



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
Τομέας: Ιατρικά εργαστήρια

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΕΣ ΣΥΛΛΟΙΜΩΞΕΙΣ

Γεωργουλοπούλου Ειρήνη Χρυσούλα

A.M.:19678032

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΕΣ

Χρυσάνθη Βογιατζάκη, DVM, PhD

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αντωνία Ευσταθίου, Χημικός-Βιοχημικός, PhD

Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αθήνα, 2024



University of West Attica
Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Division: Medical Laboratories

GRADUATE THESIS:

**STUDY OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS
WITH PARASITIC CO-INFECTIONS**

Georgouloupoulou Eirini Chrysoula

C.N.:19678032

SUPERVISORS

Chrysanthi Vogiatzaki, DVM, PhD

Assistant Professor, Department of Biomedical Sciences, Division of Medical Laboratories, University of West Attica

Antonia Efstathiou, Chemist-Biochemist, PhD

Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences, Division of Medical Laboratories, University of West Attica

Athens, 2024

Μέλη τριμελούς επιτροπής εξέτασης

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Αντωνία Ευσταθίου

Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Απόστολος Μπελούκας

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Γεωργουλοπούλου Ειρήνη Χρυσούλα του Χρήστου, με αριθμό μητρώου 19678032 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, 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 μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της πτυχιακής μου μέχρι 6 μήνες και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Υπογραφή φοιτήτριας

Υπογραφή Επιβλέποντα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις επιβλέπουσες καθηγήτριες μου, κα. Αντωνία Ευσταθίου, για τη πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε για την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής πτυχιακής εργασίας και κα. Χρυσάνθη Βογιατζάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συνεχή υποστήριξη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	VI
Abstract.....	VII
Συνοπμογραφίες.....	VIII
1..Εισαγωγή	1
1.1. <i>Leishmania spp.</i>	1
1.1.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	1
1.1.2. Επιδημιολογία	3
1.1.3. Κύκλος ζωής.....	5
1.1.4. Ανοσοπαθγένεια.....	6
1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	9
1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	9
1.2.2. Επιδημιολογία	13
1.2.3. Κύκλος ζωής.....	15
1.2.4. Ανοσοπαθγένεια.....	17
1.3. HIV	22
1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία.....	22
1.3.2. Επιδημιολογία	25
1.3.3. Κύκλος ζωής.....	28
1.3.4. Ανοσοπαθγένεια.....	29
1.4. Συλλοίμωξη	34
1.4.1. Επιδημιολογία συλλοίμωξης HIV/ <i>Leishmania spp.</i>	34
1.4.2. Ανοσοπαθγένεια της συλλοίμωξης HIV/ <i>Leishmania spp.</i>	35
1.4.3. Επιδημιολογία συλλοίμωξης HIV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	37
1.4.4. Ανοσοπαθγένεια της συλλοίμωξης HIV/ <i>Toxoplasma gondii</i>	38
2. Πειραματικό Μέρος.....	39
2.1. Σκοπός.....	39
2.2. Υλικά – Μέθοδοι	39
2.2.1. Συλλογή & Προετοιμασία δειγμάτων	39
2.2.2. Σχεδιασμός μελέτης	40
2.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης με ELISA	40
Αρχή Μεθόδου.....	40
2.2.3.1. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IFN-γ	41

A) Εξοπλισμός-Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια	41
B) Πειραματική διαδικασία	44
2.2.3.2. Έλεγχος με ELISA για τη ποσοτική μέτρηση της IL-6	46
A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια	46
B) Πειραματική διαδικασία	48
2.2.3.3. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-10	49
A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια	50
B) Πειραματική διαδικασία	52
2.2.3.5. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-17A	53
A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια	54
B) Πειραματική διαδικασία	56
2.2.3.6. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-22	57
A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια	58
B) Πειραματική διαδικασία	59
2.2.4. Στατιστική ανάλυση	62
3.Αποτελέσματα	62
3.1. Αποτελέσματα ELISA για την IFN-γ	62
3.2. Αποτελέσματα ELISA για την IL-6	66
3.3. Αποτελέσματα ELISA για την IL-10	70
3.4. Αποτελέσματα ELISA για την IL-17A	74
3.5. Αποτελέσματα ELISA για την IL-22	78
4. Συζήτηση – Συμπέρασμα	83
Βιβλιογραφία	89

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ανοσολογική απόκριση των ασθενών με παρασιτικές συλλοιμώξεις. Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των κυτταροκινών IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17A και IL-22 στον ορό ασθενών με συλλοιμώξη HIV(+)/*T.gondii*(+) και HIV(+)/*Leishmania*(+). Τα αποτελέσματα των ορών αυτών συγκρίθηκαν με τις συγκεντρώσεις κυτταροκίνης των ορών ασθενών HIV(+) και των ορών που ήταν αρνητικοί και για όλα τα παθογόνα. Οι οροί που εξετάστηκαν παραχωρήθηκαν από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος κατά το χρονικό διάστημα 2019-2020. Εφαρμόστηκε Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA) τύπου “Sandwich” για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των κυτταροκινών IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17A και IL-22. Οι οροί ομαδοποιήθηκαν στις κατηγορίες HIV(+)/*T.gondii*(+), HIV(+)/*Leishmania*(+), HIV(+), All positive [HIV(+)/*T.gondii*(+)/*Leishmania*(+)] και «All negative» (αρνητικοί για όλα τα παθογόνα) και «Στικτός» (οροί με αποτελέσματα στικτού ανοσοφθορισμού για το παρασιτο *Leishmania infantum*). Οι οροί ασθενών με συλλοιμώξεις δεν παρουσίασαν σημαντική αύξηση στη παραγωγή της IFN- γ συγκριτικά με τους ορούς ασθενών «All negative» ούτε με τους ορούς ασθενών HIV(+). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της IL-10 σε πολλά από τα δείγματα ορού ασθενών με συλλοιμώξη και HIV(+) συγκριτικά με την ομάδα δειγμάτων ορού «All negative». Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός ορών δεν συμφωνούσε με αυτή τη παρατήρηση. Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι παρατηρείται μια τάση προς την Th2 ανοσολογική απόκριση σε πολλά από τα δείγματα ορού με συλλοιμώξη. Εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ των συγκεντρώσεων της ίδιας κατηγορίας δειγμάτων ορού, δεν ήταν δυνατή η λήψη συμπεράσματος για την IL-6. Οι οροί ασθενών με συλλοιμώξη HIV(+)/*Leishmania*(+) παρουσίασαν αύξηση στη συγκέντρωση της IL-17A σε σύγκριση τόσο με τους ορούς ασθενών «All negative», όσο και με τους ορούς ασθενών HIV(+). Οι οροί ασθενών με συλλοιμώξη HIV(+)/*T.gondii*(+) παρουσίασαν αυξημένη συγκέντρωση IL-17A σε σύγκριση με τους ορούς ασθενών «All negative», αλλά μικρότερη αύξηση συγκριτικά με τους ορούς ασθενών HIV(+). Επομένως, η παραγωγή της IL-17A βρέθηκε ότι ενισχύεται σε δείγματα ορών από ασθενείς με συλλοιμώξη που έχουν επιβαρυσμένο ανοσοποιητικό, ενισχύοντας περαιτέρω την Th2 ανοσολογική απόκριση. Η IL-22 δεν παράγεται στους ασθενείς με συλλοιμώξη και φαίνεται πως δεν έχει κάποιο ρόλο στην εξέλιξη της νόσου. Παρόλο που τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν ότι η συλλοιμώξη HIV(+)/*T.gondii*(+) και HIV(+)/*Leishmania*(+) έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην ανοσία του ξενιστή όπως είναι αναμενόμενο, και ενισχύουν την Th2 ανοσολογική απόκριση με εμπλοκή κυρίως των κυτταροκινών IL-17A και IL-10, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση και πραγματοποίηση περισσότερων ερευνών που να εξετάζουν την έκκριση και συμμετοχή διάφορων κυτταροκινών στον ορό ασθενών με συλλοιμώξη HIV(+)/*T.gondii*(+) και HIV(+)/*Leishmania*(+), για να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός ανοσολογικής απόκρισης σε αυτές τις καταστάσεις.

Λέξεις - Κλειδιά: Συλλοιμώξη, HIV, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, Κυτταροκίνες, ELISA

Abstract

In this thesis, the immune response of patients with parasitic co-infections was studied. The concentration of cytokines IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17A and IL-22 was determined in the sera of patients with HIV(+)/*T. gondii*(+) and HIV(+)/*Leishmania*(+) co-infection. The results of these sera were compared with the cytokine concentrations of HIV(+) patient sera and sera that were negative for all pathogens. The sera tested were provided by the National AIDS Reference Center of Southern Greece during the period 2019-2020. The Sandwich-type Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was applied to determine the concentration of cytokines IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-17A and IL-22. The sera were grouped into HIV(+)/*T.gondii*(+), HIV(+)/*Leishmania*(+), HIV(+), All positive [HIV(+)/*T.gondii*(+)/*Leishmania*(+)] and "All negative" (negative for all pathogens) and "Spotted" (sera with spotted immunofluorescence results for the parasite *Leishmania infantum*). The sera of patients with co-infections did not show a significant increase in IFN- γ production compared to the sera of "All negative" patients nor to the sera of HIV(+) patients. In contrast, a significant increase in IL-10 concentration was observed in many of the serum samples of co-infected and HIV(+) patients compared to the "All negative" serum sample group. However, a significant number of sera did not agree with this observation. From the above, we conclude that there is a trend towards a Th2 immune response in many of the serum samples with co-infection. Because of the large variation between the concentrations of the same class of serum samples, it was not possible to draw a conclusion for IL-6. HIV(+)/*Leishmania*(+) co-infected patient sera showed an increase in IL-17A concentration compared to both "All negative" and HIV(+) patient sera. HIV(+)/*T.gondii*(+) co-infection patient sera showed increased IL-17A concentration compared to "All negative" patient sera, but a smaller increase compared to HIV(+) patient sera. Therefore, IL-17A production was found to be enhanced in serum samples from immune compromised co-infected patients, further enhancing the Th2 immune response. IL-22 is not produced in patients with co-infection and appears to have no role in disease progression. Although the results of the present study agree that HIV(+)/*T.gondii*(+) and HIV(+)/*Leishmania*(+) have a negative impact on host immunity as expected, and enhance the Th2 immune response with the involvement of mainly the cytokines IL-17A and IL-10, further investigation and more studies examining the secretion and involvement of various cytokines in the serum of patients with HIV(+)/*T. gondii*(+) and HIV(+)/*Leishmania*(+) co-infection, to clarify the exact mechanism of the immune response in these conditions.

Keywords: Co-infection, HIV, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, Cytokines, ELISA

Συντομογραφίες

HIV	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της Ανθρώπινης Ανασοσανεπάρκειας
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Σύνδρομο Επίκτητης Ανασοσανεπάρκειας
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
IFN	Interferon	Ιντερφερόνη
IL	Interleukin	Ιντερλευκίνη
TNF	Tumor necrosis factor	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	Ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακαροφάγων
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Παράγοντας διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακαροφάγων
MAF	Macrophage-activating factor	Παράγοντας ενεργοποίησης μακαροφάγων
SDF	Stromal cell-derived factor	Παράγοντας που προέρχεται από τα στοματικά κύτταρα
MIP	Macrophage inflammatory protein	Φλεγμονώδεις Πρωτεΐνες Μακροφάγων
RENTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted	
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	C-C υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 5
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Προσδέτης χημειοκίνης 2 (C-C μοτίβο)
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Προσδέτης χημειοκίνης 2 (C-X-C μοτίβο)
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4	C-X-C υποδοχέας χημειοκίνης τύπου 4
TGF	Transforming growth factor	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού
Lk	Lymphokine	Λεμφοκίνη
VL	Visceral Leishmaniasis	Σπλαχνική λεισμανίαση
CL	Cutaneous Leishmaniasis	Δερματική λεισμανίαση
MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis	Βλεννογοδερματική λεισμανίαση
PKDL	Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis	Δερματική λεισμανίαση μετά το Καλα-Αζάρ
DCL	Diffuse Cutaneous Leishmaniasis	Διάχυτη δερματική λεισμανίαση

ML	Mucosal Leishmaniasis	Λεισμανίαση των βλεννογόνων
NK cell	Natural killer cell	Κύτταρα φυσικοί φονείς
APC cell	Antigen-presenting cell	Αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο
DC	Dendritic cell	Δενδριτικό κύτταρο
Th cell	T helper cell	T βοηθητικό κύτταρο
PAMPs	Pathogen-associated molecular pattern	Μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με το παθογόνο
TLR	Toll-like receptor	Υποδοχέας τύπου Toll
IRGs	Immunity-related GTPases	GTPασες που σχετίζονται με την ανοσία
GBPs	Guanylate-binding proteins	Πρωτεΐνες δέσμησης γουανιλικού
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88	
RONs	Rhoptry Neck Proteins	
ROPs	Rhoptry Organelle Proteins	
MIC	Microneme proteins	
LPG	Lipophosphoglycan	Λιποφωσφογλυκάνη
IDO	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase	Διοξυγενάση 2,3-ινδολεαμίνης-πυρρόλης
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	Επαγώγιμες συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου
IH	Intermediate host	Ενδιάμεσος ξενιστής
DH	Definitive host	Τελικός ή οριστικός ξενιστής
TE	Toxoplasma Encephalitis	Εγκεφαλική τοξοπλάσμωση
MSM	Men who have sex with men	Άνδρες που έρχονται σε σεξουαλική επαφή με άνδρες
PWID	People who inject drugs	Χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών
SIV	Simian immunodeficiency virus	Ιός ανοσοανεπάρκειας του πιθήκου
CRFs	Circulating Recombinant Forms	Κυοφορούμενες ανασυνδιασμένες μορφές
URFs	Unique Recombinant Forms	Μοναδικά ανασυνδιασμένες μορφές
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρο ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΕΟΔΥ		Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας

EKAANE		Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy	Υψηλής δράσης αντιρετροϊκή θεραπεία
HLA	Human Leukocyte antigen	Αντιγόνο ανθρώπινου λευκοκυττάρου
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	Μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης -1
SA	Streptavidin	Στρεπταβιδίνη
HRP	Horseradish peroxidase	Υπεροξειδάση του χρένου
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin	3,3',5,5'- τετραμεθυλοβενζιδίνη
mAb	Monoclonal antibody	Μονοκλωνικό Αντίσωμα
H₂SO₄	Sulfuric acid	Θειικό οξύ
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
dH₂O	Distilled water	Αποσταγμένο νερό
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ

1. Εισαγωγή

1.1. *Leishmania* spp.

1.1.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Το πρωτόζωο παράσιτο *Leishmania* ανήκει στην οικογένεια *Trypanosomatidae*, στο γένος *Leishmania*. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Cunningham το 1885 και λίγα χρονιά αργότερα παρατηρήθηκε από τον Leishman και τον Donovan. Προκαλεί την νόσο λεισμανίαση, η οποία είναι ενδημική σε τουλάχιστον 98 χώρες και συναντάται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές καθώς και στις χώρες της Μεσογείου [1], [2]. Αν και η λεισμανίαση έχει παγκόσμια εξάπλωση (εκτός από την Ανταρκτική) έχουν διαιρεθεί οι περιοχές εξάπλωσης της στις εξής δυο κατηγορίες: στο «Νέο Κόσμο», όπου περιλαμβάνει περιοχές της Αμερικής και στον «Παλιό Κόσμο», όπου περιλαμβάνει περιοχές της Αφρικής, της Ασίας και της Ευρώπης [3], [4]. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 12 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν, 350 εκατομμύρια βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και 26.000 έως 65.000 άνθρωποι καταλήγουν από αυτή την νόσο κάθε χρόνο, κάτι που την κατατάσσει ψηλά στη κλίμακα των τροπικών ασθενειών που προκαλούν νόσο και θνησιμότητα (2^η και 4^η θέση, αντίστοιχα) [1], [5].

Το πρωτόζωο παράσιτο *Leishmania* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα ενός ευρέος φάσματος κλινικών εκδηλώσεων οι οποίες εμφανίζονται με τις πιο συχνές μορφές: α) η σπλαχνική λεισμανίαση (Visceral Leishmaniasis-VL) γνώστη και ως Καλα Αζάρ (Kala-Azar), η οποία είναι η πιο σοβαρή εκδήλωση της νόσου, με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας αν μείνει χωρίς θεραπεία (εμφάνιση πυρετού, απώλεια βάρους, διόγκωση ήπατος και αναιμία), β) η δερματική λεισμανίαση (Cutaneous Leishmaniasis-CL), η οποία είναι η πιο συνηθισμένη μορφή της νόσου (δερματικές βλάβες και έλκη σε όλο το σώμα που είναι πιθανό να αφήσουν μόνιμες βλάβες) και γ) η βλεννογερματική λεισμανίαση (Mucocutaneous Leishmaniasis-MCL), όπου το άτομο παρουσιάζει εκτεταμένη καταστροφή των βλεννογόνων [6]. Επιπρόσθετα, λιγότερο συχνά απαντάται η δερματική λεισμανίαση μετά το Καλα Αζάρ (Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis-PKDL), η διάχυτη δερματική λεισμανίαση (Diffuse Cutaneous Leishmaniasis-DCL) και η λεισμανίαση των βλεννογόνων (Mucosal Leishmaniasis-ML). Παρόλο που ο αριθμός των ετήσιων κρουσμάτων λεισμανίασης είναι σημαντικά υψηλός, το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθρώπων που έχουν μολυνθεί είναι ασυμπτωματικοί [1]. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί σε πολλά αστικά κέντρα η ύπαρξη ατόμων με συλλοίμωση λεισμανίασης και HIV καθώς εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα λεισμανίασης μετά από επανεργοποίηση μιας προ-υπάρχουσας λανθάνουσας λοίμωξης [2]. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι η παθογένεια και οι κλινικές εκδηλώσεις της λεισμανίασης μπορεί να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών ειδών λεισμανίας που μπορεί να μολύνουν

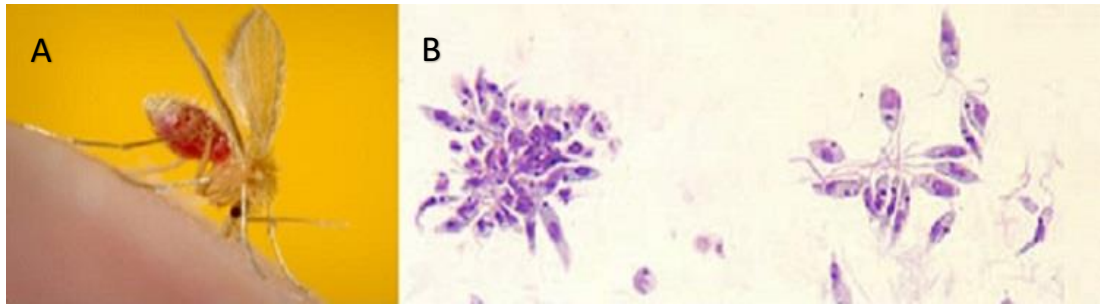
τον ξενιστή καθώς και ότι η πορεία μιας νόσου μπορεί να εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό τόσο από τον τύπο της σκνίπας (φορέας) όσο και από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή [1].

Το παράσιτο *Leishmania* έχει την δυνατότητα να παρασιτεί σε αρκετά θηλαστικά (σπονδυλωτοί) ξενιστές, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, αλλά και σε ασπόνδυλους φορείς με μεγάλη επιτυχία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει αναπτύξει διαφορετικούς μηχανισμούς και μορφές του παράσιτου για να προσαρμόζεται σε ποικίλα περιβάλλοντα [3]. Από τους πιο σημαντικούς ξενιστές αποτελούν τα θηλαστικά της οικογένειας Canids (λύκος, αλεπού, σκύλος), τα τρωκτικά, τα μαρσιποφόρα, οι νυχτερίδες, οι μαγκούστες και τα υρακοειδή. Παρόλο που η λεισμανίαση είχε θεωρηθεί αρχικά ότι μεταδίδεται κυρίως μεταξύ των ζώων έχει πλέον τεκμηριωθεί ότι τα 21 από τα 54 είδη λεισμάνιας μπορούν να προκαλέσουν νόσο και στον άνθρωπο. Μόνο ένας μικρός αριθμός περιπτώσεων συγκεκριμένων ειδών *Leishmania* έχει αναφερθεί ότι μεταδίδεται μεταξύ ανθρώπων (άνθρωπος -σκνίπα -άνθρωπος) [1].

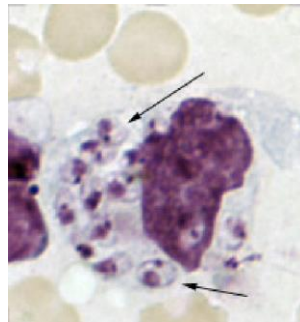
Το παράσιτο *Leishmania* μεταδίδεται στους διαφορετικούς ξενιστές με την βοήθεια της σκνίπας φλεβοτόμου (ασπόνδυλος φορέας), η οποία ανήκει στην τάξη των δίπτερων (*Diptera*), στην οικογένεια *Phychodidae* και υποοικογένειας *Phlebotominae* (**Εικόνα 1,A**) [5]. Μεγάλης σημασίας για την εξάπλωση της λεισμανίασης διαδραματίζουν τα 2 από τα 6 γένη της συγκεκριμένης σκνίπας, το γένος *Phlebotomus* που εντοπίζεται πρωτίστως στον «Παλαιό Κόσμο» και το γένος *Lutzomyia* που εντοπίζεται στον «Νέο Κόσμο». Από τον μεγάλο αριθμό διαφορετικών ειδών σκνίπας, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό έχει την δυνατότητα να φέρει τα παθογόνα είδη *Leishmania* [3].

Οι μολυσματικές μορφές του παράσιτου *Leishmania* είναι δύο και εναλλάσσονται κατά την διάρκεια του συνθέτου κύκλου ζωής του παράσιτου. Η προμαστιγωτή μορφή του παράσιτου εντοπίζεται μέσα στην μολυσμένη σκνίπα (εξωκυτταρικό στάδιο), έχει σχήμα επίμηκες και ένα ελεύθερο μαστίγιο το οποίο του προσδίδει την δυνατότητα να κινείται (**Εικόνα 1,B**). Η αμαστιγωτή μορφή του παράσιτου εντοπίζεται κυρίως μέσα στα μακροφάγα (ενδοκυτταρικό στάδιο) των θηλαστικών που έχουν μολυνθεί, είναι ωοειδής και μη κινητή (**Εικόνα 2**) [3].

Τα τελευταία χρόνια η καταστροφή μεγάλου εύρους δασικών εκτάσεων και οι έντονες κλιματικές αλλαγές είχε ως αποτέλεσμα τόσο τη μετακίνηση πολλών μολυσμένων σκνιπών σε περιοχές που δεν υπήρχε αυτή η νόσος, αλλά και τη συνύπαρξη δύο ή και περισσότερων ειδών *Leishmania* σε μια περιοχή. Σε αυτές τις συνθήκες είναι πιθανό ένας φορέας που κάποτε παρουσίαζε υψηλή εξειδίκευση με κάποιο συγκεκριμένο είδος, να φέρει δύο διαφορετικά είδη ή ένα καινούριο είδος το οποίο προέκυψε μετά από γενετική ανταλλαγή μεταξύ διακριτών ειδών. Αυτά τα είδη αποκαλούνται υβρίδια και αποτελούν μια νέα επιδημιολογική απειλή [1], [3].



Εικόνα 1: Α. Ο φορέας σκνίπα *Phlebotomus*. Β. Η προμαστιγωτή μορφή του παράσιτου *Leishmania* σε καλλιέργεια [7].



Εικόνα 2: Ένα μολυσμένο με την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου (βέλη) μακροφάγο [8].

1.1.2. Επιδημιολογία

Όπως προαναφέρθηκε η λεισμανίαση έχει παγκόσμια εξάπλωση και εξακολουθεί να αποτελεί μέχρι και σήμερα μια τροπική νόσος που δεν λαμβάνει την απαραίτητη προσοχή για την επιτήρηση και καταπολέμηση της. Είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με φτωχούς λαούς με εξασθενημένο ανοσοποιητικό που ζουν κάτω από κακές συνθήκες διαβίωσης και στερούνται βασικά αγαθά (νερό, τροφή) καθώς και υποδομές κοινωνικής μέριμνας [3], [6].

Ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή απαντώνται διαφορετικές μορφές της νόσου και η επίπτωση κάθε χρόνο μπορεί να εμφανίζει διακυμάνσεις [4]. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), υπολογίζεται ότι έχουμε περίπου 50.000 μέχρι 90.000 νέα κρούσματα σπλαχνικής λεισμανίασης και 600.000 μέχρι 1 εκατομμύριο νέα κρούσματα δερματικής λεισμανίασης κάθε χρόνο με μόνο ένα μικρό ποσοστό να κοινοποιείται στον WHO [6].

Η σπλαχνική λεισμανίαση εμφανίζει μεγάλο επιπολασμό για συνεχόμενα έτη στη Βραζιλία, στην Ανατολική Αφρική (κυρίως στην Αιθιοπία, την Κένυα και το Σουδάν) στην Ινδία, στο Νεπάλ και στο Μπαγκλαντές. Σε αυτή τη μορφή της νόσου οι συμπτωματικοί ξενιστές διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην εξάπλωση της ασθένειας και μεγάλη επιδημιολογική πρόκληση, ειδικά στις ενδημικές περιοχές. Το 95% των κλινικών εκδηλώσεων δερματικής λεισμανίασης παρατηρείται στην Αμερική (κυρίως Βραζιλία και Περού), τη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή καθώς και την Κεντρική

Ασία. Τέλος, αυξημένα ποσοστά ασθενών με PKDL έχουν σημειωθεί στην Ανατολική Αφρική (κυρίως Σουδάν), στην Ινδία και τις γύρω χώρες, όπου ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση θα αναπτύξει μετέπειτα τη νόσο. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι και στην Βραζιλία μερικές φορές συναντάται η PKDL σε ασθενείς που νοσούν ταυτόχρονα με HIV και VL την οποία εμφάνισαν μετά από μόλυνση με *L.infantum* [1], [6].

