1 results on Western blot*. Transfusion, 1995. **35**(2): p. 98-102.

313. Rich, J.D., et al., *Interpretation of indeterminate HIV serology results in an incarcerated population.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **17**(4): p. 376-9.
314. Chiodi, F., et al., *Radioimmunoprecipitation and Western blotting with sera of human immunodeficiency virus infected patients: a comparative study.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1987. **3**(2): p. 165-76.
315. Gallo, D., et al., *Comparison of detection of antibody to the acquired immune deficiency syndrome virus by enzyme immunoassay, immunofluorescence, and Western blot methods.* J Clin Microbiol, 1986. **23**(6): p. 1049-51.
316. Hedenskog, M., et al., *Testing for antibodies to AIDS-associated retrovirus (HTLV-III/LAV) by indirect fixed cell immunofluorescence: specificity, sensitivity, and applications.* J Med Virol, 1986. **19**(4): p. 325-34.
317. Carlson, J.R., et al., *Comparison of indirect immunofluorescence and Western blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies.* J Clin Microbiol, 1987. **25**(3): p. 494-7.
318. Zaaijer, H.L., et al., *New anti-human immunodeficiency virus immunoblot assays resolve nonspecific western blot results.* Transfusion, 1997. **37**(2): p. 193-8.
319. Daar, E.S., et al., *Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection.* N Engl J Med, 1991. **324**(14): p. 961-4.
320. Most, J. and R. Zangerle, *Absence of awareness of primary HIV infection.* Lancet, 1997. **349**(9044): p. 62.
321. *Recommendations for Donor Screening with a Licensed Test for HIV-1 Antigen, in Food and Drug Administration Memorandum.* 1995.
322. Scarlatti, G., *Paediatric HIV infection.* Lancet, 1996. **348**(9031): p. 863-8.
323. Bremer, J.W., et al., *Diagnosis of infection with human immunodeficiency virus type 1 by a DNA polymerase chain reaction assay among infants enrolled in the Women and Infants' Transmission Study.* J Pediatr, 1996. **129**(2): p. 198-207.
324. Burgard, M., et al., *The use of viral culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group.* N Engl J Med, 1992. **327**(17): p. 1192-7.
325. Farzadegan, H., et al., *Virologic and serologic markers of rapid progression to AIDS after HIV-1 seroconversion.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **13**(5): p. 448-55.
326. Goudsmit, J., et al., *Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection.* Lancet, 1986. **2**(8500): p. 177-80.
327. *U.S. Public Health Service guidelines for testing and counseling blood and plasma donors for HIV-1 antigen, in CDC, Morbidity and Mortality Weekly Report.* 1996.
328. Nishanian, P., et al., *A simple method for improved assay demonstrates that HIV p24 antigen is present as immune complexes in most sera from HIV-infected individuals.* J Infect Dis, 1990. **162**(1): p. 21-8.
329. Portera, M., et al., *Free and antibody-complexed antigen and antibody profile in apparently healthy HIV seropositive individuals and in AIDS patients.* J Med Virol, 1990. **30**(1): p. 30-5.
330. Fiscus, S.A., et al., *Detection of infectious immune complexes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections: correlation with plasma viremia and CD4 cell counts.* J Infect Dis, 1991. **164**(4): p. 765-9.
331. Chaisson, R.E., et al., *Significant changes in HIV antigen level in the serum of patients treated with azidothymidine.* N Engl J Med, 1986. **315**(25): p. 1610-1.
332. Jurriaans, S., et al., *Distinct changes in HIV type 1 RNA versus p24 antigen levels in serum during short-term zidovudine therapy in asymptomatic individuals with and without progression to AIDS.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(4): p. 473-9.
333. Sloand, E.M., et al., *HIV testing. State of the art.* Jama, 1991. **266**(20): p. 2861-6.
334. Coombs, R.W., *HIV-1 burden as a marker of disease progression and clinical response to therapy in AIDS.* Clin Lab Med, 1994. **14**(2): p. 301-11.
