ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ HIV-1 ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Λιγνός Ιωάννης

1113200800109

Επιβλέποντες:

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας,

Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ

Απόστολος Μπελούκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας και Ιολογίας,
Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, ΠαΔΑ

Αθήνα, 2023

HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCES
FACULTY OF BIOLOGY

GRADUATE THESIS

DETECTION OF HIV-1 INFECTION USING IMMUNOASSAYS

Lignos Ioannis

1113200800109

Supervisors:

Ourania Tsitsiloni, Profesor of Immunology, Department of Biology

Apostolos Beloukas, Associate Professor, Department of Biomedical Sciences

Athens, 2023

Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής διπλωματικής εργασίας:

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Λιγνός Ιωάννης, με αριθμό μητρώου 1113200800109, φοιτητής του Τμήματος Βιολογίας .του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκλαση του πτυχίου μου».

Υπογραφή

ΙΩΑΝΝΗΣ Κ. ΛΙΓΝΟΣ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (ΠαΔΑ). Η ολοκλήρωση της διπλωματικής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη υποστήριξη της καθηγήτριας μου κ. Ράνιας Τσιτσιλώνη την οποία ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για όλα όσα μου έχει προσφέρει και του αγαπημένου μου καθηγητή κ. Απόστολου Μπελούκα, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του ΠαΔΑ και Επιστημονικού υπεύθυνου του εργαστηρίου μας. Χρωστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Παναγιώτα Ρέστα Μοριακή Βιολόγο - Γενετίστρια του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας τόσο για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας όσο και της καθημερινότητας του εργαστηρίου σε αυτούς τους 9 μήνες.

Τέλος παράλληλα με τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στους δύο μου γονείς Κωνσταντίνο και Άννα Λιγνού και τα 3 αδέλφια μου Γιώργο, Μηνά και Εβελίνα οι οποίοι υπήρξαν το πολυτιμότερο στήριγμα για εμένα σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου προσφέροντας τους απλόχερα ως ελάχιστη ανταμοιβή τον τίτλο του Βιολόγου Επιστήμονα, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Περιεχόμενα

Περίληψη 7
Abstract 9
Συντομογραφίες 10
Σκοπός 11
Εισαγωγή 12
Επιδημιολογικά δεδομένα για τον ιό HIV 12
Μετάδοση και στάδια της HIV λοίμωξης 14
Δομή και κύκλος ζωής του ιού HIV 17
Διάγνωση της HIV λοίμωξης 22
Διαγνωστικοί δείκτες 22
Εργαστηριακές μέθοδοι αρχικού ελέγχου (screening test) 24
Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (confirmatory tests) 30
Κατευθυντήριες οδηγίες (Guidelines) για εργαστηριακή διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης 33
Πειραματικό μέρος 35
Υλικά – Μέθοδοι 35
Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων 35
Αρχικός Έλεγχος με ELISA 4ης Γενιάς 35
Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Western Blot 39
Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Geenius 43
Αποτελέσματα 46
Συζήτηση 50
Ιικές πρωτεΐνες φακέλου gp120, gp160 και gp41 50
Ιικό αντιγόνο καψιδίου p24 51
Ιικά αντιγόνα p17 και p31 52
Βιβλιογραφία 54

Περίληψη

Σήμερα, ο ιός HIV, αιτιολογικός παράγοντας της νόσου του AIDS, εξακολουθεί να είναι ένα μείζον πρόβλημα της δημόσιας υγείας. Καθημερινά μολύνονται περίπου 4.000 άτομα σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ έχει υπολογιστεί πως οι θάνατοι που οφείλονται σε AIDS-σχετιζόμενες λοιμώξεις έφτασαν συνολικά τους 630.000 για το έτος 2022. Έχει αποδειχθεί πως αν η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση ακολουθείται από αποτελεσματική αντιρετροϊκή θεραπεία εξασφαλίζεται καλύτερη ποιότητα ζωής για τα άτομα που ζουν με τον ιό HIV-1 και μείωση των ατόμων που χάνουν τη ζωή τους. Σημαντική έχει υπάρξει η συνεχής εξέλιξη των εργαστηριακών τεχνικών, οπού πλέον χρησιμοποιούνται ανοσολογικές μέθοδοι προσδιορισμού 4^{ης} γενιάς για την πραγματοποίηση του αρχικού διαγνωστικού ελέγχου, ενώ στις επιβεβαιωτικές μεθοδολογίες περιλαμβάνονται ανοσολογικές αναλύσεις όπως το Western Blot και το σύστημα Geenius, τα οποία χρησιμοποιούνταιι για την επιβεβαίωση και διαφοροποίηση αντισωμάτων HIV1 και HIV2. Η παρούσα διπλωματική στοχεύει στην διάγνωση και επιβεβαίωση της HIV-1 λοίμωξης με την χρήση ανοσολογικών τεχνικών σε δείγματα προερχόμενα από νοσοκομεία και άλλες δομές υγείας της Αττικής και της Νοτίου Ελλάδος την χρονική περίοδο 2021-2022. Τα δείγματα εξετάστηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Ν. Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ), της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (ΠαΔΑ) σύμφωνα με τα όσα ορίζουν τόσοι οι διεθνείς, όσο και οι αντίστοιχες του ΕΟΔΥ κατευθυντήριες οδηγίες. Συνολικά αναλύθηκαν 425 δείγματα θετικά στον ιό HIV-1 εκ των οποίων τα 143 διαγνώστηκαν το έτος 2021, 49 με την χρήση της μεθοδολογίας W. Blot και 94 με την ανοσολογική μέθοδο Geenius. Για το 2022 ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν ανέρχεται στα 282, 162 εκ των οποίων διαγνώστηκαν θετικά με το σύστημα Geenius και τα υπόλοιπα 120 με W. Blot. Η συλλογή των δεδομένων βασίστηκε στην ανάγνωση του ανοσολογικού προτύπου που εμφανίζεται στις ζώνες αντισωμάτων που

ανιχνεύονται με τις προαναφερθείσες τεχνικές τόσο στις μεμβράνες της W.Blot όσο και στις κασέτες Geenius.

Λέξεις κλειδιά: HIV, AIDS, προϊός, αρχικός έλεγχος, επιβεβαιωτικός έλεγχος, νέες διαγνώσεις, άτομα που ζουν με τον HIV, ELISA 4^{ης} γενιάς, Western Blot, Geenius.

Abstract

Nowadays, HIV, the causative agent of AIDS, remains a major public health problem. Around 4,000 people are infected every day worldwide, and it has been estimated that deaths due to AIDS-related infections total 630.000 in 2022. It is proven that if early and accurate diagnosis is followed by effective antiretroviral therapy, a better quality of life for those affected and a reduction in the number of people who lose their lives is ensured. With the continuous evolution of laboratory techniques, 4th generation immunoassays are now used to perform the initial screening, while confirmatory techniques include immunoassays such as Western Blot and Geenius which can differentiate antibodies against HIV-1 and HIV-2 virus. The present thesis aims to diagnose and confirm HIV-1 infection using immunological techniques in samples from hospitals and health facilities in Southern Greece during the period 2021-2022. The samples were tested at the National AIDS Reference Centre of Greece (NCRC) in University of West Attica, Department of Biomedical Sciences, according to international guidelines. A total of 425 HIV-1 positive samples were analysed, 143 of which were diagnosed in 2021, 49 using the Western Blot methodology and 94 using the Geenius immunological method. For 2022 the number of analysed samples were 282, 162 which were diagnosed using Geenius confirmatory assay and the rest of them, a total of 120, with W. Blot. Data collection was based on the reading of the immunological pattern displayed in the antibody bands detected by the above-mentioned techniques on both W. Blot and Geenius membranes.

Keywords: HIV, AIDS, provirus, initial screening, confirmatory screening, new diagnoses, people living with HIV, 4th generation ELISA, Western blot, Geenius.

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός Ανθρώπινης Ανοσοανεπάρκειας
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
ART	Anti-retroviral Therapy	Αντιρετροϊκή Θεραπεία
XEN	People who inject drugs, PWID	Χρήστες Ενδοφλέβιων Ναρκωτικών Ουσιών
ΠΟΥ	World Health Organization, WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
MSM	Men having Sex with Men	Άνδρες που έχουν Σεξουαλικές επαφές με Άνδρες (ΑΣΑ)
SPVL	Set Point Viral Load	Ιικό Φορτίο πριν την Εναρξη της Θεραπείας
ARS	Acute Retroviral Syndrome	Οξύ Ρετροϊκό Σύνδρομο
GAG	Group specific antigen	Ειδικό Αντιγόνο Ομάδας
ENV	Envelope	Η Γονιδιακή Περιοχή env
POL	Polymerase	Πολυμεράση
RTC	Reverse Transcription Complex	Σύμπλοκο της Αντίστροφης Μεταγραφάσης
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport	Ενδοσωμικό Σύμπλεγμα Ταξινόμησης
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
ELISA/ EIA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ανοσοενζυμική Μέθοδος Προσδιορισμού
IF	Indirect Immunofluorescence	Έμμεσος Ανοσοφθορισμός
HLA	Human Leukocyte Antigens	Μείζον Σύμπλεγμνα Ιστοσυμβατότητας
HSV-2	Herpes Simplex Virus-2	Ιός του Απλού Έρπητα Τύπου 2

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να πραγματοποιηθεί η παρατήρηση και η καταγραφή των πρωτεϊνών που έχουν ανιχνευθεί στα δείγματα, τα οποία επιβεβαιώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ως θετικά κατά τα έτη 2021 και 2022 μέσω των ανοσολογικών τεχνικών Western Blot και Geenius.

Εισαγωγή

Επιδημιολογικά δεδομένα για τον ιό HIV

Ο ιός HIV *(Human Immunodeficiency Virus, HIV)* είναι υπεύθυνος για το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας *(Aquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS)* στους ανθρώπους. Ο ιός επιτίθεται στο ανοσοποιητικό σύστημα και εξασθενεί την άμυνα έναντι πολλών ασθενειών και λοιμώξεων, τις οποίες άτομα με υγιές ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν σε φυσιολογικές συνθήκες εύκολα να αντιμετωπίσουν. Σταδιακά, καθώς ο ιός καταστρέφει τα $CD4^+$ Τ λεμφοκύτταρα, βασικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα άτομα που έχουν προσβληθεί, καθίστανται ανοσοανεπαρκή. Το τελικό στάδιο της HIV λοίμωξης αποτελεί τη νόσο του AIDS (WHO, 2022). Το AIDS διαγνώστηκε για πρώτη φορά το 1981 και με βάση τα επιδημιολογικά δεδομένα της εποχής, υπήρξε η υπόθεση ότι βασίζεται σε κάποιον μολυσματικό παράγοντα. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1983, η ομάδα του Luc Montagnier στο Ινστιτούτο Παστέρ στο Παρίσι, ανακάλυψε τον ιό HIV, ενώ το 1984 η ομάδα του Gallo στο Εθνικό Ινστιτούτο για τον καρκίνο (National Cancer Institute, NCI) στη Βηθεσδά του Μέριλαντ, έδειξε την αιτιολογική εμπλοκή του ιού στην εμφάνιση της νόσου του AIDS[1].

Στις μέρες μας, ο ιός HIV αποτελεί πρόβλημα δημόσιας υγείας καθώς σύμφωνα με το σχετικό πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για τον HIV και το AIDS, το οποίο ονομάζεται UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) υπολογίζεται ότι κάθε μέρα μολύνονται τουλάχιστον 4.000 άνθρωποι και πως συνολικά είναι υπεύθυνος για 84.2 εκατομμύρια λοιμώξεις έως και τα τέλη του 2021. Έως σήμερα, οι θάνατοι που σχετίζονται με σχετιζόμενες με το AIDS ασθένειες φτάνουν τους 40 εκατομμύρια. Σημειώνεται ότι κάθε μέρα μολύνονται 4.000 άτομα, ενώ η Ανατολική Ευρώπη, η Κεντρική Ασία, η Μέση Ανατολή, η Βόρεια Αφρική και η Λατινική Αμερική έχουν παρουσιάσει αύξηση των ετήσιων μολύνσεων από τον ιό HIV κατά την τελευταία δεκαετία[2].Μέχρι το τέλος του 2021, 38.4 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με τον ιό, από τους οποίους 36.7 εκατομμύρια ήταν ενήλικες ενώ 1.7 εκατομμύρια παιδιά ηλικίας 0 έως 14 ετών. Σχεδόν το 85% των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV, γνώριζαν την κατάσταση της υγείας τους, ενώ σχεδόν 5.9 εκατομμύρια άνθρωποι δεν ήξεραν πως έχουν προσβληθεί και ζουν με τον ιό[3]. Επιπρόσθετα, το 75% των ατόμων με HIV, δηλαδή 28.7 εκατομμύρια άνθρωποι, λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία *(Antiretroviral Therapy, ART)*. Ο *πίνακας 1* παρουσιάζει τα παγκόσμια δεδομένα για το έτος 2021 αναφορικά

με την HIV λοίμωξη, με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Όσον αφορά τις νέες λοιμώξεις, περίπου το 70% αναφέρεται σε ομάδες υψηλού κινδύνου. Το UNAIDS έχει ορίσει ως ομάδες υψηλού επιπολασμού τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (ΧΕΝ), τους άνδρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άλλους άνδρες (Men having Sex with Men,MSM) τα τρανς άτομα και τα άτομα που παρέχουν υπηρεσίες σχετικές με τη σεξουαλική επαφή, καθώς και τους συντρόφους ή πελάτες τους [2].

Σύνοψη παγκόσμιων δεδομένων της HIV επιδημίας, 2021			
	Άτομα που ζουν με τον ιό HIV	Νεοδιαγνωσθέντες	Άτομα που πέθαναν από HIV- σχετιζόμενες ασθένειες το 2021
Σύνολο	38,4 εκατ. (33,9 – 43,8 εκατ.)	1,5 εκατ. (1,1 – 2,0 εκατ.)	650 000 (510 000 – 860 000)
Ενήλικες	36,7 εκατ. (32,3 – 41,9 εκατ.)	1,3 εκατ. (990 000 – 1,8 εκατ.)	560 000 (430 000 – 740 000)
Γυναίκες	19,7 εκατ. (17,6 – 22,4 εκατ.)	640 000 (480 000 – 870 000)	240 000 (180 000 – 320 000)
Άνδρες	16,9 εκατ. (14,6 – 19,7 εκατ.)	680 000 (500 000 – 920 000)	320 000 250 000 – 430 000)
Παιδιά (κάτω των 15 ετών)	1,7 εκατ. (1,3 – 2,1 εκατ.)	160 000 (110 000 – 230 000)	98 000 (67 000 – 140 000)

Πίνακας 1. Σύνοψη των επιδημιολογικών δεδομένων για τον HIV, για το έτος 2021 (τα δεδομένα ανακτήθηκαν από την ιστοσελίδαhttps://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids).

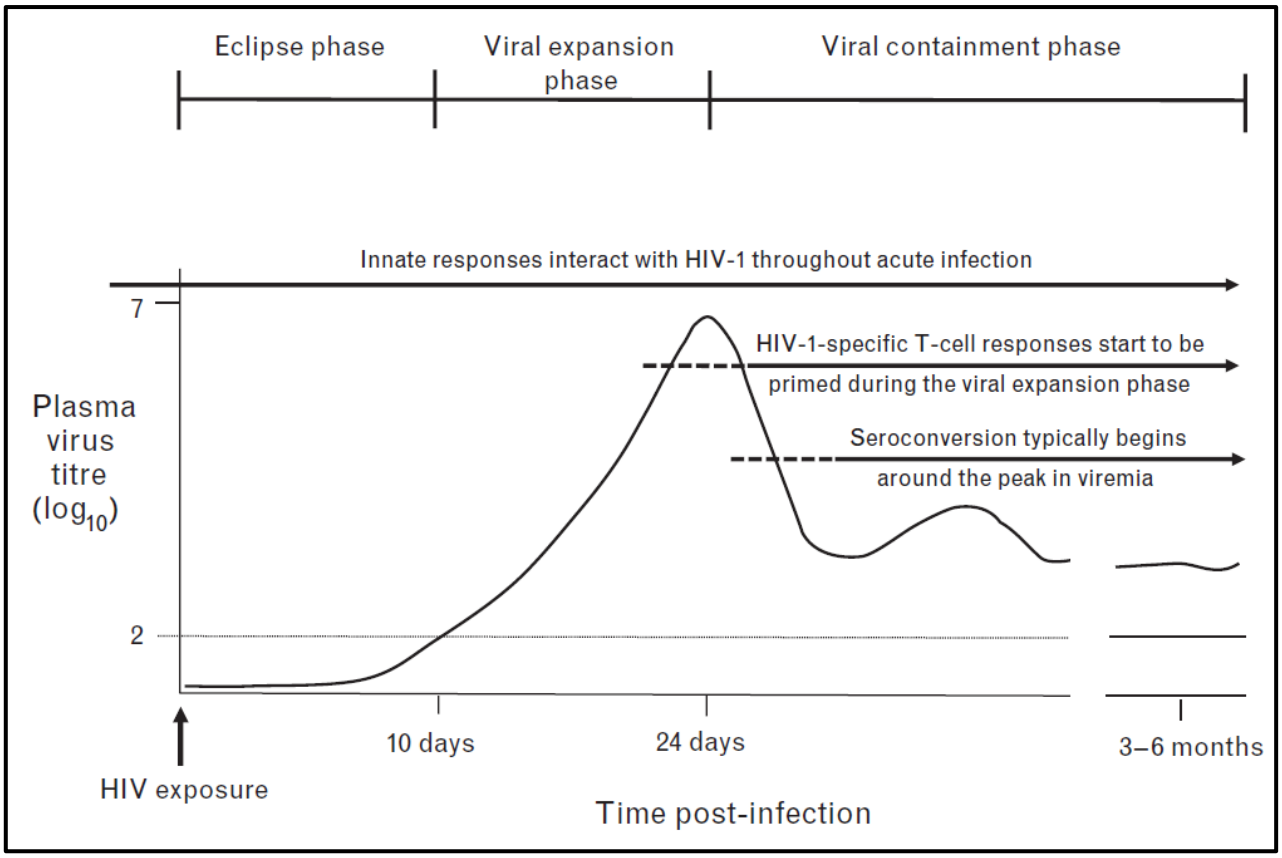
Από την εμφάνιση της πρώτης μόλυνσης από τον ιό, έχουν ανακαλυφθεί δύο υπότυποι, ο HIV-1 και ο HIV-2[4]. Οι δύο αυτοί υπότυποι, έχουν πολλά κοινά στοιχεία όπως γονίδια, τρόπους μετάδοσης, μονοπάτια αναπαραγωγής και κλινική έκβαση. Παρόλα αυτά, όσον αφορά τον ιό HIV-2 υπάρχουν χαμηλότερες πιθανότητες να εξελιχθεί η λοίμωξη σε AIDS. Επίσης, ενώ ο ιός HIV-1 ευθύνεται για λοιμώξεις γεωγραφικά σε όλο τον κόσμο, ο ιός HIV-2 ανιχνεύεται κυρίως στη δυτική Αφρική. Ακόμη, ο ιός HIV-1 κατηγοριοποιείται περεταίρω ομάδες ιικών στελεχών, όπου ονομάζονται M (Major), O (Outlier) και N (non-M, non-O). Τα πλέον συχνά στελέχη ανήκουν στην ομάδα M, με περισσότερα από το 90% των ατόμων που ζουν με τον ιό, να έχουν προσβληθεί από στελέχη αυτής της ομάδας [5].