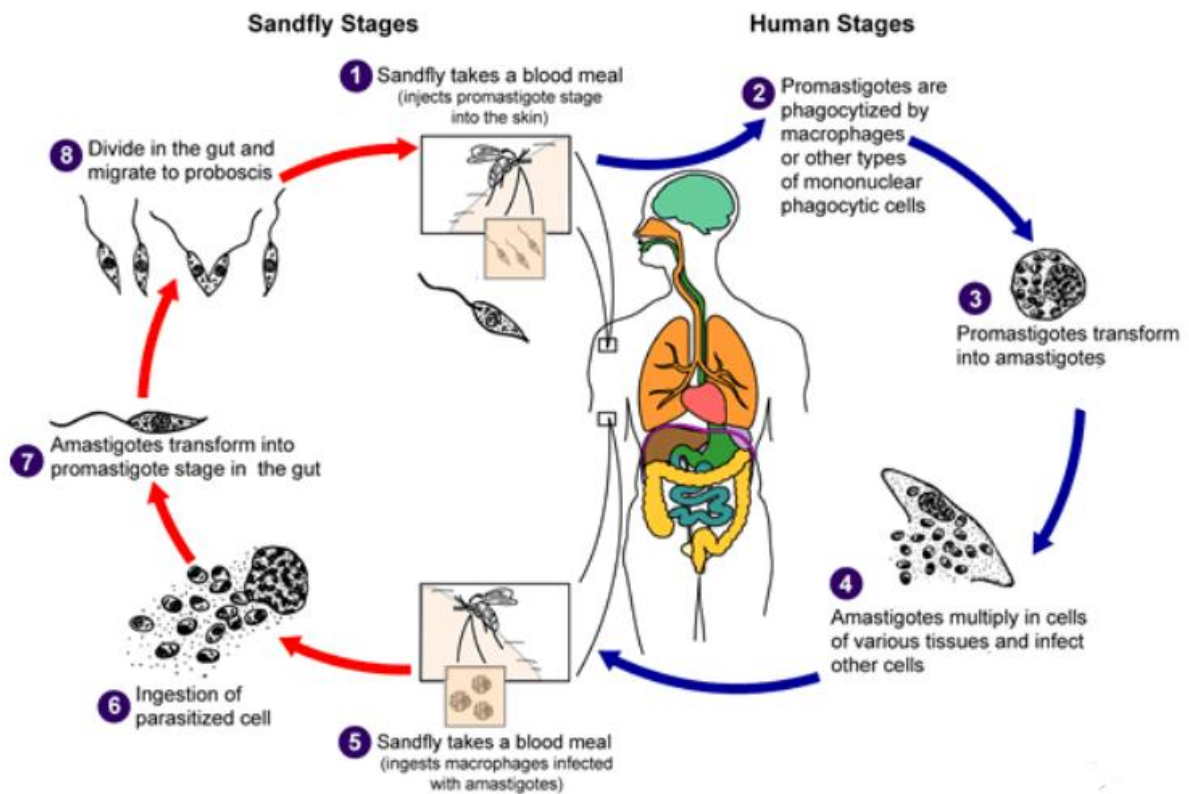
Αναλυτικότερα, για κάθε γεωγραφική κατανομή αξίζει να σημειωθεί ότι από την Αφρικανική Ήπειρο, στην Αλγερία, φαίνεται η CL να είναι ενδημική ενώ στην Ανατολική Αφρική συναντάμε όλες τις μορφές της νόσου και διαστήματα επιδημιών σπλαχνικής λεισμανίασης. Στην Αμερικανική Ήπειρο είναι δύσκολο να έχουμε ένα ξεκάθαρο συμπέρασμα για τα επιδημιολογικά δεδομένα καθώς σε πολλές περιοχές συνυπάρχουν πολλοί διαφορετικοί φορείς, πολλές διαφορετικές δεξαμενές και πολλά είδη λεισμανίας. Ωστόσο, φαίνεται η CL να είναι η συχνότερη μορφή της νόσου. Στην ευρύτερη περιοχή της νοτιοανατολικής Ασίας παρουσιάζονται περιστατικά τόσο σπλαχνικής όσο και δερματικής λεισμανίασης. Η πλειονότητα των κρουσμάτων που εμφανίζουν δερματική λεισμανίαση σε όλο τον κόσμο εντοπίζεται στις περιοχές της Ανατολικής μεσογείου [6].

Στην Ευρώπη, και κυρίως στις χώρες της λεκάνης της Μεσόγειο, η λεισμανίαση είναι ενδημική και απαντάται με την σπλαχνική και τη δερματική μορφή και αιτιολογικό παράγοντα το είδος *L.infantum*. Πολλά από τα κρούσματα που εντοπίζονται στην Ευρώπη έχουν προέλθει από ενδημικές για τη λεισμανίαση περιοχές της Αμερικής και της Αφρικής, μετά από μετακίνηση πληθυσμών. Αν και για πολλά χρόνια η λεισμανίαση ανήκε στην κατηγορία των παιδικών ασθενειών, πλέον στην Ευρώπη τα περισσότερα κρούσματα είναι σε ενήλικες μεταξύ της τρίτης και της πέμπτης δεκαετίας της ζωής. Η σημαντικότερη δεξαμενή που συμβάλει, στην εξάπλωση των κρουσμάτων και στη συνέχεια της πορείας μετάδοσης του *L.infantum* αποτελεί ο σκύλος [6], [9].

Σήμερα στην Ελλάδα τα κρούσματα λεισμανίασης είναι απαραίτητο να γνωστοποιούνται για να γίνεται μια εκτίμηση της ετήσιας επίπτωσης και προσπάθεια εύρεσης των δεξαμενών του παρασίτου. Φαίνεται ότι η λεισμανίαση είναι ενδημική στη πλειονότητα των νησιών αλλά και σε όλες τις παραθαλάσσιες περιοχές [10]. Παρόλα αυτά, κρούσματα εντοπίζονται και στο ηπειρωτικό τμήμα της χώρας καθώς και στην Αττική λόγω του ευνοϊκού περιβάλλοντος που επιτρέπει στη σκνίπα να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί [5]. Τα τελευταία χρόνια έχουν εντοπιστεί και κρούσματα στους προσφυγικούς καταυλισμούς της χώρας και μάλιστα από είδη τα οποία δεν εντοπίζονται και τόσο συχνά στην Ευρώπη, όπως το *L.tropica* και το *L.donovani* [11].

1.1.3. Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του παράσιτου *Leishmania* ξεκινάει όταν μια θηλυκή μολυσμένη με το παράσιτο σκνίπα, προσλάβει γεύμα αίματος από ένα θηλαστικό-ξενιστή με το οποίο θα μεγαλώσει τα αυγά της. Η σκνίπα μεταφέρει στο σημείο του τσιμπήματος έναν μεγάλο αριθμό μετακυκλικών προμαστιγωτών παράσιτων (μολυσματική μορφή του παράσιτου). Εκτός από τους μετακυκλικούς προμαστιγώτες η σκνίπα απελευθερώνει και έναν μεγάλο αριθμό ουσιών, οι οποίες προσελκύουν πρώτα τα ουδετερόφιλα και στη συνέχεια τα μακροφάγα στο σημείο του τσιμπήματος. Τα ουδετερόφιλα που μολύνονται δεν αποτελούν το κύριο κύτταρο ξενιστή του παράσιτου αλλά περισσότερο έναν ενδιάμεσο φορέα που θα παρακάμψει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και θα μεταφέρει το παράσιτο με ασφάλεια στα μακροφάγα. Το παράσιτο χρησιμοποιεί λιποφωσφογλικάνες (LPGs) και την γλυκοπρωτεΐνη gr63 για να συνδεθεί με τους επιφανειακούς υποδοχείς των μακροφάγων (κύριο κύτταρο που προσβάλλει το παράσιτο *Leishmania*). Τα μακροφάγα ως απάντηση της σύνδεσης αυτής αναπτύσσουν ψευδοπόδια με τα οποία φαγοκυτταρώνουν το παράσιτο. Το παράσιτο εσωτερικεύεται σε ένα παρασιτοφόρο κενοτόπιο το οποίο συντήκεται με λυσόσωμα σχηματίζοντας το φαγολυσόσωμα εντός του οποίου η προμαστιγωτή μορφή μετατρέπεται στην αμαστιγώτη μορφή. Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός των αμαστιγωτών μορφών με διχοτόμηση και ύστερα από πολλούς κύκλους διαδοχικών πολλαπλασιασμών τα μακροφάγα ρήγνυνται και η αμαστιγωτή μορφή απελευθερώνεται στους ιστούς. Οι ελεύθερες αμαστιγωτές μορφές μπορούν πλέον να μολύνουν νέα μακροφάγα και να επαναλάβουν τον κύκλο του πολλαπλασιασμού. Η θηλυκή σκνίπα μολύνεται με την αμαστιγωτή μορφή του παρασίτου κατά την απομύζηση αίματος, προσλαμβάνοντας μολυσμένα μονοκύτταρα/μακροφάγα και ελεύθερες αμαστιγωτές μορφές, από τον μολυσμένο τελικό ξενιστή. Μέσα στον αυλό ή στο τοίχωμα του μεσεντέρου της σκνίπας οι αμαστιγωτές μορφές του παρασίτου μετατρέπονται σε προκυκλικές προμαστιγώτες μορφές και ξεκινούν τις διαδοχικές διαιρέσεις. Με την βοήθεια του μαστιγίου το παράσιτο μεταναστεύει στο φάρυγγα (ανάπτυξη μετακυκλικών μορφών) και τέλος στα στοματικά μόρια του εντέρου, έτοιμο πλέον να μεταφερθεί στον υποδόριο ιστό ενός νέου τελικού ξενιστή κατά την λήψη του επόμενου γεύματος αίματος (**Εικόνα 3**) [3], [12].



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του παράσιτου της *Leishmania* και απεικόνιση των σταδίων του στον φορέα (σκνίπα) και στον ξενιστή (άνθρωπο) [8].

1.1.4. Ανοσοπαθογένεια

Λόγω των ασυμπτωματικών φορέων μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φυσική ανοσία καταφέρνει να περιορίσει με μεγάλη επιτυχία την εξέλιξη της νόσου λείσμανιαση [3]. Ωστόσο η επίκτητη ανοσολογική απάντηση και η μεσολαβούμενη από τα Τ κύτταρα ανοσία και έκκριση κυτταροκινών είναι απαραίτητη. Στο σημείο της μόλυνσης έχουμε μια συσσώρευση κυττάρων όπως ουδετερόφιλα, κύτταρα φυσικούς φονείς (NK), μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Από αυτά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) θεμελιώδους σημασίας για την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης και την πορεία της νόσου φαίνεται να έχουν κυρίως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα [13]. Οι αλληλεπιδράσεις του παράσιτου με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα είναι περίπλοκες και έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου [14]. Μετά την μόλυνση αυτών των κυττάρων, φαίνεται ότι το παράσιτο έχει αναπτύξει περίπλοκους μηχανισμούς που του επιτρέπουν να αποφύγει ή και να επιλέξει ποια αντίγονα του θα παρουσιαστούν σε μια προσπάθεια να κατευθύνει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή προς όφελος του [3]. Τα μακροφάγα αποτελούν τόσο το κύριο κύτταρο που παρασιτεί και πολλαπλασιάζεται το παράσιτο όσο και το κύριο κύτταρο καταπολέμησης της νόσου [14].

Για την απαλλαγή των μακροφάγων από τους αμαστιγώτες, είναι σημαντική η ενεργοποίηση της κατάλληλης ανοσολογικής απόκρισης η οποία ξεκινάει από τα ίδια τα μακροφάγα αλλά και από τα δενδριτικά κύτταρα. Η κλασική ενεργοποίηση των μακροφάγων προάγεται από παράγωγα των κυττάρων Th1 και συγκεκριμένα θεμελιώδη σημασία διαδραματίζει η κυτταροκίνη IFN- γ , η οποία ωθεί τα μακροφάγα να παράγουν το ένζυμο iNOS, όπου μετά από συγκεκριμένες αντιδράσεις μετατρέπεται στο τοξικό μόριο για τα παράσιτα NO (μονοξειδίο του αζώτου). Ως εκ τούτου η Th1 ανοσολογική απόκριση ευθύνονται για την παραγωγή ενός σημαντικού αριθμού προφλεγμονωδών κυτταροκινών οι οποίες ενεργοποιούν τα μακροφάγα να καταστρέψουν το παράσιτο. Στον αντίποδα, η εναλλακτική ενεργοποίηση των μακροφάγων παρακινείται από την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-4 και η IL-10, από την Th2 ανοσολογική απόκριση και συγχέεται με απενεργοποίηση των μακροφάγων και εξέλιξη της νόσου. Η ύπαρξη Th2 απόκρισης περιορίζει την ύπαρξη Th1 απόκρισης και το αντίστροφο [13], [14].

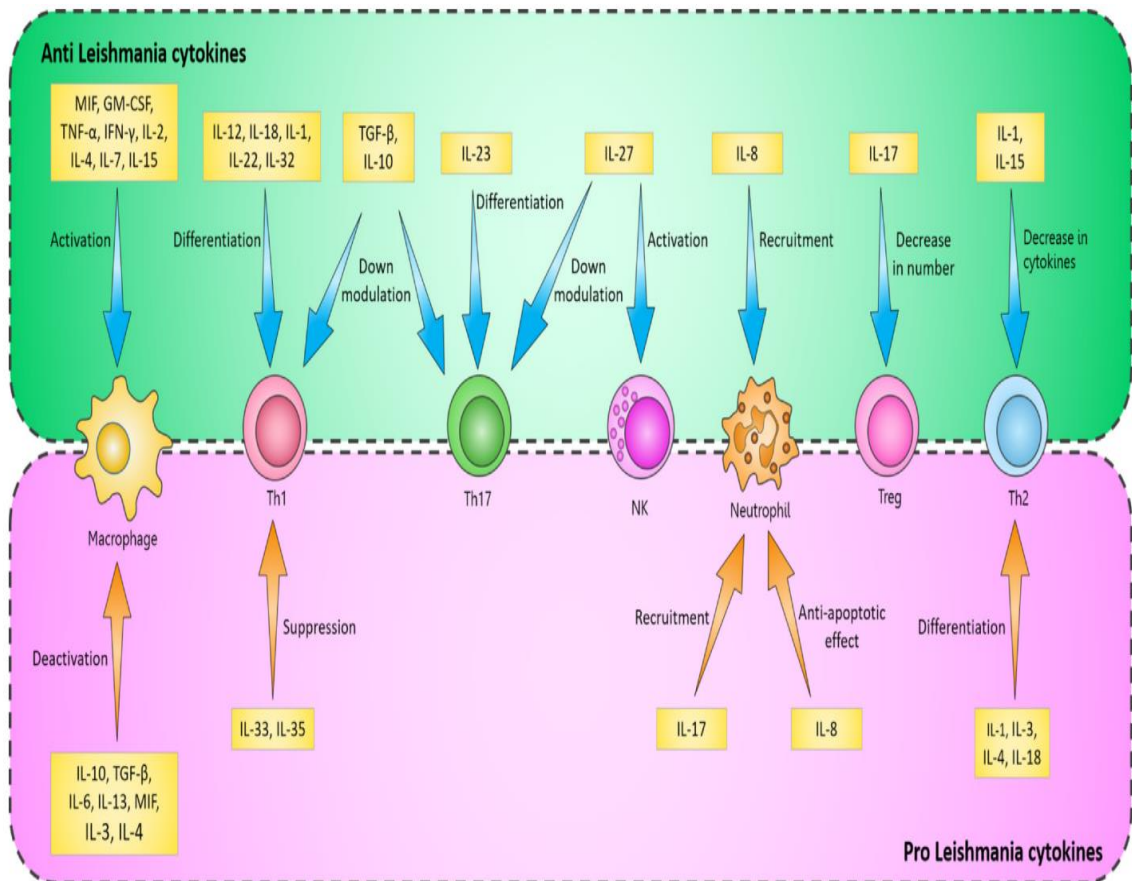
Δεδομένου ότι η κλινική εικόνα και οι μορφές της λειψμανίασης μπορεί να είναι διαφορετικές, καθώς και το γεγονός ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά στελέχη του παράσιτου και πολλοί ξενιστές, είναι δύσκολο να γενικεύσουμε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς και τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε όλους τους οργανισμούς [14]. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι στη δερματική λειψμανίαση έχουμε μια αυξημένη απόκριση Th2, στη διάχυτη δερματική λειψμανίαση παρουσιάζεται κυρίως απόκριση Th1 σε ασθενείς με αυτοπεριοριζόμενες βλάβες, στη βλεννογοδερματική υπάρχει έναν συνδυασμό Th1/Th2 απόκρισης με αυξημένη ποσότητα εκκρινόμενης IFN- γ ενώ στη σπλαχνική παρατηρείται ίδια απόκριση με τη βλεννογοδερματική λειψμανίαση με ταυτόχρονη αύξηση της IL-10 [3].

Γενικά θα μπορούσαμε να χωρίσουμε τις κυτταροκίνες που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση κατά την πορεία της λειψμανίασης σε αυτές που δρουν προκειμένου να καταπολεμηθεί η νόσος και σε αυτές που η δράση τους ευνοεί την εξέλιξη της νόσου. Συνοπτικά, ξεκινώντας από τις κυτταροκίνες που δρουν προς όφελος του ξενιστή, από τα πειράματα σε ποντίκια έχει βρεθεί ότι η IFN- γ αποτελεί την πρώτη λεμφοκίνη (Lk) που συμμετέχει στην εξάλειψη του παρασίτου μέσω της ενεργοποίησης των μακροφάγων (παράγοντας ενεργοποίησης της δράσης των μακροφάγων-MAF). Η δράση της IFN- γ ενισχύεται από διάφορες άλλες κυτταροκίνες όπως η IL-2, η IL-4 και τον παράγοντα διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF). Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει πως η IFN- γ δεν επαρκεί για να επάγει την απόκριση Th1 σε όλα τα στάδια της νόσου και τονίστηκε ο ρόλος της IL-12 ως μια κρίσιμη κυτταροκίνη για την ενίσχυση και ανάπτυξη της Th1 απόκρισης καθώς και για την παραγωγή IFN- γ [13], [14]. Παρόμοια λειτουργία με την IL-12 φαίνεται να έχει και η IL-1 με ταυτόχρονη καταστολή της Th2 απόκρισης, ενώ η IL-15 συμβάλει στην καταπίεση της Th2 απόκρισης χωρίς όμως να επηρεάζει την Th1. Επίσης, δεν θα μπορούσε να παραληφθεί ο σημαντικός ρόλος της IL-8 στα αρχικά στάδια της μόλυνσης η οποία προωθεί την θανάτωση του παράσιτου και τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, προσελκύοντας ουδετερόφιλα στο σημείο της μόλυνσης.

Τέλος, κάποιες άλλες κυτταροκίνες που καταφέρνουν με επιτυχία να ενεργοποιήσουν τα μακροφάγα έτσι ώστε να μειώσουν τον αριθμό των αμαστιγωτών και να συμβάλουν στην αντίσταση της νόσου είναι ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF- α), η IL-7 και ο ανασταλτικός παράγοντας μετανάστευσης μακροφάγων (MIF) ενώ υπάρχουν και κυτταροκίνες, όπως η IL-6, η IL-22, η IL-17 και η IL-23, που με πιο συνθέτους τρόπους έχουν μια θετική δράση για την πορεία της νόσου (**Εικόνα 4**) [13].

Συνεχίζοντας με τις κυτταροκίνες που η δράση τους συνδέεται με επιδείνωση της λειψμανίασης, τόσο ο GM-CSF όσο και η IL-1 στη δερματική λειψμανίαση αυξάνουν το μέγεθος της βλάβης στον ξενιστή, με τη διαφορά ότι η δράση της GM-CSF αυξάνει επίσης και τον αριθμό των παράσιτων οδηγώντας στην επιδείνωση της νόσου. Ακόμα, η IL-1 καθώς και η IL-18 ενισχύουν την Th2 διαφοροποίηση ενώ άλλες κυτταροκίνες όπως η IL-33 και η IL-35 καταπιέζουν την Th1 απόκριση οδηγώντας και στις δύο περιπτώσεις στον έντονο πολλαπλασιασμό του παράσιτου και την εξέλιξη της νόσου. Πολλές κυτταροκίνες όπως η IL-6, ο TNF- β , η IL-4 και κυρίως η IL-10 αναστέλλουν την δράση των μακροφάγων κάνοντας τον ξενιστή ευάλωτο στην ανάπτυξη κλινικής ασθένειας. Τέλος έχει βρεθεί ότι η IL-17 μέσω περίπλοκων μηχανισμών λειτουργεί επιβαρυντικά για την εξέλιξη της νόσου (**Εικόνα 4**) [13].

Ως εκ τούτου από τα παραπάνω φαίνεται ότι ένας πιο περιορισμένος αριθμός κυτταροκινών κατατάσσονται αυστηρά σε μια από τις δύο κατηγορίες κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης ενώ οι περισσότερες κυτταροκίνες έχει διαπιστωθεί ότι έχουν διπλό ρολό στην πορεία της νόσου. Η δράση αυτών των κυτταροκινών επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες που επικρατούν στον ξενιστή μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (ύπαρξη Th1 ή Th2, ποσότητα μιας συγκεκριμένης κυτταροκίνης κλπ.). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες στην εξέλιξη της ανοσοπαθogenείας και στη λειτουργία των κυτταροκινών διαδραματίζουν και τα επίπεδα των υποδοχέων της κάθε κυτταροκίνης τα οποία εκφράζουν τα κύτταρα στόχοι, η γονιδιακή δράση και το γενετικό προφίλ κάποιων κυτταρικών του ξενιστή (πολυμορφισμός), όπου η κάθε μορφή μπορεί να επηρεάζει διαφορετικά την εξέλιξη της νόσου, καθώς και τη διαφορετική εντόπιση σε αλλά όργανα μεταξύ των διαφορετικών μορφών της νόσου [13].



Εικόνα 4: Εικόνα της δράσης των κυτταροκινών στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς και του ρόλου τους στην έκβαση της λείσμανιάσης [13].

1.2. *Toxoplasma gondii*

1.2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Το πρωτόζωο παράσιτο *Toxoplasma gondii* αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Nicolle και τον Manseaux μετά από απομόνωση του παρασίτου από το τρωκτικό *Ctenodactylus gondii*. Το πρώτο επιβεβαιωμένο ανθρώπινο κρούσμα καταγράφηκε λίγα χρόνια αργότερα (το 1923) από τον Janku [15]. Το υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό κοκκίδιο παράσιτο ανήκει στο φύλο *Apicomplexa*, στο γένος *Toxoplasma* με μοναδικό είδος το *Toxoplasma gondii*. Ενώ γενικά δεν παρουσιάζει γενετικές διαφοροποιήσεις, αυτά τα στελέχη που έχουν βρεθεί, ταξινομούνται σε γενετικούς τύπους I, II και III. Ο κάθε γενετικός τυπος είναι διαφορετικά λοιμογόνος και εντοπίζεται σε διαφορετική γεωγραφική περιοχή [16]. Επίσης αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα παράσιτα με πολυάριθμους ξενιστές, όπως θαλάσσια ζώα, πτηνά, οικόσιτα και αγρία θηλαστικά ακόμα και τον άνθρωπο [17]. Το *T.gondii* εμφανίζει παγκόσμια εξάπλωση με το ποσοστό μολυσμένων ανθρώπων σε κάποιες συγκεκριμένες περιοχές να ξεπερνάει το 50% ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο, περίπου το 30% του πληθυσμού είναι χρόνια

μολυσμένο με το παράσιτο [16], [18]. Κατέχει την τέταρτη θέση στα παράσιτα που μεταδίδονται υστέρα από βρώση μολυσμένης τροφής και νερού και αποτελεί σημαντική απειλή εκτός από τον άνθρωπο και για τα ζώα τα οποία εμφανίζουν εξίσου υψηλά ποσοστά μόλυνσης [17].

Όλα τα παράσιτα, συμπεριλαμβανομένου και το *T.gondii*, που ανήκουν στο φύλο *Apicomplexa* μοιράζονται κάποια κοινά οργανίδια. Ανάμεσα σε αυτά είναι οι ροπτρίες (rhoptries) και οι μικρονέμες (micronemes) τα οποία βρίσκονται στο κορυφαίο (apical) άκρο του ταχυζωΐτη. Τα δυο αυτά οργανίδια εκκρίνουν σημαντικές πρωτεΐνες για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή του παράσιτου μέσα στο κύτταρο του ξενιστή καθώς και για την διαμόρφωση της ανοσολογικής απόκρισης [19].