335. Lathey, J.L., et al., *Optimization of quantitative culture assay for human immunodeficiency virus from plasma. Plasma Viremia Group Laboratories of the AIDS*

- Clinical Trials Group (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(12): p. 3064-7.
336. Paxton, W.B., et al., *Longitudinal analysis of quantitative virologic measures in human immunodeficiency virus-infected subjects with > or = 400 CD4 lymphocytes: implications for applying measurements to individual patients*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. J Infect Dis, 1997. **175**(2): p. 247-54.
 337. Piatak, M., Jr., et al., *High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1749-54.
 338. Cao, Y., et al., *Clinical evaluation of branched DNA signal amplification for quantifying HIV type 1 in human plasma*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(3): p. 353-61.
 339. Hollinger, F.B., et al., *Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group*. The NIH/NIAID/DAIDS/ACTG Virology Laboratories. J Clin Microbiol, 1992. **30**(7): p. 1787-94.
 340. Ho, D.D., T. Moudgil, and M. Alam, *Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons*. N Engl J Med, 1989. **321**(24): p. 1621-5.
 341. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
 342. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
 343. Lifson, A.R., et al., *Detection of human immunodeficiency virus DNA using the polymerase chain reaction in a well-characterized group of homosexual and bisexual men*. J Infect Dis, 1990. **161**(3): p. 436-9.
 344. Persing, D., *Polymerase chain reaction: Trenches to Benches*. J Clin Microbiol, 1991. **29**: p. 1281-1285.
 345. Byrne, B.G., et al., *Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification*. Nucleic Acids Res, 1989. **16**: p. p4165.
 346. Ottama, M., P. Innocenti, and M. Thenadey, *The polymerase chain reaction for the detection of HIV-1 genomic RNA in plasma from infected individuals*. J Virol Methods, 1991. **31**: p. 273-284.
 347. Gibson, K., J. Mori, and J. Clewly, *Detection of HIV-1 in serum, using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)*. J Virol Methods, 1993. **43**: p. 101-110.
 348. Rogers, M., et al., *Use of the polymerase chain reaction for early detection of proviral sequences of HIV in infants born to seropositive mothers*. N Engl J Med, 1989. **320**: p. 1649-1654.
 349. Hart, C., et al., *Direct detection of HIV RNA expression in seropositive subjects*. Lancet, 1988. **2**(8611): p. 596-9.
 350. Holodniy, M., et al., *Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction*. J Infect Dis, 1991. **163**(4): p. 862-6.
 351. Eastman, P.S., et al., *Nonisotopic hybridization assay for determination of relative amounts of genotypic human immunodeficiency virus type 1 zidovudine resistance*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(10): p. 2777-80.
 352. Schuurman, R., et al., *Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC)*. J Infect Dis, 1995. **171**(6): p. 1411-9.
 353. Stuyver, L., et al., *Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(2): p. 284-91.
 354. Sauvaigo, S., et al., *Standardized nested polymerase chain reaction-based assay for detection of HIV-1 DNA in whole blood lysates*. J Clin Microbiol, 1993. **31**: p. 1066-1074.
 355. Salk, J., *Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals*. Nature, 1987. **327**: p. 473-476.

356. Coombs, R.W., et al., *Association of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups.* J Infect Dis, 1996. **174**(4): p. 704-12.
357. Haase, A.T., et al., *Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue.* Science, 1996. **274**(5289): p. 985-9.
358. Ginocchio, C.C., et al., *Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma.* J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2886-93.
359. Holodniy, M., et al., *Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin.* J Clin Microbiol, 1991. **29**(4): p. 676-9.
360. Griffith, B.P., et al., *Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze-thaw cycles.* J Clin Microbiol, 1997. **35**(12): p. 3288-91.
361. Owens, D.K., et al., *Polymerase chain reaction for the diagnosis of HIV infection in adults. A meta-analysis with recommendations for clinical practice and study design.* Ann Intern Med, 1996. **124**(9): p. 803-15.