Μετάδοση και στάδια της HIV λοίμωξης

Η μετάδοση του ιού HIV γίνεται κυρίως μέσω σωματικών υγρών. Σε αυτά περιλαμβάνονται το αίμα, τα κολπικά, σπερματικά, προσπερματικά υγρά και το μητρικό γάλα[6].Προκειμένου να υπάρξει μετάδοση του ιού πρέπει να υπάρξει κάποια δερματική βλάβη, καθώς το δέρμα λειτουργεί ως φυσιολογικός φραγμός ενάντια στη λοίμωξη από τον ιό HIV και οι βλεννογόνοι δυσκολεύουν την μετάδοσή του. Παρόλα αυτά, εάν καταφέρει να περάσει στην αιματική ή λεμφική κυκλοφορία μπορεί να εδραιωθεί στον ξενιστή[7].

Γενικά, ο πιο συχνός τρόπος μετάδοσης του ιού είναι μέσω της χωρίς προφύλαξη σεξουαλικής επαφής, αλλά σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχουν και οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, καθώς η χρήση μολυσμένων βελόνων μπορεί να οδηγήσει σε μετάδοση της HIV λοίμωξης από έναν χρήστη σε έναν άλλο χρήστη. Εκτός από τις βελόνες που χρησιμοποιούν οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, μολυσμένες βελόνες που χρησιμοποιούνται για τρύπημα αυτιών ή για τατουάζ μπορεί να αποτελούν εστίες μετάδοσης λοίμωξης[6]. Σε κάθε περίπτωση, ο ιός HIV δεν μεταδίδεται μέσω αγκαλιάς, από τσίμπημα εντόμου, μέσω σταγονιδίων ιδρώτα ή σάλιου από φτέρνισμα ή βήχα κ.α. Παράλληλα, μια μητέρα που ζεί με τον ιό HIV μπορεί να μεταδώσει τον ιό στο βρέφος, κατά την εγκυμοσύνη, τον τοκετό ή τον θηλασμό. Ο τρόπος αυτός ονομάζεται κάθετη μετάδοση του ιού[8]. Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι άτομα που πάσχουν από σεξουαλικώς μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως είναι ο ιός του έρπη τύπου 2 (Herpes Simplex Virus-2, HSV-2) ή η σύφιλη, είναι πιο πιθανό να μολυνθούν από τον ιό HIV[6]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις βλάβες που προκαλούνται από τον ιό HSV-2 στον βλεννογόνο, όπως επίσης και στη συσσώρευση των Τ λεμφοκυττάρων. Τα Τ λεμφοκύτταρα μαζεύονται για να αντιμετωπίσουν τη λοίμωξη από το σεξουαλικώς μεταδιδόμενο νόσημα, είναι όμως και στόχος του ιού HIV ο οποίος επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό του [7].

Ειδικότερα, η λοίμωξη από ιό HIV διακρίνεται στα παρακάτω στάδια:



Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των διαφορετικών φάσεων της πρώιμης HIV λοίμωξης (ανακτήθηκε από Borrow, 2011).

1. Πρώιμη λοίμωξη

Αυτό το στάδιο ξεκινάει τη στιγμή της μόλυνσης από τον ιό και διαρκεί περίπου 7 με 8 εβδομάδες[9]. Σε αυτή την περίοδο, ενώ αναπτύσσεται η ανοσολογική απόκριση του προσβεβλημένου ατόμου, ο ιός αναπαράγεται και πολλαπλασιάζεται φτάνοντας σε ένα καθορισμένο όριο (set-point viral load – SPVL) που θεωρείται προβλεπτικός παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου[9].Το στάδιο αυτό χωρίζεται σε επιμέρους φάσεις (*Εικόνα 1*).

Πιο αναλυτικά, από τη στιγμή της μόλυνσης μέχρι τη στιγμή που μπορεί να ανιχνευτεί το ιικό φορτίο, δηλαδή το RNA του ιού, απαιτούνται περίπου 10 ημέρες, ενώ πολύ σπάνια χρειάζονται ακόμα και μήνες [10]. Στη συνέχεια, ακολουθεί η οξεία φάση της λοίμωξης που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ειδικών αντι-HIV-1 αντισωμάτων στον ορό (ορομετατροπή) και διαρκεί περίπου 24 ημέρες. Κατά τη φάση αυτή το ιικό φορτίο αυξάνεται πολύ, ενώ παράλληλα μειώνεται ο αριθμός των CD4+ Τ-λεμφοκυττάρων[11,12]. Κατά την οξεία φάση, τα περισσότερα προσβεβλημένα άτομα αναπτύσσουν το Οξύ Ρετροϊκό Σύνδρομο (Acute Retroviral Syndrome, ARS), το οποίο διαρκεί συνήθως 7 έως 10 ημέρες και χαρακτηρίζεται από πλήθος ετερογενών συμπτωμάτων. Παρόλα αυτά, άτομα στα οποία τα

συμπτώματα είναι αρκετά σοβαρά και δεν υποχωρούν, τείνουν να φτάνουν γρηγορότερα στο τελικό στάδιο της λοίμωξης. Στο τέλος της πρώιμης φάσης το ιικό φορτίο μειώνεται σταδιακά και φτάνει ένα συγκεκριμένο επίπεδο, το SPVL, το οποίο παραμένει σταθερό για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα[11].

2. Χρόνια ή λανθάνουσα λοίμωξη

Το επόμενο στάδιο, χαρακτηρίζεται ως χρόνια ή λανθάνουσα λοίμωξη και διαρκεί μήνες ή ακόμα μπορεί να διαρκέσει και χρόνια. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται απουσία συμπτωμάτων και αυξημένη παραγωγή ειδικών αντι-HIV-1 αντισωμάτων με αποτέλεσμα το ιικό φορτίο να παραμένει σε σχετικά σταθερά επίπεδα[13]. Ταυτόχρονα όμως ο ιός πολλαπλασιάζεται συνεχώς, προκαλώντας μια κατάσταση χρόνιας φλεγμονής στον ξενιστή. Η σταδιακή απώλεια των CD4+ T λεμφοκυττάρων οδηγεί σε προοδευτική εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η καταστροφή του λεμφικού ιστού οδηγεί σε ευκολία διάχυσης του ιού στο λεμφικό περιβάλλον[14].

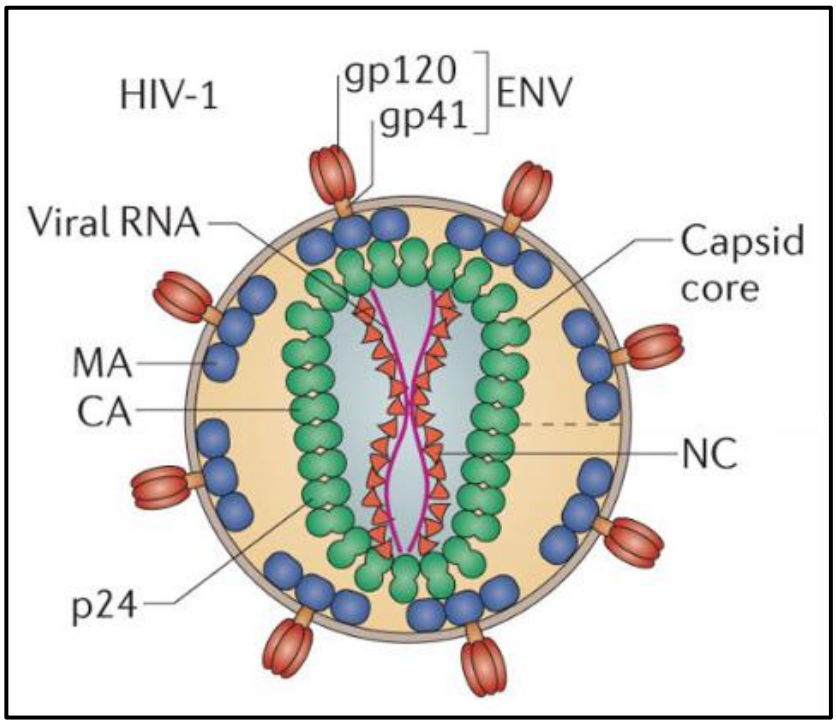
3. Τελικού σταδίου λοίμωξη – νόσος AIDS

Η σταδιακή εξάλειψη των CD4+ T λεμφοκυττάρων, που φτάνουν σε επίπεδα χαμηλότερα από 200 κύτταρα/mm^3, σηματοδοτεί την έναρξη του τελικού σταδίου. Άτομα που δεν λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία είναι πολύ πιθανό να αναπτύξουν συμπτωματολογία της νόσου του AIDS, λόγω της εξασθένησης του ανοσοποιητικού τους συστήματος. Τα άτομα αυτά είναι πολύ ευάλωτα σε ευκαιριακές μικροβιακές μολύνσεις, οι οποίες μπορεί να προέρχονται από μύκητες, όπως ο *Candidaalbicans,* από ιούς, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός ή ο έρπητας ζωστήρα, και από παράσιτα που κατοικούν στο έντερο[15]. Παράλληλα, μπορεί να εμφανιστούν νεοπλασματικές κακοήθειες, όπως το λέμφωμα, οι οποίες εξασθενούν ακόμα περισσότερο τον οργανισμό και επιταχύνουν την εξέλιξη της νόσου [15]. Ωστόσο, η κλινική πορεία της HIV λοίμωξης είναι ιδιαίτερα μεταβλητή και εξαρτάται τόσο από τον ιό και τον κύκλο ζωής του, όσο και από τον ξενιστή, το ανοσοποιητικό του σύστημα, το πλήθος ιοσωματίων που φέρει και την απόκριση στην θεραπεία[16].

Δομή και κύκλος ζωής του ιού HIV

Ο ιός HIV ανήκει στους ρετροϊούς, δηλαδή το γονιδίωμά του αποτελείται από μονόκλωνο RNA, από το οποίο παράγεται δίκλωνο DNA, ενώ όταν εισβάλει στον ξενιστή επιτίθεται στο ανοσοποιητικό του σύστημα, και πιο συγκεκριμένα στα CD4+ T λεμφοκύτταρα και στα μακροφάγα. Η επικείμενη μείωση των CD4+ T κυττάρων, τα οποία είναι κύριοι ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης, οδηγεί στην εμφάνιση της νόσου του AIDS[17]. Βασικό χαρακτηριστικό των RNA ιών, είναι η ικανότητά τους να συγκεντρώνονται σε ιοσωμάτια, τα οποία μπορούν να εξαπλωθούν και να μολύνουν παρακείμενα κύτταρα. Η μορφογένεση του ιού μπορεί να χωριστεί σε 3 στάδια: συναρμολόγηση, εκβλάστηση και ωρίμανση [18].

Ένα HIV ιοσωμάτιο, είναι σφαιρικό και έχει διάμετρο περίπου 100 nm (Ε*ικόνα 2*). Περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία ονομάζεται φάκελος και περιέχει ετεροδιμερή γλυκοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στην πρόσδεση με άλλα κύτταρα[15]. Παρόμοια με άλλους ιούς, το γονιδίωμα του ιού HIV βρίσκεται μέσα σε μια δομή, που ονομάζεται νουκλεοκαψίδιο (ή καψίδιο) και αποτελείται από περίπου 1000 με 1500

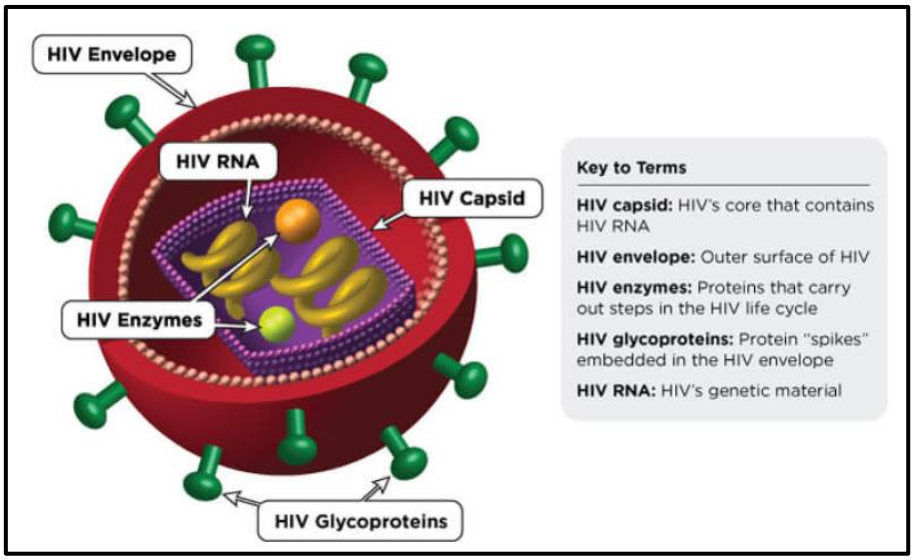


Εικόνα 2. Αναπαράσταση του ιού HIV. Εξωτερικά απεικονίζεται ο φάκελος με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες gp120 και gp41, με πράσινο αναπαρίσταται το καψίδιο και εσωτερικά το νουκλεοκαψίδιο (ENV: Πρωτεϊνικός φάκελος, ViralRNA: Ιικό RNA, MA: Πρωτεϊνική μήτρα, CA: Καψίδιο, NC: Νουκλεκαψίδιο – ανακτήθηκε απόCambelandHope, 2015).

αντίγραφα της ίδιας πρωτεΐνης [19]. Το γονιδίωμα αποτελείται από δύο θετικής πολικότητας μονόκλωνα RNA μόρια (+ssRNA) και περιέχει τις γονιδιακές περιοχές gag,pol,env. Η

γονιδιακή περιοχή *gag* (group specific antigen), κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα p24 (η οποία είναι κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου), p7, p6 και p17, ενώ από την γονιδιακή περιοχή env (envelope) προκύπτουν οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου gp120 καιgp41, που είναι υπεύθυνες για τον σχηματισμό του, καθώς και την αναγνώριση και πρόσδεση σε κυτταρικούς υποδοχείς. Στην επιφάνεια του ιοσωματίου, υπάρχουν επίσης πρωτεΐνες που προκύπτουν μετά από την εκβλάστηση του ιού από το κύτταρο ξενιστή, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (*Human Leukocyte Antigens*, HLA) και πρωτεΐνες προσκόλλησης όπως η πρωτεΐνη ICAM-1 της οποίας ο ρόλος είναι να διευκολύνει την προσκόλληση του ιού σε άλλα κύτταρα στόχους[15]. Τέλος, η γονιδιακή περιοχή *pol* (polymerase) κωδικοποιεί τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή του ιού. Σε αυτά περιλαμβάνονται η αντίστροφη μεταγραφάση που μετατρέπει στο RNA του ιού σε DNA, η ιντεγκράση η οποία ενσωματώνει το ιικό DNA στο γονιδίωμα του ξενιστή και η ιική πρωτεάση που οδηγεί στην ωρίμανση των πρωτεϊνών που προκύπτουν από τα γονίδια *gag* και *pol*, οι οποίες αρχικά δομούνται ως μακριές πολυπρωτεΐνες που στη συνέχεια πρέπει να διασπαστούν στα κατάλληλα λειτουργικά τμήματα. Εκτός από τα προαναφερθέντα, το γονιδίωμα του ιού HIV περιέχει επίσης τα ρυθμιστικά γονίδια *Tat* και *Rev*, και τα βοηθητικά γονίδια *Vpr, Vif, Vpu* και *Nef*, τα οποία συμμετέχουν στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού HIV[15].

Όπως έχει προαναφερθεί, στόχος του ιού είναι να προσβάλει κυρίως τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα, που παίζουν κυρίαρχο ρόλο για το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών στοιχείων του ιοσωματίου (ανακτήθηκε από The HIV Life Cycle, 2021

Η *Εικόνα 3* παρουσιάζει σχηματικά τα βασικά στοιχεία του, που τον βοηθούν να επιτύχει σε αυτή τη διαδικασία. Ο κύκλος ζωής του ιού HIV[20] χωρίζεται στα παρακάτω στάδια (εικόνα 4):

1. Πρόσδεση.

Για να μπορέσει ο ιός HIV να μολύνει ένα κύτταρο-ξενιστή θα πρέπει να προσδεθεί σε αυτό, και στη συνέχεια να υπάρξει σύντηξη μεταξύ του φακέλου του ιού και της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή. Η πρωτεΐνη gp120 που βρίσκεται στον φάκελο, έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκο με το N-τελικό άκρο των CD4+ υποδοχέων, οι οποίοι βρίσκονται στη μεμβράνη των CD4+ T λεμφοκυττάρων[21]. Η δημιουργία αυτού του συμπλόκου οδηγεί σε δομική αναδιάταξη του ιικού φακέλου και με αυτόν τον τρόπο, η περιοχή της gp120 εκτίθεται και μπορεί να αλληλοεπιδράσει με συν-υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης καθιστώντας δυνατή τη σύντηξη[15].

2. Είσοδος στο κύτταρο-ξενιστή.

Κατά τη σύντηξη του φακέλου και της μεμβράνης, το ιικό καψίδιο αποσυντίθεται, ενώ οι πρωτεΐνες και το γονιδίωμα του ιού, εισέρχονται και απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου [20].

3. Αντίστροφη μεταγραφή.

Το σύμπλοκο της αντίστροφης μεταγραφάσης (*Reverse Transcription Complex*, RTC), το οποίο απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα μαζί με τα υπόλοιπα στοιχεία που υπήρχαν στο καψίδιο, μεταγράφει το ιικό RNA σε cDNA. Αποτελείται από το ιικό γονιδίωμα, το οποίο είναι συνδεμένο με διάφορες πρωτεΐνες του ιού που βοηθούν στη μεταγραφή. Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας το σύμπλοκο μειώνεται σε μέγεθος, αποτελούμενο πλέον από το ιικό cDNA και διάφορες πρωτεΐνες και είναι εφικτό να εισαχθεί στον πυρήνα και να ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή. Σε αυτό το στάδιο ο ιός HIV ονομάζεται προϊός[22].

4. Ενσωμάτωση στο DNA του κυττάρου-ξενιστή.