Οι περισσότεροι ξενιστές του παράσιτου συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, αποτελούν ενδιάμεσοι ξενιστές (Intermediate Host-IH) καθώς σε αυτούς το παράσιτο αναπαράγεται μόνο με άφυλο τρόπο (σχιζογονία). Μοναδικοί οριστικοί ή τελικοί ξενιστές (Definitive Host-DH) αποτελούν οι οικόσιτες και οι άγριες γάτες (οικογένεια *Felidae*) στις οποίες το παράσιτο εκτός από την μέθοδο της σχιζογονίας μπορεί να αναπαραχθεί και με αμφιγονικό τρόπο [20]. Κατά τη διάρκεια του συνθέτου κύκλου της ζωής του, το παράσιτο *T.gondii* εναλλάσσεται μεταξύ τριών μολυσματικών μορφών. Ο ταχυζωΐτης αποτελεί μια έντονα μολυσματική μορφή του παράσιτου, η οποία χαρακτηρίζεται από συνεχόμενο πολλαπλασιασμό και ενοχοποιείται για την εδραίωση της οξείας φάσης της νόσου και την καταστροφή των ιστών του ξενιστή (**Εικόνα 6, β**). Ο βραδυζωΐτης είναι μια μορφή του παράσιτου που συναντάται μέσα σε ιστικές κύστες στον ξενιστή και συνδέεται με αργό ή και καθόλου πολλαπλασιασμό κατά τη χρόνια φάση της νόσου (**Εικόνα 6, α**). Τέλος, ο σποροζωΐτης είναι μια μορφή του παράσιτου που συναντάται μέσα σε μια δομή, η οποία αποβάλλεται μαζί με τα περιττώματα μόνο των τελικών ξενιστών, την λεγόμενη ωκύστη [21].

Αφού μολυνθεί η γάτα με το *T.gondii* σε σύντομο χρονικό διάστημα αρχίζει να αποβάλλει ωκύστες για περίπου 1-2 εβδομάδες. Αυτές οι ωκύστες όταν έρθουν σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον μέσα σε λίγες ημέρες, με την βοήθεια των περιβαλλοντικών συνθήκων, σποριώνονται. Η σπορίωση είναι μια απαραίτητη διαδικασία που πραγματοποιείται για να γίνει η ωκύστη μολυσματική [15], [17]. Έχει βρεθεί ότι η ωκύστη είναι ανθεκτική στις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως υγρασία και αυξημένες ή χαμηλές θερμοκρασίες, και αυτό το χαρακτηριστικό της επιτρέπει να επιβιώνει και να εξακολουθεί να είναι μολυσματική για χρόνια. Εκτιμάται πως αρχικά το *T.gondii* ήταν κοκκίδιο παράσιτο μόνο των αιλουροειδών και αργότερα επεκτάθηκε και στους υπολοίπους ενδιάμεσους ξενιστές [17], [22]. Ωστόσο, η ωκύστη του παράσιτου έχει διαπιστωθεί πως προκαλεί συνήθως μια πιο ήπια νόσο στον τελικό ξενιστή από ότι στους ενδιάμεσους [23].

Ο ταχυζωΐτης μετατρέπεται σε βραδυζωΐτη ο οποίος δημιουργεί μια ιστική κύστη σε περιόδους που το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή προσπαθεί να

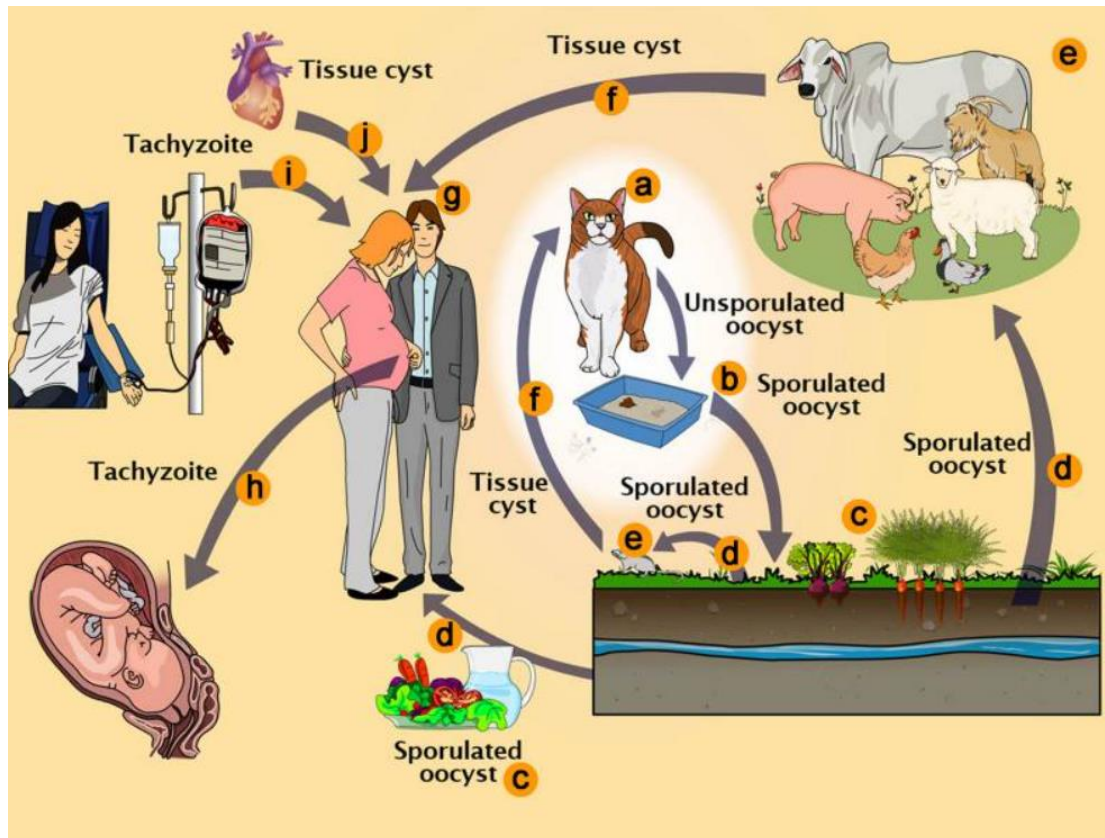
περιορίσει το παράσιτο. Οι κύστες αναπτύσσονται σε πολλούς ιστούς και όργανα και είναι δύσκολο να εξαλειφθούν τόσο από τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή όσο και από τα φάρμακα. Κατά συνέπεια, η κύστη μπορεί να παραμείνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του μολυσμένου οργανισμού (χρόνια φάση της λοίμωξης). Παρόλο που το παράσιτο έχει αναπτύξει την ικανότητα να μολύνει σχεδόν όλα τα εμπύρρινα κύτταρα ενός ξενιστή, παρουσιάζει τις περισσότερες φορές προτίμηση στα κύτταρα του εγκέφαλου, του ήπατος, των εμβρυικών υμένων, των πνευμόνων, της καρδιάς καθώς και των σκελετικών μυών [15], [19], [20].

Η μετάδοση του πρωτόζωου παράσιτου *T.gondii* στους ξενιστές γίνεται με την κατανάλωση ατελώς ψημένου και μολυσμένου με ιστικές κύστες κρέατος. Επίσης, το παράσιτο μπορεί να μεταδοθεί με τη κατάποση ωοκύστεων που βρίσκονται σε τροφές ή νερό ή από διαχείριση κοπράνων μολυσμένης γάτας. Άλλος ένας σημαντικός τρόπος μετάδοσης είναι από την μολυσμένη με το παράσιτο έγκυο μητέρα στο έμβρυο μετά από μεταφορά των ταχυζωϊτών διάμεσου του πλακούντα (κάθετη μετάδοση). Η λοίμωξη που πιθανώς θα αναπτύξει το έμβρυο ονομάζεται συγγενής τοξοπλάσμωση. Άλλοι λιγότερο συχνοί τρόποι μετάδοσης συμβαίνουν κατά τη μεταμόσχευση οργάνου και με τη μετάγγιση αίματος. Τέλος, σπάνια έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μετάδοσης από μη παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (Εικόνα 5) [17], [21].

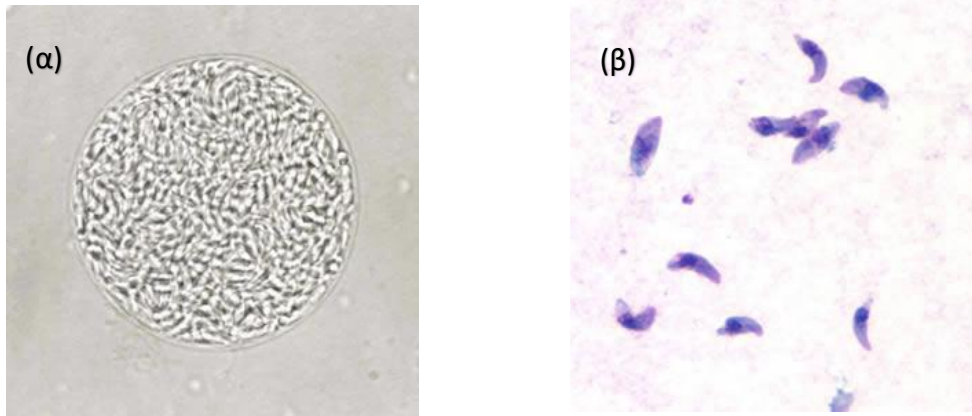
Παρόλο που ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού έχει μολυνθεί από το πρωτόζωο *T.gondii* ένας μολυσμένος ανοσοεπαρκής άνθρωπος δεν θα εκδηλώσει κάποια μορφή τοξοπλάσμωσης ή θα παρουσιάσει ηπία συμπτώματα γριπώδους συνδρομής και τις περισσότερες φορές αυτοπεριοριζόμενη λεμφαδενοπάθεια. Ωστόσο υπάρχουν περιπτώσεις που μολυσμένα άτομα με μερικά απομονωμένα στελέχη του παράσιτου μπορεί να εμφανίσουν οφθαλμική τοξοπλάσμωση με απώλεια όρασης ή οξεία γενικευμένη τοξοπλάσμωση [16], [24]. Σημαντικό κίνδυνο διατρέχουν από αυτό το παράσιτο οι ανοσοκατασταλαμένοι (μολυσμένα άτομα από τον ιό HIV, άτομα με κακοήθειες, άτομα που έχουν κάνει μεταμόσχευση) και οι έγκυες γυναίκες [17].

Οι ανοσοκατασταλαμένοι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν σοβαρή τοξοπλάσμωση σε πολλά οργανικά συστήματα μετά από νέα μόλυνση από το παράσιτο ή μετά από ενεργοποίηση χρόνιας λοίμωξης. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που νοσούν από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας και έχουν μολυνθεί από το *T.gondii*, παρουσιάζουν σοβαρή για τη ζωή εγκεφαλική τοξοπλάσμωση. Τέλος, μια έγκυος που έχει μολυνθεί από το *T.gondii* σπάνια εμφανίζει ενεργή νόσο, όμως η συγγενής τοξοπλάσμωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μακροχρόνιες βλάβες ή την αυτόματη αποβολή του εμβρύου. Ένα ποσοστό των ατόμων που έχουν μολυνθεί με συγγενή τοξοπλάσμωση παραμένουν ασυμπτωματικοί για αρκετά χρόνια και εμφανίζουν οφθαλμικές βλάβες πολύ αργότερα (κατά την δεύτερη δεκαετία της ζωής τους) [16], [24].

Τα κλινικά συμπτώματα της τοξοπλάσμωσης δεν είναι ειδικά για την αναγνώριση της νόσου και απαιτείται ένας συνδυασμός διαφορετικών διαγνωστικών μεθόδων για την ταυτοποίηση του παράσιτου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εκδήλωση της νόσου σε έναν μολυσμένο ξενιστή εξαρτάται σημαντικά από τον αριθμό των ταχυζωϊτών, το ανοσολογικό υπόβαθρο του ξενιστή, την ηλικία και το είδος του, καθώς και από το στέλεχος του παράσιτου [15], [16], [17].



Εικόνα 5: Απεικόνιση των οδών μετάδοσης του *T.gondii* στον άνθρωπο. *a.* Ο οριστικός ξενιστής (γάτα), *b.* Μη σποριωμένες ωκύστες στα κόπρανα γάτας, *c.* Τα τρόφιμα μολύνονται με σποριωμένες ωκύστες, *d.* Οι ωκύστες μπορούν να καταναλωθούν από ενδιάμεσους ξενιστές μέσω μολυσμένου νερού ή ωμών λαχανικών, *e.* Ενδιάμεσοι ξενιστές (πχ βοοειδή, πρόβατα, πουλερικά, χοίροι), *f.* Κατανάλωση ιστικών κύστεων σε ωμό κρέας, *g.* Ενδιάμεσοι ξενιστές (άνθρωποι), *h.* Ταχυζωϊτες μεταδίδονται μέσω του πλακούντα στο έμβρυο (κάθετη μετάδοση), *i.* Μετάδοση μετά από μετάγγιση αίματος και *j.* μεταμόσχευση οργάνων [21].



Εικόνα 6: (α) Κύστη με βραδυζωΐτες. Το μέγεθος της κυμαίνεται μεταξύ 5 με 50 μm . (β) Ταχυζωΐτες του *T.gondii* μετά από χρώση Giemsa. Το μήκος τους κυμαίνεται από 4 έως 8 μm και το πλάτος τους 2 έως 3 μm [24].

1.2.2. Επιδημιολογία

Το πρωτόζωο *T.gondii* αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα παράσιτα παγκοσμίως που προκαλούν νόσο τόσο σε ανθρώπους όσο και στα ζώα. Το ποσοστό των μολυσμένων ατόμων είναι τόσο αυξημένο που παρόλο που η πλειονότητα είναι ασυμπτωματική εξακολουθεί να θεωρείται από τις κορυφαίες τροφιμογενείς παρασιτικές νόσους με τους πιο πολλούς συμπτωματικούς ασθενείς. Έχει τεκμηριωθεί ότι έως και το 63% των μολύνσεων από το παράσιτο *T.gondii* οφείλονται σε βρώση μολυσμένης τροφής και πιο συγκεκριμένα πρώτα ενοχοποιούνται το ατελώς ψημένο χοιρινό κρέας, το κρέας από βοοειδή, το κρέας από άλλα μηρυκαστικά καθώς και τα λαχανικά [25]. Όπως προαναφέρθηκε, σε διαφορετικές χώρες του πλανήτη, ακόμα και σε διαφορετικές περιοχές της ίδιας χώρας, ο επιπολασμός του παράσιτου *T.gondii* μπορεί να είναι διαφορετικός και να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Μετά από την μέτρηση αντισωμάτων στον ορό ατόμων από διαφορετικές περιοχές προέκυψε ότι μικρό επιπολασμό (από 10% έως 30%) παρουσιάζουν χώρες της Βόρειας Αμερικής, της Νοτιοανατολικής Ασίας και της Βόρειας Ευρώπης. Έναν μέτριο (30% έως 50%) επιπολασμό παρουσιάζουν οι περισσότερες χώρες της Κεντρικής και Νοτιάς Ευρώπης. Τέλος, αρκετά υψηλό επιπολάσομε παρουσιάζουν οι περισσότερες χώρες με τροπικό κλίμα (περιοχές κοντά στον ισημερινό) με επικρατέστερες τις χώρες με καιρικές συνθήκες την ζεστή και την υγρασία καθώς σε αυτό το περιβάλλον είναι πιο εύκολη η επιβίωση της ωκύστης [18], [26].

Καθοριστικό ρολό στην εξάπλωση του παρασίτου και στη μεταβολή του επιπολασμού διαδραματίζουν πολιτιστικοί, οικονομικοί, κοινωνικοί και διατροφικοί παράγοντες [26]. Στα ζώα η μόλυνση από *T.gondii* είναι το ίδιο συχνή με τους ανθρώπους και το ίδιο απειλητική για την ζωή τους και την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Η μόλυνση των ζώων και οι ζωικές δεξαμενές είναι μεγάλο οικονομικό και υγειονομικό πρόβλημα καθώς έχει καθοριστικό ρολό στην μετάδοση του παράσιτου,

ειδικά αν τα ζώα τα οποία μολύνονται προορίζονται για κατανάλωση [17]. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι και η μόλυνση της οικόσιτης γάτας είναι εξίσου σημαντική καθώς αποτελεί την σημαντικότερη δεξαμενή του παράσιτου και πηγή των ωκύστεων [27]. Στην κεντρική Αμερική, για τα περισσότερα κρούσματα τοξοπλάσμωσης που έχουν εμφανιστεί, ευθύνεται ο υπερβολικά αυξημένος πληθυσμός των αδέσποτων γάτων σε περιοχές με υγρασία και περιβαλλοντικές συνθήκες που ευνοούν την επιβίωση της ωκύστης [24].

Στην Ευρώπη, το *T.gondii* αποτελεί το δεύτερο σε σειρά πιο συχνό παθογόνο που μεταδίδεται με την τροφή. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα παρουσιάζεται αυξημένη μόλυνση στα κατσίκια, στα πρόβατα και γενικότερα σε ζώα που προορίζονται για κατανάλωση και χαμηλότερη μόλυνση στις οικόσιτες γάτες συγκριτικά με την υπόλοιπη Ευρώπη. Μείζον πρόβλημα της τροφιμογενούς εξάπλωσης τόσο στην Ελλάδα όσο και στην υπόλοιπη Ευρώπη αποτελεί ο ανεπαρκής έλεγχος των ζώων που προορίζονται για κατανάλωση καθώς και η μη ύπαρξη οδηγιών για την καταγραφή των ζώων που έχουν μολυνθεί με το παράσιτο *T.gondii* [25]. Στη Γαλλία έχει αναφερθεί αύξηση των μολύνσεων από το *T.gondii* εξαιτίας της προτίμησης αυτού του πληθυσμού για κατανάλωση ανεπαρκώς ψημένου κρέατος [24].

Οι μεγαλύτερη επιδημία τοξοπλάσμωσης που έχει παρατηρηθεί οφειλόταν σε μολυσμένο πόσιμο νερό με ωκύστες από μια δεξαμενή νερού σε μια επαρχιακή πόλη του Καναδά. Το μολυσμένο νερό έχει ενοχοποιηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν αλλά και μέχρι σήμερα για αρκετά ξεσπάσματα τοξοπλάσμωσης ειδικότερα σε γεωγραφικές περιοχές και χώρες με κακές συνθήκες διαβίωσης. Φαίνεται ότι οι περισσότεροι νοσούντες με τοξοπλάσμωση σε αυτές τις χώρες εντοπίζονται στην παιδική ηλικία και έχουν μολυνθεί μετά από πόση μολυσμένου νερού ενώ αντίθετα στις αναπτυγμένες χώρες ο μολυσμένος πληθυσμός είναι κυρίως ενήλικες και η μόλυνση από νερό είναι πιο σπάνια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Βραζιλία, όπου το 60% των παιδιών ηλικίας κάτω των 10 ετών εμφανίζει αντισώματα έναντι *T.gondii* και η κατάποση ωκύστης είναι η κυρία οδός μετάδοσης [26], [27].

Από μελέτη σε έγκυες γυναίκες, προέκυψε ότι ο παγκόσμιος επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης σε εγκύους αγγίζει και ίσως ξεπερνά το 33% με τα περισσότερα κρούσματα να εντοπίζονται στη Νότιο Αμερική και τα λιγότερα κρούσματα σε περιοχές του Δυτικού Ειρηνικού [17]. Η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση συγγενούς τοξοπλάσμωσης στον άνθρωπο είναι περίπου 190.100 νέες περιπτώσεις ανά έτος [25]. Σε 29 χώρες της Ευρώπης η αναφορά και η επιτήρηση της συγγενούς τοξοπλάσμωσης είναι υποχρεωτική [28]. Σε αυτές τις χώρες ο προληπτικός έλεγχος για τη διάγνωση της πιθανής τοξοπλάσμωσης στις εγκύους είναι υποχρεωτικός (κάποιες από αυτές τις χώρες είναι η Γαλλία και το Βέλγιο), ενώ σε άλλες χώρες της Ευρώπης είναι προαιρετικός (κάποιες από τις χώρες είναι η Τσεχία και η Ουγγαρία) [25].

Παρόλο που η ελλιπής αναφορά των κρουσμάτων είναι ένα μεγάλο πρόβλημα για την επιτήρηση και τον περιορισμό της τοξοπλάσμωσης τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, ο επιπολασμός της λοίμωξης έχει ελαττωθεί φανερά [16], [17]. Η μεταβολή των διατροφικών συνήθειων και η αποστείρωση των ζωοτροφών είναι κάποιοι από τους λόγους αυτής της μείωσης, ωστόσο υπάρχουν κάποια επαγγέλματα (εργαζόμενοι σε σφαγεία, κρεοπώλες) με υψηλό κίνδυνο μόλυνσης [25], [26]. Η παγκοσμιοποίηση και το εμπόριο δίνει την δυνατότητα της μεταφοράς νέων γενετικά ανασυνδιασμένων στελεχών του παράσιτου *T.gondii*, τα οποία δημιουργήθηκαν μετά από το στάδιο της σεξουαλικής αναπαραγωγής στον τελικό ξενιστή. Αυτά τα νέα στελέχη αποτελούν σημαντικές απειλές και έχουν εντοπιστεί μέχρι και σε μέρη που ο επιπολασμός της τοξοπλάσμωσης είναι γενικά χαμηλός [28].

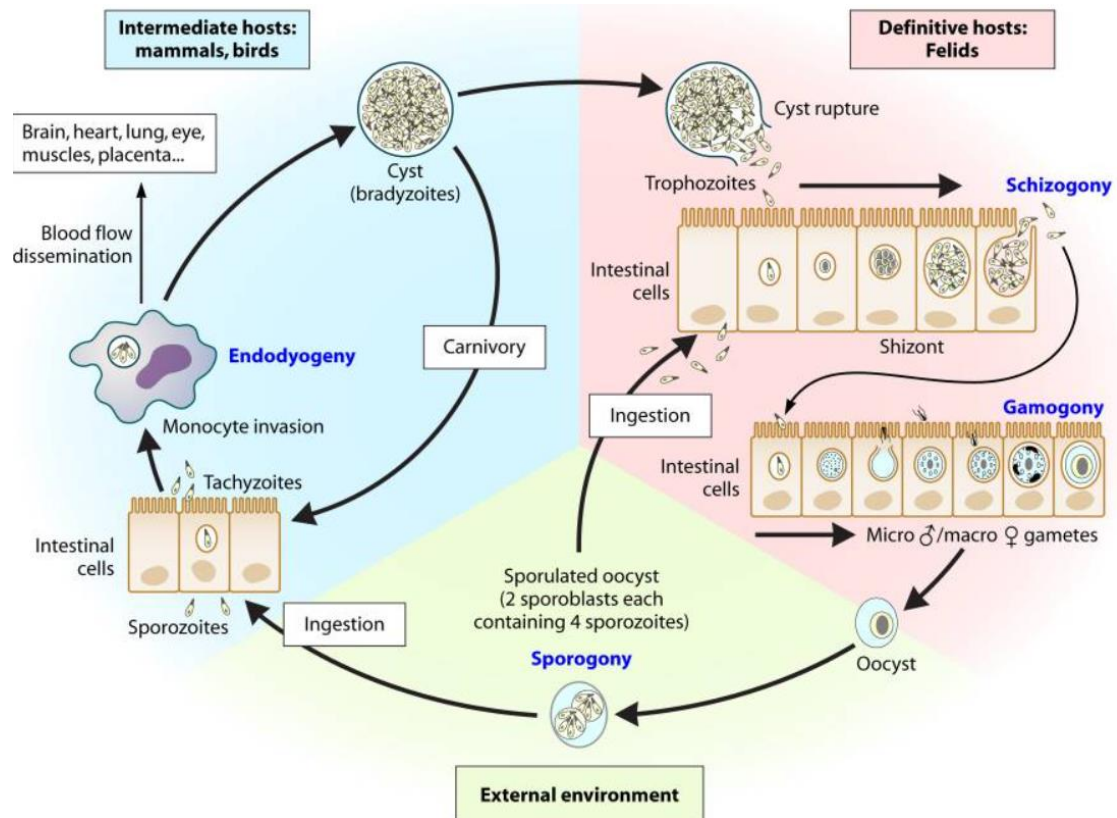
1.2.3. Κύκλος ζωής

Ο κύκλος ζωής του παράσιτου *T.gondii* θα μπορούσε να χωριστεί στον κύκλο ζωής που πραγματοποιεί στους τελικούς ξενιστές, στο περιβάλλον και στον κύκλο ζωής που πραγματοποιεί στους ενδιάμεσους ξενιστές όπως ο άνθρωπος [21].