362. Schwartz, D.H., et al., *Extensive evaluation of a seronegative participant in an HIV-1 vaccine trial as a result of false-positive PCR.* Lancet, 1997. **350**(9073): p. 256-9.
363. Brown, A.E., et al., *Viral RNA in the resolution of human immunodeficiency virus type 1 diagnostic serology.* Transfusion, 1997. **37**(9): p. 926-9.
364. Henrard, D.R., et al., *Detection of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen and plasma RNA: relevance to indeterminate serologic tests.* Transfusion, 1994. **34**(5): p. 376-80.
365. Havlichek, D.H., Jr. and E. Hage-Korban, *False-positive HIV diagnosis by HIV-1 plasma viral load testing.* Ann Intern Med, 1999. **131**(10): p. 794.
366. Lin, H.J., et al., *Multicenter evaluation of quantification methods for plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA.* J Infect Dis, 1994. **170**(3): p. 553-62.
367. Revets, H., et al., *Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR-HIV monitor, and QUANTIPLEX HIV RNA assay, three methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(5): p. 1058-64.
368. Yen-Lieberman, B., et al., *Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trials Group virology laboratories.* J Clin Microbiol, 1996. **34**(11): p. 2695-701.
369. Mulder, J., et al., *Rapid and simple PCR assay for quantitation of HIV-1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection.* J Clin Microbiol, 1994. **32**: p. 292-300.
370. Piatak, M., Jr., et al., *Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species.* Biotechniques, 1993. **14**(1): p. 70-81.
371. Guenther, P.C. and C.E. Hart, *Quantitative, competitive PCR assay for HIV-1 using a microplate-based detection system.* Biotechniques, 1998. **24**(5): p. 810-6.
372. van Gemen, B., et al., *Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection.* J Virol Methods, 1993. **43**(2): p. 177-87.
373. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR.* Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
374. Fahey, J.L., et al., *The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1.* N Engl J Med, 1990. **322**(3): p. 166-72.
375. Osmond, D.H., et al., *Immune activation markers and AIDS prognosis.* Aids, 1991. **5**(5): p. 505-11.
376. Stein, D.S., J.A. Korvick, and S.H. Vermund, *CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review.* J Infect Dis, 1992. **165**(2): p. 352-63.
377. Malone, J.L., et al., *Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important.* J Acquir Immune Defic Syndr, 1990. **3**(2): p. 144-51.

378. Reichert, T., et al., *Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians*. Clin Immunol Immunopathol, 1991. **60**(2): p. 190-208.
379. MacDonell, K.B., et al., *Predicting progression to AIDS: combined usefulness of CD4 lymphocyte counts and p24 antigenemia*. Am J Med, 1990. **89**(6): p. 706-12.
380. Harrison, N.A. and S.J. Skidmore, *Neopterin and beta-2 microglobulin levels in asymptomatic HIV infection: the predictive value of combining markers*. J Med Virol, 1990. **32**(2): p. 128-33.
381. Crocchiolo, P.R., et al., *CD4+: neopterin ratio significantly improves correlation with the Walter Reed staging system if compared with CD4+ and neopterin considered separately*. Aids, 1988. **2**(6): p. 481-2.
382. Anderson, R.E., et al., *Use of beta 2-microglobulin level and CD4 lymphocyte count to predict development of acquired immunodeficiency syndrome in persons with human immunodeficiency virus infection*. Arch Intern Med, 1990. **150**(1): p. 73-7.
383. Lifson, A.R., et al., *Serum beta 2-microglobulin and prediction of progression to AIDS in HIV infection*. Lancet, 1992. **339**(8807): p. 1436-40.
384. Schulte, C. and M. Meurer, *Soluble IL-2 receptor serum levels - a marker for disease progression in patients with HIV-1 infection*. Arch Dermatol Res, 1989. **281**: p. 299-303.
385. Honda, M., et al., *Soluble IL-2 receptor in AIDS: correlation of its serum level with the classification of HIV-induced diseases and its characterization*. J Immunol, 1989. **142**: p. 4248-4255.