Για την ενσωμάτωση του ιικού cDNA, η ιντεγκράση επεμβαίνει και κόβει το DNA του ξενιστή με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθούν κολλώδη άκρα, στα όποια μπορεί να κολλήσει το ιικό cDNA με βάση τον κανόνα της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Έτσι, αφού έχουν προσκολληθεί τα μόρια DNA, με την μεταγραφή του γονιδιώματος του ξενιστή,

μεταγράφεται και το ιικό γονιδίωμα, προκαλώντας τη δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων του ιού και προκαλώντας τη δημιουργία ώριμων ιοσωματίων [15,20].

5. Σύνθεση ιοσωματίων.

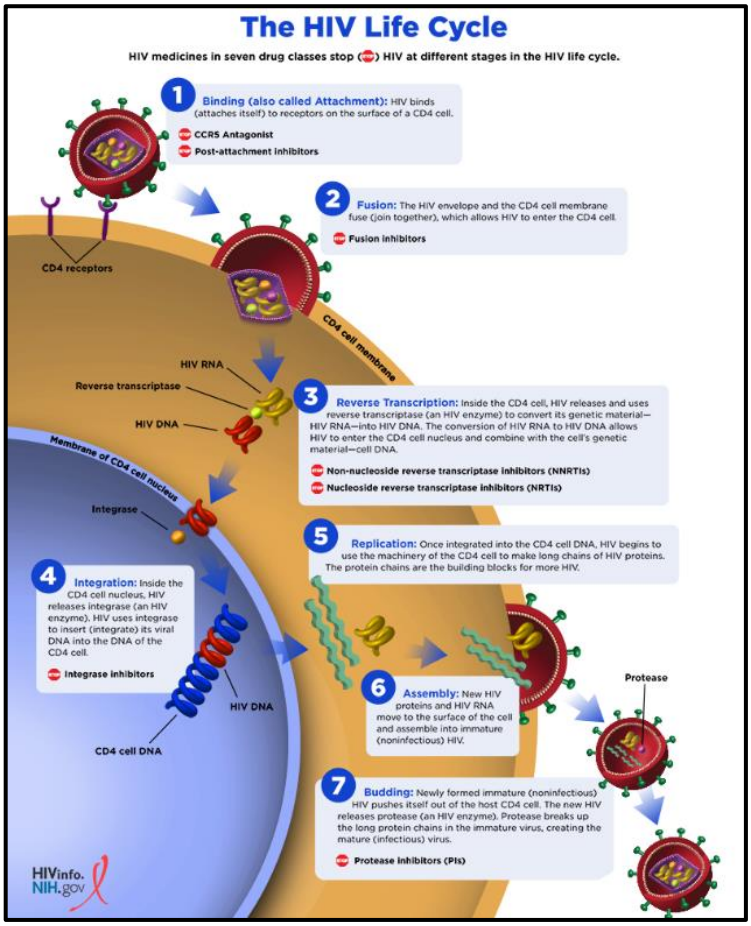
Η μεταγραφή και η μετάφραση του συνόλου των ιικών γονιδίων, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη συναρμολόγηση των ιοσωματίων. Για τον σκοπό αυτό, η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Gag έχει κατευθυντήριο ρόλο καθώς μέσω των αλληλεπιδράσεων που υπάγει, οδηγεί το ιικό RNA προς την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή [23]. Εκεί συσσωρεύονται πολλές γλυκοπρωτεΐνες και μαζί με τις χιλιάδες πρωτεΐνες Gag που βρίσκονται ήδη εκεί, συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το καψίδιο του ιού [15].

6. Εκβλάστηση.

Η συσσώρευση πολλών πρωτεϊνών στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης προκαλεί τη διόγκωσή της, σχηματίζοντας ένα σφαιρικό σωμάτιο προς την εξωτερική της πλευρά. Τέλος, η Gag στρατολογεί το σύμπλοκο ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), το οποίο είναι απαραίτητο για τη σχάση της μεμβράνης και την εκβλάστηση των νέων ιοσωματίων [23]. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ο νέος ιός περιέχει πολλές πρωτεΐνες της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή [15].

7. Ωρίμανση.

Αφού έχει απελευθερωθεί ο ιός, η πολυπρωτεΐνη Gag διασπάται και σχηματίζονται οι ώριμες μορφές της. Το γεγονός αυτό κατευθύνει την ωρίμανση του ιού και ως αποτέλεσμα τη μορφολογική αλλαγή του [23]. Οι αλλαγές των γλυκοπρωτεϊνών στο καψίδιο, καθιστά τον HIV μολυσματικό [24].

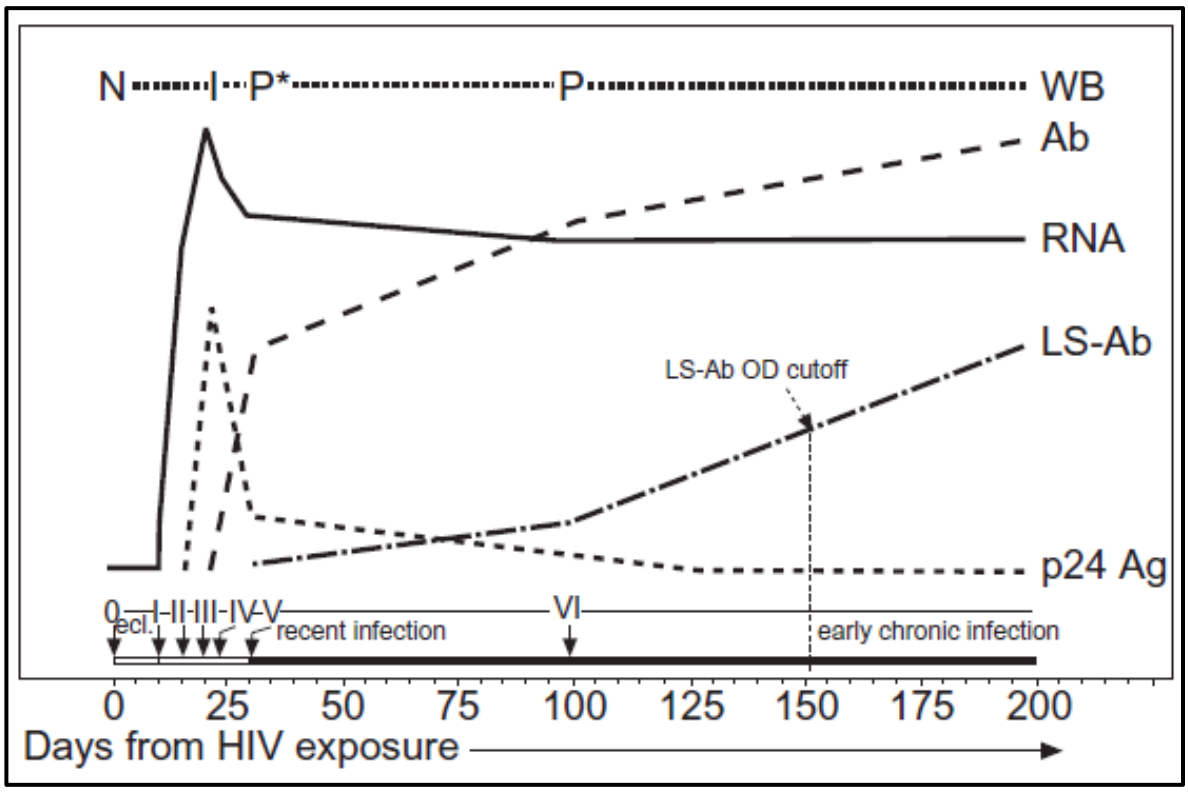


Εικόνα 4. Τα στάδια του κύκλου ζωής του HIV (ανακτήθηκε από The HIV Life Cycle, 2021).

Διάγνωση της HIV λοίμωξης

Διαγνωστικοί δείκτες

Η έγκαιρη διάγνωση της HIV λοίμωξης είναι υψίστης σημασίας τόσο για τη λήψη της κατάλληλης θεραπείας από τα άτομα που πάσχουν, όσο και για την επιτήρηση της εξέλιξης και της νοσηρότητας της νόσου σε παγκόσμιο επίπεδο. Δείκτες της HIV λοίμωξης αποτελούν τα CD4+T λεμφοκύτταρα, το ιικό RNA, το ιικό αντιγόνο p24, καθώς και τα ειδικά αντισώματα έναντι του ιού, που παράγονται ως ανοσολογική απόκριση στην ιική μόλυνση μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ορομετατροπή, κατά την οξεία φάση. Η ορομετατροπή θεωρείται σημείο αναφοράς για την εξέλιξη της νόσου. Έτσι, υπάρχουν δύο διακριτές φάσεις, πριν και μετά από αυτή. Η πρώιμη περίοδος, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ιικού RNA και της πρωτεΐνης p24, ενώ στη συνέχεια αρχίζουν να παράγονται IgM αντισώματα και αργότερα IgG αντισώματα (*Εικόνα 6*)[25]. Πιο αναλυτικά, το γονιδίωμα του ιού είναι ανιχνεύσιμο στο αίμα από την 10η ημέρα και για έως 5 ημέρες αποτελεί μοναδικό διαγνωστικό δείκτη. Στη συνέχεια, αφού έχουν περάσει οι δύο πρώτες εβδομάδες από την αρχή της λοίμωξης, μπορεί να ανιχνευτεί [26] (*Εικόνα 5*).



Εικόνα 5. Διάγνωση του HIV, μετά την έναρξη της λοίμωξης (ανακτήθηκε από Fiebig et al., 2003).

Σύμφωνα με τον Fiebig και την ομάδα του[25], με βάση τη διαδοχική εμφάνιση των διαγνωστικών δεικτών, η HIV λοίμωξη μπορεί να χωριστεί σε έξι στάδια*(Εικόνα 6).* Η κατηγοριοποίηση αυτή είναι σημαντική κατά την εργαστηριακή διάγνωση της πρώιμης

Fiebig stages of early HIV infection

Fiebig stage	Cumulative duration (days)	HIV RNA	p24 antigen	Immunoassay	Western blot
1	5	+	–	–	–
2	10	+	+	–	–
3	14	+	+	+	–
4	19	+	+/–	+	Indeterminate
5	88	+	+/–	+	+ (p31 band negative)
6	Open-ended	+	+/–	+	+ (p31 band positive)

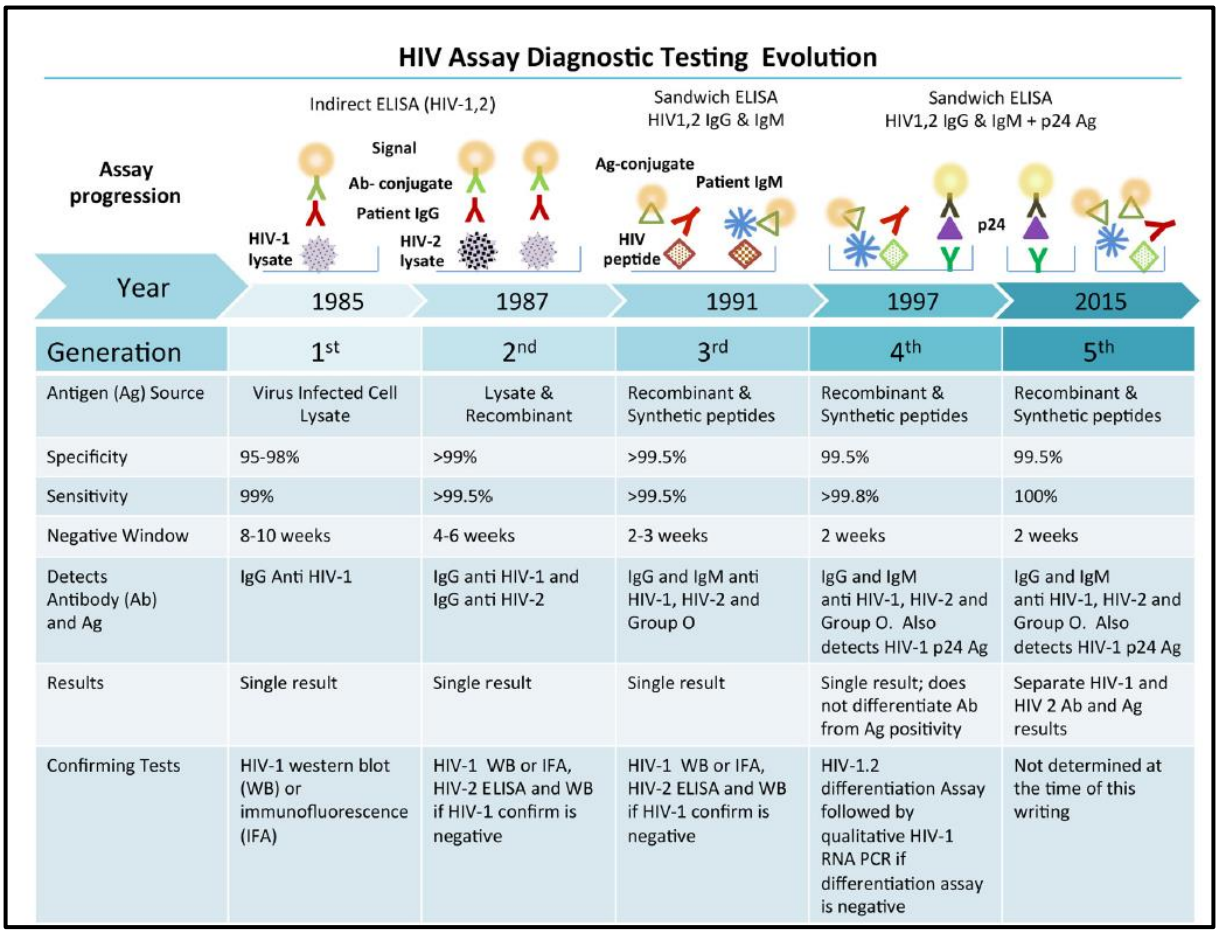
Εικόνα 6. Τα στάδια της HIVλοίμωξης, σύμφωνα με τον Fiebig και την ομάδα του.

λοίμωξης. Κατά το πρώτο στάδιο, μπορεί να ανιχνευτεί μόνο το ιικό RNA με τεχνικές ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, όπως είναι η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Στο δεύτερο στάδιο, εκτός από το ιικό γονιδίωμα, η ιική πρωτεΐνη p24 μπορεί επίσης να ανιχνευτεί με 4ης γενιάς Ανοσοενζυμικές Μεθόδους Προσδιορισμού. Στη συνέχεια, κατά το τρίτο στάδιο, έχουν αρχίσει να εμφανίζονται τα ειδικά αντι-HIV αντισώματα IgM, και είναι εφικτό να ανιχνευτούν με τεχνικές 3ης και 4ης γενιάς EIAs. Η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) μπορεί να ανιχνεύσει τα αντισώματα από το τέταρτο στάδιο και μετά, και στο πέμπτο στάδιο δίνει θετικά αποτελέσματα για όλα τα αντισώματα έναντι του HIV εκτός από αυτά ενάντια στο αντιγόνο p31. Τέλος, στο έκτο και τελευταίο στάδιο είναι εφικτή η επιβεβαίωση της λοίμωξης, με όλες τις εργαστηριακές δοκιμασίες να δίνουν θετικό αποτέλεσμα[27].

Η διάγνωση πρέπει ιδανικά να πραγματοποιείται κατά την οξεία φάση, διότι τότε η συγκέντρωση του ιικού RNA είναι πολύ υψηλή στα βιολογικά υγρά των προσβεβλημένων ατόμων και έτσι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μετάδοσης, έως και 26 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με ένα πιο προχωρημένο στάδιο[28]. Παράλληλα, αρκετά μεγάλο ποσοστό νέων λοιμώξεων οφείλεται σε άτομα που βρίσκονται στην οξεία φάση και πιθανόν δεν γνωρίζουν πως έχουν προσβληθεί[29]. Επομένως, η έγκαιρη διάγνωση είναι υψίστης σημασίας, με την αξιολόγηση του ιικού φορτίου να βρίσκεται ανάμεσα στις πιο χρησιμοποιούμενες μεθόδους[13].

Εργαστηριακές μέθοδοι αρχικού ελέγχου (screening test)

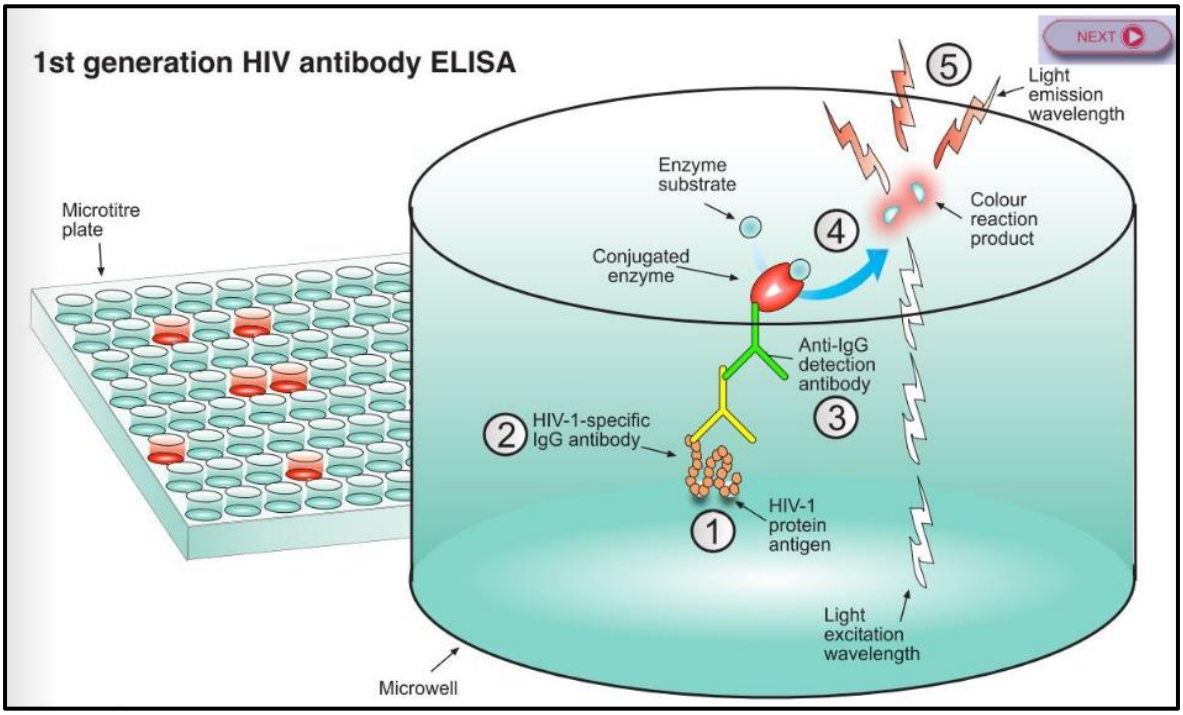
Πολλές είναι οι εργαστηριακές μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την διάγνωση της HIV λοίμωξης. Τις περισσότερες φορές, η διάγνωση ξεκινάει με μια Ανοσοενζυμική Μέθοδο Προσδιορισμού (EnzymeImmunoAssay, EIA)[27]. Η μέθοδοςEIA (ή αλλιώς Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) θεωρείται το gold standard για την αρχική ανίχνευση της λοίμωξης, λόγω της υψηλής της ευαισθησίας [30] και χωρίζεται σε EIA 1ης έως EIA 5ης γενιάς *(Εικόνα 7*).