Στους ενδιάμεσους ξενιστές, όπως ο άνθρωπος, μετά την κατανάλωση μολυσμένης τροφής, οι ωοκύστεις ή οι ιστικές κύστεις μεταφέρονται στο στομάχι. Οι όξινες συνθήκες που επικρατούν στο στομάχι σε συνδυασμό με τα πρωτεολυτικά ένζυμα οδηγούν στην καταστροφή του τοιχώματος των κύστεων και στην απελευθέρωση βραδιζωϊτών από τις ιστικές κύστεις και σποροζωϊτών από τις ωοκύστεις αντίστοιχα [21]. Το παράσιτο παίρνει την μορφή του ταχυζωϊτη και με την βοήθεια των πρωτεϊνών MICs που απελευθερώνονται από τις μικρονέμες (οργανίδιο του παράσιτου), κινείται ολισθαίνοντας προς το κύτταρο στόχο. Όλα τα κύτταρα με πύρινα αποτελούν στόχο του παράσιτου και ειδικότερα τα μακροφάγα, τα μυϊκά κύτταρα και τα κύτταρα του νευρικού συστήματος. Η ενεργός εισβολή του ταχυζωϊτη ξεκινά όταν έρθει σε επαφή με ένα κύτταρο του ξενιστή και είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο στο οποίο συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνει το παράσιτο, όπως οι RONS (πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τις ρόπτρες) και οι MICs [19], [21]. Το παράσιτο εισβάλλει μέσα στο κύτταρο δημιουργώντας από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή ένα παρασιτοφόρο κενοτόπιο. Το παράσιτο απελευθερώνει σε αυτή τη φάση έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών ROPs (εκκρίνονται από το οργανίδιο ρόπτρας), οι οποίες συμβάλουν στη δημιουργία περαιτέρω μεμβράνης γύρω από το παρασιτοφόρο κενοτόπιο, προσελκύουν διαφορά οργανίδια του κυττάρου όπως τα μιτοχόνδρια γύρω από το κενοτόπιο, εμποδίζουν την σύντηξη του κενοτόπιου με τα λυσοσώματα και άλλες πολλές περίπλοκες μεταβολές που βοηθούν στην επιβίωση των ταχυζωϊτών κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Ο ταχυζωϊτης πολλαπλασιάζεται μέσα στο παρασιτοφόρο κενοτόπιο με σχιζογονία και έπειτα από πολλούς κύκλους διαδοχικών πολλαπλασιασμών και ένα συγκεκριμένο ερέθισμα, η μεμβράνη του παρασιτοφόρου κενοτοπίου και του κυττάρου ξενιστή ρήγνυται. Οι νέοι ταχυζωϊτες απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, μεταφέρονται μέσω της λέμφου και του

αίματος σε διαφορά σημεία του σώματος και μπορούν πλέον να μολύνουν νέα εμπύρηννα κύτταρα. Μετά το πέρασμα κάποιων ημερών μετά την μόλυνση, οι ταχυζωΐτες που βρίσκονται μέσα στο παρασιτοφόρο κενοτόπιο αρχίζουν να επιβραδύνουν τον πολλαπλασιασμό τους και να μετατρέπονται σε βραδυζωΐτες οι οποίοι εκκρίνουν πρωτεΐνες που συμβάλουν στη δημιουργία κυστικού τοιχώματος. Έτσι δημιουργούνται ιστικές κύστες που περιέχουν πολυάριθμους βραδυζωΐτες, σε διάφορα μέρη του σώματος του ξενιστή και οι οποίες διαφέρουν σε μέγεθος και αριθμό βραδυζωΐτων. Σε περίπτωση που ο ξενιστής βρεθεί σε περίοδο ανοσοκαταστολής τότε έχουμε μετατροπή του βραδυζωΐτη σε ταχυζωΐτη και της χρόνιας τοξοπλάσμωσης σε οξεία αντίστοιχα [21].

Οι τελικοί ξενιστές (οικιακή γάτα και άλλα είδη *Felidae*), μολύνονται με την κατάποση μολυσμένου με ιστικές κύστες θηράματος ή με την κατανάλωση μολυσμένου με ωκύστες νερού. Μετά την κατάποση των κύστεων και την απελευθέρωση των βραδυζωΐτων ή σποροζωΐτων, τα πρώτα κύτταρα που θα μολύνουν είναι τα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου του τελικού ξενιστή με σκοπό να αρχίσουν τον άφυλο πολλαπλασιασμό με σχιζογονία (ενδοδυογένεση) μέσα στο παρασιτοφόρο κενοτόπιο [21]. Ύστερα από πολλούς κύκλους πολλαπλασιασμού και την μόλυνση πολλών επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου του τελικού ξενιστή, το παράσιτο αρχίζει να πολλαπλασιάζεται με αμφιγονικό τρόπο [19]. Οι μεροζωΐτες που απελευθερώθηκαν μετά από την καταστροφή του παρασιτοφόρου κενοτόπιου και της κυτταρικής μεμβράνης ενός μολυσμένου κυττάρου, διαφοροποιούνται σε μακρογαμέτες και σε μικρογαμέτες. Στη συνέχεια ο μακρογαμέτης με τον μικρογαμέτη ενώνονται και παράγουν την μη σποριομένη ωκύστη, η οποία περιέχει ένα σποροβλάστη (η μονή διπλοειδής φάση του παράσιτου). Η ωκύστη αποβάλλεται με τα περιττώματα της γάτας και μόλις έρθει σε επαφή με το περιβάλλον υπόκειται σε μια διαδικασία που ονομάζεται σπορίωση και πλέον περιέχει δυο σποροκύστες (επιστρέφει στην απλοειδή φάση). Στο τέλος, μόλις ολοκληρωθεί η ωρίμανση της ωκύστης καταλήγει να έχει μέσα τέσσερις σποροζωΐτες (**Εικόνα 7**) [21], [28].



Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής του παράσιτου *T.gondii* και οι μορφές του στον ενδιάμεσο και στον τελικό ξενιστή, καθώς και στο περιβάλλον [26].

1.2.4. Ανοσοπαθγένεια

Είναι φανερό πως η τοξοπλάσμωση είναι μια νόσος που εμφανίζεται κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές με μείωση στον αριθμό των Τ λεμφοκυττάρων [29]. Οι περισσότεροι ξενιστές που είναι ικανοί να ενεργοποιούν επαρκείς ανοσολογικές απαντήσεις μετά την μόλυνση των μονοκυττάρων με τον ταχυζωΐτη *T.gondii*, αναπτύσσουν ισχυρές έμφυτες ανοσολογικές αποκρίσεις. Σε αυτό το στάδιο μπορούν να παραχθούν πολλές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες οι οποίες με τη σειρά τους παρακινούν την έναρξη μιας προσαρμοστικής ανοσολογικής απάντησης με την συνεισφορά των Τ και Β λεμφοκυττάρων. Η επίκτητη ανοσία είναι απαραίτητη για την αντίσταση του ξενιστή στο παράσιτο καθώς ενεργοποιεί τα μολυσμένα κύτταρα να παράγουν αυτόνομες κυτταρικές αποκρίσεις με σκοπό τον περιορισμό του παράσιτου. Τις περισσότερες φορές αυτές οι αποκρίσεις δεν επαρκούν για να εξουδετερώσουν το παράσιτο αλλά μετατρέπουν την οξεία φάση της μόλυνσης σε χρόνια με την μετατροπή του ταχυζωΐτη σε βραδυζωΐτη μέσα σε ιστικές κύστεις [30]. Οι ανοσοανεπαρκείς ξενιστές δεν εμφανίζουν επαρκείς ανοσολογικές αποκρίσεις για να διατηρήσουν την χρόνια λοίμωξη, για αυτό και σε σύντομο χρονικό διάστημα είναι πιθανό να εμφανίσουν κλινική ασθένεια. Σε αντίθεση, οι ανοσοεπαρκείς αναπτύσσουν μια έντονη κυτταρομεσολαβούμενη ανοσολογική απάντηση και τα

κύτταρα τους απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες IFN- γ , καταφέροντας να διατηρήσουν την ασθένεια σε υποκλινικό επίπεδο [29].

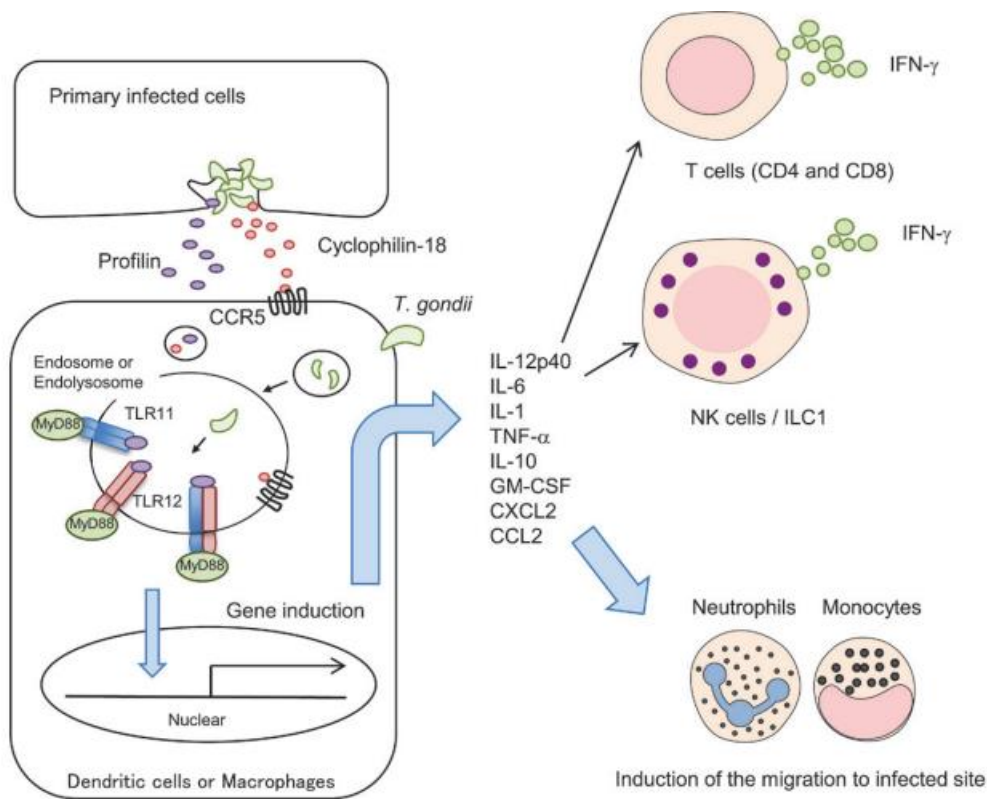
Η αναγνώριση του πρωτοζώου *T.gondii* από την έμφυτη ανοσία είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή με σκοπό τον περιορισμό της εξάπλωσης και πολλαπλασιασμού του παράσιτου. Μετά από πολλά πειράματα σε ποντίκια έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς TLRs, που υπάρχουν σε πολλά κύτταρα αλλά κυρίως στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα μακροφάγα, αναγνωρίζουν μικροβιακές δομές του παράσιτου που ονομάζονται μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με το παθογόνο (PAMPs). Αν και εμπλέκεται ένας σημαντικός αριθμός υποδοχέων TLR στην ανίχνευση των παράσιτων *T.gondii*, οι υποδοχείς TLR11 και TLR12 αποτελούν τους πιο σημαντικούς και εντοπίζονται μέσα στα ενδολυσosomalία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs). Οι υποδοχείς αυτοί αναγνωρίζουν και συνδέονται με την πρωτεΐνη προφιλίνη που απελευθερώνει το *T.gondii* και η οποία είναι κρίσιμη για την εισβολή, τον πολλαπλασιασμό και την έξοδο του παράσιτου από το κύτταρο ξενιστή. Επίσης έχει αναφερθεί και η ύπαρξη της πρωτεΐνης κυκλοφιλίνης-18, η οποία συνδέεται στον υποδοχέα CCR5 συμμετέχοντας στην αναγνώριση του παράσιτου από τα δενδριτικά κύτταρα. Μετά την αναγνώριση της προφιλίνης από τους υποδοχείς TLR11 και TLR12 των DCs, ενεργοποιείται μια περίπλοκη οδός στην οποία συμμετέχει ενεργά η πρωτεΐνη MYD88. Το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης αυτής της οδού από την προφιλίνη και την κυκλοφιλίνη-18 είναι η ενεργοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν χημειοκίνες και κυτταροκίνες με σημαντικότερη την IL-12 [30], [31].

Εκτός από τους βασικούς TLRs, TLR11 και TLR12 υπέχουν και άλλοι ενδοσωμικοί υποδοχείς όπως ο TLR7 και TLR9 που αναγνωρίζουν RNA και DNA *T.gondii* αντίστοιχα. Όπως και οι βασικοί TLRs έτσι και αυτοί, σε συνεργασία με την MYD88, προωθούν την έκφραση πολλών κυτταροκινών από τα DCs. Τέλος, έχει δειχθεί πως οι υποδοχείς TLR2 και TLR4, οι οποίοι εντοπίζονται στην επιφάνεια των APCs, αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας του παράσιτου και ρυθμίζουν την παραγωγή του TNF- α και CCL2 από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [31].

Αν και έχει αποδειχθεί ότι στα ανθρώπινα κύτταρα δεν εκφράζονται οι TLR12 και TLR11, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα τελικά παράγουν IL-12 και τις άλλες προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που είναι απαραίτητες για την άμυνα του ξενιστή. Αυτό υποδηλώνει ότι στα ανθρώπινα κύτταρα μπορεί να συμμετέχει κάποιος άλλος TLR που δεν έχει ακόμα μελετηθεί ή κάποιος άγνωστος μηχανισμός που να ενεργοποιεί τα APCs προς παραγωγή των απαραίτητων κυτταροκινών. Ακόμα μας είναι άγνωστο αν στους ανθρώπους η αναγνώριση της προφιλίνης είναι αρκετή από μόνη της να επάγει μια φλεγμονώδη απόκριση [30], [31].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μετά την αναγνώριση του *T.gondii* και των πρωτεϊνών που εκκρίνει από τους TLRs, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, διεγερτικά μόρια και προχωρούν στην

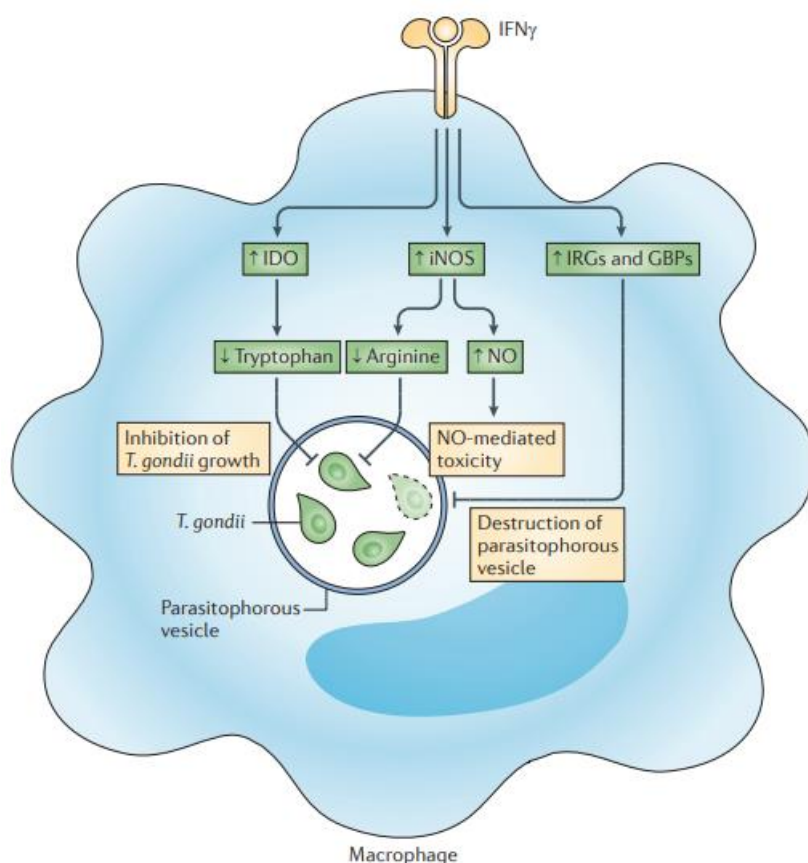
αντιγονοπαρουσίαση [31]. Τα δενδριτικά κύτταρα αποτελούν τα σημαντικότερα APCs για την ανίχνευση *T.gondii* και την παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-12 η οποία με τη σειρά της δρα στα κύτταρα NK, στα CD4⁺ T κύτταρα και στα CD8⁺ T κύτταρα, επάγει τον πολλαπλασιασμό τους και αυτά με την σειρά τους μεσολαβούν στην κυτταροτοξικότητα παράγοντας μεγάλες ποσότητες IFN-γ [30]. Η παραγωγή IFN-γ από τα κύτταρα NK μετά την ενεργοποίησή τους με την IL-12 είναι μεγάλης σημασίας για την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά την οξεία φάση της λοίμωξης από *T.gondii*, καθώς δείχνει την δυνατότητα παραγωγής αυτής της σημαντικής κυτταροκίνης με τρόπο ανεξάρτητο από τα T κύτταρα. Τα CD4⁺ T κύτταρα παράγουν και την IL-2, η οποία δρα στα CD8⁺ T κύτταρα και προωθεί τον πολλαπλασιασμό τους και την επαρκή απόκριση IFN-γ [29]. Επιπρόσθετα, οι χημειοκίνες που παράγονται μετά την αναγνώριση του *T.gondii* από τα APCs, όπως η CCL2 και η CXCL2, ωθούν τα ουδετερόφιλα και τα μακαροφάγα στο σημείο της μόλυνσης (Εικόνα 8) [30].



Εικόνα 8: Η απελευθέρωση προφιλίνης και κυκλοφιλίνης-18 από ένα μολυσμένο κύτταρο οδηγεί στην έκφραση κυτταροκινών και χημειοκινών από τα APCs μέσω ενεργοποίησης και μεσολάβησης των TLRs και της πρωτεΐνης MyD88. Η IL-12 επάγει τα T και NK κύτταρα να πράξουν IFN-γ ενώ οι χημειοκίνες CCL2 και CXCL2 ωθούν τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης [30].

Η IFN-γ είναι μια κυτταροκίνη καθοριστικής σημασίας για τον περιορισμό του παράσιτου και την ενεργοποίηση των μολυσμένων μακροφάγων ώστε να εξουδετερώσουν το παράσιτο. Η IFN-γ έχει πολειοτροπικές δράσεις στα μολυσμένα κύτταρα. Αρχικά, προκαλεί αναστολή της αναπαραγωγής του παράσιτου με ενεργοποίηση της έκφρασης ινδολαμίνης-2,3- διοξυγονάσης (IDO) και παρακινεί τις συνθάσες μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), καθώς επίσης και την έκφραση των

πρωτεϊνών τελεστών GTPάσες που σχετίζονται με την ανοσία (IRGs) και των πρωτεϊνών δέσμησης γουανιλικού (GBPs) (Εικόνα 9). Οι μηχανισμοί που προωθούνται από την IFN- γ , διαφέρουν σε διάφορους τύπους κυττάρων, αλλά η έκφραση του υποδοχέα της κυτταροκίνης αυτής, τόσο σε κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών όσο και σε στρωματικά κύτταρα, είναι απαραίτητη για την προστασία του ξενιστή, καθώς το *T. gondii* μπορεί να μολύνει οποιοδήποτε εμπύρηνο κύτταρο [31].



Εικόνα 9: Κάποιες από τις δράσεις της IFN- γ στα μακροφάγα. Η IDO μειώνει την ποσότητα της τρυπτοφάνης, ενός απαραίτητου αμινοξέος για την ανάπτυξη του *T. gondii*. Το iNOS, εκτός από τη δημιουργία του εξαιρετικά τοξικού μεταβολίτη μονοξειδίου του αζώτου (NO), περιορίζει την αναπαραγωγή του παρασίτου εξαντλώντας την αργινίνη, ένα απαραίτητο αμινοξύ για την ανάπτυξη του *T. gondii*. Οι IRGs και οι GBPs είναι υπεύθυνες για την καταστροφή του παρασιτοφόρου κενοτόπιου, ενός ειδικού οργανιδίου που περιέχει το *T. gondii* και το προστατεύει από τα ενδολυσώματα. Μόλις το παρασιτοφόρο κενοτόπιο καταστραφεί, τα παράσιτα *T. gondii* απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και είναι ευάλωτο να καταστραφεί [31].

Τα τελευταία χρόνια πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια έδειξαν πως ένας σημαντικός αριθμός κυτταροκινών συμμετέχει στην κατεύθυνση και διαφοροποίηση της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης ενάντια του *T. gondii* [32]. Εκτός από την IFN- γ (ιντερφερόνη τύπου II) που εμπλέκεται κρίσιμα στην ενεργοποίηση διαφόρων αντιπαρασιτικών και ανοσορυθμιστικών μηχανισμών στα μολυσμένα κύτταρα, η IFN- α και β (ιντερφερόνες τύπου I) φαίνεται να ενισχύουν την παραγωγή της IFN- γ και να έχουν κάποιο ρόλο στο περιορισμό του παράσιτου παρόλο που έχει διαπιστωθεί ότι έχουν κυρίως αντιική δράση. Επίσης σημαντικό

ρόλο έχει και ο TNF- α ο οποίος παράγεται από ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα όταν μολυνθούν με το παράσιτο και έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τα μακροφάγα και να συνεργάζεται με την IFN- γ ενισχύοντας την αντιπαρασιτική της δράση. Έχει βρεθεί πως η επανενεργοποίηση της χρόνιας φάσης της τοξοπλάσμωσης σε ενεργό νόσο συμβαίνει μετά από εξουδετέρωση της IFN- γ και του TNF- α . Η IL-1, που παράγεται με παρόμοια κινητική με τον TNF- α , είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία έχει βρεθεί πως αναπτύσσει φλεγμονώδεις αντιδράσεις κατά την εγκεφαλική τοξοπλάσμωση (TE). Αν και η IL-1 έχει μικρή σημασία για τον έλεγχο του πολλαπλασιασμού του παράσιτου, φαίνεται να συνεργάζεται με τις κυτταροκίνες TNF- α και IFN- γ και να ενισχύει την ικανότητα τους να αναστέλλουν την αντιγραφή του παράσιτου. Η IL-12 όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι σημαντική κυτταροκίνη για την ανάπτυξη προσαρμοστικών αποκρίσεων αν και έχει μικρότερο ρόλο στη χρόνια από ότι στην οξεία φάση της λοίμωξης. Αυτό επαληθεύεται διότι η μειωμένη παραγωγή της IL-12, κατά την οξεία φάση, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της IFN- γ , στην επαγωγή Th2 απόκρισης και παραγωγή των κυτταροκινών IL-4 και IL-10 [29].

Η επαγωγή αποκρίσεων τύπου Th1, που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της IFN- γ , και αποκρίσεων τύπου Th2, που χαρακτηρίζονται από την παραγωγή της IL-4 και της IL-5, συνδέονται ευρέως με την αντίσταση και την ευαισθησία αντίστοιχα έναντι των ενδοκυττάρων παθογόνων. Αυτές οι απαντήσεις έχουν την τάση να αλληλεπικαλύπτονται, καθώς μπορούν να ρυθμίζουν αρνητικά η μία την άλλη. Ενώ είναι προφανές ότι η ανοσία έναντι του *T. gondii* συνδέεται με μια ισχυρή απάντηση τύπου Th1, υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι μια παρόμοια ισχυρή απάντηση τύπου Th2 αναπτύσσεται σε απουσία απάντησης τύπου Th1 ή ότι η παραγωγή κυτταροκινών Th2 έχει κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό της ευαισθησίας στην μόλυνση. Αξίζει να αναφερθεί ότι, μελέτες έχουν δείξει πως κυτταροκίνες τύπου Th2 έχουν κάποιους ρόλους στην αντίσταση έναντι του *T. gondii*, αν και τα περισσότερα δεδομένα είναι αντιφατικά και ασαφή [29].

Γενικά, έχει παρατηρηθεί από μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα ότι η IL-4 συμβάλει στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των B και T κυττάρων καθώς και στην αναστολή της παραγωγής IDO που προκαλείται από την IFN- γ στους ινοβλάστες, επιτρέποντάς έτσι την αναπαραγωγή του *T. gondii* στον εγκέφαλο. Η IL-5 δρα στα ηωσινόφιλα και στα B λεμφοκύτταρα επάγοντας την παραγωγή των αντισωμάτων έναντι του παρασίτου, αλλά οι αναφερόμενες έρευνες στη δράση αυτής της κυτταροκίνης παρουσιάζουν αντιφατικά δεδομένα. Επίσης, η IL-10 έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την δραστηριότητα των μακροφάγων που επάγει η IFN- γ , ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό του *T. gondii*. Ωστόσο, η IL-10 δεν έχει αναγνωριστεί αυστηρά ως αναστολέας της Th1 απόκρισης αλλά περισσότερο ως ρυθμιστής της φλεγμονής προσπαθώντας να εξισορροπήσει τις αποκρίσεις Th1 και Th2. Τέλος, ο TNF- β έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τα ενεργοποιημένα μακροφάγα όπως και ότι ανταγωνίζεται τη δράση της IL-12 στα κύτταρα NK. Πρέπει να τονιστεί ότι η δράση των κυτταροκινών κατά την μόλυνση από *T. gondii* πολλές φορές δεν μας είναι πλήρως κατανοητή και

ενδεχομένως να είναι από λίγο έως πολύ διαφορετική στον άνθρωπο από ότι στα ποντίκια [29].

1.3. HIV

1.3.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Το 1981 παρατηρήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής περιπτώσεις σαρκώματος Karosi και πνευμονίας που έχει προκληθεί από *Pneumocystis carinii* (*jirovecii*) σε άνδρες που έρχονται σε σεξουαλική επαφή με άνδρες (MSM). Έρευνες του CDC ανακάλυψε πως αυτά τα νοσήματα οφείλονταν στο σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS), επισημαίνοντας μια ιογενή αιτιολογία. Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), ο οποίος προκαλεί το AIDS, απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1983, σύντομα διαπιστώθηκε ότι είχε διαπεράσει το φραγμό πίθηκων- ανθρώπων αρκετά χρονιά πριν την πρώτη απομόνωση, και είχε εξαπλωθεί ευρέως σε πολλούς πληθυσμούς της κεντρικής και ανατολικής Αφρικής [33].

Ο HIV είναι μέλος του γένους *Lentivirus* (φακοϊός) και της οικογένειας *Retroviridae* (ρετροϊός) και όπως και οι υπόλοιποι φακοϊοί χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο διάστημα από την αρχική μόλυνση μέχρι την ανάπτυξη συμπτωμάτων [34]. Έχουν απομονωθεί δυο τύποι HIV, ο HIV τύπου 1 (HIV-1), ο οποίος αποτελεί τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα του AIDS και ο HIV τύπου 2 (HIV-2), ο οποίος περιορίζεται κυρίως σε κάποιες περιοχές της Κεντρικής και Δυτικής Αφρικής. Τόσο ο HIV-1 όσο και HIV-2 μπορούν να προκαλέσουν AIDS, ωστόσο ο HIV-2 προκαλεί πιο συχνά νόσο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, είναι λιγότερο λοιμογόνος και η πορεία της μόλυνσης διαρκεί περισσότερο χρόνο μέχρι να εξελιχθεί σε AIDS [35].