386. Bofill, M., et al. *The percentage of CD8+ CD38+ CD45RO+ lymphocytes relates to HIV clinical stage*. in IX International Conference on AIDS. 1993. Berlin.
387. Gruters, R.A., et al., *Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte generation in AIDS-related complex and AIDS*. Eur J Immunol, 1990. **20**(5): p. 1039-44.
388. Schellekens, P.T., et al., *Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men*. J Clin Immunol, 1990. **10**(2): p. 121-7.
389. O'Brien, W.A., et al., *Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS*. N Engl J Med, 1996. **334**(7): p. 426-31.
390. Mellors, J.W., et al., *Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection*. Ann Intern Med, 1997. **126**(12): p. 946-54.
391. *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents*, in CDC, *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1998. p. 43-82.
392. Simonds, R.J., et al., *Transmission of HIV-1 from a seronegative organ and tissue donor*. N Engl J Med, 1992. **326**: p. 726-732.
393. Petersen, L.R., et al., *Duration of time from onset of human immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. The HIV Seroconversion Study Group*. Transfusion, 1994. **34**(4): p. 283-9.
394. Horsburgh, C.R., Jr., et al., *Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody*. Lancet, 1989. **2**(8664): p. 637-40.
395. Phair, J., et al., *The significance of western blot assays indeterminate for antibody to HIV in a cohort of homosexual/bisexual men. The Multicenter AIDS Cohort Study*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1992. **5**(10): p. 988-92.
396. Salahuddin, S.Z., et al., *HTLV-III in symptom-free seronegative persons*. Lancet, 1984. **2**(8417-18): p. 1418-20.
397. Loche, M. and B. Mach, *Identification of HIV-infected seronegative individuals by a direct diagnostic test based on hybridisation to amplified viral DNA*. Lancet, 1988. **2**(8608): p. 418-21.
398. Pezzella, M., et al., *HIV viral sequences in seronegative people at risk detected by in situ hybridisation and polymerase chain reaction*. Bmj, 1989. **298**(6675): p. 713-6.

399. Wolinsky, S.M., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection a median of 18 months before a diagnostic western blot. Evidence from a cohort of homosexual men.* Ann Intern Med, 1989. **111**(12): p. 961-72.
400. Imagawa, D.T., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods.* N Engl J Med, 1989. **320**(22): p. 1458-62.
401. Soriano, V., et al., *Silent HIV infection in heterosexual partners of seropositive drug abusers in Spain.* Lancet, 1990. **335**(8693): p. 860.
402. Mariotti, M., et al., *Failure to detect evidence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection by polymerase chain reaction assay in blood donors with isolated core antibodies (anti-p24 or -p17) to HIV-1.* Transfusion, 1990. **30**(8): p. 704-6.
403. Ammar, A., et al., *Biological and biochemical characterization of a factor produced spontaneously by adherent cells of HIV-infected patients inhibiting interleukin-2 receptor alpha chain (Tac) expression on normal T cells.* J Clin Invest, 1991. **87**: p. 2048-2055.
404. Hoffman, A.D., B. Banapour, and J.A. Levy, *Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions.* Virology, 1985. **147**: p. 326-335.
405. Lee, M.H., et al., *Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus.* J Clin Microbiol, 1987. **25**: p. 1717-1721.
406. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 1982, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publications.
407. Davis, L.G., M.D. Dibner, and J.F. Battey, *Basic methods in Molecular Biology.* 1986, New York: Elsevier Science.
408. Ou, C.Y., et al., *DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells.* Science, 1988. **238**: p. 295-297.
409. Hausler, W.J.J., *Report of the Third Consensus Conference on HIV Testing sponsored by the Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors.* Infect Control Hosp Epidemiol, 1988. **9**: p. 345-349.
410. Dodd, R. and C. Fang, *The Western immunoblot procedure for HIV antibodies and its interpretation.* Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**: p. 240-245.
411. Shaw, G.M., et al., *Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome.* Science, 1984. **226**: p. 1165-1171.