Εικόνα 7. Εξέλιξη των Ανοσοενζυμικών Μεθόδων Προσδιορισμού για τη διάγνωση του HIV από το 1985 έως το 2015 (ανακτήθηκε από Alexandert., 2016)

ΕΙΑ 1ης γενιάς

Οι ΕΙΑ 1ης γενιάς ανιχνεύουν αποκλειστικά αντισώματα IgG έναντι του ιού HIV-1 *(Εικόνα 8)*. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στην καθήλωση ιικών HIV-1 αντιγόνων στη στερεή φάση της μικροπλάκας και στην επικείμενη σύνδεσή τους με αντι-HIV-1 IgG αντισώματα, σε περίπτωση που το προς εξέταση δείγμα είναι μολυσμένο [27]. Στη συνέχεια, στα αντι-HIV IgG αντισώματα συνδέονται ειδικά αντι-IgG αντισώματα, τα οποία είναι συζευγμένα με κάποιο συγκεκριμένο ένζυμο και με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος παρατηρείται αλλαγή χρώματος στο υπό έλεγχο δείγμα.

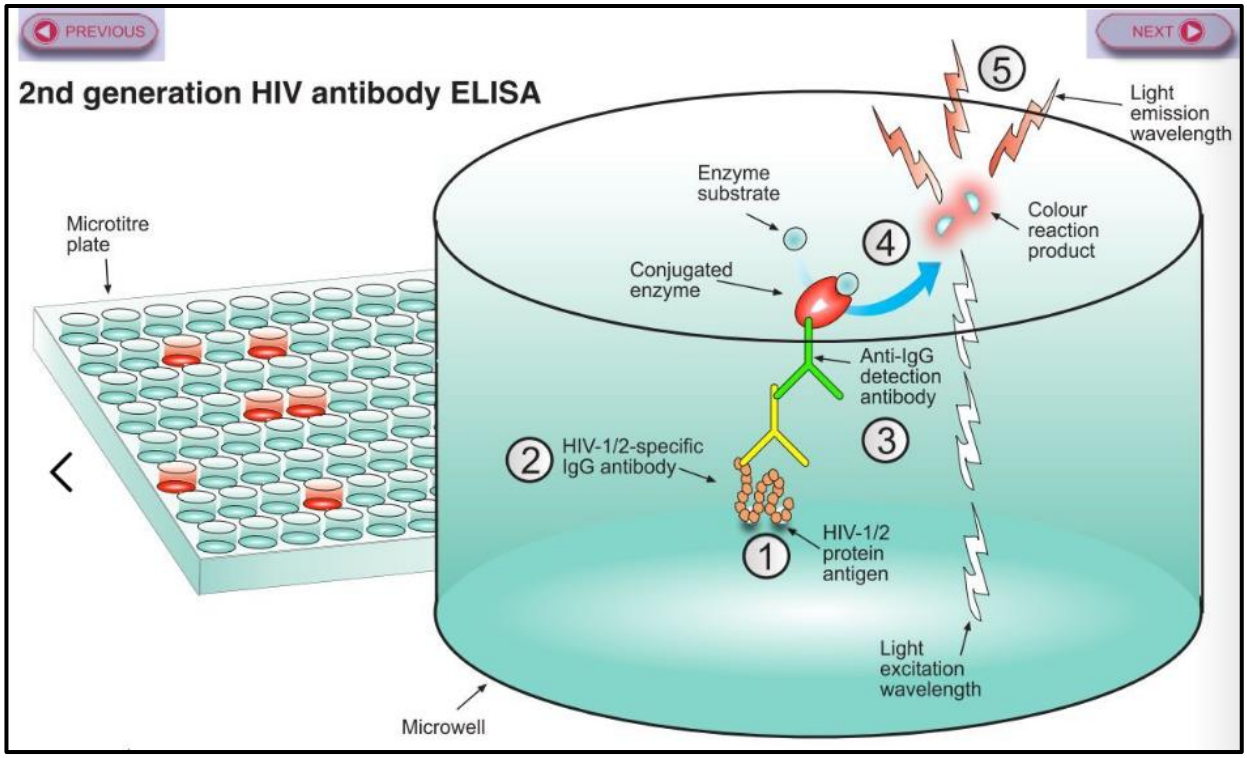


Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση Ανοσοενζυμικής Μεθόδου Προσδιορισμού 1ης γενιάς (ανακτήθηκε από Immunopaedia.org)

Βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του ιού HIV-2. Παράλληλα, συχνά εμφανίζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ειδικής σύνδεσης IgG αντισωμάτων του προς εξέταση δείγματος [27]. Τέλος, η ανίχνευση των αντισωμάτων αντι-HIV-1 στον ορό είναι εφικτή σε μεγάλο χρονικό διάστημα (8 έως 10 εβδομάδες) μετά τη μόλυνση[31].

ΕΙΑ 2ης γενιάς

Δύο χρόνια αργότερα από την εμφάνιση των ΕΙΑ 1ης γενιάς, εμφανίστηκαν οι πιο εξελιγμένες τεχνικές 2ης γενιάς (*Εικόνα 9),* οι οποίες επιτρέπουν και την ανίχνευση αντιγόνων του HIV-2 ιού. Ειδικότερα, στη στερεή φάση της μικροπλάκας είναι καθηλωμένα συνθετικά ή ανασυνδυασμένα ιικά αντιγόνα τόσο του ιού HIV-1, όσο και του ιού HIV-2. Τα επόμενα βήματα είναι ίδια με την αντίστοιχη τεχνική 1ης γενιάς, ακολουθώντας διαδοχικά την σύνδεση με τα ειδικά αντι-IgG σημασμένα αντισώματα, την προσθήκη του υποστρώματος και την δημιουργία χρώματος, στην περίπτωση θετικού δείγματος[27].

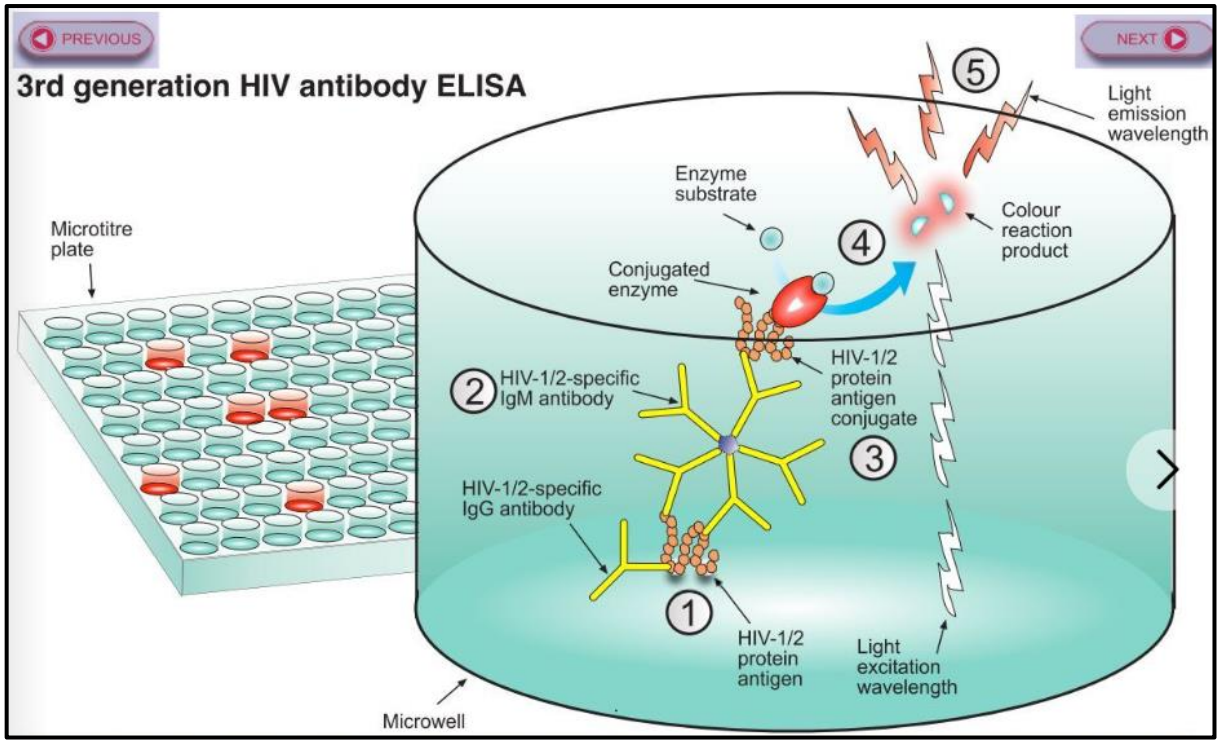


Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση Ανοσοενζυμικής Μεθόδου Προσδιορισμού 2ης γενιάς (ανακτήθηκε από Immunopaedia.org).

Η χρήση των συνθετικών ή ανασυνδυασμένων ιικών αντιγόνων βελτίωσε την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου. Έτσι, μπορεί να ανιχνευτεί η μόλυνση έως και μια εβδομάδα νωρίτερα, σε σχέση με την αντίστοιχη τεχνική 1ης γενιάς [32].Ωστόσο, και σε αυτή τη μέθοδο υπάρχουν υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων[27].

ΕΙΑ 3ης γενιάς

Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής διαφέρει από τις προηγούμενες, διότι ακολουθεί την μεθοδολογία τύπου sandwich *(Εικόνα 10).*Συγκεκριμένα, στη στερεή φάση της μικροπλάκας είναι καθηλωμένα ανασυνδυασμένα ιικά HIV-1 και HIV-2 αντιγόνα, στα οποία θα συνδεθούν τα αντίστοιχα αντισώματα. Βασική διαφορά στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι ότι ανιχνεύει τόσο τα IgG αντισώματα, όσο και τα IgM. Στη συνέχεια, σε αντίθεση με τις προϋπάχρουσες μεθόδους, προστίθεται ένα σύμπλοκο ενζύμου-αντιγόνου, και όχι ενζύμου-αντισώματος. Έτσι προκύπτει η δομή τύπου sandwich (αντιγόνο – αντίσωμα – σημασμένο αντιγόνο). Τέλος, με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος και στην περίπτωση θετικού δείγματος, προκύπτει αλλαγή χρώματος [27]. Η ανάπτυξη των τεχνικών 3ης γενιάς έδωσε το πλεονέκτημα

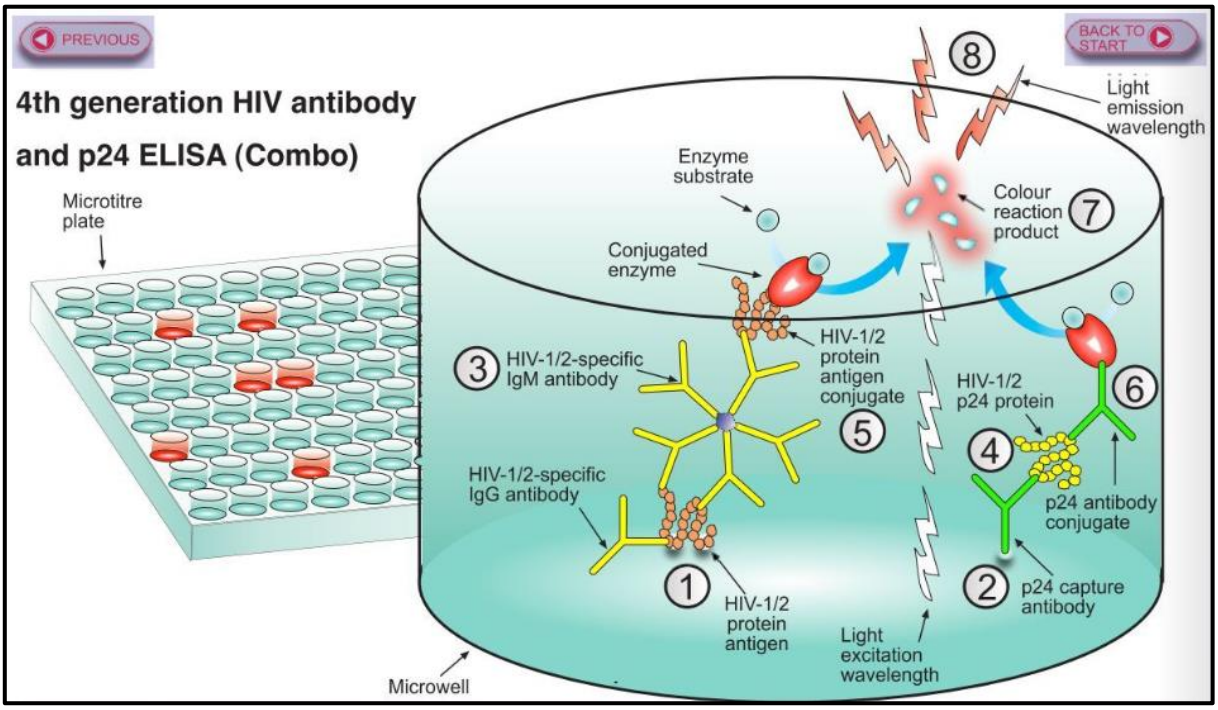


Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση Ανοσοενζυμικής Μεθόδου Προσδιορισμού 3ης γενιάς (ανακτήθηκε από Immunopaedia.org).

ακόμα πιο έγκαιρης ανίχνευσης και μεγαλύτερης ευαισθησίας, σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές[32]. Παρόλα αυτά, δεν έχει καταφέρει να μειώσει τον χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την αρχική λοίμωξη έως την διάγνωση [33].

ΕΙΑ 4ης γενιάς

Η τεχνική ΕΙΑ 4ης γενιάς δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης τόσο των αντισωμάτων έναντι των ιών HIV-1 και HIV-2, όσο και του αντιγόνου p24 *(Εικόνα 11),* καθιστώντας εφικτή την ανίχνευση της μόλυνσης σε 11-14 ημέρες [27]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση στη στερεή φάση της μικροπλάκας είναι καθηλωμένα τόσο τα ανασυνδυασμένα HIV-1 και HIV-2 αντιγόνα, όσο και μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του p24 αντιγόνου. Από τη μια, τα ανασυνδυασμένα HIV-1 και HIV-2 αντιγόνα συνδέονται με την μεθοδολογία τύπου sandwich και χρωματίζουν το δείγμα, σε περίπτωση που αυτό είναι θετικό. Από την άλλη, στην περίπτωση που υπάρχει η πρωτεΐνη p24 στο δείγμα, αυτή θα συνδεθεί με το καθηλωμένο αντίσωμα. Στη συνέχεια, προστίθεται ένα σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου (μεθοδολογία τύπου sandwich) και τελικά με την προσθήκη υποστρώματος το δείγμα χρωματίζεται. Η αλλαγή του χρώματος ανιχνεύεται με φασματοφωτομετρία[27].



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση Ανοσοενζυμικής Μεθόδου Προσδιορισμού 3ης γενιάς (ανακτήθηκε από Immunopaedia.org).

ΕΙΑ 5^{ης} γενιάς

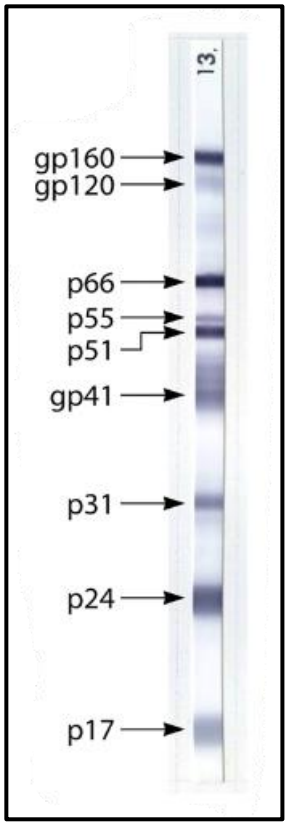
Πρόσφατα, η εταιρία *Bio-Rad* ανέπτυξε μια ακόμα πιο εξελιγμένη τεχνική ΕΙΑ 5^{ης} γενιάς, η οποία μπορεί να διαχωρίσει επιπλέον την μόλυνση από τον ιό HIV-1 ή τον ιό HIV-2. Ωστόσο δεν χρησιμοποιείται ακόμα ως διαγνωστικό εργαλείο[31].

Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (*confirmatory tests*)

Η πολύ μεγάλη ευαισθησία των τεχνικών ΕΙΑ, αύξησε σε μεγάλο βαθμό και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, δημιουργώντας την ανάγκη για επιπλέον μεθόδους εργαστηριακής ανίχνευσης και επιβεβαίωσης της λοίμωξης, ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα της διάγνωσης [30]. Ειδικότερα, τα θετικά δείγματα που έχουν εξεταστεί με τεχνικές ΕΙΑ, θεωρούνται δραστικά (ή αντιδρώντα) και είναι αναγκαίο να υποβάλλονται σε συμπληρωματικό/ επιβεβαιωτικό έλεγχο για την ανίχνευση και τον διαχωρισμό των ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού[13].

Η επιβεβαίωση της λοίμωξης πραγματοποιείται όταν το αρχικό δείγμα έχει δώσει θετικό αποτέλεσμα στον αρχικό έλεγχο. Εάν ο αρχικός έλεγχος έχει πραγματοποιηθεί με ΕΙΑ 1ης γενιάς, τότε στον επιβεβαιωτικό έλεγχο ανιχνεύονται αντισώματα έναντι του HIV-1, ενώ αν έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση τεχνικών 2ης ή 3ης γενιάς, ανιχνεύονται αντισώματα τόσο έναντι του ιού HIV-1, όσο και του ιού HIV-2. Όταν η αρχική ανίχνευση γίνεται με ΕΙΑ 4ης γενιάς, απαιτούνται πιο εξελιγμένες επιβεβαιωτικές τεχνικές[28]. Εάν ένα δείγμα δίνει επαναλαμβανόμενο θετικό αποτέλεσμα με την 4ης γενιάς τεχνική, αλλά στην επιβεβαιωτική μέθοδο είναι αρνητικό ή ακαθόριστο θα πρέπει να εξεταστεί για την παρουσία ιικού RNA με PCR ή για την παρουσία του αντιγόνου p24 με εναλλακτική ΕΙΑ 3ης γενιάς.[34].