Ο HIV-2 ταξινομείται σε ομάδες από A έως G και ανασυνδιασμένες μορφές (CRFs) και εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με τον ιό της ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (SIV) που απομονώθηκε από το είδος πιθήκου *Sooty Mangabey*. Ο HIV-1 είναι πανδημικό στέλεχος και απαρτίζεται από 4 ομάδες: την M (Major) , την N (non-M/non-O) , την O (Outlier) και την P. Η κάθε ομάδα αντιπροσωπεύει ανεξάρτητα γεγονότα μετάδοσης του SIV από χιμπατζήδες (*Pan troglodytes troglodytes*) για τις ομάδες M, N, O και από γορίλλες για την ομάδα P. Η ομάδα N έχει εντοπιστεί σε λίγες περιπτώσεις στο Καμερούν, η ομάδα O περιορίζεται στο Καμερούν και άλλες γειτονικές χώρες, ενώ η ομάδα P έχει ελάχιστα κρούσματα. Η ομάδα M έχει παγκόσμια εξάπλωση και ταξινομείται σε 9 γενετικούς υπότυπους ή clades (A-D, F-H, J, K), υπο-υπότυπους (A1, A2, F1, F2), CRFs καθώς και σε συγκεκριμένους πληθυσμούς μοναδικές ανασυνδιασμένες μορφές (URFs) [33], [36]. Ο υπότυπος C κυριαρχεί στην Αφρική και στην Ινδία και το 2007 αποτελούσε το 48% των περιπτώσεων HIV παγκοσμίως ενώ ο υπότυπος B συναντάται κυρίως στην Δυτική Ευρώπη, την Αμερική και την Αυστραλία [36]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μετανάστευση και η ανάμιξη

πληθυσμών έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της κατανομής των διάφορων υπότυπων καθώς και τη δημιουργία νέων CRF [33].

Ο HIV προσβάλλει και καταστρέφει κυρίως τα CD4⁺ Τ λεμφοκύτταρα όπως και αλλά κύτταρα του ανοσοποιητικού που έχουν CD4 υποδοχείς όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Επίσης, μπορεί να εισβάλει και σε κάποια είδη κυττάρων που δεν έχουν CD4 υποδοχείς όπως τα αστροκύτταρα και τα νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα [36]. Ο HIV επιβιώνει μόνο εντός της κυκλοφορίας του αίματος και του λεμφικού ιστού και είναι εύκολο να αδρανοποιηθεί με έκθεση σε απορρυπαντικά και απολυμαντικά. Επομένως, η μετάδοση του ιού επιτυγχάνεται μόνο μετά από έκθεση σε μολυσμένο αίμα ή σε εκκρίσεις με παρουσία δερματικής βλάβης, όπως συμβαίνει κατά τη χρήση βελονιών, αιχμηρών εργαλείων ή εκδορών στους ιστούς του βλεννογόνου κατά τη σεξουαλική επαφή. Η μετάδοση του HIV εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα βιολογικά χαρακτηριστικά του ιού, τη συγκέντρωσή του στα μολυσμένα σωματικά υγρά και, τέλος, την ευαισθησία του ξενιστή [35]. Επίσης παρουσιάζεται μεγάλος κίνδυνος μετάδοσης του HIV από την μολυσμένη μητέρα στο έμβρυο ή στο νεογνό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, την ώρα του τοκετού ή με τον θηλασμό [34].

Λίγες μέρες έως λίγες εβδομάδες μετά την έκθεση του ατόμου στον ιό, τα περισσότερα άτομα παρουσιάζουν γριπώδη συμπτώματα ή συμπτώματα που μοιάζουν με λοιμώδη μονοπυρήνωση όπως πυρετός, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, στοματικά έλκη, λεμφαδενοπάθεια, αρθραλγία, φαρυγγίτιδα, κακουχία, απώλεια βάρους και μυαλγία. Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί να διαφέρουν και η συμπτωματική φάση της οξείας λοίμωξης από HIV-1 διαρκεί περίπου 7 έως 10 μέρες. Η οξεία λοίμωξη συνοδεύεται επίσης και από σημαντική πτώση των CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων όπως και από έντονη ιαιμία (ανιχνεύεται με RT-qPCR). Μετά από λίγες εβδομάδες, τα περισσότερα άτομα εισέρχονται σε μια κλινικά ασυμπτωματική περίοδο, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη ειδικών ανοσοαποκρίσεων (CD8⁺ κυτταροτοξικά, αντισώματα έναντι του HIV). Η ιαιμία πέφτει κάτω από τα επίπεδα ανίχνευσης και τα CD4⁺ ανεβαίνουν ξανά αλλά δεν καταφέρνουν να φτάσουν στο επίπεδο που ήταν πριν την μόλυνση. Κατά τη διάρκεια της ασυμπτωματικής περιόδου, ο ιός αναπαράγεται και προκαλεί αργή αλλά προοδευτική απώλεια των CD4⁺ κυττάρων και εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει από μήνες έως και χρονιά ανάλογα με την ικανότητα του ατόμου να περιορίζει τον πολλαπλασιασμό του ιού και να ανασυνθέτει τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα. Όταν η καταστροφή των λεμφικών ιστών είναι εκτεταμένη και ο αριθμός των CD4⁺ λεμφοκυττάρων είναι εξαιρετικά χαμηλός (κάτω από 200 κύτταρα/μL) το άτομο βρίσκεται στο στάδιο του AIDS. Το άτομο σε αυτό το στάδιο είναι ευάλωτο σε πολλές ευκαιριακές λοιμώξεις από βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα καθώς μπορεί να εμφανίσει και διάφορες νεοπλασίες. Οι πιο χαρακτηριστικές λοιμώξεις του AIDS προκαλούνται από *Microcystis carinii*, *Candida albicans*, κυτταρομεγαλοϊό, έρπη ζωστήρα ή εντερικά παράσιτα (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Isospora belli*) τα οποία είναι απειλητικά για την ζωή του

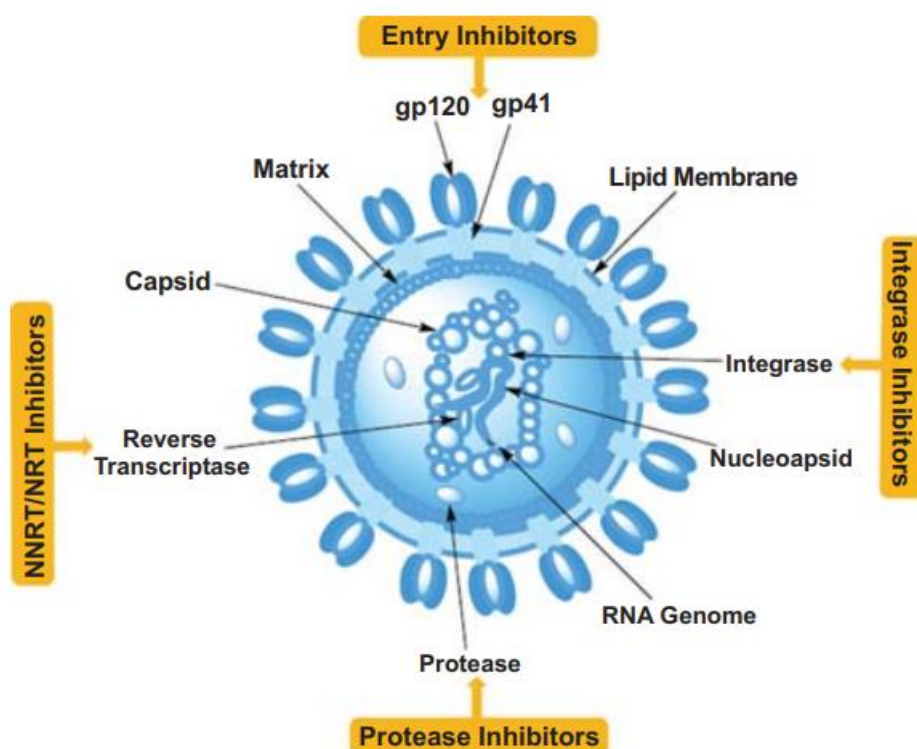
ασθενή. Το στάδιο του AIDS συνοδεύεται επίσης και από λεμφαδενίτιδα, σημαντική μείωση του σωματικού βάρους, πυρετό και αναπνευστικές και γαστρεντερικές δυσλειτουργίες. Τέλος, ο ασθενείς μπορεί να αναπτύξει εγκεφαλοπάθεια, σάρκωμα Karosi και λεμφώματα, τα οποία επιδεινώνουν την κλινική πορεία της νόσου και οδηγούν σε θάνατο [35].

Το ιοσωμάτιο του HIV είναι σφαιρικό και έχει διάμετρο περίπου 100nm και το εξωτερικό του αποτελείται από μια μεμβράνη λιποπρωτεϊνών, η οποία ονομάζεται φάκελος. Στην επιφάνεια του φακέλου εντοπίζονται σύμπλοκα ετεροδιμερών πρωτεϊνών τα οποία σχηματίζονται με την ένωση της επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης gp120 με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη gp41. Το ιοσωμάτιο μπορεί επίσης να περιλαμβάνει στην επιφάνεια του διάφορες πρωτεΐνες που έχουν προέλθει από την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή κατά την διαδικασία εκβλάστησης όπως οι πρωτεΐνες HLA I και II και οι πρωτεΐνες προσκόλλησης ICAM-1. Στην εσωτερική μεμβράνη του φακέλου υπάρχει η πρωτεϊνική μήτρα που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη p17. Η p17 και ο ιϊκός φάκελος περιβάλλουν το καψίδιο το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη p24. Μέσα στο νουκλεοκαψίδιο περιέχονται δύο θετικά φορτισμένα μονόκλιωνα μόρια RNA (+ssRNA), το κάθε ένα συνδεδεμένο με ένα tRNA^{lys3} και με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση, ιντεγκράση και πρωτεάση (**Εικόνα 10**) [35], [37], [38].

Το γονιδίωμα των ssRNA του ιού αποτελείται από τρία δομικά γονίδια, gag, pol και env καθώς και από αλλά ρυθμιστικά γονίδια. Το γονίδιο gag κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του πυρήνα p24, p7, p6 και την πρωτεΐνη μήτρας p17. Επιπρόσθετα, το γονίδιο env κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες p120 και p41 του ιϊκού φακέλου. Το γονίδιο pol κωδικοποιεί ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του ιού. Σημαντικά ρυθμιστικά γονίδια αποτελούν επίσης το γονίδιο tat που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη tat, η οποία προωθεί την έναρξη της έκφρασης των γονιδίων του ιού και το γονίδιο rev που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη rev που στη συνέχεια βοηθά στην εξαγωγή του mRNA και του γονιδιωματικού RNA από τον πυρήνα του κυττάρου και φροντίζει για την ορθή επεξεργασία τους [35].

Ο HIV μετρά εκατομμύρια μολύνσεις και θανάτους από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 που απομονώθηκε. Ωστόσο, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος με την εύρεση και εξέλιξη της υψηλής δράσης αντιρετροϊκής θεραπείας (HAART), η οποία κατάφερε να μετατρέψει τον HIV από μια θανατηφόρα ασθένεια σε μια χρόνια πάθηση, χωρίς όμως να αποτελεί μόνιμη θεραπεία [33]. Σήμερα, τα άτομα που διαγιγνώσκονται με HIV λαμβάνουν HAART άμεσα με σκοπό να μειώσουν το ιϊκό φορτίο, να ανακάμψει ο αριθμός των CD4⁺ κυττάρων και να περιορίσουν την μετάδοση της ασθένειας. Οι ασθενείς παρακολουθούνται διότι αν το ιϊκό φορτίο αυξηθεί και τα CD4⁺ κύτταρα δεν ανακάμψουν, θα πρέπει να αλλάξει θεραπευτικό σχήμα [39]. Κάποια από τα φάρμακα που έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται ευρέως είναι οι αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs/NNRTIs), οι αναστολείς πρωτεάσης (PIs), οι αναστολείς σύντηξης και οι αναστολείς ιντεγκράσης

(INSTIs) (Εικόνα 10). Χρησιμοποιείται επίσης και μια προληπτική θεραπεία, η PrEP (Pre-Exposure Prophylaxis), για HIV αρνητικά άτομα που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αποκτήσουν τον ιό [37].



Εικόνα 10: Η δομή του ιοσωμάτιου και οι διάφοροι αναστολείς που χρησιμοποιούνται στην HAART [37].

1.3.2. Επιδημιολογία

Ο HIV αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημοσίας υγείας καθώς συνολικά 85,6 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν νοσήσει με HIV και 40,4 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν χάσει την ζωή τους παγκοσμίως εξαιτίας συλλοιμώξεων- AIDS, από την αρχή της καταγραφής των κρουσμάτων [40]. Αν και λιγότεροι άνθρωποι διαγιγνώσκονται με HIV, ο επιπολασμός αυξάνεται διότι τα άτομα που λαμβάνουν HAART ζουν περισσότερο [36]. Από τα δεδομένα που προέκυψαν από δείγματα που συλλέχθηκαν το 2022, υπολογίζεται ότι συνολικά περίπου 39,0 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούσαν με HIV, εκ των οποίων το 1,5 εκατομμύριο ήταν κάτω των 15 ετών, το 53% όλων των ανθρώπων που νοσούσε ήταν γυναίκες και κορίτσια και το 86% γνώριζε ότι νοσεί με αυτόν τον ιό. Επίσης, σημειώθηκαν 1,3 εκατομμύριο νέες μολύνσεις, εκ των οποίων τα 130.000 ήταν κάτω των 15 ετών και συνολικά 630.000 νέοι θάνατοι. Οι νέες μολύνσεις παρουσίασαν σημαντική μείωση (59%) από την κορύφωση το 1995 (3,2 εκατομμύρια νέες μολύνσεις). Επιπρόσθετα, το 2022 σημειώθηκαν 630.000 νέοι θάνατοι από ασθένειες που σχετίζονται με το AIDS, παρουσιάζοντας μια σημαντική μείωση από την κορύφωση το 2004 (2,0 εκατομμύρια θάνατοι) αλλά και από το 2010 (1,3 εκατομμύρια θάνατοι). Αξίζει να αναφερθεί ότι το 76% (29,8 εκατομμύρια άνθρωποι)

του συνολικού αριθμού ανθρώπων που νοσούν με HIV, είχε πρόσβαση στην HAART το 2022 και το 71% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Οι κύριοι πληθυσμοί που διατρέχουν τον πιο αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν και παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό είναι οι εργαζόμενοι του σεξ, οι άνδρες που έρχονται σε σεξουαλική επαφή με άνδρες (MSM), οι χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών (PWID), τα τρανς άτομα και οι φυλακισμένοι [40], [41].

Σύμφωνα με των WHO, τα δύο τρίτα των ατόμων που νοσούσε με HIV το 2022 εντοπίζονταν στην Αφρικανική Ήπειρο [42]. Σε αυτή τη γεωγραφική περιοχή εκτιμάται ότι το 2022, περίπου 25,6 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με HIV, από τους οποίους το 90% γνώριζε για την κατάσταση του, το 76% λάμβανε HAART και το 76% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Εκτιμάται ότι περίπου 20,9 εκατομμύρια άνθρωποι λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος αυτού του έτους. Επίσης σημειώθηκαν 660.000 νέες μολύνσεις και 380.000 θάνατοι σε αυτή την περιφέρεια. Στην Αμερικανική Ήπειρο, συνολικά περίπου 3,8 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούσαν με HIV το 2022, εκ των οποίων το 86% γνώριζε ότι νοσεί με τον ιό, το 71% λάμβανε HAART και το 65% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Περίπου 2,7 εκατομμύρια λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος του έτους σε αυτή την περιοχή. Ακόμα, σημειώθηκαν 160.000 νέες μολύνσεις και 41.000 θάνατοι σε αυτή την περιφέρεια. Στην περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας, περίπου 3,9 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούσαν συνολικά με τον HIV το 2022, εκ των οποίων 81% γνώριζε ότι νοσεί από τον ιό, το 65% λάμβανε HAART και το 61% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Περίπου 2,6 εκατομμύρια άνθρωποι λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος του χρόνου σε αυτή την περιφέρεια. Ακόμα, σημειώθηκαν 110.000 νέες μολύνσεις και 52.000 νέοι θάνατοι. Στην περιφέρεια της Ανατολικής Μεσογείου, περίπου 490.000 άνθρωποι ζούσαν με HIV το 2022, εκ των οποίων το 38% γνώριζε για την κατάσταση του, το 27% λάμβανε HAART και το 24% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Περίπου 130.000 άνθρωποι λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος του έτους σε αυτή την περιφέρεια. Επίσης, σημειώθηκαν 56.000 νέες μολύνσεις και 20.000 νέοι θάνατοι. Στην περιοχή του Δυτικού Ειρηνικού εκτιμάται ότι συνολικά 2,2 εκατομμύρια άτομα νοσούσαν το 2022, εκ των οποίων 81% γνωρίζει ότι νοσεί με τον ιό, το 73% λάμβανε HAART και το 70% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Περίπου 1,6 εκατομμύριο άτομα λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος εκείνου του έτους. Επίσης σημειώθηκαν περίπου 140.000 νέες μολύνσεις HIV και 51.000 θάνατοι από ασθένειες σχετιζόμενες με τον HIV. Στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο, συνολικά 3,0 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούσαν με τον HIV το 2022, εκ των οποίων το 72% γνώριζε ότι νοσεί με τον ιό, το 63% λάμβανε την HAART και το 60% είχε κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Περίπου 1,9 εκατομμύριο άνθρωποι λάμβαναν HAART μέχρι το τέλος εκείνης της χρονιάς. Επιπρόσθετα, σημειώθηκαν περίπου 180.000 νέες μολύνσεις με HIV και 52.000 θάνατοι [41].

Ο HIV εξακολουθεί να αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεταδοτικές ασθένειες στην Ευρώπη [43]. Το 2022, στην Ευρωπαϊκή περιφερικά του WHO, όπως και στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των νέων διαγνώσεων συγκριτικά με το 2021, κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στην

αυξημένη μετανάστευση τον τελευταίο χρόνο όπως και στο γεγονός ότι κατά τη διάρκεια του έτους πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια μέσω υπηρεσιών τεστ να διαγνωστεί το ποσοστό των ατόμων που δεν διαγνωστικέ κατά την πανδημία. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι αν ο αριθμός των ατόμων που ζουν σε αυτή την περιοχή χωρίς διάγνωση αυξάνεται και η ελλιπής διάγνωση εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα. Η οδός μετάδοσης καθώς και ο πληθυσμοί που παρουσιάζουν υψηλό επιπολασμό μπορεί να διαφέρουν σε κάθε γεωγραφική περιοχή της Ευρώπης. Στην δυτική και κεντρική περιοχή της ΕΕ η σεξουαλική μετάδοση μεταξύ των MSM αποτελεί την κυρία οδό μετάδοσης με τα περισσότερα κρούσματα να παρατηρούνται στους πληθυσμούς των μεταναστών από άλλες περιοχές, ενώ στην ανατολική περιοχή οι κύριοι τρόποι μετάδοσης είναι η σεξουαλική ετεροφυλοφιλική επαφή και η ενέσιμη χρήση ναρκωτικών. Από τα συνολικά άτομα που διαγνωστήκαν με HIV το 2022 στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο, το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν στην ανατολή και το μικρότερο στη δύση. Αξίζει να αναφερθεί ότι το ποσοστό στην ανατολική Ευρώπη είναι φανερά δυσανάλογα αυξημένο από το ποσοστό της δυτικής και του κεντρικής Ευρώπης. Επίσης στην Ευρωπαϊκή Ήπειρο ο πιο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης αποτελεί το ετεροφυλικό σεξ και στη δεύτερη θέση βρίσκεται η μετάδοση μέσω μολυσμένων βελόνων στους PWID. Όλα τα δεδομένα παρακολούθησης του HIV για το έτος 2022 παρουσιάζουν σημαντική διακύμανση μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ηπείρου [44].

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ), το έτος 2022 διαγνωστήκαν 565 άνθρωποι με HIV, εκ των οποίων οι 450 ήταν άνδρες και οι 115 γυναίκες. Το 61,6% των νέων διαγνώσεων ήταν ελληνικής εθνικότητας. Επίσης, η κύρια οδός μετάδοσης είναι η σεξουαλική επαφή μεταξύ MSM και δεύτερη έρχεται η μετάδοση μετά από χρήση μολυσμένης βελόνας σε PWID. Το 48,1% ξεκίνησε την HAART σε διάστημα μικρότερο των 30 ημέρων. Επίσης, περίπου 71 άτομα διαγνωστήκαν με AIDS το έτος 2022, εκ των οποίων οι 60 είχαν εμφανίσει ήδη συμπτώματα ή εμφάνισαν λίγο καιρό μετά την διάγνωση. Τέλος στην Ελλάδα 2.186 άνθρωποι έχουν χάσει την ζωή τους από ασθένειες σχετικές με το AIDS από τους οποίους 30 άνθρωποι έχασαν την ζωή τους για το έτος 2022. Η κυρία ασθένεια η οποία είναι χαρακτηριστική του AIDS είναι η μόλυνση από *Pneumocystis jirovecii* [45].

Ο WHO έχει θέσει ως στόχο μέχρι το 2025 το 95% των ανθρώπων που νοσούν με HIV να έχουν διαγνωστεί, από αυτούς το 95% πρέπει να λαμβάνει HAART και από αυτούς το 95% πρέπει να έχει κατεσταλμένο ιϊκό φορτίο. Το 2022 τα ποσοστά αυτά ήταν 86%, 89% και 93%, αντίστοιχα και μόνο πέντε χώρες κατάφεραν να πετύχουν το παραπάνω στόχο, αναμεσά τους η Ζιμπάμπουε και η Ηνωμένη Δημοκρατία της Τανζανίας [40], [42].

1.3.3. Κύκλος ζωής

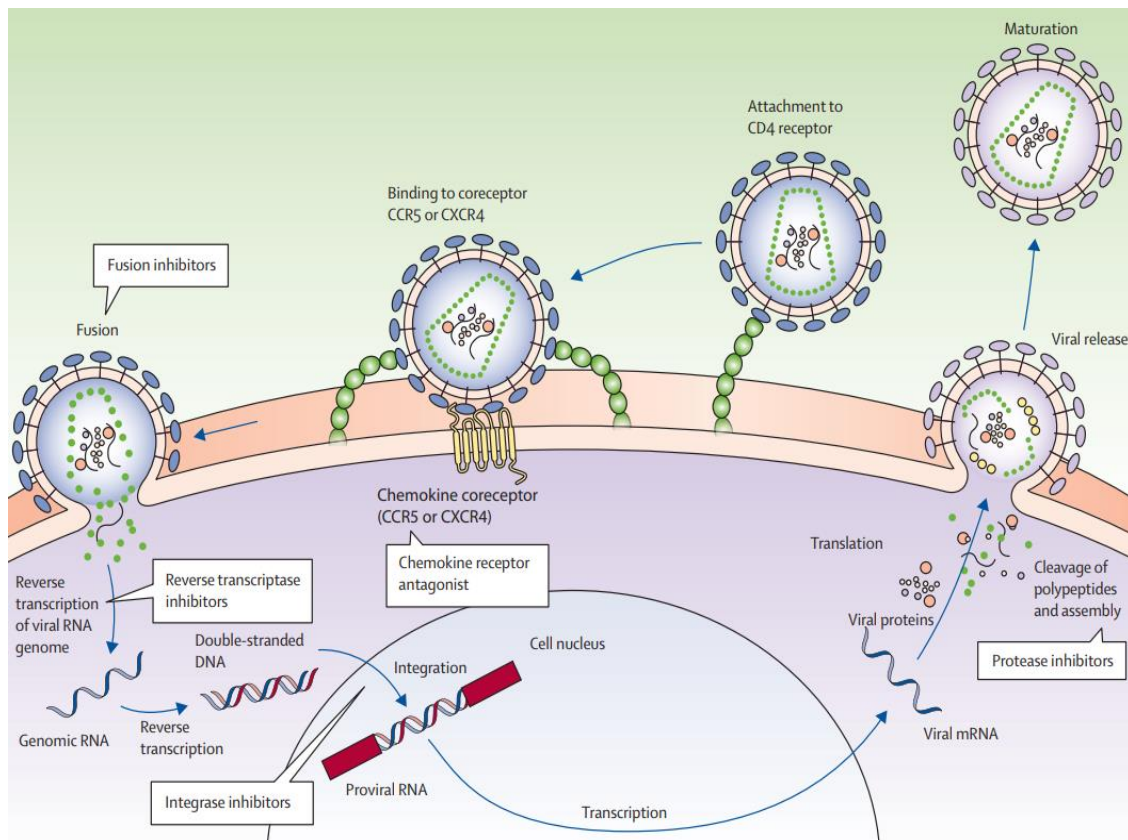
Ο κύκλος ζωής του HIV συνοπτικά χαρακτηρίζεται και περιγράφεται από τα εξής στάδια: 1) σύνδεση και είσοδος του ιοσωμάτιου, 2) αποκάλυψη του +ssRNA, 3) αντιστροφή μεταγραφή, 4) ενσωμάτωση προιού στο γονιδίωμα του κυττάρου, 5) σύνθεση και συναρμολόγηση των πρωτεϊνών του ιού, 6) εκβλάστηση του ιοσωμάτιου, 7) ωρίμανση [35], [46].