412. Moncany, M., et al., *Late seroconversion in three multitransfused young haemophiliacs confirmed by HIV PCR analysis.* J Virol Dis, 1993. **3**: p. 14-23.
413. Huet, T., et al., *A highly defective HIV-1 strain isolated from a healthy Gabonese individual presenting an atypical western blot.* Aids, 1989. **3**(11): p. 707-15.
414. Busch, M., et al., *Reliable confirmation and quantitation of HIV-1 antibody using a recombinant-antigen immunoblot assay.* Transfusion, 1991. **31**: p. 129-137.
415. Tribe, D.E., et al., *Antibodies reactive with HIV gag-coded antigens (gag reactive only) are a major cause of enzyme-linked immunosorbent assay reactivity in a blood donor population.* J Clin Microbiol, 1988. **26**: p. 641-647.
416. Pau, C.P., et al., *Surveillance for HIV-1 group O infections in the United States.* Transfusion, 1996. **36**: p. 398-400.
417. *Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS.* AIDS, 1997. **11**: p. 1-15.
418. Kostrikis, L.G., et al., *Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I.* J Virol, 1995. **69**(10): p. 6122-30.
419. Gao, F., et al., *An isolate of human immunodeficiency virus type 1 originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I).* J Virol, 1998. **72**(12): p. 10234-41.
420. Nasioulas, G., et al., *Molecular analysis of the full-length genome of HIV type 1 subtype I: evidence of A/G/I recombination.* AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **15**(8): p. 745-58.

421. Peeters, M. and P.M. Sharp, *Genetic diversity of HIV-1: the moving target*. AIDS, 2000. **14 (suppl 3)**: p. S129-S140.
422. Glynn, S.A., et al., *Trends in incidence and prevalence of major transfusion-transmissible viral infections in US blood donors, 1991 to 1996*. *Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS)*. *Jama*, 2000. **284(2)**: p. 229-35.
423. Roth, W.K., et al., *NAT and viral safety in blood transfusion*. *Vox Sang*, 2000. **78(Suppl 2)**: p. 257-9.
424. Kleinman, S. and K. Secord, *Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV negative blood. Estimates using the lookback methodology*. *Transfusion*, 1988. **28(5)**: p. 499-501.
425. Leitman, S.F., et al., *Clinical implications of positive tests for antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in asymptomatic blood donors*. *N Engl J Med*, 1989. **321(14)**: p. 917-24.
426. Jackson, J.B., et al., *Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate western blot tests for antibody to HIV-1*. *N Engl J Med*, 1990. **322(4)**: p. 217-22.
427. Dock, N.L., et al., *Human immunodeficiency virus infection and indeterminate western blot patterns. Prospective studies in a low prevalence population*. *Arch Intern Med*, 1991. **151(3)**: p. 525-30.
428. Eble, B.E., et al., *Resolution of infection status of human immunodeficiency virus (HIV)-seroindeterminate donors and high-risk seronegative individuals with polymerase chain reaction and virus culture: absence of persistent silent HIV type 1 infection in a high-prevalence area*. *Transfusion*, 1992. **32(6)**: p. 503-8.
429. Ranki, A., et al., *Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection*. *Lancet*, 1987. **2(8559)**: p. 589-93.
430. Vaira, D., et al., *Absence of seroconversion in a PCR-positive person 18 months after transfusion of HIV-infected blood*. *Vox Sang*, 1989. **57(3)**: p. 220-1.
431. Gibbons, J., et al., *Silent infections with human immunodeficiency virus type 1 are highly unlikely in multitransfused seronegative hemophiliacs*. *Blood* 1990 Nov 15;76(10):1924-6., 1990.
432. Aiuti, F., et al., *Silent HIV infection*. *Vaccine* 1993;11(5):538-41., 1993.
433. Groopman, J.E., et al., *Antibody seronegative human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III)-infected patients with acquired immunodeficiency syndrome or related disorders*. *Blood*, 1985. **66(3)**: p. 742-4.