Η τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western Blot είναι η πιο συχνή μέθοδος επιβεβαιωτικού ελέγχου με βάση την βιβλιογραφία. Βασική αρχή της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός των αντιγόνων του ιού που υπάρχουν σε ένα μολυσμένο δείγμα με βάση το μοριακό τους βάρος, σε συνθήκες ηλεκτροφόρησης [35].Με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος σχηματίζονται διακριτές ζώνες που επιβεβαιώνουν τον αρχικό έλεγχο *(Εικόνα 12).* Πιο εξελιγμένες μορφές της τεχνικής αυτής επιτρέπουν την ανίχνευση και διάκριση μεταξύ των δύο τύπων του ιού HIV[13].



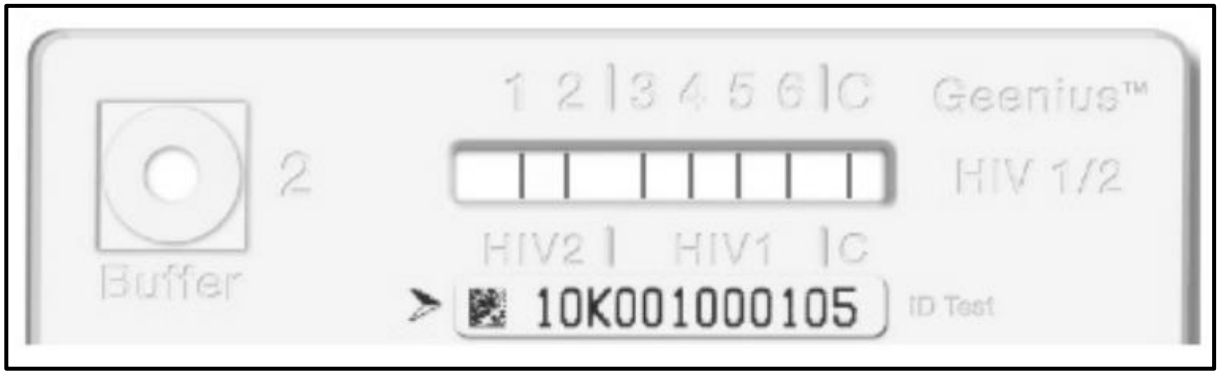
Εικόνα 12. Απεικόνιση ζωνώσεων μετά από ανάλυση θετικού HIVδείγματος. Οι ζωνώσεις διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος μετά από ηλεκτροφόρηση (η εικόνα ανακτήθηκε από Parekhetal., 2019).

Παράλληλα, η ανοσοδοκιμασία γραμμής ή κουκίδας Geenius αποτελεί μια ακόμα επιβεβαιωτική τεχνική θετικών δειγμάτων[30]. Η Geenius είναι μια ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία μιας χρήσης, η οποία επιτρέπει την επιβεβαίωση, αλλά και τη διαφοροποίηση αντισωμάτων έναντι του HIV-1 και του HIV-2, σε δείγματα ολικού αίματος, ορού και πλάσματος [36]. Ειδικότερα, πρόκειται για μια κασέτα, που περιέχει μια ταινία μέτρησης (που αποτελείται από νιτροκυτταρίνη) στην οποία υπάρχουν ακινητοποιημένα αντιγόνα τόσο του ιού HIV-1 όσο και του ιού HIV-2. Επίσης χρησιμοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται τόσο στα αντιγόνα του HIV, όσο και σε χρωμοφόρα μόρια κολλοειδούς χρυσού – πρωτεΐνη Α. Κάθε φορά που πραγματοποιείται ένας έλεγχος, τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος στην περιοχή προσθήκης. Εάν το δείγμα είναι θετικό, πραγματοποιείται σύνδεση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, σχηματίζοντας έγχρωμες γραμμές - λωρίδες 1 έως 6, οι οποίες αντιστοιχούν στα παρακάτω:

- Ζώνη 1: gp36 (HIV-2, περίβλημα, πεπτίδιο)
- Ζώνη 2: gp140 (HIV-2, περίβλημα, πεπτίδια)
- Ζώνη 3: p31 (HIV-1, πολυμεράση, πεπτίδιο)
- Ζώνη 4: gp160 (HIV-1, περίβλημα, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη)

- Ζώνη 5: p24 (HIV-1, πυρήνας, ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη)
- Ζώνη 6: gp41 (Ομάδα Μ και Ο) (HIV-1, περίβλημα, πεπτίδια)

Τέλος υπάρχει μια ζώνη ελέγχου, η οποία υποδεικνύει εάν ο έλεγχος είναι έγκυρος *(Εικόνα 13)*[37].



Εικόνα 13. Απεικόνιση κασέτας Geenius με τις 6 λωριδες (1-6) και τη ζώνη ελέγχου (C) (η εικόνα ανακτήθηκε από Bio-Rad, 2013)

Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους επιβεβαιωτικού ελέγχου καθώς είναι μια απλή και γρήγορη διαδικασία, η οποία παρέχει τη δυνατότητα αυτοματοποιημένης ερμηνείας του αποτελέσματος, μέσω του Geenius Reader[38,39].

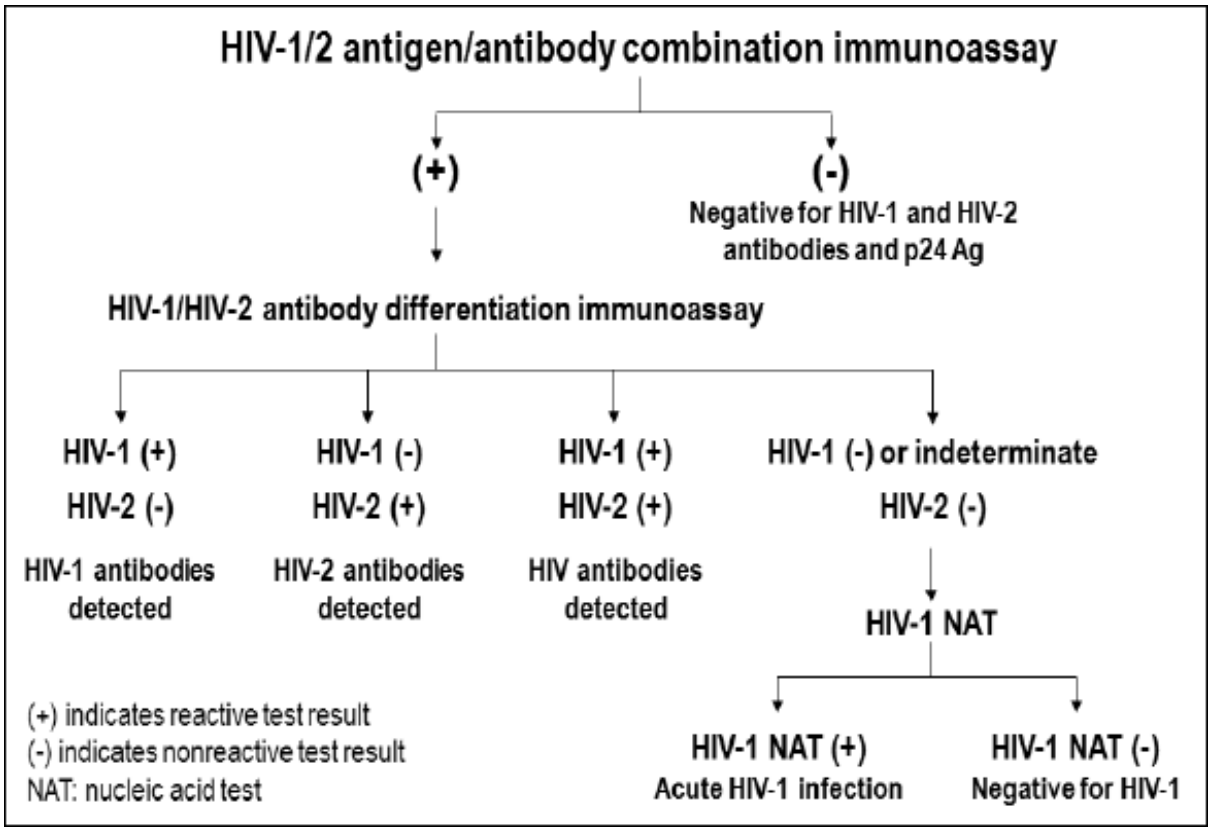
Τέλος, μια ακόμα τεχνική επιβεβαιωτικού ελέγχου αποτελεί ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IF). Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής βασίζεται στον φθορισμό που προκύπτει μετά από τη σύνδεση των αντιγόνων με σημασμένα αντισώματα. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη θετικού δείγματος που περιέχει αντισώματα IgG σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό, προκαλεί την σύνδεση τους με τα ιικά αντιγόνα, δημιουργώντας ανοσοσύμπλοκα. Στη συνέχεια, προστίθενται αντι-IgG αντισώματα, τα οποία είναι σημασμένα με φθοριοχρώματα και τα οποία συνδέονται με το σύμπλοκο που έχει ήδη δημιουργηθεί. Η παρατήρηση του φθορισμού γίνεται κάτω από μικροσκόπιο[40].

Κατευθυντήριες οδηγίες (Guidelines) για εργαστηριακή διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης

Από τον Δεκέμβρη του 2020, υπήρξε αναθεώρηση των παγκόσμιων κατευθυντήριων οδηγιών από τους αρμόδιους οργανισμούς, για την περίοδο 2020-2025[6,41]. Στόχο αποτελεί η επίτευξη του 95-95-95, όπου:

- Το 95% των πασχόντων πρέπει να το γνωρίζουν.
- Το 95% των διαγνωσθέντων πρέπει να λαμβάνουν θεραπεία.
- Το 95% των θεραπευόμενων πρέπει να έχουν μειωμένο ιικό φορτίο μέχρι το 2025.

Ο αλγόριθμος που ακολουθείται στο ΕΚΑΑΝΕ (Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδας) βασίζεται στις παραπάνω οδηγίες. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας τα κριτήρια θετικοποίησης ενός δείγματος παρουσιάζονται στις *Εικόνες 14-16* που ακολουθούν:



Εικόνα 14. Οδηγίες ΠΟΥ για την θετικοποίηση ενός δείγματος για τον ιό HIV-1.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΓΟΝΙΔΙΟΜΑ	ΕΙΔΟΣ	ΜΟΡΦΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ WESTERN BLOT
GP 160	ENV	Πρόδρομος γλυκοπρωτεΐνης GP 110/120 και GP 41	Ζώνη με εκτεταμένα άκρα
GP 110/120	ENV	Γλυκοπρωτεΐνη εξωτερικού περιβλήματος (έλυτρο)	Ζώνη με εκτεταμένα άκρα
P 68/66	POL	Ανάστροφη τρανσκριπτάση	Διαφανής ζώνη
P 55	GAG	Πρόδρομος πυρηνικών πρωτεϊνών	Εις δίπλοιν
P 52/51	POL	Ανάστροφη τρανσκριπτάση	Διαφανής ζώνη
GP 41	ENV	Διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη	Εκτεταμένη ζώνη
P 40	GAG	Πρόδρομος πυρηνικών πρωτεϊνών	Διαφανής ζώνη
P 34/31	POL	Ενδονουκλεάση	Διαφανής ζώνη
P 24/25	GAG	Πυρηνική πρωτεΐνη	Διαφανής ζώνη
P 18/17	GAG	Πυρηνική πρωτεΐνη	Ορισμένες φορές εις δίπλοιν

Ερμηνεία

ΕΡΜΗΝΕΙΑ	ΚΡΙΤΗΡΙΑ Π.Ο.Υ.*	ΚΡΙΤΗΡΙΑ CRSS**
Θετικό	2 ENV ± GAG ± POL	1 ENV + (1 GAG ή 1 POL)
Απροσδιόριστο	1 ENV ± GAG ± POL GAG + POL GAG POL	GAG + POL GAG POL ENV
Αρνητικό	Απουσία ζώνης Μη ταξινομημένες ζώνες	Απουσία ζώνης Μη ταξινομημένες ζώνες

** Π.Ο.Υ.: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ** CRSS: Consortium for Retrovirus Serology Standardization.*

Εικόνα 15. Κριτήρια Θετικοποίησης W. Blot (Biorad)

The Geenius™ HIV 1/2 Confirmatory Assay cassette contains a Control band (C) and six (6) test lines which are numbered on the cassette corresponding to the following:

Band 1:	gp36 (HIV-2, envelop peptide)	HIV-2 ENV
Band 2:	gp140 (HIV-2, envelop peptides)	HIV-2 ENV
Band 3:	p31 (HIV-1, polymerase peptide)	HIV-1 POL
Band 4:	gp160 (HIV-1, envelop recombinant protein)	HIV-1 ENV
Band 5:	p24 (HIV-1, core recombinant protein)	HIV-1 GAG
Band 6:	gp41 (Group M and O) (HIV-1, envelop peptides)	HIV-1 ENV
CTRL band:	Protein A	

Εικόνα 16.Κριτήρια Θετικοποίησης Geenius (Biorad)

Πειραματικό μέρος

Υλικά – Μέθοδοι

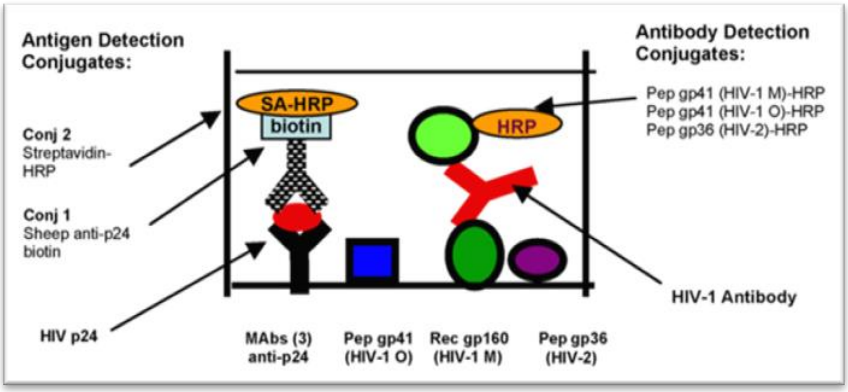
Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων

Ο έλεγχος για την HIV-1 λοίμωξη διενεργήθηκε σε δείγματα που στάλθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) κατά τα ημερολογιακά έτη 2021 – 2022 (δηλαδή από 01-01-2021 έως και 31-12-2022) από διάφορες δομές υγείας (νοσοκομεία, ιδιωτικά διαγνωστικά εργαστήρια, κλπ.) . Τα δείγματα που έρχονται στο ΕΚΑΑΝΕ για επιβεβαίωση της HIV λοίμωξης, έχουν κατά πλειοψηφία ήδη υποβληθεί σε αρχικό έλεγχο (screening) και έχουν δώσει θετικό αποτέλεσμα. Εξαίρεση αποτελούν κάποιες σπάνιες περιπτώσεις δειγμάτων που στάλθηκαν στο ΕΚΑΑΝΕ για αρχικό έλεγχο, χωρίς δηλαδή να έχουν ήδη υποβληθεί σε δοκιμασίες ανίχνευσης στο νοσοκομείο. Αποδεκτά δείγματα για την εξέταση διάγνωσης αποτέλεσαν ο ορός και το πλάσμα. Στην περίπτωση ολικού αίματος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 3200 rpm για 15 min και έπειτα απομόνωση του ορού ή του πλάσματος. Αξιοσημείωτο είναι ότι για τον επιβεβαιωτικό έλεγχο με *Geenius*, πέρα από ορό ή πλάσμα, μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί τριχοειδικό ή φλεβικό αίμα. Ωστόσο στο ΕΚΑΑΝΕ η εξέταση διενεργήθηκε αποκλειστικά σε ορό ή πλάσμα, καθώς σε αντίθετη περίπτωση απαιτείται άμεση εξέταση του δείγματος μετά την λήψη του. Τα δείγματα φυλάσσονται σε συντήρηση (+2, -8°C) μέχρι να εξεταστούν (το αργότερο, μετά από 7 μέρες).

Αρχικός Έλεγχος με ELISA 4ης Γενιάς

<u>Α) Αρχή Μεθόδου</u>

Η αρχή μεθόδου της ELISA 4ης γενιάς συνοψίζεται στην *Εικόνα 17*.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση των βιολογικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται με την μέθοδο GS HIV-1/2 Ag/Ab της Bio-Rad [42].

<u>Β) Εξοπλισμός</u>

- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 200μL& 1000μL
- Δοσομετρική πιπέτα πολλαπλών ρίψεων
- Αυτόματος επωαστήρας για μικροπλάκες, ρυθμισμένος στους 37 ^{o}C $\pm$ 1 ^{o}C
- Αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για μικροπλάκες
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450nm, 620nm)
- Εμπορικά διαθέσιμο kit*GENSCREEN™ ULTRAHIVAg-Ab*της Bio-Rad

Για τον αρχικό έλεγχο των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit με εμπορική ονομασία *GENSCREEN™ ULTRAHIVAg-Ab* της *Bio-Rad*, εγκεκριμένο από τον FDA από το 2011.

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο kit είναι τα ακόλουθα:

I. **R1: Πλάκα μικροτιτλοδότησης**

II. Αποτελείται από 12 λωρίδες με 8 πηγάδια η καθεμία. Στον πυθμένα κάθε πηγαδιού βρίσκονται καθηλωμένα:
   - μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του καψιδικού αντιγόνου p24 του HIV (προερχόμενα από ποντίκια)
   - αντιγόνα των HIV-1 και HIV-2 (τα οποία έχουν υποστεί καθαρισμό)

III. **R2: Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης (20X)**

   Ρυθμιστικό διάλυμα Tris–NaCl με pH=7,4. Απαιτείται αραίωση 1:20 με απεσταγμένο νερό.

   Συντηρητικό: ProClin™ 300 0,04%

IV. **R3: Διάλυμα ελέγχου αρνητικού μάρτυρα**

   Ανθρώπινο πλάσμα, το οποίο έχει καταστεί ανενεργό μέσω θέρμανσης, αρνητικό έναντι του αντιγόνου HIV-Ag, του αντιγόνου HBs και των αντισωμάτων αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και αντι-HCV.

   Συντηρητικό: Αζίδιο του νατρίου (νατραζίδιο) <0,1%

V. **R4: Διάλυμα ελέγχου θετικού μάρτυρα HIV-Ab**

Ανθρώπινο πλάσμα, το οποίο έχει καταστεί ανενεργό μέσω θέρμανσης, θετικό στα αντισώματα αντι-HIV και αρνητικό έναντι του αντιγόνου HIV-Ag, του αντιγόνου HBs και των αντι-HCV (συνθετικό αραιωτικό διάλυμα)

Συντηρητικό: ProClin™ 300 < 0,1%

VI. **R5: Διάλυμα ελέγχου θετικού μάρτυρα HIV-Ag**

Συνθετικό διάλυμα που περιέχει το HIV-Ag , το οποίο έχει υποστεί καθαρισμό. Το διάλυμα έχει καταστεί ανενεργό μέσω χαοτροπικού παράγοντα.

VII. **R6: Διάλυμα σύζευξης 1**

Περιέχει βιοτινυλικά πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του αντιγόνου p24 (προερχόμενα από πρόβατο). Διάλυμα πρασινοκίτρινου χρώματος.