Η είσοδος του HIV επιτυγχάνεται όταν ο ιϊκός φάκελος έρθει σε επαφή με το κύτταρο στόχο. Κατά την επαφή, η πρωτεΐνη gp120 του φακέλου δεσμεύει τον CD4 υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (ο CD4 υποδοχέας υπάρχει στην επιφάνεια και άλλων κυττάρων όπως στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και στα δενδριτικά). Ως αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης, ο ιϊκός φάκελος υφίσταται δομικές αλλαγές που οδηγούν στην αποκάλυψη μιας συγκεκριμένης περιοχής της πρωτεΐνης gp120, η οποία δεσμεύει τους υποδοχείς χημειοκίνης στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου στόχου. Οι πιο συνηθισμένοι συν-υποδοχείς που χρησιμοποιεί ο HIV είναι ο υποδοχέας α-χημειοκινών CXCR4 και ο υποδοχέας β-χημειοκινών CCR5. Ο υποδοχέας CXCR4 συναντάται κυρίως στα T-λεμφοκύτταρα, για αυτό και οι ιοί που παρουσιάζουν προτίμηση σε αυτόν τον υποδοχέα λέγονται και T-τροπικοί ή X4 ιοί, ενώ ο CCR5 υποδοχέας συναντάται κυρίως στα μακροφάγα, για αυτό και οι ιοί που παρουσιάζουν προτίμηση σε αυτόν τον υποδοχέα λέγονται και M-τροπικοί ή R5 ιοί. Επίσης έχουν απομονωθεί στελέχη HIV που δεσμεύουν και τους δύο υποδοχείς και ονομάζονται δίπλα τροπικοί (dual tropic) ή X4R5 ιοί. Η διπλή δέσμευση της gp120 τόσο με τον υποδοχέα CD4 όσο και με τον συν-υποδοχέα επιτρέπει σε ένα πεπτίδιο, που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της gp41, να προκαλέσει σύντηξη του ιϊκού φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη και την επακόλουθη είσοδο του ιϊκού καψιδίου [35].

Μετά την είσοδο του ιϊκού καψιδίου στο κύτταρο στόχο, το ιϊκό γονιδίωμα και οι πρωτεΐνες που περιέχονται μέσα στο καψίδιο απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Η αντιστροφή μεταγράψαση χρησιμοποιεί ως εκκινήτη το tRNA^{lys3} και ξεκινάει την αντιστροφή μεταγραφή του ssRNA. Ακολουθεί η ολοκλήρωση της αντιστροφής μεταγραφής δημιουργώντας ένα υβριδικό μόριο cDNA/RNA. Στη συνέχεια, η RNA αλυσίδα διασπάται από ριβονουκλεάσες. Η μονόκλωνη έλικα cDNA μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο DNA με την βοήθεια της αντιστροφής μεταγραφάσης [35], [38]. Το πλέον δίκλωνο μόριο cDNA, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του με την βοήθεια της ιντεργκράσης, η οποία διασπά τα νουκλεοτίδια κάθε 3' άκρου της διπλής έλικας DNA του γονιδιώματος δημιουργώντας δυο συμπληρωματικά άκρα [35].

Αφού το κύτταρο ενεργοποιηθεί, το προϊκό DNA μεταγράφεται σε mRNA και γονιδιακό RNA, τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα για να μεταφραστούν από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα συντίθενται οι νέες πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την επιβίωση του ιοσωμάτιου αλλά και πολλές δομικές πρωτεΐνες που βοηθούν στο σχηματισμό του. Οι πρωτεΐνες που

κωδικοποιούνται από το γονίδιο *env* (gp160 η οποία με τη δράση της πρωτεάσης μετατρέπεται σε gp41 και gp120), μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια, μαζί με τις απαραίτητες πρωτεΐνες αντιγραφής (αντιστροφή μεταγραφάση, ιντεγκράση, πρωτεάση), τις δυο RNA μονόκλωνες έλικες του ιού και την πολυπρωτεΐνη gag και αρχίζει να πραγματοποιείται η διαδικασία της εκβλάστησης. Μετα την απελευθέρωση του ανώριμου ισωμάτιου, η πρωτεάση διασπά την πολυπρωτεΐνη gag σε πρωτεΐνες μήτρας, καψιδίου και νουκλεοκαψιδίου, δημιουργώντας το ώριμο ισωμάτιο. Κατά την διαδικασία της εκβλάστησης η μεμβράνη του ισωμάτιου εμπλουτίζεται με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη από την μεμβράνη του κυττάρου. Το νέο ώριμο ισωμάτιο μπορεί να μολύνει αλλά κύτταρα CD4 και να επαναλάβει τον κύκλο αντιγραφής (**Εικόνα 11**) [34], [35], [46].



Εικόνα 11: Ο κύκλος ζωής του HIV και τα σημεία δράσης των διαφορετικών HAART [36].

1.3.4. Ανοσοπαθογένεια

Ο HIV φαίνεται να απορρυθμίζει το προφίλ κυτταροκινών τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, κάτι που επηρεάζει σημαντικά την ορθή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την ανάπτυξη τόσο έμφυτων όσο και προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά την διάρκεια της λοίμωξης από τον ιό, οι κυτταροκίνες IL-2 και η αντιϊκή IFN- γ της Th1 απόκρισης μειώνονται, ενώ αυξάνονται οι κυτταροκίνες της Th2, IL-4 και IL-10, οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1, IL-6, IL-8 και ο παράγοντας TNF- α όπως και TGF- β . Οι προφλεγμονώδεις

κυτταροκίνες από μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύουν την ιϊκή αντιγραφή. Γενικά, οι κυτταροκίνες οι οποίες ενισχύουν την αντιγραφή του HIV είναι ο TNF- α , TNF- β , GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-7, IL-15 και η IL-6, οι οποίες διεγείρουν την αντιγραφή του HIV στα T κύτταρα και στα μακροφάγα που προέρχονται από μονοκύτταρα, ενώ κυτταροκίνες που περιορίζουν τον HIV είναι η IFN- α , IFN- β , IL-10, IL-13 και η IL-16. Επίσης, έχουν αναφερθεί και κυτταροκίνες που φαίνεται να έχουν κατασταλτική ή επαγωγική επίδραση στη μόλυνση και αυτές είναι η IL-4, IL-12, IFN- γ και GM-CSF. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι β -χημειοκίνες, όπως η MIP-1 α , η MIP-1 β και η RANTES αποτελούν σημαντικοί αναστολείς των M-τροπικών ιών καθώς τους ανταγωνίζονται για να συνδεθούν στον υποδοχέα CCR5. Το ίδιο συμβαίνει και με τις α -χημειοκίνες όπως ο παράγοντας SDF-1, ο οποίος καταsteίλει την μόλυνση των T-τροπικών στελεχών, καθώς ανταγωνίζεται τον ιό για την σύνδεση στον CXCR4 υποδοχέα. Η προκαλούμενη από τον HIV ανοσοανεπάρκεια σχετίζεται με τον χαμηλό αριθμό των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων αλλά και με την μετατροπή της Th1 απόκρισης σε Th2, και είναι καθοριστικής σημασίας. Η αφύσικη παραγωγή κυτταροκινών συμβάλει στην παθογένεια της νόσου εμποδίζοντας την κυτταρομεσολαβούμενη ανοσία και μπορεί να αναστραφεί σε κάποιο βαθμό μετά την έναρξη της HAART [47], [48].

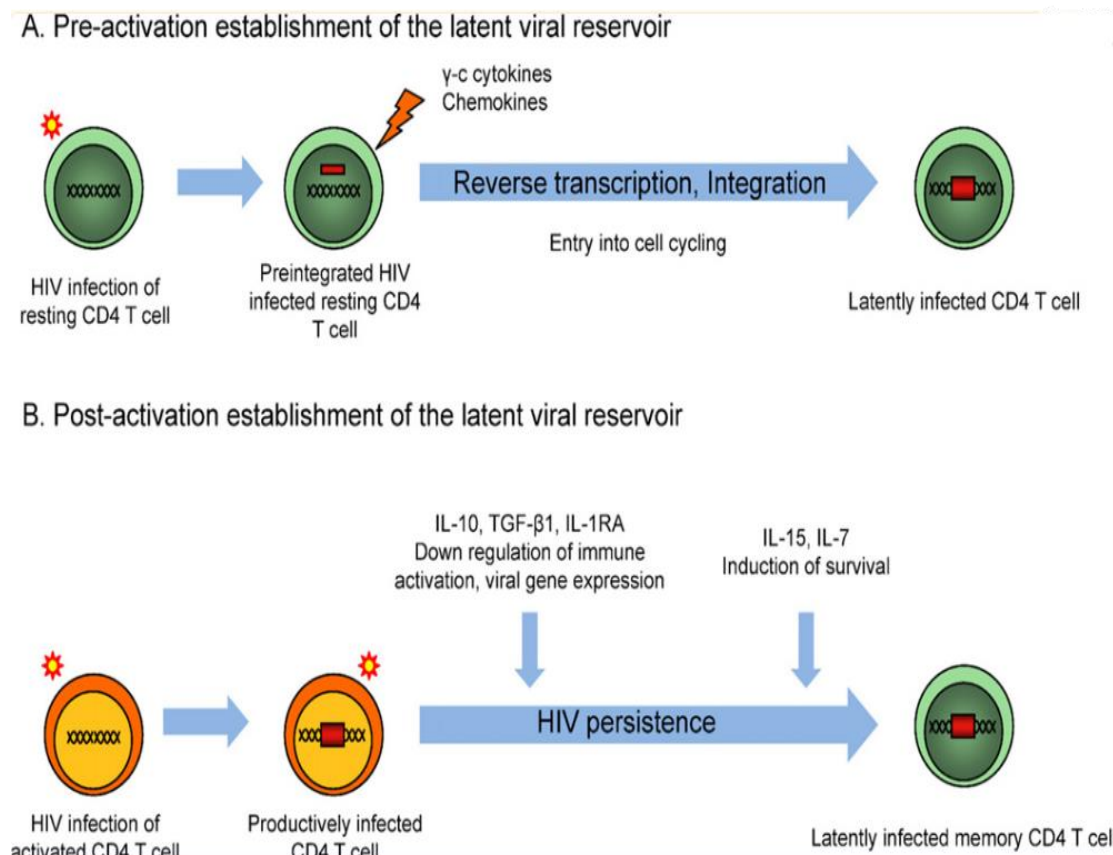
Αναλυτικότερα, στο εσωτερικό των CD4⁺ T κυττάρων σε ηρεμία συναντάμε μη ενσωματωμένο ιϊκό DNA το οποίο είναι ασταθές και είτε θα απικοδομηθεί, είτε θα ενσωματωθεί μετά την ενεργοποίηση του κυττάρου. Ακόμα, συναντάται και ενσωματωμένο προϊικό DNA του ιού σε κύτταρα που δεν παράγουν ενεργά ιοσωμάτια και αυτή η λανθάνουσα κατάσταση παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα και περιορίζεται στον κύκλο ζωής του κυττάρου και των απογόνων του. Από πολλές μελέτες *in vitro* έχει διαπιστωθεί ότι τα CD4⁺ T κύτταρα σε ηρεμία παρόλο που είναι σχετικά δύσκολο να μολυνθούν (σε σύγκριση με τα ενεργοποιημένα) με τον HIV, παρουσία γκ κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-7, IL-15), αυξάνουν την ευαισθησία τους και το προϊικό DNA μπορεί να ενσωματωθεί χωρίς να ενεργοποιηθούν (**Εικόνα 12, Α**) [49].

Η ανάπτυξη και η εκτεταμένη εφαρμογή της HAART έχει καταφέρει να μειώσει την αναπαραγωγή του ιού στα άτομα που την λαμβάνουν, ωστόσο δεν μπορεί να θεραπεύσει τον HIV και η λήψη της είναι αναγκαστική καθόλα την διάρκεια της ζωής του μολυσμένου ατόμου. Τα κυρία εμπόδια της καταστροφής του HIV είναι δυο: α) ο ιός μπορεί να παραμένει ως ελεύθερος ιός εξαιτίας μια υπολειπομένης αντιγραφής σε συγκεκριμένες ανατομικές δεξαμενές όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας και οι λεμφαδένες, β) ο ιός μπορεί να παραμένει σε μακρόβιες λανθάνουσες κυτταρικές δεξαμενές ως ενσωματωμένο προϊικό DNA. Έχει διαπιστωθεί ότι οι κυτταροκίνες έχουν καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία των παραπάνω μορφών δεξαμενής στα άτομα με HIV ακόμα και αν λαμβάνουν HAART [49].

Στο αρχικό στάδιο της λοίμωξης το περισσότερο ιϊκό DNA δεν έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου, ωστόσο μπορούμε να εντοπίσουμε μικρές ιϊκές δεξαμενές ακόμα και σε αυτό το στάδιο της νόσου. Ο μηχανισμός δεν

μας είναι πλήρως κατανοητός αλλά η αυξημένη ιαιμία που εντοπίζεται στα αρχικά στάδια της λοίμωξης συνοδεύεται και από μια έντονη έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, που ίσως διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των δεξαμενών. Οι πρώτες κυτταροκίνες που ανιχνεύονται μετά την μόλυνση με HIV κατά την οξεία φάση είναι η IFN-α και η IL-15 και στην συνέχεια ακολουθούν ο TNF-α, CXCL10, η IFN-γ και η IL-12. Έπειτα ακολουθεί η έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-10 και η έκκριση του ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1 (IL-1RA), κάτι που χαρακτηρίζει την μετατροπή της οξείας φάσης σε χρόνια φάση της λοίμωξης και την δημιουργία ιικών δεξαμενών [49].

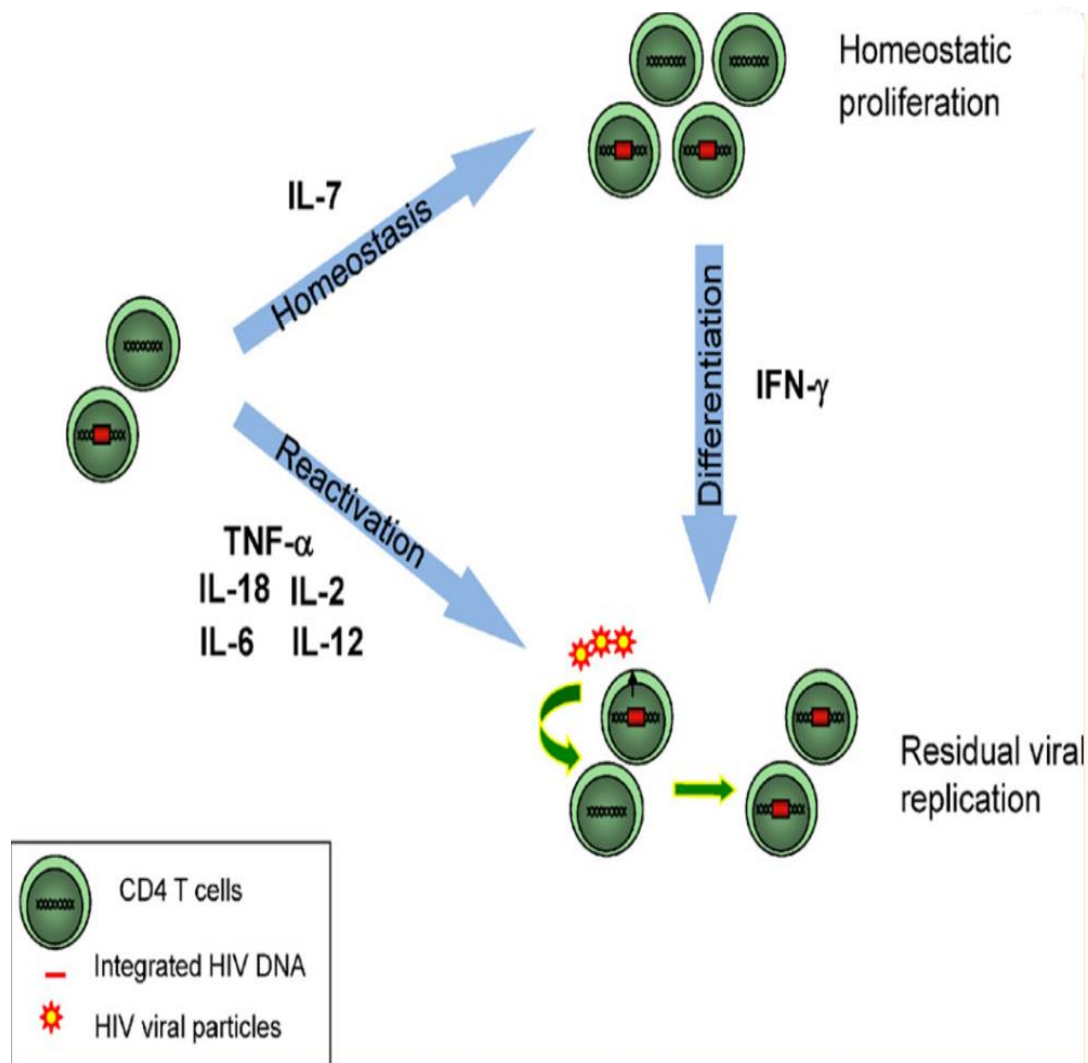
Η δημιουργία ιικών δεξαμενών γίνεται με την βοήθεια των ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών, η οποίες επιτρέπουν την δημιουργία αδρανών CD4⁺ T κυττάρων μνήμης με ενσωματωμένο το DNA του ιού στο γονιδίωμα τους. Η IL-10 και ο TGF-β μπορούν να αναστείλουν την μεταγραφή του HIV ελαττώνοντας την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και μειώνοντας και την ειδική για τον ιό ανοσία. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η IL-1RA ανταγωνίζεται την IL-1, η οποία προωθεί την αντιγραφή του HIV, και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει την αναπαραγωγή του ιού και την εδραίωση της λανθάνουσας φάσης στο κύτταρο. Τέλος, έχει τονιστεί και ο ρόλος των κυτταροκινών IL-7 και IL-15 στην διατήρηση των T κυττάρων μνήμης καθώς τροποποιούν τα αποπτωτικά σήματα και με αυτό τον τρόπο διατηρούν τις ιικές δεξαμενές (Εικόνα 12, Β) [49].



Εικόνα 12: Η δημιουργία λανθάνουσας ιικής δεξαμενής. (Α) Εγκατάσταση της ιικής δεξαμενής πριν την ενεργοποίηση του CD4⁺ T κυττάρου: Τα αδρανή CD4⁺ T κύτταρα εκτίθενται σε σωματίδια HIV σε ένα

μικρο-περιβάλλον εμπλουτισμένο σε κυτταροκίνες γς και χημειοκίνες που προωθούν την ενσωμάτωση του προΐου, απουσία κυτταρικής ενεργοποίησης. (B) Εγκατάσταση της λανθάνουσας ιϊκής δεξαμενής μετά την ενεργοποίηση: οι ανοσοτροποποιητικές κυτταροκίνες (IL-10, TGF-β, IL-1RA) μπορεί να ρυθμίσουν την ενεργοποίηση παραγωγικά μολυσμένων CD4⁺ T κυττάρων, αποσιωπώντας έτσι την ιϊκή μεταγραφή. Οι κυτταροκίνες γς προάγουν την επιβίωση των λανθάνοντα μολυσμένων κυττάρων. Συνολικά, αυτό το κυτταροκινητικό περιβάλλον μπορεί να ευνοήσει τη δημιουργία μακρόβιων λανθάνοντα μολυσμένων T κυττάρων CD4⁺ [49].

Ο χρόνος που ξεκινάει το μολυσμένο άτομο την HAART έχει κρίσιμο αντίκτυπο στην ανασύσταση των CD4⁺ T κυττάρων και στο μέγεθος της λανθάνουσας δεξαμενής. Το άτομο που ξεκινά καθυστερημένα την HAART παρουσιάζει έντονη λεμφοπενία και μεγάλη εξάπλωση στις δεξαμενές καθώς και κάποια υπολειπομένη αντιγραφή του ιού, ακόμα και μετά από μακροχρόνια θεραπεία. Έχει παρατηρηθεί ότι ένας αριθμός κυτταροκινών έχει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση και επιμονή του HIV στις λανθάνουσες δεξαμενές κατά τη διάρκεια της HAART. Από διάφορες μελέτες έχει βρεθεί ότι IL-7 ενισχύει την αντιγραφή του ιού σε κάποια κύτταρα ενώ η κυρία δράση της είναι ο ομοιοστατικός πολλαπλασιασμός των λανθάνοντα μολυσμένων κυττάρων χωρίς να επάγει την ενεργοποίηση ή διαφοροποίηση τους. Ακόμα, η υψηλή έκφραση των προφλεγμονόδων κυτταροκινών TNF-α, IL-2, IL-12 και IL-18 στο πλάσμα και στους λεμφικούς ιστούς μπορεί να οδηγήσουν σε επανενεργοποίηση του HIV από λανθάνοντα μολυσμένα κύτταρα και στην συνεχιζόμενη ιϊκή αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της HAART. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι η IFN-γ είναι ένας ισχυρός παράγοντας διαφοροποίησης των CD4⁺ T κυττάρων δημιουργώντας έτσι περισσότερους στόχους για τον ιό άλλα ταυτόχρονα μπορεί να ενισχύσει και την αντιγραφή του (Εικόνα 13) [49].



Εικόνα 13: Ο ρόλος των κυτταροκινών στην επιμονή του HIV. Η IL-7 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην διατήρηση των CD4⁺ T κυττάρων, εξασφαλίζοντας τη μακροχρόνια επιμονή των λανθάνοντα μολυσμένων κυττάρων μέσω του ομοιοστατικού πολλαπλασιασμού κατά τη διάρκεια της HAART. Πολλές κυτταροκίνες που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα άτομα μολυσμένα με HIV, όπως οι TNF-α, IL-2, IL-12 και IL-18 μπορεί να προκαλέσουν επανενεργοποίηση του HIV από λανθάνοντα μολυσμένα κύτταρα και να διατηρήσουν τη συνεχιζόμενη ιϊκή αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια του HAART. Ως ισχυρός παράγοντας προ-διαφοροποίησης, η IFN-γ μπορεί να προκαλέσει παραγωγή ιών από λανθάνοντα μολυσμένα κύτταρα ταυτόχρονα με κυτταρική διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα, με τη δημιουργία περισσότερων στόχων για τη μόλυνση από τον HIV, η IFN-γ μπορεί με τη σειρά της να ενισχύσει την αντιγραφή του ιού [49].

Η μακροχρόνια HAART, ενώ όπως προαναφέρθηκε έχει πετύχει σε μεγάλο βαθμό τον περιορισμό της μετάδοσης του HIV, προκαλεί πολυάριθμες παρενέργειες. Επομένως, κρίνεται απαραίτητο η ανάπτυξη ενός θεραπευτικού σχήματος που θα εμποδίζει τόσο τον πολλαπλασιασμό του HIV όσο και θα στοχεύει την καταπολέμηση των ιϊκών δεξαμενών. Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες να ενισχυθεί το ανοσοποιητικό σύστημα με ανοσοθεραπείες σε συνδυασμό με HAART. Η χορήγηση των κυτταροκινών IL-7, IL-2 και IFN-γ αποτελεί μια στρατηγική ενεργοποίησης των λανθανόντων μολυσμένων κυττάρων με σκοπό την εκρίζωση του HIV. Παρόλο που η χορήγηση των κυτταροκινών αυτών κατάφερε να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό

σύστημα, απέτυχε να εξαλείψει τις λανθάνουσες δεξαμενές καθώς μετά την δίκωπη της HAART παρουσιάστηκε ιαιμία. Η χορήγηση των κατάλληλων κυτταροκινών σε συνδυασμό με HAART αποτελεί πολλά υποσχόμενη θεραπεία που μπορεί να εξαντλήσει τις δεξαμενές του HIV στα CD4⁺ κύτταρα μνήμης και να απαλλάξει τον ασθενή από την ανάγκη να βασίζεται στην HAART για όλη του τη ζωή [47], [49].

1.4. Συλλοίμωξη

1.4.1. Επιδημιολογία συλλοίμωξης HIV/*Leishmania spp.*

Ο πρώτος ασθενής που εντοπιστικέ να νοσεί με συλλοίμωξη HIV/*Leishmania* αναφέρθηκε στην Ισπανία στα τέλη του 1980 και από τότε είχε αναφερθεί σε 45 χώρες [50]. Τα πρώτα χρόνια μετά την αναφορά της συλλοίμωξης, το 90% των κρουσμάτων εντοπιζόταν στη Νότια Ευρώπη. Ωστόσο, μετά την εισαγωγή της HAART, η επίπτωση μειώθηκε αισθητά στις αναπτυγμένες χώρες, αλλά εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις χώρες της Ασίας, της Αφρικής και της Λατινικής Αμερικής [51]. Τα υψηλότερα ποσοστά συλλοίμωξης παρουσιάζουν η Βραζιλία, η Αιθιοπία και κάποιες περιοχές της Ινδίας [50].