434. Sheppard, H.W., et al., *HIV-1 PCR and isolation in seroconverting and seronegative homosexual men: absence of long-term immunosilent infection*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993. **6(12)**: p. 1339-46.
435. Pan, L.Z., et al., *Lack of detection of human immunodeficiency virus in persistently seronegative homosexual men with high or medium risks for infection*. *J Infect Dis*, 1991. **164(5)**: p. 962-4.
436. Farzadegan, H., et al., *Loss of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies with evidence of viral infection in asymptomatic homosexual men. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study*. *Ann Intern Med*, 1988. **108(6)**: p. 785-90.
437. van der Poel, C.L., et al., *Blood donors with indeterminate anti-p24gag reactivity in HIV-1 western blot: absence of infectivity to transfused patients and in virus culture*. *Vox Sang*, 1989. **56(3)**: p. 162-7.
438. Reiser, I.W., W.B. Shapiro, and J.G. Porush, *The incidence and epidemiology of human immunodeficiency virus infection in 320 patients treated in an inner-city hemodialysis center*. *Am J Kidney Dis*, 1990. **16(1)**: p. 26-31.
439. Johnston, B.L., et al., *Cohort study of human immunodeficiency virus (HIV) antibody testing among patients receiving long-term dialysis at a university hospital*. *Am J Infect Control*, 1988. **16(6)**: p. 235-40.
440. Perez, G., et al., *HIV-1 and HTLV-I infection in renal transplant recipients*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1990. **3(1)**: p. 35-40.
441. Arnow, P.M., et al., *False-positive results of screening for antibodies to human immunodeficiency virus in chronic hemodialysis patients*. *Am J Kidney Dis*, 1988. **11(5)**: p. 383-6.

442. Perez, G.O., et al., *Circulating immune complexes in regularly dialyzed patients with chronic renal failure*. Am J Nephrol, 1984. **4**(4): p. 215-21.
443. Celum, C.L. and R. Coombs, *Indeterminate HIV-1 Western blots: Implications and considerations for widespread HIV testing*. J Gen Intern Med, 1992. **7**: p. 640-645.
444. Migali, E., et al., *HIV-1: absence of infection in subjects with indeterminate western blot*. Allergol Immunopathol (Madr), 1993. **21**(2): p. 61-5.
445. Katoh, S., K. Ida, and A. Mizunoya, *Irregular isoantibodies in the sera of patients undergoing chronic hemodialysis*. Int J Artif Organs, 1991. **14**(3): p. 136-40.
446. Howell, E.D. and H.A. Perkins, *Anti-N-like antibodies in the sera of patients undergoing chronic hemodialysis*. Vox Sang, 1972. **23**: p. 291-299.
447. Sayers, M.H., P.G. Beatty, and J.H. Hansen, *HLA antibodies as a cause of false-positive reaction in screening enzyme immunoassays for antibodies to HTLV-III*. Transfusion, 1986. **26**: p. 113-115.
448. Peterman, T.A., et al., *HTLV-III/LAV infection in hemodialysis patients*. JAMA, 1986. **255**: p. 2324-2326.
449. Vardinon, N., et al., *Anti-HIV indeterminate western blot in dialysis patients: a long-term follow-up*. Am J Kidney Dis 1999 Jul;34(1):146-9., 1999.
450. Golding, H., et al., *Identification of homologous regions in HIV-1 gp41 and human class II β 1 domain*. J Exp Med, 1988. **167**: p. 914-923.
451. Rich, J.D., et al., *Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series*. Ann Intern Med, 1999. **130**(1): p. 37-9.
452. Busch, M. and S. Kleinman, *Nucleic acid amplification testing and disease transmission*. Transfusion, 2000. **40**: p. 143-146.
453. Hatzidimitriou, K., Kontopoulou, I., Mandalaki, T., Renieri, N., et al., *HIV Seropositivity in Greek Blood Donors (1985-1990)*. Vox Sang, 1991. **61**: p. 215-216.