Συντηρητικό: ProClin™ 300 0,5%

VIII. **R7a[1]:Διάλυμα σύζευξης2**

Περιέχει λυοφιλιωμένη στρεπταβιδίνη, συνδεδεμένη με υπεροξειδάση και αντιγόνα των HIV-1 και HIV-2, που έχουν υποστεί καθαρισμό.

IX. **R7b[1]: Αραιωτικό διάλυμα για το διάλυμα σύζευξης 2[1]**

Διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος, κόκκινου χρώματος

Συντηρητικό: ProClin™ 300 0,5%

X. **R8: Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος υπεροξειδάσης**

Διάλυμα οξικού νατρίου και κιτρικού οξέος (pH=4,0) που περιέχει H_2O_2 (0,015%) andDMSO (4%)

XI. **R9: Χρωμογόνο (11X)**

Διάλυμα 3,3΄, 5,5΄-τετραμεθυλοβενζιδίνης (Tetramethylbenzidin - TMB)

XII. **R10: Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης**

Διάλυμα θειικού οξέος (H_2SO_4, 1N)

<u>Γ) Πειραματική Διαδικασία</u>

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται (αφορά την χρήση 1 λωρίδας) είναι η εξής:

1) Οργάνωση της σειράς τοποθέτησης των δειγμάτων και των μαρτύρων στα πηγάδια.

---

[1]Την πρώτη φορά που ανοίγουμε ένα νέο Kit*GENSCREEN™ ULTRAHIVAg-Ab*απαιτείται ανάμιξη των R7a και R7b.

2) Ρύθμιση του επωαστήρα στους 37 ^{o}C.
3) Προετοιμασία του διαλύματος έκπλυσης (R2) (Αραίωση 1:20)
4) Τοποθέτηση 1 λωρίδας στην βάση της πλάκας μικροτιτλοδότησης
5) Προσθήκη 25 μLδιαλύματος σύζευξης 1 (R6) σε κάθε πηγάδι (προτιμάται η πολυεπαναληπτική πιπέτα)
6) Προσθήκη 75 μL από κάθε δείγμα σε ξεχωριστό πηγάδι (σε μία λωρίδα 8 θέσεων τρέχουν συνολικά 6 διαφορετικά δείγματα ασθενών) και ήπια ανάδευση με την πιπέτα
7) Προσθήκη 75 μL θετικού και αρνητικού μάρτυρα στα δύο πηγάδια που απομένουν και ήπια ανάδευση
8) Επώαση της πλάκας για 60 λεπτά στους ~37 ^{o}C στον αυτόματο επωαστήρα
9) Πλύσεις των πηγαδιών στο αυτόματο μηχάνημα πλύσεων (x5 επαναλήψεις με ενδιάμεση αναμονή 40 δευτερόλεπτα, 500 μLδιαλύματος έκπλυσης σε κάθε πηγάδι)
10) Προσθήκη 100 μLδιαλύματος σύζευξης 2 (R7) σε κάθε πηγάδι (προτιμάται η πολυεπαναληπτική πιπέτα)
11) Αναμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (~25 ^{o}C)
12) Προετοιμασία του διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος (Αραίωση 1:11 του R9 με το R8)
13) Πλύσεις των πηγαδιών στο αυτόματο μηχάνημα πλύσεων (5 επαναλήψεις χωρίς αναμονή, 800 μL διαλύματος έκπλυσης σε κάθε πηγάδι)
14) Προσθήκη 80 μL διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος σε κάθε πηγάδι
15) Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (~25 ^{o}C) στο σκοτάδι
16) Προσθήκη 100 μL διαλύματος διακοπής της αντίδρασης σε κάθε πηγάδι
17) Φωτομέτρηση στα 450/620 nm
18) Υπολογισμός cut-off (CO) μετρήσεων: $CO = OD_{Neg} + 0{,}200$

Θετικό αποτέλεσμα στην ELISA θεωρείται κάθε αλλαγή χρώματος από ροζ σε μπλε που παρατηρείται στα πηγάδια πριν την προσθήκη διαλύματος διακοπής της αντίδρασης (ποιοτικός προσδιορισμός). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του θετικού αποτελέσματος χρησιμοποιείται η φωτομέτρηση στην οποία θετική θεωρείται κάθε τιμή οπτικής πυκνότητας (OD), ή απορρόφησης (A), που είναι μεγαλύτερη του της τιμής - κατωφλίου, δηλαδή:

$$OD_{δείγματος} > CO$$

Αρνητικό αποτέλεσμα στην ELISA θεωρείται πως δίνει κάθε δείγμα για το οποίο δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος, δηλαδή το χρώμα παραμένει ροζ, πριν την προσθήκη διαλύματος διακοπής της αντίδρασης. Το αρνητικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται κατά την φωτομέτρηση, οπότε η οπτική πυκνότητα (OD) ή απορρόφηση (A) του δείγματος είναι μικρότερη ή ίση του Cut-off, δηλαδή:

$$OD_{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma} \leq CO$$

Δείγματα με αρνητικό αποτέλεσμα ELISA 4ης γενιάς θεωρούνται αρνητικά για τον HIV-1.

Όλα τα δείγματα που έχουν δώσει θετικό αποτέλεσμα κατά την πρώτη εξέταση με ELISA (screening test) θεωρούνται δραστικά και υποβάλλονται υποχρεωτικά σε δεύτερη επιβεβαιωτική εξέταση (confirmatory test). Στο ΕΚΑΑΝΕ ο επιβεβαιωτικός έλεγχος γίνεται είτε με Western Blot (των εταιριών Bio-Rad ή Mikrogen) είτε με Geenius.

Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Western Blot

Α) Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται ως εξής:

Αντιγόνα του ιού διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, σχηματίζοντας διακριτές ζώνες, οι οποίες στην συνέχεια, μεταφέρονται σε λωρίδες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, δημιουργώντας στύπωμα *(blot)*. Στην συνέχεια προστίθενται ειδικά Abs σημασμένα με ένζυμο, τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται ειδικά στα δεσμευμένα αντί-HIV Abs. Με την προσθήκη κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος πραγματοποιείται αντίδραση που χρωματίζει τις ανάλογες αντιγονικές ζώνες, υποδηλώνοντας θετικό αποτέλεσμα ως προς την ύπαρξη ειδικών Abs έναντι του αντιγόνου που αντιπροσωπεύει την εκάστοτε ζώνη [43].

New Lav Blot I

α) Εξοπλισμός

- Αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα των 20μL
- Τσιμπίδα

- Αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για τους δίσκους της WesternBlot
- Εμπορικά διαθέσιμο kit *New Lav Blot I* kit της Bio-Rad

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο kit *New Lav Blot I* της Bio-Rad είναι τα ακόλουθα:

I. **R1: Ταινίες νιτροκυτταρίνης HIV-1**

Αποτελούν ταινίες στις οποίες έχουν μεταφερθεί οι ιικές πρωτεΐνες HIV-1. Οι ταινίες νιτροκυτταρίνης περιλαμβάνουν επίσης πρότυπο εσωτερικού ελέγχου anti-IgG με σκοπό τον έλεγχο της εγκυρότητας της εξέτασης. (**Εικόνα 20**)

II. **R2: Συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα (5X)**

Περιέχει χλωροφόρμιο 0,5%. Μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος ενυδατώνονται τα strips.

III. **R3: Διάλυμα ελέγχου αρνητικού μάρτυρα**

Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα HBsAg, anti-HIV-1 και anti-HIV-2 καθώς και anti-HCV.*Συντηρητικό:* Αζίδιο του νατρίου <0,1%

IV. **R4: Διάλυμα ελέγχου θετικού μάρτυρα anti-HIV-1**

Ανθρώπινος ορός θετικός για αντισώματα anti-HIV-1, αρνητικός για αντισώματα anti-HCV και HBsAg, αδρανοποιείται με θερμότητα. *Συντηρητικό:* Αζίδιο του νατρίου <0,1%

V. **R5: Διάλυμα σύζευξης**

Το διάλυμα σύζευξης αποτελεί αντι-ανθρώπινα αντισώματα IgG αίγας επισημασμένα με αλκαλική φωσφατάση και αζίδιο του νατρίου <1% ως συντηρητικό.

VI. **R6: Διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (BCIP)/(NBT)**

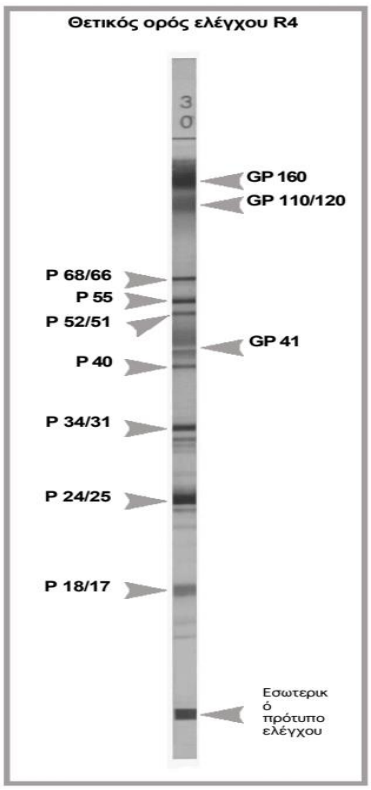
Το διάλυμα αποτελείται από 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλφωσφορικό (BCIP) και νιτροκυανού του τετραζολίου (NBT) ως ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος.

β) Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται (αφορά την χρήση 1 ταινίας) είναι η εξής:

1) Έλεγχος λειτουργίας κάθε αντλίας του πλυστικού μηχανήματος.
2) Τοποθέτηση των ταινιών (R1) στις υποδοχές του δίσκου. Οι ταινίες πρέπει να τοποθετηθούν προσεκτικά με την χρήση τσιμπίδας, ώστε να μην διαταραχθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών.

3) Προσθήκη 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2) σε κάθε υποδοχή όπου είναι τοποθετημένη η ταινία.
4) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση του δίσκου.
5) Προσθήκη 20μL δείγματος στην υποδοχή.
6) Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
7) Απορρόφηση του ρυθμιστικού διαλύματος και του ορού μέσω της αντλίας κενού που περιέχει απολυμαντικό.
8) Πλύση των ταινιών με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2), χωρίς επώαση. Η πλύση των ταινιών πραγματοποιείται συνολικά 3 φορές.
9) Προσθήκη 2mL διαλύματος σύζευξης (R5) σε κάθε υποδοχή, για να απορριφθούν τα αντισώματα που δεν έχουν προσδεθεί στο αντιγόνο.
10) Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
11) Απορρόφηση του συζεύγματος μέσω της αντλίας κενού που περιέχει απολυμαντικό.
12) Πλύση των ταινιών με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2), χωρίς επώαση. Η πλύση των ταινιών πραγματοποιείται συνολικά 3 φορές.
13) Προσθήκη 2mL διαλύματος ανάπτυξης χρώματος (R6) σε κάθε υποδοχή, προκειμένου να χρωματιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών πάνω στις οποίες έχουν προσδεθεί τα αντισώματα. Το διάλυμα ανάπτυξης χρώματος αποτελείται από 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ φωσφορικό (BCIP) και νιτροκυανού του τετραζωλίου (NBT) ως ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης.
14) Επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση για τουλάχιστον 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση παρατηρείται η εμφάνιση των ζωνών στις ταινίες.
15) Για την παύση της αντίδρασης αφαιρείται το διάλυμα ανάπτυξης και ακολουθούν 3 πλύσεις των ταινιών με απεσταγμένο νερό χωρίς επώαση.
16) Αφότου στεγνώσουν οι μεμβράνες, αρχειοθετούνται και αξιολογείται το αποτέλεσμα της δοκιμασίας.



Εικόνα 18. Λωρίδα με θετικό ορό ελέγχου του kit New Lav Blot I. Στην ταινία της εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί ο θετικός ορός ελέγχου, υποδεικνύοντας πώς αναμένεται να αποτυπώνονται οι ζώνες στην περίπτωση δείγματος που διαθέτει αντισώματα έναντι όλων των πρωτεϊνών του ιού HIV-1.

Σε κάθε ταινία έχουν μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά οι γλυκοπρωτεΐνες gp160, gp110/gp120 και gp41 και οι πρωτεΐνες p68/66, p55, p52/51, p40, p34/31, p24/25, p18/17.

Ο αποχρωματισμός δύο ζωνών τουλάχιστον σε συνδυασμό με την ζώνη του εσωτερικού προτύπου ελέγχου είναι απαραίτητος για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα θετικό. Οι δύο αυτές ζώνες θα πρέπει να αφορούν τουλάχιστον μία γλυκοπρωτεΐνη Env (gp160, gp110/gp120 ή/και gp41) και είτε μία πρωτεΐνη gag (p55, p40, p24/p25 ή/και p18/p17), είτε μια πολυμεράση. (p68/66, p52/51 ή/και p34/31).

Σε περίπτωση που στην ταινία δεν έχει σχηματιστεί καμιά ζώνη, πέρα από την ζώνη του εσωτερικού προτύπου ελέγχου, το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό.

Ακαθόριστο αποτέλεσμα προκύπτει αν, ενώ έχουν σχηματιστεί ζώνες, δεν συμφωνούν με το πρότυπο του θετικού αποτελέσματος δηλαδή, δεν αφορούν μία γλυκοπρωτεΐνη και είτε μία πρωτεΐνη gag είτε μία πολυμεράση.

Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Geenius

Α) Αρχή Μεθόδου

Η διαφοροποιητική δοκιμασία HIV-1/2 Geenius (Ανοσοδοκιμασία γραμμής ή κουκίδας) αποτελεί «rapid test» εγκεκριμένο από τον FDA για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από screening έλεγχο με EIA 4^{ης} γενιάς. Πρόκειται για κασέτες ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής σε δύο επίπεδα με την οποία ανιχνεύονται αντισώματα έναντι συνθετικών ή ανασυνδυασμένων αντιγόνων έναντι του HIV-1 και του HIV-2 (Εικόνα 15). Αναλυτικότερα, στην περιοχή δοκιμασίας της λωρίδας νιτροκυτταρίνης (στερεή φάση) της κασέτας Geenius βρίσκονται καθηλωμένα αντιγόνα του HIV-1 (gp160, gp41, p31 και p25) και του HIV-2 (gp140 και gp34) και στην περιοχή ελέγχου καθηλωμένα μόρια πρωτεΐνης Α. Παράλληλα, στην περιοχή προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος βρίσκονται μόρια πρωτεΐνης Α συζευγμένα με χρωμοφόρα σωματίδια κολλοειδούς χρυσού. Με την προσθήκη θετικού δείγματος τα αντισώματα έναντι του ιού συνδέονται ειδικά με τα καθηλωμένα αντιγόνα. Έπειτα το σύζευγμα πρωτεΐνη Α - χρωμοφόρο αναγκάζεται σε ροή, αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά στα σχηματισμένα ανοσοσύμπλοκα αντιγόνου – αντι-HIV, χρωματίζοντας τα αντίστοιχα σημεία και υποδεικνύοντας θετικό αποτέλεσμα [44].

Β) Εξοπλισμός

- Αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα των 20μL
- Geenius Reader
- Εμπορικάδιαθέσιμο kit *GEENIUS™ HIV 1/2 Confirmatory Assay* της Bio-Rad

Το kit *GEENIUS™ HIV 1/2 Confirmatory Assay* περιέχει:

I. **Συσκευές ανοσοχρωματογραφίας** (**Εικόνα 15**)

   Πρόκειται για μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με:

   - μόρια πρωτεΐνης Α (αντιγόνο) συνδεδεμένα με χρωμοφόρα σωματίδια κολλοειδούς χρυσού στην περιοχή βυθίσματος του ρυθμιστικού διαλύματος
   - καθηλωμένα διαφορετικά αντιγόνα των HIV-1 (4 λωρίδες) και HIV-2 (2 λωρίδες) στην περιοχή δοκιμασίας (Test)
   - καθηλωμένη πρωτεΐνη Α στην περιοχή ελέγχου (Control)

II. **Ρυθμιστικό διάλυμα**

Συντηρητικά: αζίδιο του νατρίου (νατραζίδιο) <0,1%, θειική γενταμυκίνη 0,125%, θειική στρεπτομυκίνη 0,125%.

Γ) Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

1) Αφαίρεση της συσκευής δοκιμασίας *Geenius* και τοποθέτησή της σε οριζόντια επιφάνεια.

   Σημ.: Παρουσία 6 μπλε γραμμών στην περιοχή δοκιμασίας (Test) και καμίας γραμμής στην περιοχή ελέγχου (Control)
2) Σημείωση του αναγνωριστικού αριθμού ΕΚΑΑΝΕ που αντιστοιχεί στο δείγμα.
3) Προσθήκη 5 μL δείγματος και στην θέση 1 (SAMPLE + BUFFER) (βλ. Εικόνα)
4) Προσθήκη 2 σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος στην θέση 1 (SAMPLE + BUFFER)
5) Αναμονή για 5-7 λεπτά.

   Σημ.: Μετά το πέρας της αναμονής οι μπλε γραμμές στην περιοχή δοκιμασίας (Test) θα πρέπει να έχουν εξαφανιστεί.
6) Προσθήκη 5 σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος στην θέση 2 (BUFFER).
7) Αναμονή για 20-30 min.
8) Ανάγνωση του αποτελέσματος με την βοήθεια Geenius Reader.

Για να θεωρηθεί έγκυρη η εξέταση θα πρέπει να σχηματιστεί μια ροζ γραμμή στην περιοχή ελέγχου (Control), ανεξάρτητα από την παρουσία ροζ γραμμών στην περιοχή δοκιμασίας (Test). Αν και η δοκιμασία *Geenius* δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης αντισωμάτων τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2, στην παρούσα εργασία εξετάζεται μόνο η διάγνωση του HIV-1. Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία δύο ή περισσότερων ροζ γραμμών εξέτασης, από τις οποίες τουλάχιστον μία να αντιστοιχεί σε παρουσία αντισωμάτων έναντι αντιγόνου Env, δηλαδή έναντι της gp160 (λωρίδα 4) ή της gp41 (λωρίδα 6).