Η πιο συχνή κλινική μορφή λεισμανίασης σε ασθενείς με συλλοίμωξη HIV/*Leishmania* είναι η VL, όμως η εξάπλωση της διαφέρει γεωγραφικά, αντικατοπτρίζοντας τις διάφορες στα επικρατούντα είδη παρασίτων σε αυτή την περιοχή. Στην νοτιοδυτική Ευρώπη, η VL έχει καταγραφεί στο 95% περιπτώσεων συλλοίμωξης [51]. Γενικά, η συλλοίμωξη προέκυψε ως αποτέλεσμα του μεγάλου βαθμού αλληλοεπικάλυψης μεταξύ γεωγραφικής κατανομής της VL και του HIV. Η ύπαρξη και των δυο ασθενειών σε μια περιοχή έχει σημαντικές κλινικές, διαγνωστικές, θεραπευτικές και επιδημιολογικές επιπτώσεις [52]. Η λεισμανίαση και ο HIV αλληλοενισχύονται καταστέλλοντας περαιτέρω το ανοσοποιητικό σύστημα, με αποτέλεσμα σοβαρή νοσηρότητα, ελάχιστες θεραπευτικές επιλογές και υψηλά ποσοστά υποτροπής και θνησιμότητας. Επίσης οι ασθενείς που έχουν τη συγκεκριμένη συλλοίμωξη είναι ευάλωτοι σε άλλες ευκαιριακές λοιμώξεις όπως η φυματίωση και η κρυπτοκοκκική μηνιγγίτιδα [50].

Μετά την πρώτη μόλυνση, το παράσιτο της λεισμανίας παραμένει σε λανθάνουσα φάση στα υγιή άτομα για μεγάλα χρονικά διαστήματα και κινδυνεύει να επανενεργοποιηθεί σε περίπτωση ανοσοκαταστολής. Σε ασθενείς με HIV που δεν παρουσιάζουν σοβαρή ανοσοκαταστολή, η νόσος μπορεί να παραμένει ασυμπτωματική, όπως στους ανοσοεπαρκείς, ενώ στα άτομα με σοβαρή ανοσοανεπάρκεια (CD4<200 κύτταρα/mm³) μπορεί να παρουσιάσουν από σοβαρές έως και άτυπες μορφές λεισμανίασης [51]. Παρά την αύξηση των CD4⁺ και την καταπολέμηση της ιαιμίας με την βοήθεια της HAART, η VL είναι πιθανό να

υποτροπιάσει και η ανοσολογική ανάκαμψη των ασθενών είναι δύσκολη [53]. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην Αιθιοπία η συλλοίμωξη σπλαχνικής λεισμανίασης-HIV έχει αυξηθεί κατά 20-30% από το 1980 και έχει το υψηλότερο ποσοστό συλλοίμωξης στον κόσμο. Ακόμα το 5-7% των ασθενών με σπλαχνική λεισμανίαση στην Ινδία ανιχνεύονται με HIV λοίμωξη [50].

Όπως προαναφέρθηκε, η σπλαχνική λεισμανίαση προκαλείται από διαφορετικά είδη του παρασίτου *Leishmania* σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Στην Ανατολική Αφρική (Αιθιοπία, Σουδάν) και νοτιοανατολική Ασία (Μπαγκλαντές, Ινδία και Νεπάλ), προκαλείται κυρίως από το *L.donovani* και μολύνει πρωτίστως ανθρώπους (κύκλος ζωής άνθρωπος- σκνίπα- άνθρωπος), δημιουργώντας ανθρώπινες δεξαμενές [50]. Στις μεσογειακές χώρες, η VL είναι υποενδημική και προκαλείται από το πρωτόζωο *L.infantum*. Οι περιπτώσεις συλλοίμωξης που προκύπτουν στην Ευρώπη πλήττουν κυρίως τις περιοχές της Μεσογείου, την Γαλλία, την Ιταλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία και παρουσιάζουν σημαντική μείωση εξαιτίας της HAART, αν και στη Πορτογαλία εξακολουθεί το ποσοστό της συνμόλυνσης να είναι μεγάλο [53]. Έχει βρεθεί ότι η μετάδοση σε αυτές τις χώρες μπορεί να συμβεί μέσω κοινής χρήση μολυσμένων συρίγγων μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών, οι οποίοι αποτελούν και τον κύριο πληθυσμό συλλοίμωξης [51]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η πλειονότητα των κρουσμάτων της συλλοίμωξης είναι ενήλικες κάτι που υποδηλώνει ότι οι ηλικιακές ομάδες κινδύνου ακολουθούν τα πρότυπα του HIV [53].

Η ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων για τον προσδιορισμό του επιπέδου της παρασιταϊμίας και του κινδύνου υποτροπής είναι μια από τις κύριες προκλήσεις για την βελτίωση της θεραπείας των ασθενών με συλλοίμωξη HIV/*Leishmania* [53].

1.4.2. Ανοσοπαθογένεια της συλλοίμωξης HIV/*Leishmania* spp.

Η μόλυνση από τον HIV εξασθενεί σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα, μολύνοντας και καταστρέφοντας κρίσιμα κύτταρα για την άμυνα του μολυσμένου ατόμου. Αυτή η έντονη ανοσοκαταστολή που προκαλείται από τον ιό καθιστούν το άτομο ευάλωτο σε διάφορες ευκαιριακές λοιμώξεις όπως λοίμωξη από το παράσιτο λεισμάνια, οδηγώντας σε περαιτέρω ανοσοκαταστολή. Τόσο η λεισμάνια όσο και ο HIV μολύνουν μονοκύτταρα/μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, αν και μπορούν επίσης να επηρεάσουν την δραστηριότητα και τη λειτουργία άλλων κυττάρων χωρίς να τα συν-μολύνουν, όπως τα T και B λεμφοκύτταρα. Έχει τονιστεί ότι κατά τη διάρκεια της συλλοίμωξης, η εξέλιξη της ιογενούς νόσου προς το AIDS επιτυγχάνεται πιο γρηγορά με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των CD4⁺ T κυττάρων και αύξηση της ιαμίας και ορομετατροπής. Με τον ίδιο τρόπο, στη συλλοίμωξη, τα συμπτώματα της λεισμανίασης επιδεινώνονται με μεγαλύτερη παρασιτική εξάπλωση, καθυστέρηση στην επούλωση των πληγών και συχνές υποτροπές παρά την χορήγηση θεραπείας [54], [55].

Εφόσον η λειψμάνια και ο HIV είναι δύο παθογόνα που ανήκουν σε δύο διαφορετικές κατηγορίες, είναι φυσιολογικό οι ανοσολογικές αποκρίσεις που αναπτύσσονται να διαφέρουν σημαντικά, παρά την ταυτόχρονη μόλυνση, καθώς αυτά τα παθογόνα μολύνουν ιστούς ή πληθυσμούς κυττάρων μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, ξεκινώντας από καθορισμένα μονοπάτια σηματοδότησης, εκφράζοντας διαφορετικούς τύπους κυτταρικών ενδιάμεσων. Επομένως, θα μπορούσαμε να πούμε ότι προκύπτουν ανσοσσοαποκρίσεις που οδηγούν σε αντίθετες απαντήσεις, καθώς το παράσιτο λειψμάνια δημιουργεί την χρόνια ανοσολογική ενεργοποίηση που καταλήγει σε αυξημένο ιικό φορτίο και εξέλιξη σε AIDS, ενώ ο ιός HIV με την σειρά του οδηγεί σε έντονη καταστολή μέσω καταστροφής των κυττάρων του ανοσοποιητικού, που στο τέλος οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του παρασίτου. Αυτός ο πολλαπλασιασμός μπορεί να προκληθεί εξαιτίας της εξάντλησης των λειτουργιών των μακροφάγων από τον ιό HIV [54], [55].

Γενικά, έχει περιγραφεί από πολλές μελέτες μια στροφή της Th1 σε Th2 στις αποκρίσεις κυτταροκινών/χημειοκινών κατά τη διάρκεια της συλλοίμωξης HIV/*Leishmania* [54]. Η μετατροπή του περιβάλλοντος προς Th2 έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία του ελέγχου των παρασίτων, την επανεμφάνιση της νόσου, έντονο πολλαπλασιασμό και μεγαλύτερο χρόνο για να επουλωθούν οι βλάβες [55]. Επίσης, το προφίλ κυτταροκινών Th2 στη συλλοίμωξη HIV/*Leishmania* διαφέρει σημαντικά από το προφίλ που αναπτύσσει ο ασθενής σε περίπτωση λοίμωξης μόνο από το παράσιτο ή από τον ιό. Τόσο ο HIV όσο και η VL οδηγούν σε ελάττωση της λειτουργίας των T κυττάρων και διαταραχές στο προφίλ των κυτταροκινών [56].

Για το προφίλ των προφλεγμονόδων κυτταροκινών, πολλές έρευνες αναφέρουν ότι κατά τη συλλοίμωξη *L.donovani*/HIV των μακροφάγων, ο ιός αναστέλλει την έκκριση της IFN- γ που επάγεται από το παράσιτο, ενώ τα επίπεδα της IL-12 είναι υψηλότερα σε ομάδες που είχαν νοσήσει μόνο με τον ιό. Επίσης, με παρόμοιο τρόπο ο ιός εξουδετερώνει την σύνθεση της IL-12, μια κρίσιμη κυτταροκίνη της Th1 απόκρισης, που ενεργοποιείται από το *L.donovani* και η ελλιπής παραγωγή της πιθανό να ενοχοποιείται για την έντονη ιϊκή και παρασιτική αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης μόλυνσης. Ακόμα, έχει διαπιστωθεί ότι η έκκριση της TNF- α είναι αρκετά αυξημένη κατά τη ταυτόχρονη λοίμωξη HIV/*Leishmania*, κάτι που προωθεί την αντιγραφή του HIV, επιδεινώνει τις βλάβες που προκαλούνται από το παράσιτο και μειώνει τον αριθμό των CD4⁺ κυττάρων [54], [55], [56].

Όσον αφορά το προφίλ των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, από μελέτες σε ασθενείς που είχαν μολυνθεί με *L.donovani*/HIV, έχει βρεθεί ότι η IL-4 παρουσιάζει σημαντική αύξηση, προωθώντας το προφίλ κυτταροκινών Th2. Ομοίως, η IL-6 παρουσίασε υψηλότερες συγκεντρώσεις στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με *L.infantum*/HIV και ενισχύει την αιμία. Τέλος, σημαντική αύξηση παρουσιάζει και η IL-10 στη συλλοίμωξη, η οποία έχει μεγάλη ανσοσοκατασταλτική δράση και επιδεινώνει τόσο τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου όσο και του ιού [54].

Παρά τις σημαντικές εξελίξεις και έρευνες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια έχει τονιστεί η αναγκαιότητα για περισσότερες έρευνες που θα εξετάζουν την σημασία της ετερογένειας των ιών και των παρασίτων στην ανοσολογική απόκριση της συλλοίμωξης. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι ορισμένες κυτταροκίνες/χημειοκίνες μπορούν να έχουν προστατευτικό ή παθογόνο ρόλο ανάλογα με το αν θα αναπτυχθεί λοίμωξη από το παράσιτο της λεισμάνιας ή τον ιό HIV. Ταυτόχρονα, οι πλειονότητα των αναλύσεων που ερευνούν την απόκριση των κυτταροκινών δεν υπολογίζουν την μεταβλητότητα που έχει η επίδραση τους σε διαφορετικούς τύπους ιστών, κυτταρικών πληθυσμών, τα παθογόνα στα οποία δρουν και τις διαφορετικές φάσεις της νόσου [54].

1.4.3. Επιδημιολογία συλλοίμωξης HIV/*Toxoplasma gondii*

Η τοξοπλάσμωση αποτελεί μια αρκετά συνηθισμένη λοίμωξη στον άνθρωπο με παγκόσμια κατανομή. Η επιβάρυνση και ο επιπολασμός της λοίμωξης από *T.gondii* στα άτομα που νοσούν με HIV εμφανίζει σημαντική γεωγραφική μεταβλητότητα και ακολουθεί κυρίως τον επιπολασμό της τοξοπλάσμωσης στον πληθυσμό. Ο επιπολασμός της συλλοίμωξης HIV/*Toxoplasma* σε χώρες με χαμηλό, μεσαίο και υψηλό εισόδημα είναι περίπου 55%, 34% και 26%, αντίστοιχα. Αρκετά υψηλό επιπολασμό φαίνεται να παρουσιάζει η Λατινική Αμερική, στη Ανατολική και Κεντρική Ευρώπη, στη Μέση ανατολή, σε κάποιες χώρες της νοτιοανατολικής Ασίας και στην Αφρική [57].

Η εξάπλωση της χρήσης της HAART κατάφερε να περιορίσει σημαντικά τα ποσοστά συλλοίμωξης HIV/*T.gondii* στις χώρες υψηλού και μεσαίου εισοδήματος. Η κυρία μορφή τοξοπλάσμωσης που εμφανίζουν τα άτομα με HIV είναι η εγκεφαλική τοξοπλάσμωση, η οποία αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε αυτή την ομάδα ανθρώπων σε αρκετές χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος [57]. Σημαντικό κίνδυνο να εμφανίσουν εγκεφαλική τοξοπλάσμωση, συνήθως μετά από επανενεργοποίηση λανθάνουσας λοίμωξης, διατρέχουν τα άτομα τα οποία έχουν αριθμό λεμφοκυττάρων $CD4 < 100$ κύτταρα/ mm^3 , δεν λαμβάνουν ορθά και αποτελεσματικά προφύλαξη και έχουν μεγάλη ηλικία [57], [58]. Παρόλα αυτά, η απουσία οποιουδήποτε από αυτές τις μεταβλητές δεν αποκλείει την πιθανότητα εμφάνισης εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης [57], [59].

Από πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι η πλειοψηφία των ατόμων με συλλοίμωξη HIV/*T.gondii* εντοπίζεται στις χώρες της Αφρικής (κυρίως λανθάνουσα λοίμωξη) και συγκεκριμένα υψηλό επιπολασμό παρουσιάζουν η Αιθιοπία, η Γκανά και το Καμερούν [59]. Σημαντικά υψηλό επιπολασμό παρουσιάζει επίσης και το Ιράν, η Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό, η Βραζιλία, το Βόριο Σουδάν και το Μεξικό [60].

Σημαντική προσπάθεια έχει γίνει για την δημιουργία των προγραμμάτων τα οποία θα περιλαμβάνουν ορολογικές εξετάσεις, παροχή φροντίδας και ελέγχου των

ζωών για την πρόληψη της σοβαρής τοξοπλάσμωσης σε άτομα που ζουν με λοίμωξη HIV [59]. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως έχει γίνει προσπάθεια για την εύρεση προφυλακτικού εμβολίου για την τοξοπλάσμωση με σκοπό να προστατέψει τους οροθετικούς HIV ασθενείς [60].

1.4.4. Ανοσοπαθογένεια της συλλοίμωξης HIV/*Toxoplasma gondii*

Το παράσιτο *T.gondii* είναι από τα πιο συχνά ευκαιριακά παθογόνα στα άτομα που νοσούν με HIV-1. Το παράσιτο εισβάλλει συχνότερα στο ΚΝΣ των ατόμων που νοσούν από των ιό και επηρεάζει σημαντικά την λειτουργία του. Η προχωρημένη λοίμωξη HIV οδηγεί σε ανεπαρκή ανοσολογική απόκριση έναντι του *T.gondii*, επανεργοποιώντας την λανθάνουσα λοίμωξη (διάσπαση των κύστεων και πολλαπλασιασμός των ταχυζωϊτών), η οποία καταλήγει σε φλεγμονή και καταστροφή των ιστών του ξενιστή. Η επανεργοποίηση της χρόνιας λοίμωξης στο ΚΝΣ συνήθως εμφανίζεται ως εγκεφαλική τοξοπλάσμωση η οποία είναι εξαιρετικά επικίνδυνη νόσος σε ασθενείς με AIDS [61].

Έχει βρεθεί ότι οι ασθενείς με συλλοίμωξη HIV/*T.gondii* παρουσιάζουν μαζί με την εγκεφαλική τοξοπλάσμωση και περαιτέρω φλεγμονή του ΚΝΣ, σημαντική νευρογνωστική επιβάρυνση, με επιδείνωση της μνήμης, των νοητικών λειτουργιών και δυνατότητας επεξεργασίας ερεθισμάτων κάτι που αυξάνει την πιθανότητα εξάρτησης αυτών των ατόμων από άλλους [61]. Ο πνεύμονας αποτελεί μια συνηθισμένη εστία μόλυνσης του *T.gondii* σε άτομα με HIV και συνοδεύεται με υποξία εμπύρετη ασθένεια με βήχα και δύσπνοια. Σπάνιες περιπτώσεις αιμοφαγοκυτταρικού συνδρόμου (HPS) έχουν αναφερθεί σε άτομα με συλλοίμωξη. Ανεξάρτητα από την ανοσολογική κατάσταση του ατόμου η πρωτογενή λοίμωξη από *T.gondii* είναι κυρίως ασυμπτωματικοί και σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζεται εξάνθημα ωχράς κηλίδας και αναπνευστικά προβλήματα [62].

Πρέπει να τονιστεί ότι η συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικής τοξοπλάσμωσης έχει μειωθεί σημαντικά στα άτομα με HIV μετά την εύρεση της HAART. Άτομα που λαμβάνουν και δευτερογενή προφύλαξη για την καταπολέμηση της τοξοπλάσμωσης, μπορούν να διακόψουν την θεραπεία όταν ο αριθμός των CD4⁺ T λεμφοκυττάρων ξεπεράσει τα 200 κύτταρα/μL με ταυτόχρονη μείωση των ενεργοποιημένων CD8⁺ T κυττάρων, όταν η έκκριση της IFN-γ επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα και παρεμποδιστεί η αντιγραφή του HIV, κάτι που επιτυγχάνεται με την HAART [63].

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης και του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της νόσου από HIV είναι ελάχιστα κατανοητές. Παρόλο που είναι γνωστό ότι η ο HIV προκαλεί σημαντική ανοσοκαταστολή που οδηγεί στην ενεργοποίηση της λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης, είναι ελάχιστα γνωστά για τις επιδράσεις του παράσιτου *T.gondii* στην εξέλιξη του HIV. Έχει αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της συλλοίμωξης

HIV/*T.gondii* παρατηρείται μια μείωση στην πλειονότητα των υποομάδων λεμφοκυττάρων. Σε μια ερευνά κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας τοξοπλάσμωσης, τα άτομα που είναι μολυσμένα με HIV παρουσίασαν μεγαλύτερη απώλεια CD4⁺ T λεμφοκυττάρων, τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην ανοσία έναντι του *T.gondii* και στην παραγωγή IFN- γ , με ταυτόχρονη μείωση των B κυττάρων, των NK και των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου που νοσούσε μόνο με HIV και παρουσίαζε μικρότερη μείωση [64].

Λίγα έχουν βρεθεί για την απέκκριση κυτταροκινών κατά τη διάρκεια της συλλοίμωσης HIV/*T.gondii*. Γενικά η συλλοίμωση έχει συσχετιστεί με σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση IFN- γ [65]. Παράλληλα, χαμηλότερη συγκέντρωση παρατηρείται και στην IL-2 [63]. Ταυτόχρονα, έχει εντοπιστεί μια σχετική αύξηση στην IL-6 και TNF- α , η οποία θα μπορούσε να συσχετιστεί με επιδείνωση των ευκαιριακών λοιμώξεων στα άτομα με HIV [65].

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης των ασθενών με παρασιτικές συλλοιμώσεις. Πιο ειδικά, μελετήθηκε η μεταβολή συγκεκριμένων κυτταροκινών σε ορούς ασθενών, οι οποίοι ήταν θετικοί στον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και στο πρωτόζωο παράσιτο *Toxoplasma gondii*, καθώς και σε ορούς ασθενών οι οποίοι ήταν θετικοί στον ιό HIV και στο πρωτόζωο παράσιτο *Leishmania infantum*.

2.2. Υλικά – Μέθοδοι

2.2.1. Συλλογή & Προετοιμασία δειγμάτων

Η μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης πραγματοποιήθηκε σε δείγματα τα οποία παραχωρήθηκαν από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) κατά τη χρονική περίοδο 2019-2020. Όλα τα δείγματα ανήκαν σε άτομα διαγνωσμένα για πρώτη φορά με τον ιό HIV, χωρίς να έχουν λάβει αντιρετροϊκή θεραπεία (HAART). Επιβεβαιώθηκε επίσης ότι τα δείγματα αυτά ήταν θετικά είτε στο παράσιτο *Leishmania infantum*, είτε στο παράσιτο *Toxoplasma gondii*. Η αρχική επιβεβαίωση ότι οι ασθενείς νοσούν με τον ιό του HIV έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ ενώ η διάγνωση ότι οι ασθενείς νοσούν με το παράσιτο *Toxoplasma gondii* ή *Leishmania infantum* έγινε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας- Ε.Μ.Μ.Α του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, στα πλαίσια της ερευνητικής διπλωματικής εργασίας

με θέμα «Διερεύνηση συλλοίμωξης HIV – πρωτόζωων παράσιτων σε ορούς HIV+ ασθενών» κατά το χρονικό διάστημα 2021-2022 [66]. Τα δείγματα φυλάσσονταν στους -80°C, σε οριζόντια θέση, αποφεύγοντας τους επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης, απόψυξης. Για να χρησιμοποιηθούν οι οροί στα πειράματα ήταν απαραίτητη η καλή απόψυξη τους και η διατήρηση τους στους -20°C. Η απόρριψη και ο χειρισμός των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες με τίτλο «Αρχές και μεθοδολογία για την διάγνωση της HIV λοίμωξης» του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ.).

2.2.2. Σχεδιασμός μελέτης

Τα πειράματα για την παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία διεξήχθησαν στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ-Ε.Ι.Π.

Συνολικά, στη διάθεση μας είχαμε 40 ορούς εκ των οποίων : οι 10 ήταν θετικοί μόνο στον ιό HIV, οι 6 ήταν θετικοί στον ιό HIV, στο παράσιτο *T.gondii* αλλά και στο παράσιτο *L.infantum*, οι 5 ήταν θετικοί στον ιό HIV και στο παράσιτο *L.infantum*, οι 10 οροί ήταν θετικοί στον ιό HIV και στο παράσιτο *T.gondii*, οι 5 ήταν αρνητικοί στα παράσιτα και στον ιό HIV και τέλος είχαμε 4 ορούς θετικούς στον ιό HIV και με σικτό αποτέλεσμα ανοσοφθορισμού για το παράσιτο *L.infantum*. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η μεταβολή των κυτταροκινών ιντερφερόνη-γ, ιντερλευκίνη-6, ιντερλευκίνη-10, ιντερλευκίνη-17Α και ιντερλευκίνη-22 με ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA). Σε όλα τα πειράματα της ELISA κάθε ορός ελέγχθηκε σε δύο θέσεις εξέτασης (duplicate) και σε αραιώση ¼.

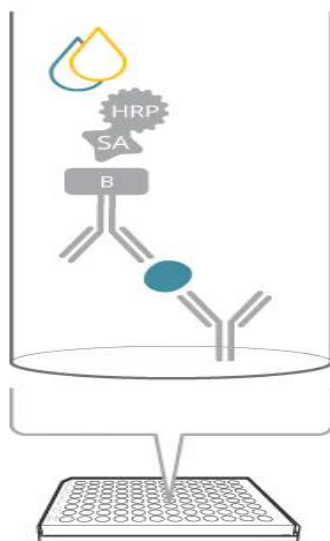
2.2.3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης με ELISA

Η αρχή μεθόδου και η παρακάτω πειραματική διαδικασία βασίζονται στις οδηγίες χρήσης που περιείχαν τα kit ELISA της εταιρείας MABTECH, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η MABTECH έχει έδρα την Σουηδία και το σύστημα διαχείρισης ποιότητάς της εταιρείας αυτής συμφωνεί με τα πρότυπα ISO 9001:2015 & ISO 1385:2016. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα kit ELISA της εταιρείας Fine Biotech, η οποία έχει έδρα την Κίνα και το σύστημα διαχείρισης ποιότητας της εταιρείας συμφωνεί με τα πρότυπα ISO 9001:2015.

Αρχή Μεθόδου

Η Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης (ELISA) είναι μια αναλυτική μέθοδος όπου χρησιμοποιεί ειδικά αντισώματα για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διάφορων πρωτεϊνών και βιοδεικτών σε ένα διάλυμα. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρήσιμη στη διάγνωση αλλά και στην ερευνά.

Σύμφωνα με την αρχή μεθόδου μιας ELISA τύπου «sandwich», σε μια πλάκα μικροτιτλοδότησης υπάρχει καθηλωμένο στη στερεά φάση των φρεατίων αντίσωμα ειδικό έναντι αντιγόνου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (το αντίγονο προς μέτρηση σε αυτό το πείραμα είναι η εκάστοτε κυτταροκίνη). Μετά την προσθήκη του δείγματος ορού, το αντίγονο συνδέεται στο καθηλωμένο αντίσωμα. Ακολουθεί η προσθήκη του επισημασμένου με βιοτίνη μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης (mAb). Η βιοτίνη, γνωστή και ως βιταμίνη B7 ή βιταμίνη H, είναι μια ετεροκυκλική ένωση που δρα ως συνένζυμο στη φύση. Το mAb ανίχνευσης συνδέεται με το αντιγόνο, αλλά σε διαφορετικό αντιγονικό επίτοπο από αυτόν που έχει ήδη δεσμεύσει το προσκολλημένο στη στερεά φάση αντίσωμα. Στο επόμενο βήμα, προστίθεται το ένζυμο Στρεπταβιδίνη συζευγμένο με το ένζυμο Υπεροξειδάση του χρένου (SA-HRP). Η στρεπταβιδίνη είναι μια πρωτεΐνη 66kD στην τετραμερή της μορφή, η οποία συνδέεται με εξαιρετικά ειδικό τρόπο με τη συζευγμένη βιοτίνη στο mAb. Στη συνέχεια, προστίθεται και το υπόστρωμα TMB το οποίο καταλύεται από το HRP και προσδίδει μπλε χρώμα στο διάλυμα. Τέλος, προστίθεται θειικό οξύ (H₂SO₄) που θα σταματήσει την αντίδραση χρώματος και το διάλυμα θα αποκτήσει κίτρινο χρώμα. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γίνεται εντός λίγων λεπτών στα 450nm [67](**Εικόνα 14**).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό του φρεατίου μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης με την μέθοδο ELISA τύπου sandwich [67].