Ακαθόριστο αποτέλεσμα προκύπτει από την παρουσία:

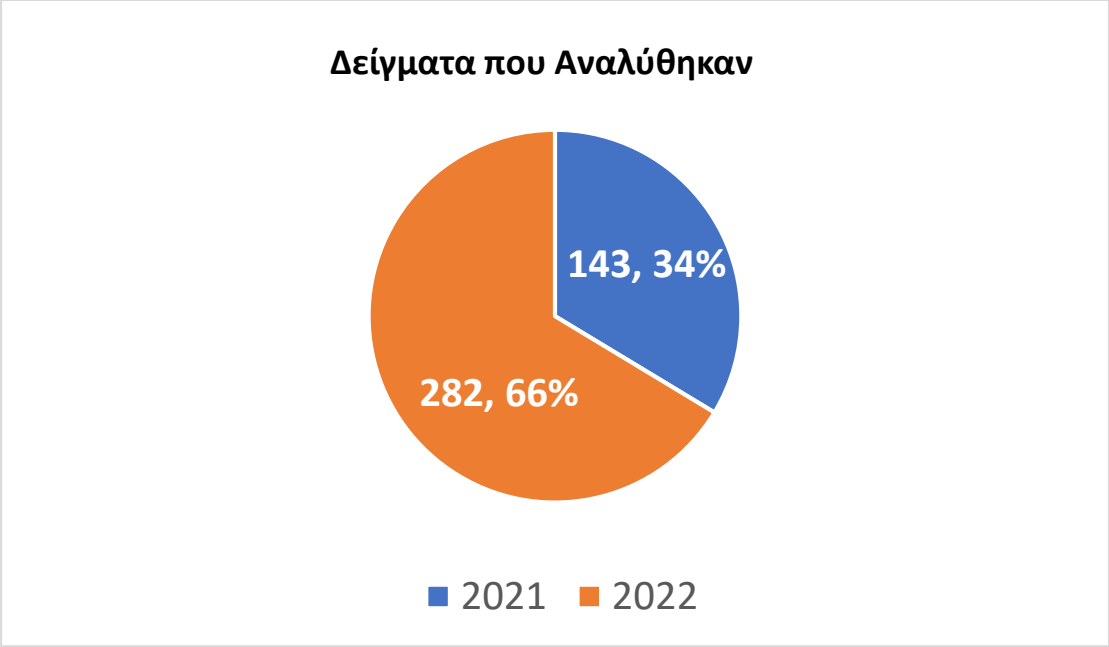
- μόνο μιας λωρίδας pol (λωρίδα 3)
- μόνο μιας λωρίδας env (λωρίδα 4 ή 6)

- μόνο μιας λωρίδας gag (λωρίδα 5)
- μιας λωρίδας pol και μιας λωρίδας gag

Το αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνεται από την απουσία λωρίδας στην περιοχή δοκιμασίας.

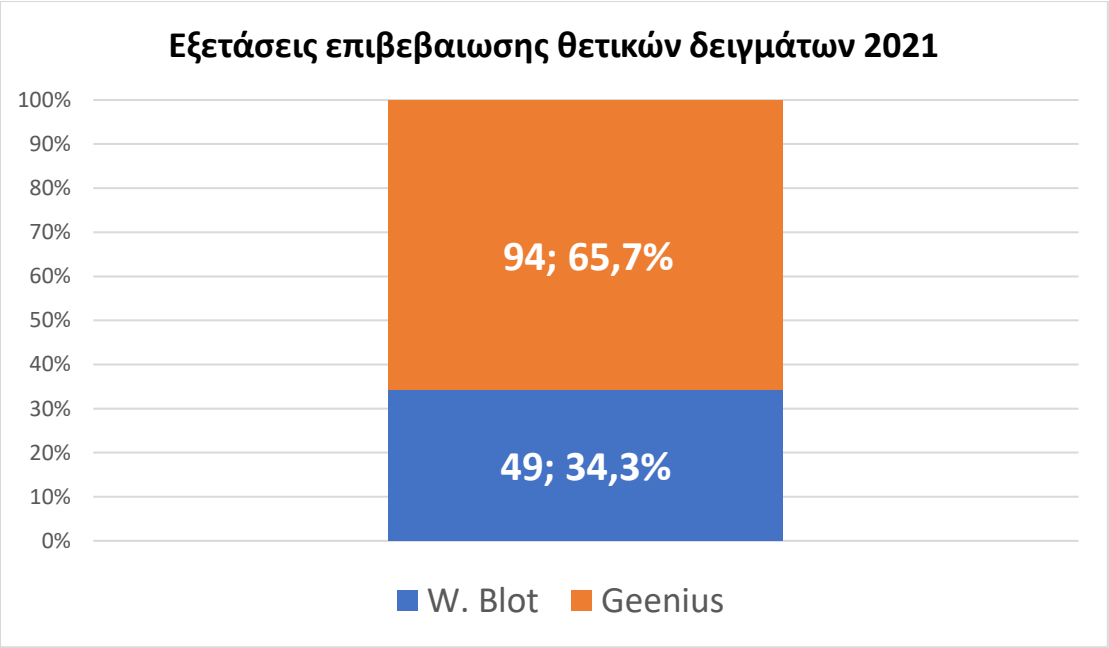
Αποτελέσματα

Συνολικά εξετάστηκαν 425 θετικά δείγματα από τα οποία τα 143 αφορούσαν σε διαγνώσεις του 2021 και 282 σε δείγματα του 2022 *(Πίνακας 2)*.



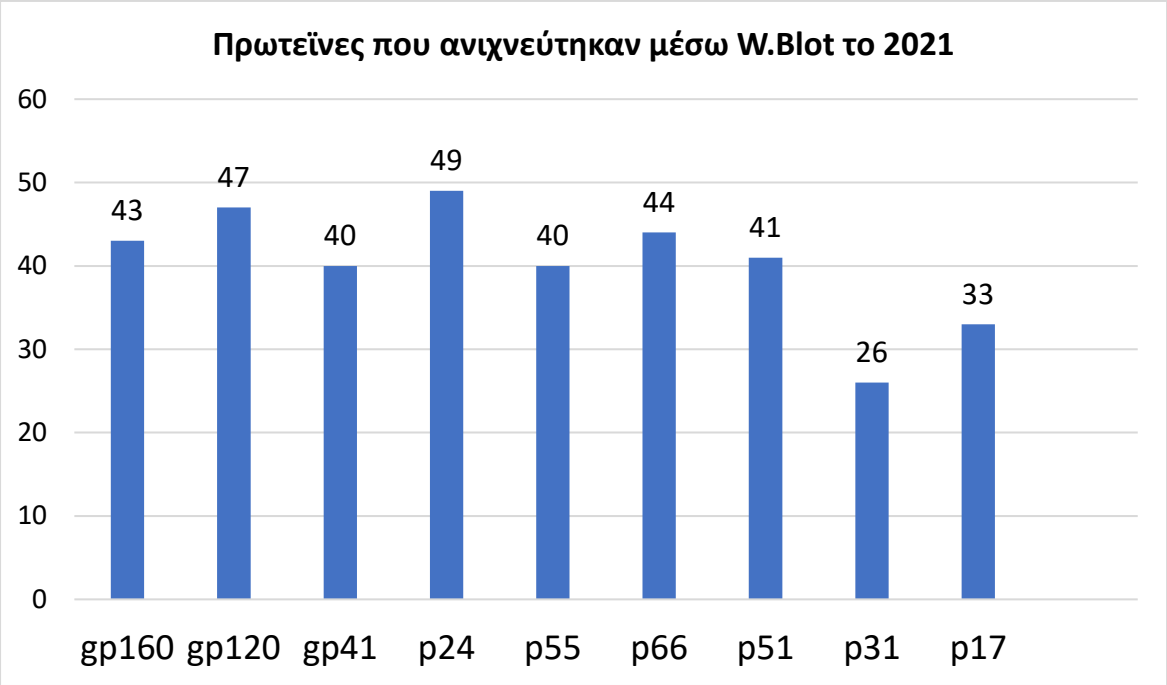
Πίνακας 2. Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν τα δύο έτη .

Πιο αναλυτικά, το έτος 2021 πραγματοποιήθηκαν 94 διαγνωστικές εξετάσεις θετικών δειγμάτων με Geenius και 49 μέσω της τεχνικής της W.blot *(Πίνακας 3).*

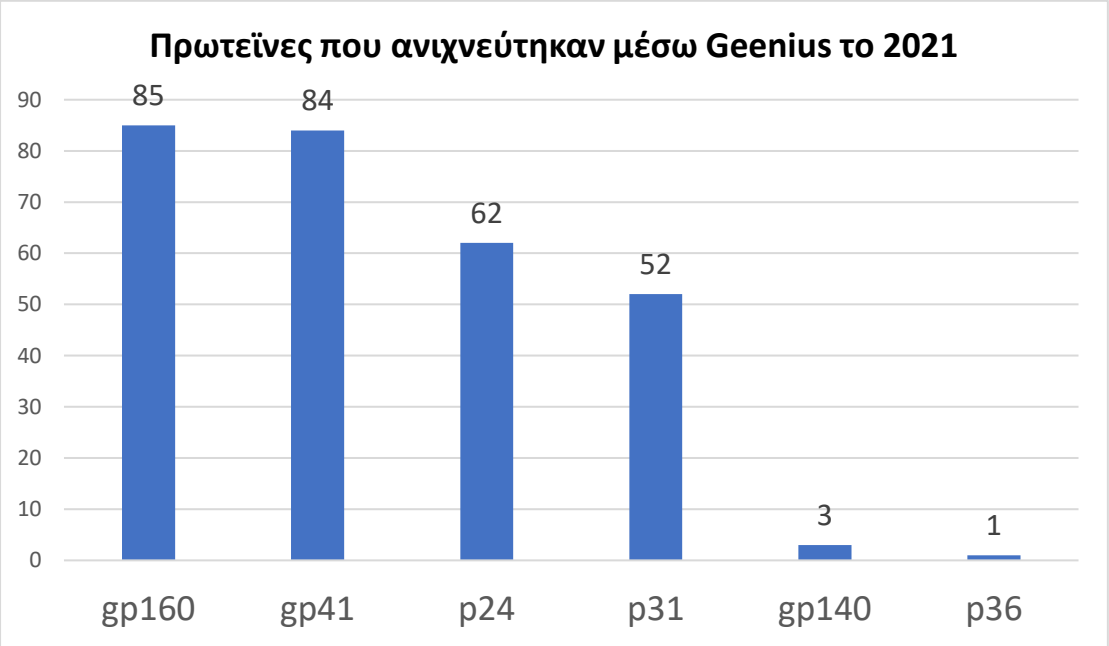


Πίνακας 3. Γράφημα που απεικονίζει τις εξετάσεις θετικών δειγμάτων με τις δύο διαφορετικές τεχνολογίες το 2021.

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων αυτών μελετήθηκαν και η ανάλυση των πρωτεϊνικών αντιγόνων που βρέθηκαν να αναγνωρίζονται από τα αντισώματα τάξης IgG και IgM τους αποτυπώνεται στους Πίνακες 4 και 5 που ακολουθούν:

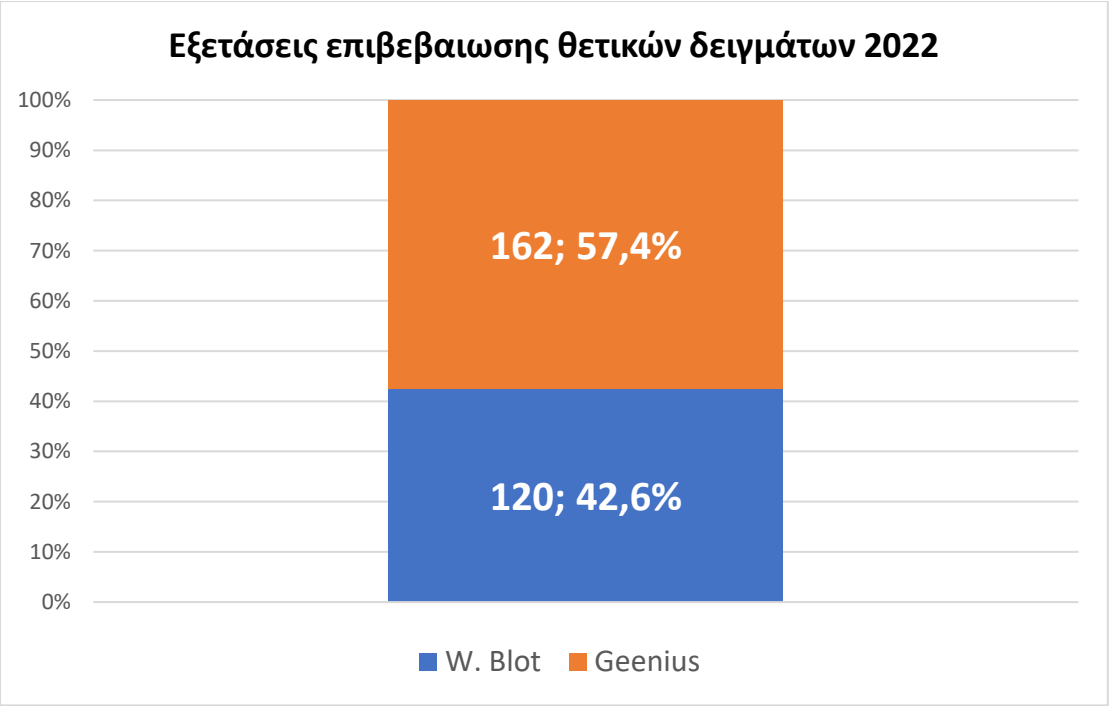


Πίνακας 4. Αντιγόνα του HIV-1 και HIV-2 που ανιχνεύτηκαν από τα αντισώματα που γίνονται ορατά κατά την W. Blot.



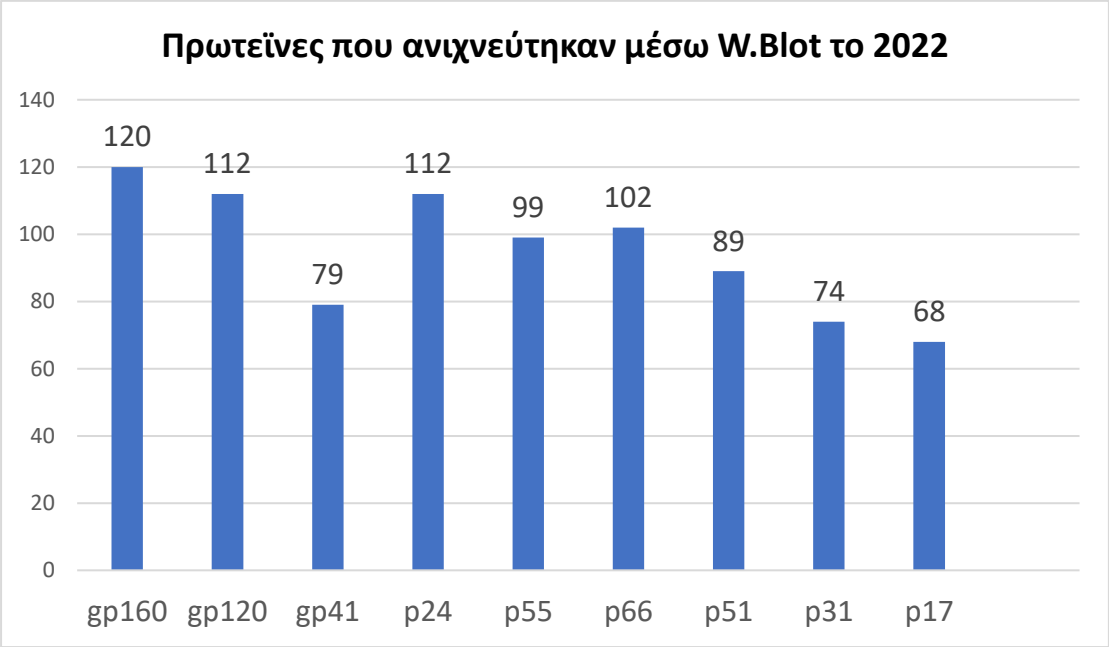
Πίνακας 5. Αντιγόνα του HIV-1 και HIV-2 που ανιχνεύτηκαν από τα αντισώματα που γίνονται ορατά κατά την Geenius.

Καθ' όλη την διάρκεια του έτους 2022, στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Ν. Ελλάδος πραγματοποιήθηκαν συνολικά 282 διαγνωστικά τεστ επιβεβαίωσης θετικών δειγμάτων για τον HIV. Όπως γίνεται κατανοητό και από τον Πίνακα 6 που ακολουθεί, η πλειοψηφία των δειγμάτων εξετάστηκε μέσω της τεχνικής ανοσοχρωματογραφίας Gennius.



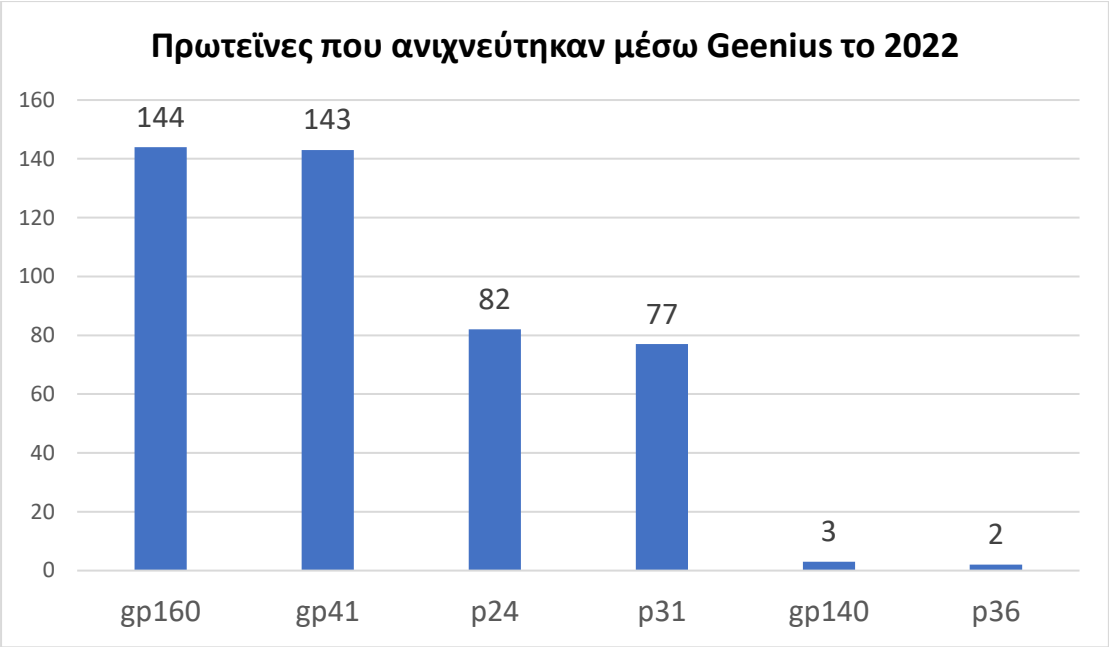
Πίνακας 6. Γράφημα που απεικονίζει τις εξετάσεις θετικών δειγμάτων με τις δύο διαφορετικές τεχνολογίες το 2022.

Για τις 120 εξετάσεις μέσω W. Blot τα πρότυπα των αντιγονικών πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκαν παρατίθενται παρακάτω, στον Πίνακα 7.



Πίνακας 7. Αντιγόνα του HIV-1 και HIV-2 που ανιχνεύτηκαν από τα αντισώματα που γίνονται ορατά κατά την W. Blot.

Τέλος, για την ίδια χρονιά, στις 162 επιβεβαιωτικές εξετάσεις Geeniusοι ζώνες που έγιναν ορατές αφορούσαν στις αντιγονικές πρωτεΐνες που αναγράφονται στον Πίνακα 8.



Πίνακας 8. Αντιγόνα του HIV-1 και HIV-2 που ανιχνεύτηκαν από τα αντισώματα που γίνονται ορατά κατά την Geenius.

Συζήτηση

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε πως τόσο κατά την ανοσοαποτύπωση Western (W. Blot) όσο και κατά την ανοσοχρωματογραφία Geenius, οι HIV-1 ιικές πρωτεΐνες που ανιχνεύονται νωρίτερα από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή είναι αυτές του ιικού φακέλου (gp160, gp120 και gp41), αλλά και το βασικό αντιγόνο του καψιδίου p24. Στον αντίποδα, η p17 και η p31 είναι οι ιικές πρωτεΐνες έναντι των οποίων η παραγωγή αντισωμάτων καθυστερεί χρονικά σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους επιτόπους.

Ιικές πρωτεΐνες φακέλου gp120, gp160 και gp41

Στον επιβεβαιωτικό έλεγχο με την μέθοδο Western Blot, δύο βασικές πρωτεΐνες του ιού HIV, η gp160 και η gp120, φάνηκε πως διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην επιβεβαίωση της λοίμωξης από τον ιό HIV. Η gp160, γνωστή και ως πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη του ιικού φακέλου, είναι μια πρωτεΐνη, η οποία μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης προκαλεί την παραγωγή των gp120 και gp41, οι οποίες συμμετέχουν στην προσκόλληση του ιού και στη σύντηξη με τα κύτταρα του ξενιστή. Η gp120, συγκεκριμένα, είναι η επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τους υποδοχείς CD4 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ξεκινώντας τη διαδικασία εισόδου του ιού. Αυτές οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικοί στόχοι σε δοκιμασίες Western Blot για την ανίχνευση αντισωμάτων HIV σε δείγματα ατόμων που ζουν με τον ιό HIV. Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των gp160 και gp120 συμβάλει στη διάγνωση της λοίμωξης από τον ιό HIV και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της. Αρκετές μελέτες έχουν χαρακτηρίσει εκτενώς τις ανοσολογικές αποκρίσεις και τους επιτόπους των gp160 και gp120, παρέχοντας πολύ χρήσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη διαγνωστικών δοκιμασιών και θεραπευτικών παρεμβάσεων[45]. Επιπλέον, στη δοκιμασία επιβεβαιωτικού ελέγχου Geenius, οι γλυκοπρωτεΐνες gp41 και gp160 ανιχνεύονται σε υψηλότερα ποσοστά ενώ η gp120 δεν συμπεριλαμβάνεται στην τεχνολογία. Συνολικά, η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των συγκεκριμένων επιτόπων οφείλεται στους παρακάτω παράγοντες:

<u>1. Ανοσογονικότητα:</u> Οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου είναι ιδιαίτερα ανοσογόνες, καθώς μπορούν να προκαλέσουν ισχυρή απόκριση σε άτομα τα οποία έχουν μολυνθεί με τον ιό HIV. Ως αποτέλεσμα, τα αντισώματα που στοχεύουν αυτές τις γλυκοπρωτεΐνες είναι πιο πιθανό να παραχθούν και να ανιχνευθούν σε διαγνωστικές δοκιμασίες.

2. Έκθεση στην επιφάνεια του ιού: Οι gp41, gp120 και gp160 εμφανίζονται σε ευδιάκριτη θέση στην επιφάνεια του ιού HIV. Η gp41 καλύπτει τον ιικό φάκελο, ενώ η gp160 είναι η πρόδρομη πρωτεΐνη που διασπάται για την παραγωγή της gp41 και της gp120. Αυτή η επιφανειακή έκθεση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών αυξάνει την πιθανότητα αναγνώρισης και δέσμευσης αντισωμάτων.

3. Διαγνωστική σημασία: Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες αποτελούν κύρια συστατικά τα οποία εμπλέκονται στην είσοδο του ιού και στη σύντηξη με τα κύτταρα του ξενιστή. Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αυτών των γλυκοπρωτεϊνών παρέχει διαγνωστικές πληροφορίες, επιβεβαιώνοντας την παρουσία λοίμωξης από τον ιό HIV και βοηθώντας στη διαφοροποίηση μεταξύ HIV-1 και HIV-2.

Ιικό **αντιγόνο καψιδίου p24**

Η πρωτεΐνη p24 του HIV ανιχνεύεται πολύ περισσότερο από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιοσωματιδίου στην ανάλυση Western Blot και Geenius για τους παρακάτω λόγους:

1. Αφθονία: Η p24 είναι η δομική πρωτεΐνη που αποτελεί το καψίδιο του ιού HIV και ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις εντός των μολυσμένων κυττάρων, ενώ αποτελεί και πρώιμο ανοσολογικό δείκτη, καθώς είναι από τις πρώτες ιικές πρωτεϊνες που απελευθερώνονται στο πλάσμα των ασθενών, μετά την είσοδο του ιοσωματίου του ιού HIV-1 στα κύτταρα στόχο. Λόγω της αφθονίας της αυξάνεται η πιθανότητα ανίχνευσης της p24 σε ορολογικές δοκιμασίες.

2. Ανοσογονικότητα: Η p24 προκαλεί ισχυρή ανοσολογική απόκριση σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό HIV, προκαλώντας την παραγωγή αντισωμάτων που στοχεύουν ειδικά σε αυτή την πρωτεΐνη. Κατά συνέπεια, η p24 είναι πιθανότερο να αναγνωριστεί από τα αντισώματα κατά την ανάλυση Western Blot αλλά και Geenius.

3. Γενετική σταθερότητα ή Συντηρημένη γενετική περιοχή: Η πρωτεΐνη p24 είναι σχετικά συντηρημένη στα διαφορετικά στελέχη και υποτύπους του ιού HIV. Αυτή η γενετική σταθερότητα επιτρέπει την ανίχνευση της p24 με τη χρήση αντισωμάτων που στοχεύουν σε συντηρημένους επιτόπους, επιτρέποντας ευρεία εφαρμογή σε αναλύσεις διαγνωστικής επιβεβαίωσης.

4. Πρώιμος δείκτης: Η p24 μπορεί να ανιχνευθεί σε δείγματα ασθενών, νωρίτερα από άλλες πρωτεΐνες του ιού HIV. Αυτό οφείλεται στο ότι κατά τα πρώιμα στάδια της λοίμωξης από τον HIV, η p24 είναι από τις πρώτες πρωτεΐνες που παράγονται και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος.

5. Διαγνωστική ευαισθησία: Η ανίχνευση της p24 στην ορολογική ανάλυση εμφανίζει διαγνωστική ευαισθησία, κυρίως κατά την οξεία φάση της λοίμωξης από τον ιό HIV, όταν το ιικό φορτίο βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση του p24 σε ανοσολογικά πρωτόκολλα συνεισφέρει στην ακριβή αλλά και έγκαιρη διάγνωση της HIV λοίμωξης και στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου.

Οι παραπάνω παράγοντες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη συχνή ανίχνευση της πρωτεΐνης p24 σε ανοσολογικές αναλύσεις , καθιστώντας την ένα κρίσιμο συστατικό της διάγνωσης του ιού HIV και των ερευνητικών μελετών[46].

Ιικά αντιγόνα p17 και p31

Στη δοκιμασία επιβεβαιωτικού ελέγχου Geenius, η πρωτεΐνη p31 του HIV-1 ανιχνεύεται συνήθως σε χαμηλότερα ποσοστά ενώ στην W. Blot το αντιγόνο p17 εμφάνισε λιγότερες ζώνες σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ιού. Και τα δύο αυτά πρωτεϊνικά μόρια είναι προϊόντα διάσπασης της πολυπρωτεΐνης Gag του ιού κατά τα τελευταία στάδια του κύκλου αντιγραφής του. Η πολυπρωτεΐνη Gag συντίθεται αρχικά ως ένα μεγαλύτερο πρόδρομο πολυπεπτίδιο και αργότερα διασπάται σε μικρότερες λειτουργικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της p17 (πρωτεΐνη μήτρας), της p24 (πρωτεΐνη καψιδίου) και της p31 (πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου). Οι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στο χαμηλότερο ποσοστό ανίχνευσης είναι οι παρακάτω:

1. Χαμηλότερη ανοσογονικότητα: Η p31 και η p17 είναι σχετικά λιγότερο ανοσογόνες σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες του HIV, όπως για παράδειγμα η p24, η gp41 ή η gp160. Αυτό σημαίνει ότι η παραγωγή αντισωμάτων που στοχεύουν ειδικά τα μόρια αυτά μπορεί να είναι χαμηλότερη σε άτομα που έχουν μολυνθεί με HIV, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε μειωμένη ανίχνευση σε διαγνωστικές δοκιμασίες όπως το Geenius.

2. Χαμηλότερη αφθονία: Η p31 εμφανίζει μειωμένη αφθονία σε σύγκριση με άλλα αντιγόνα του HIV. Συνδέεται κυρίως με τη δομή της μήτρας του HIV με αποτέλεσμα να εκτίθεται

λιγότερο στην επιφάνεια του ιού. Η χαμηλότερη αφθονία της p31 και η περιορισμένη έκθεση της p17 στην επιφάνεια του ιού, μειώνουν την πιθανότητα αναγνώρισης και δέσμευσης αντισωμάτων σε αναλύσεις όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

3. Μεταβλητότητα: η πρωτεΐνη p31 εμφανίζει υψηλότερη γενετική μεταβλητότητα μεταξύ των διαφόρων στελεχών και υποτύπων του HIV. Η μεταβλητότητα αυτή μπορεί να επηρεάσει τη δέσμευση των αντισωμάτων που στοχεύουν στην p31, οδηγώντας σε μειωμένη ευαισθησία και ποσοστά ανίχνευσης στις διαγνωστικές δοκιμασίες.

4. Διαγνωστική ιεράρχηση: Οι διάφορες επιβεβαιωτικές δοκιμασίες έχουν σχεδιαστεί για την ιεράρχηση της ανίχνευσης συγκεκριμένων αντιγόνων του HIV με βάση τη διαγνωστική τους σημασία. Η εκάστοτε δοκιμασία μπορεί να επικεντρωθεί περισσότερο σε ιδιαίτερα συντηρημένα και ανοσογόνα αντιγόνα της το p24, το gp41 και το gp160, τα οποία έχουν αποδεδειγμένη διαγνωστική χρησιμότητα στην επιβεβαίωση του HIV[47].

Συνολικά, οι δύο επιβεβαιωτικές τεχνολογίες παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες αλλά και διαφορές. Η ανίχνευση των αντισωμάτων και στις δύο περιπτώσεις επιτρέπει την επιβεβαίωση της HIV-1 λοίμωξης και την διαφοροποίησή της από την λοίμωξη που προκαλείται από τον ιό HIV-2. Είναι τεχνικές εγκεκριμένες από τον FDA και συμπεριλαμβάνονται στα διαγνωστικά πρωτόκολλα χωρών σε όλον τον κόσμο. Οι διαφορές τους αφορούν κυρίως στην ταχύτητα και την αυτοματοποίηση και λιγότερο στην ειδικότητα και την ευαισθησία των τεχνολογιών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, η δοκιμασία Geenius μπορεί να είναι πιο κοστοβόρα από άλλες επιβεβαιωτικές εξετάσεις για τον HIV αλλά δεν απαιτεί ιδιαίτερη εξειδίκευση προσωπικού και επιτρέπει την αυτοματοποίηση και καταγραφή του αποτελέσματος ταχύτατα. Στον αντίποδα, η Western Blot χρησιμοποιείται ευρέως για την επιβεβαίωση του HIV εδώ και αρκετές δεκαετίες και έχει καθιερωθεί στην ρουτίνα των διαγνωστικών εργαστηρίων και των Κέντρων Αναφοράς HIV. Η εξέταση ωστόσο είναι σχετικά χρονοβόρα, απαιτώντας εξειδίκευση και εμπειρία για την εκτέλεση αλλά και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθώς λόγω έλλειψης αυτοματοποιημένων Western Blot η ανάγνωση της Western Blot μπορεί να είναι υποκειμενική.

Βιβλιογραφία

1. Schmid S. The discovery of HIV-1. *Nat Commun* (2018).
2. UNAIDS. *IN DANGER: UNAIDS Global AIDS Update 2022*. (2022).
3. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet*. (2022).
4. Nyamweya, S. *et al.* Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology* vol. 23 221–240 Preprint at https://doi.org/10.1002/rmv.1739 (2013).
5. Faria, N. R. *et al.* The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science (1979)* **346**, 56–61 (2014).
6. UNAIDS. Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030. *World Health Organisation* (2022).
7. Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P. & Robbiani, M. Current Concepts of HIV Transmission. (2007).
8. UNAIDS. *Start free, Stay free, AIDS Free: Final report on 2020 targets*. (2021).
9. Suthar, A. B. *et al. Programmatic implications of acute and early HIV infection*. *Journal of Infectious Diseases Advance Access* http://jid.oxfordjournals.org/http://jid.oxfordjournals.org/ (2015).
10. Borrow, P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS* vol. 6 353–363 Preprint at https://doi.org/10.1097/COH.0b013e3283495996 (2011).
11. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N. & Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* vol. 10 11–23 Preprint at https://doi.org/10.1038/nri2674 (2010).
12. Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J. & Haynes, B. F. Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine* **364**, 1943–1954 (2011).
13. Parekh, B. S. *et al.* Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 32 Preprint at https://doi.org/10.1128/CMR.00064-18 (2019).
14. Moir, S., Chun, T. W. & Fauci, A. S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **6**, 223–248 (2011).
15. Fanales, E., Raimondo, M. & Suligoi, B. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *HIV virus and pathogenicity* **46**, 5–14 (2010).
16. Oladipo, K. & Awoyelu, H. Pathogenesis of HIV: Pathway to eradication. (2015).
17. Campbell, E. M. & Hope, T. J. HIV-1 capsid: The multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology* vol. 13 471–483 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrmicro3503 (2015).
18. Sundquist, W. I. & Kräusslich, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* vol. 2 Preprint at https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924 (2012).

19. Chen, B. HIV Capsid Assembly, Mechanism, and Structure. *Biochemistry* **55**, 2539–2552 (2016).

20. *The HIV Life Cycle*. (2021).

21. Turner, B. G. & Summers, M. F. Structural Biology of HIV. 1–32 (1999).

22. Bukrinskaya, A. HIV-1 matrix protein: A mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Research* vol. 124 1–11 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.001 (2007).

23. Freed, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology* vol. 13 484–496 Preprint at https://doi.org/10.1038/nrmicro3490 (2015).

24. Qu, K. *et al.* Maturation of the matrix and viral membrane of HIV-1. *Science (1979)* **373**, 700–704 (2021).

25. Fiebig, E. W. *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **17**, 1871–1879 (2003).

26. Weber, B. Screening of HIV infection: Role of molecular and immunological assays. *Expert Review of Molecular Diagnostics* vol. 6 399–411 Preprint at https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.399 (2006).

27. Kumar Barik, S. *et al.* An Overview of Enzyme Immunoassay: The Test Generation Assay in HIV/AIDS Testing. *J AIDS Clin Res* **09**, (2018).

28. Branson, B. M. The Future of HIV Testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* **55**, (2010).

29. Henn, A., Flateau, C. & Gallien, S. Primary HIV Infection: Clinical Presentation, Testing, and Treatment. *Current Infectious Disease Reports* vol. 19 Preprint at https://doi.org/10.1007/s11908-017-0588-3 (2017).

30. Do Rosario Augusto, A. *et al.* High level of HIV false positives using EIAbased algorithm in survey: Importance of confirmatory testing. *PLoS One* **15**, (2020).

31. Kabir, M. A., Zilouchian, H., Caputi, M. & Asghar, W. Advances in HIV diagnosis and monitoring. *Critical Reviews in Biotechnology* vol. 40 623–638 Preprint at https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1751058 (2020).

32. Cornett, J. K. & Kirn, T. J. Laboratory diagnosis of HIV in adults: A review of current methods. *Clinical Infectious Diseases* vol. 57 712–718 Preprint at https://doi.org/10.1093/cid/cit281 (2013).

33. Vallefuoco, L., Mazzarella, C. & Portella, G. Fourth generation assays for HIV testing. *Expert Rev Mol Diagn* **16**, 723–732 (2016).

34. Alexander, T. S. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clinical and Vaccine Immunology* **23**, 249–253 (2016).

35. Papadopoulos-Eleopoulos, E., Turner, V. & Papadimitriou, J. Is a positive Western Blot proof of HIV infection? *Nature* 696–707 (1993).

36. Fernández McPhee, C. *et al.* HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology* **63**, 66–69 (2015).

37. Bio-Rad. *Geenius ™ HIV 1/2 Confirmatory Assay*. (2013).

38. Serhir, B. *et al. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV 1/2 Assay as Part of a Confirmatory HIV Testing Strategy for Quebec, Canada: Comparison with Western Blot and Inno-Lia Assays*. https://doi.org/10 (2019).

39. Wong, C. C. *et al.* Performance of the HIV Blot 2.2, INNO-LIA HIV I/II score, and geenius HIV 1/2 confirmatory assay for use in HIV confirmation. *PLoS One* **13**, (2018).

40. Carlson,', J. R. *et al. Comparison of Indirect Immunofluorescence and Western Blot for Detection of Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* vol. 25 (1987).

41. UNAIDS. PREVAILING AGAINST PANDEMICS BY PUTTING PEOPLE AT THE CENTRE. *WORLD AIDS DAY REPORT* (2020).

42. Bentsen, C. *et al.* Performance evaluation of the Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA, a 4th generation HIV assay for the simultaneous detection of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1 (groups M and O) and HIV-2 in human serum or plasma. *Journal of Clinical Virology* **52**, (2011).

43. Parekh, B. S. *et al.* Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 32 Preprint at https://doi.org/10.1128/CMR.00064-18 (2019).

44. Fernández McPhee, C. *et al.* HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology* **63**, 66–69 (2015).

45. Holmstrom, P., Syrjanen, S., Laine, P., Valle, S.-L. & Suni, J. *HIV Antibodies in Whole Saliva Detected by ELISA and Western Blot Assays*. *Journal of Medical Virology* vol. 30 (1990).

46. Guan, M. Frequency, causes, and new challenges of indeterminate results in western blot confirmatory testing for antibodies to human immunodeficiency virus. *Clinical and Vaccine Immunology* vol. 14 649–659 Preprint at https://doi.org/10.1128/CVI.00393-06 (2007).

47. Kondo, M. *et al.* Comparative evaluation of the Geenius HIV 1/ 2 Confirmatory Assay and the HIV-1 and HIV-2 Western blots in the Japanese population. *PLoS One* **13**, (2018).