2.2.3.1. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IFN- γ

A) Εξοπλισμός-Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Πολυκάναλη, αυτόματη πιπέτα των 300 μ L (8 καναλιών)
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 10 μ L & 100 μ L & 1000 μ L

- Tips για τις πιπέτες
- Φιαλίδια φυγοκέντρησης (Eppendorf tubes)
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450 nm)
- Απορροφητικό χαρτί
- Αποσταγμένο νερό (dH₂O)
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- Σωληνάρια κωνικά (Falcon)
- Αναδευτήρας Vortex
- Εμπορικά διαθέσιμο kit ELISA Pro: Human IFN-γ της MABTECH

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IFN-γ των εξεταζόμενων ορών χρησιμοποιήθηκε το kit με την εμπορική ονομασία ELISA Pro: Human IFN-γ της MABTECH.

Τα αντιδραστήρια που περιείχε το kit ELISA Pro: Human IFN-γ είναι τα ακόλουθα:

i. Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Η πλάκα αποτελείται από 8 γραμμές αριθμημένες με το γράμμα A έως το γράμμα H και 12 στήλες αριθμημένες με το γράμμα 1 έως 12. Συνολικά δηλαδή υπάρχουν 96 φρεάτια (wells) στην κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο πυθμένας του κάθε φρεατίου είναι επιστρωμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 1-D1K έναντι της IFN-γ.

ii. Recombinant human IFN-γ ELISA Standard (1 µg/mL)

Το πρότυπο διάλυμα ELISA περιέχει λυοφιλιωμένη σκόνη ανασυνδυασμένης ανθρώπινης IFN-γ. Πραγματοποιείται ανασύσταση της λυοφιλιωμένης σκόνης με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης πριν την πρώτη χρήση. Με το πέρας του πειράματος το πρότυπο διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C σε aliquots ενώ αποφεύγονται οι επανειλημμένοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης.

iii. Detection mAb 7-B6-1, biotinylated (1 mg/mL)

Θετικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης mAb 7-B6-1 (επισημασμένο με βιοτίνη) το οποίο είναι ειδικό έναντι της IFN-γ.

iv. Διάλυμα Streptavidin-HRP

Διάλυμα που περιέχει το ένζυμο Στρεπταβιδίνη, συζευγμένο με το ένζυμο Υπεροξειδάση (SA-HRP) και το συντηρητικό Kathon CG¹.

v. Standard reconstitution buffer A8

Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης, που χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του λυοφιλιωμένου πρότυπου διαλύματος ELISA.

vi. Wash buffer concentrate 20X

Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG (χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X μετά από αραιώση με αποσταγμένο νερό).

vii. ELISA diluent

Αραιωτικό διάλυμα ELISA που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων και του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης. Το αραιωτικό διάλυμα ELISA εμποδίζει τις διασταυρούμενες αντιδράσεις, διότι δεσμεύεται και μπλοκάρει τα ετερόφυλα αντισώματα και αποτρέπει τα ψευδή θετικά σήματα.

viii. Streptavidin-HRP diluent

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος Στρεπταβιδίνη-Υπεροξειδάση (SA-HRP).

ix. TMB substrate

Το διάλυμα περιέχει το υπόστρωμα 3,3',5,5'-Τετραμεθυλοβενζιδίνη (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine - TMB) σε συγκέντρωση <1% και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε συγκέντρωση <0,1%.

x. Stop solution H₂SO₄

Διάλυμα που περιέχει θειικό οξύ (0,96%), σταματάει τη χρωμογόνο αντίδραση και μετατρέπει το μπλε χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο.

xi. Αυτοκόλλητο κάλυμμα πλάκας

¹ Το Kathon CG περιέχει ένα μείγμα από 5-Χλωρο-2-μεθυλ-4-ισοθειαζολιν-3-όνη <0.002% και 2-Μεθυλ-4-ισοθειαζολιν-3-όνη <0,002%

B) Πειραματική διαδικασία

Για την ποσοτική μέτρηση της IFN- γ με το kit ELISA Pro: Human IFN- γ ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

- 1) Καθορισμός της σειράς και της θέσης του κάθε δείγματος, των προτύπων και του τυφλού στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης.
- 2) Προετοιμασία διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer) 1X: Σε 950mL dH₂O προστέθηκαν 50 mL Wash Buffer 20X (σε ογκομετρικό κυλίνδρο)
- 3) Προετοιμασία αραιωμένων δειγμάτων (αραίωση ¼): Για κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf, προστέθηκαν 52,5 μ L δείγμα (Stock) και 157,5 μ L ELISA diluent.
- 4) Προετοιμασία ELISA Standard Stock: Στο λυοφιλιωμένο πρότυπο προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης ELISA. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με περιδίνηση (Vortex).
- 5) Προετοιμασία διαδοχικά αραιωμένων προτύπων Standard για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (σταθερότητα για 30 λεπτά):
 - Αραίωση APXIKH (10 ng/mL): Σε 380 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 20 μ L από το Standard Stock (αυτή η αραίωση δεν συμμετέχει στην πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιείται μόνο για την δημιουργία των υπολοίπων αραιώσεων)
 - Αραίωση A (1000 pg/mL): Σε 360 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 40 μ L από την αραίωση APXIKH
 - Αραίωση B (289 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση A
 - Αραίωση C (84 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση B
 - Αραίωση D (24 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση C
 - Αραίωση E (7 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση D
 - Αραίωση F (2 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση E
 - Αραίωση G (0,6 pg/mL): Σε 295 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 120 μ L από την αραίωση F
 - Blank (no standard 0 pg/mL): 270 μ L αραιωτικού διαλύματος ELISA.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν πέντε εκπλύσεις της πλάκας με Wash Buffer 1X (300 μ L/φρεάτιο).
- 7) Τοποθέτηση 100 μ L σε κάθε φρεάτιο των διαδοχικών αραιώσεων, του τυφλού δείγματος- Blank και έκαστο εκ των εξεταζόμενων ορών σε δύο θέσεις εξέτασης.

- 8) Κάλυψη της πλάκας με το αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 2 ώρες.
- 9) Προετοιμασία του αραιωμένου mAb ανίχνευσης (Detection) (αραίωση 1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L detection mAb σε 12 mL αραιωτικού διαλύματος ELISA (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 10) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 11) Τοποθέτηση 100 μ L Detection mAb/ φρεάτιο
- 12) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 13) Προετοιμασία του διαλύματος Streptavidin-HRP (1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L Streptavidin-HRP σε 12 mL Streptavidin-HRP diluent (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 14) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 15) Τοποθέτηση 100 μ L Streptavidin-HRP/ φρεάτιο.
- 16) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 17) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 18) Τοποθέτηση 100 μ L TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα).
- 19) Κάλυψη της πλάκας με μεμβράνη και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου σε σκοτεινό θάλαμο για 15 λεπτά.
- 20) Τοποθέτηση 100 μ L Stop solution/φρεάτιο σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα).
- 21) Μέτρηση της απορρόφησης με φασματόφωτομετρο, κατευθείαν (μέσα σε 15 λεπτά) στα 450 nm με μήκος μέτρησης αναφοράς μεταξύ 570 nm και 650 nm.

Μετα την μέτρηση της απορρόφησης των 7 προτύπων (τιμές συγκέντρωσης που κυμαίνονται από 0,6 έως 1000 μ g/mL) και του αρνητικού μαρτυρά στο λ_{\max} (450 nm), κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη της ποσοτικής μέτρησης των εξεταζόμενων ορών. Στον άξονα x τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις των προτύπων (C μ g/mL) και στον άξονα y οι αντίστοιχες μέσες τιμές των απορροφήσεων τους (OD_{mean} σε nm για το κάθε duplicate προτύπου). Η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος είναι ανάλογη της τιμής της απορρόφησης και υπολογίζεται με την εξίσωση που προκύπτει με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ελεύθερης πρόσβασης Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3).

Από τις απορροφήσεις του κάθε δείγματος και των προτύπων αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα πριν την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση που υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης πολλαπλασιάζεται με τη σχετική αναλογία αραίωσης.

2.2.3.2. Έλεγχος με ELISA για τη ποσοτική μέτρηση της IL-6

A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Πολυκάναλη, αυτόματη πιπέτα των 300 µL (8 καναλιών)
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 10 µL & 100 µL & 1000 µL
- Tips για τις πιπέτες
- Φιαλίδια φυγοκέντρησης (Eppendorf tubes)
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450 nm)
- Απορροφητικό χαρτί
- Αποταγμένο νερό (dH₂O)
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- Σωληνάρια κωνικά (Falcon)
- Αναδευτήρας Vortex
- Εμπορικά διαθέσιμο kit ELISA Pro: Human IL-6 της MABTECH

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IL-6 των εξεταζόμενων ορών χρησιμοποιήθηκε το kit με την εμπορική ονομασία ELISA Pro: Human IL-6 της MABTECH.

Τα αντιδραστήρια που περιείχε το kit ELISA Pro: Human IL-6 είναι τα ακόλουθα:

i. Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Η πλάκα αποτελείται από 8 γραμμές αριθμημένες με το γράμμα A έως το γράμμα H και 12 στήλες αριθμημένες με το γράμμα 1 έως 12. Συνολικά δηλαδή έχουμε 96 φρεάτια στην κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο πυθμένας του κάθε φρεάτιου είναι επιστρωμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 13A5 έναντι της IL-6.

ii. Recombinant human IL-6 ELISA Standard (1 µg/mL)

Το πρότυπο διάλυμα ELISA περιέχει λυοφιλιωμένη σκόνη ανασυνδιασμένης ανθρώπινης IL-6. Πραγματοποιείται ανασύσταση της λυοφιλιωμένης σκόνης με 1mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης πριν την πρώτη χρήση. Με το πέρας του πειράματος το πρότυπο διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C σε αλίωτος και αποφεύγονται οι επανειλημμένοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης.

iii. Detection mAb 39C3, biotinylated (1 mg/mL)

Θετικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης mAb 39C3 (επισημασμένο με βιοτίνη) το οποίο είναι ειδικό έναντι της IL-6.

iv. Διάλυμα Streptavidin-HRP

Διάλυμα που περιέχει το ένζυμο Στρεπταβιδίνη, συζευγμένο με το ένζυμο Υπεροξειδάση (SA-HRP) και το συντηρητικό Kathon CG.

v. Standard reconstitution buffer A5

Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης, που χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του λυοφιλιωμένου πρότυπου διαλύματος ELISA.

vi. Wash buffer concentrate 20X

Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG (χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X μετά από αραιώση με αποσταγμένο νερό)

vii. ELISA diluent

Αραιωτικό διάλυμα ELISA που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων και του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης. Το αραιωτικό διάλυμα ELISA εμποδίζει τις διασταυρούμενες αντιδράσεις διότι δεσμεύεται και μπλοκάρει τα ετερόφυλα αντισώματα και αποτρέπει τα ψευδοί θετικά σήματα.

viii. Streptavidin-HRP diluent

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος Στρεπταβιδίνη-Υπεροξειδάση (SA-HRP).

ix. TMB substrate

Το διάλυμα περιέχει το υπόστρωμα 3,3',5,5'-Τετραμεθυλοβενζιδίνη (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin - TMB) σε συγκέντρωση <1% και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε συγκέντρωση <0,1%.

x. Stop solution H₂SO₄

Διάλυμα που περιέχει θειικό οξύ (0,96%), σταματάει τη χρωμογόνο αντίδραση και μετατρέπει το μπλε χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο.

xi. Αυτοκόλλητο κάλυμμα πλάκας

B) Πειραματική διαδικασία

Για την ποσοτική μέτρηση της IL-6 με το kit ELISA Pro: Human IL-6 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

- 1) Καθορισμός της σειράς και της θέσης του κάθε δείγματος, των προτύπων και του αρνητικού μάρτυρα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης.
- 2) Προετοιμασία διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer) 1X: Σε 950 mL dH₂O προστέθηκαν 50 mL Wash Buffer 20X (σε ογκομετρικό κύλινδρο).
- 3) Προετοιμασία αραιωμένων δειγμάτων (αραίωση ¼): Για κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf, προστέθηκαν 52,5 μL δείγμα (Stock) και 157,5 μL ELISA diluent.
- 4) Προετοιμασία ELISA Standard Stock: Στο λυοφιλωμένο πρότυπο προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης ELISA. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με περιδίνηση (Vortex).
- 5) Προετοιμασία διαδοχικά αραιωμένων προτύπων Standard για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (σταθερότητα για 30 λεπτά):
 - Αραίωση APXIKH (10 ng/mL): Σε 990 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 10 μL από το Standard Stock (αυτή η αραίωση δεν συμμετέχει στην πρότυπη καμπύλη , χρησιμοποιείται μόνο για την δημιουργία των υπολοίπων αραιώσεων)
 - Αραίωση A (3160 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση APXIKH
 - Αραίωση B (1000 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση A
 - Αραίωση C (316 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μ από την αραίωση B
 - Αραίωση D (100 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση C
 - Αραίωση E (31,6 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση D
 - Αραίωση F (10 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστεθηκαν, 125 μL από την αραίωση E
 - Αραίωση G (3,16 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση F
 - Blank (no standard 0 pg/mL): 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν πέντε εκπλύσεις της πλάκας με Wash Buffer 1X (300 μL/φρεάτιο).
- 7) Τοποθέτηση 100 μL σε κάθε φρεάτιο των διαδοχικών αραιώσεων, του τυφλού δείγματος-Blank και έναστο εκ των εξεταζόμενων ορών σε δύο θέσεις εξέτασης.

- 8) Κάλυψη της πλάκας με το αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 2 ώρες.
- 9) Προετοιμασία του αραιωμένου mAb ανίχνευσης (Detection) (αραίωση 1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L detection mAb σε 12 mL αραιωτικού διαλύματος ELISA (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 10) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 11) Τοποθέτηση 100 μ L Detection mAb/ φρεάτιο
- 12) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 13) Προετοιμασία του διαλύματος Streptavidin-HRP (1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L Streptavidin-HRP σε 12 mL Streptavidin-HRP diluent (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 14) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 15) Τοποθέτηση 100 μ L Streptavidin-HRP/φρεάτιο
- 16) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 17) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 18) Τοποθέτηση 100 μ L TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα).
- 19) Κάλυψη της πλάκας με μεμβράνη και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου σε σκοτεινό θάλαμο για 15 λεπτά.
- 20) Τοποθέτηση 100 μ L Stop solution/φρεάτιο).
- 21) Μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο, κατευθείαν (μέσα σε 15 λεπτά) στα 450 nm με μήκος μέτρησης αναφοράς μεταξύ 570 nm και 650 nm.

Μετά την μέτρηση της απορρόφησης των 7 προτύπων (τιμές συγκέντρωσης που κυμαίνονται από 3,16 έως 3160 μ g/mL) και του αρνητικού μάρτυρα στο λ_{\max} (450 nm), κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την ποσοτική μέτρηση των δειγμάτων αυτών. Στον άξονα x τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις των προτύπων (C μ g/mL) και στον άξονα y οι αντίστοιχες μέσες τιμές των απορροφήσεων τους (OD_{mean} σε nm για το κάθε duplicate προτύπου). Η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος είναι ανάλογη της τιμής της απορρόφησης και υπολογίζεται με την εξίσωση που προκύπτει με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ελεύθερης πρόσβασης Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3).

Από τις απορροφήσεις του κάθε δείγματος και των προτύπων αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα πριν την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση που υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης πολλαπλασιάζεται με τη σχετική αναλογία αραιώσης.

2.2.3.3. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-10

A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Πολυκάναλη, αυτόματη πιπέτα των 300 μ L (8 καναλιών)
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 10 μ L & 100 μ L & 1000 μ L
- Tips για τις πιπέτες
- Φιαλίδια φυγοκέντρησης (Eppendorf tubes)
- Φασματοφώτομετρο για μικροπλάκες (450 nm)
- Απορροφητικό χαρτί
- Αποσταγμένο νερό (dH₂O)
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- Σωληνάρια κωνικά (Falcon)
- Αναδευτήρας Vortex
- Εμπορικά διαθέσιμο kit ELISA Pro: Human IL-10 της MABTECH

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IL-10 των εξεταζόμενων ορών χρησιμοποιήθηκε το kit με την εμπορική ονομασία ELISA Pro: Human IL-10 της MABTECH.

Τα αντιδραστήρια που περιείχε το kit ELISA Pro: Human IL-10 είναι τα ακόλουθα:

i. Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Η πλάκα αποτελείται από 8 γραμμές αριθμημένες με το γράμμα A έως το γράμμα H και 12 στήλες αριθμημένες με το γράμμα 1 έως 12. Συνολικά δηλαδή υπάρχουν 96 φρεάτια στην κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο πυθμένας του κάθε φρεατίου είναι επιστρωμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα mAb 9D7 έναντι της IL-10.

ii. Recombinant human IL-10 ELISA Standard (0,25 μ g/mL)

Το πρότυπο διάλυμα ELISA περιέχει λυοφιλιωμένη σκόνη ανασυνδιασμένης ανθρώπινης IL-10. Πραγματοποιείται ανασύσταση της λυοφιλιωμένης σκόνης με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης πριν την πρώτη χρήση. Με το πέρας του πειράματος το πρότυπο διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C σε aliquots και αποφεύγονται οι επανειλημμένοι κύκλοι ψύξης-απόψυξης.

iii. Detection mAb 12G8, biotinylated (1 mg/mL)

Θετικός μάρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης mAb 12G8 (επισημασμένο με βιοτίνη) το οποίο είναι ειδικό έναντι της IL-10.

iv. Διάλυμα Streptavidin-HRP

Διάλυμα που περιέχει το ένζυμο Στρεπταβιδίνη, συζευγμένο με το ένζυμο Υπεροξειδάση (SA-HRP) και το συντηρητικό Kathon CG.

v. Standard reconstitution buffer A5

Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης, που χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του λυοφιλιωμένου πρότυπου διαλύματος ELISA.

vi. Wash buffer concentrate 20X

Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG (χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X μετά από αραιώση με αποσταγμένο νερό).

vii. ELISA diluent

Αραιωτικό διάλυμα ELISA που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων και του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης. Το αραιωτικό διάλυμα ELISA εμποδίζει τις διασταυρούμενες αντιδράσεις, διότι δεσμεύεται και μπλοκάρει τα ετερόφυλα αντισώματα και αποτρέπει τα ψευδή θετικά σήματα.

viii. Streptavidin-HRP diluent

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος Στρεπταβιδίνη-Υπεροξειδάση (SA-HRP).

ix. TMB substrate

Το διάλυμα περιέχει το υπόστρωμα 3,3',5,5'-Τετραμεθυλοβενζιδίνη (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine - TMB) σε συγκέντρωση <1% και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε συγκέντρωση <0,1%.

x. Stop solution H₂SO₄

Διάλυμα που περιέχει θειικό οξύ (0,96%), σταματάει τη χρωμογόνο αντίδραση και μετατρέπει το μπλε χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο.

xi. Αυτοκόλλητο κάλυμμα πλάκας

B) Πειραματική διαδικασία

Για την ποσοτική μέτρηση της IL-10 με το kit ELISA Pro: Human IL-10 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

- 1) Καθορισμός της σειράς και της θέσης του κάθε δείγματος , των προτύπων και του αρνητικού μάρτυρα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης .
- 2) Προετοιμασία διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer) 1X: Σε 950 mL dH₂O προστέθηκαν 50 mL Wash Buffer 20X (σε ογκομετρικού κυλίνδρου).
- 3) Προετοιμασία αραιωμένων δειγμάτων (αραίωση ¼): Για κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf, προστέθηκαν 52,5 μL δείγμα (Stock) και 157,5 μL διαλυτικού μέσου ELISA diluent.
- 4) Προετοιμασία ELISA Standard Stock: Στο λυοφιλωμένο πρότυπο προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης ELISA. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με περιδίνηση (Vortex).
- 5) Προετοιμασία διαδοχικά αραιωμένων προτύπου Standard για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (σταθερότητα για 30 λεπτά):
 - Αραίωση APXIKH (10 ng/mL): Σε 960 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 40 μL από το Standard Stock (αυτή η αραίωση δεν συμμετέχει στην πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιείται μόνο για την δημιουργία των υπολοίπων αραιώσεων).
 - Αραίωση A (1000 pg/mL): Σε 360 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 40 μL από την αραίωση APXIKH
 - Αραίωση B (316 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση A
 - Αραίωση C (100 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση B
 - Αραίωση D (31,6 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση C
 - Αραίωση E (10 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση D
 - Αραίωση F (3,16 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση E
 - Αραίωση G (1 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση F
 - Blank (no standard 0 pg/mL): 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν πεντε εκπλύσεις της πλάκας με Wash Buffer 1X (300 μL/φρεάτιο).
- 7) Τοποθέτηση 100μL σε κάθε φρεάτιο, των (διαδοχικών αραιώσεων), του τυφλού δείγματος- Blank και έκαστο εκ των εξεταζόμενων ορών σε δύο θέσεις εξέτασης.

- 8) Κάλυψη της πλάκας με το αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 2 ώρες.
- 9) Προετοιμασία του αραιωμένου mAb ανίχνευσης (Detection) (αραίωση 1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L detection mAb σε 12 mL αραιωτικού διαλύματος ELISA (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 10) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 11) Τοποθέτηση 100 μ L Detection mAb/φρεάτιο
- 12) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 13) Προετοιμασία του διαλύματος Streptavidin-HRP (1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L Streptavidin-HRP σε 12 mL Streptavidin-HRP diluent (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 14) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 15) Τοποθέτηση 100 μ L Streptavidin-HRP/φρεάτιο
- 16) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου για 1 ώρα.
- 17) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 18) Τοποθέτηση 100 μ L TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα).
- 19) Κάλυψη της πλάκας με μεμβράνη και επώαση σε θερμοκρασία δωμάτιου σε σκοτεινό θάλαμο για 15 λεπτά.
- 20) Τοποθέτηση 100 μ L Stop solution /φρεάτιο
- 21) Μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο, κατευθείαν (μέσα σε 15 λεπτά) στα 450nm με μήκος μέτρησης αναφοράς μεταξύ 570nm και 650nm.

Μετά την μέτρηση της απορρόφησης των 7 προτύπων (τιμές συγκέντρωσης που κυμαίνονται από 1 έως 1000 μ g/mL) και του αρνητικού μάρτυρα στο λ_{\max} (450nm), κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την ποσοτική μέτρηση των δειγμάτων αυτών. Στον άξονα x τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις των προτύπων (C μ g/mL) και στον άξονα y οι αντίστοιχες μέσες τιμές των απορροφήσεων τους (OD_{mean} σε nm για κάθε duplicate προτύπου). Η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος είναι ανάλογη της τιμής της απορρόφησης και υπολογίζεται με την εξίσωση που προκύπτει με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ελεύθερης πρόσβασης Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3).

Από τις απορροφήσεις του κάθε δείγματος και των προτύπων αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα πριν την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση που υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης πολλαπλασιάζεται με τη σχετική αναλογία αραιώσης.

2.2.3.5. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-17A

A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Πολυκάναλη, αυτόματη πιπέτα των 300 µL (8 καναλιών)
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 10 µL & 100 µL & 1000 µL
- Tips για τις πιπέτες
- Φιαλίδια φυγοκέντρησης (Eppendorf tubes)
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450 nm)
- Απορροφητικό χαρτί
- Αποσταγμένο νερό (dH₂O)
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000 mL
- Σωληνάρια κωνικά (Falcon)
- Αναδευτήρας Vortex
- Εμπορικά διαθέσιμο kit ELISA Pro: Human IL-17A της MABTECH

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IL-17A των εξεταζόμενων ορών χρησιμοποιήθηκε το kit με την εμπορική ονομασία ELISA Pro: Human IL-17A της MABTECH.

Τα αντιδραστήρια που περιείχε το kit ELISA Pro: Human IL-17A είναι τα ακόλουθα:

i. Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Η πλάκα αποτελείται από 8 γραμμές αριθμημένες με το γράμμα A έως το γράμμα H και 12 στήλες αριθμημένες με το γράμμα 1 έως 12. Συνολικά δηλαδή έχουμε 96 φρεάτια στην κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ον πυθμένας του κάθε φρεάτιου είναι επιστρωμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα MT44.6 έναντι της IL-17A.

ii. Recombinant human IL-17A ELISA Standard (1 µg/mL)

Το πρότυπο διάλυμα ELISA περιέχει λυοφιλιωμένη σκόνη ανασυνδιασμένης ανθρώπινης IL-17A. Πραγματοποιείται ανασύσταση της λυοφιλιωμένης σκόνης με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης πριν την πρώτη χρήση. Με το πέρας του πειράματος το πρότυπο διάλυμα φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C σε aliquots και αποφεύγονται οι επανειλημμένοι κύκλοι ψύξης- απόψυξης.

iii. Detection mAb MT504, biotinylated (0,5 mg/mL)

Θετικός μαρτυρας του πειράματος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης mAb MT504 (επισημασμένο με βιοτίνη) το οποίο είναι ειδικό έναντι της IL-17A.

iv. Διάλυμα Streptavidin-HRP

Διάλυμα που περιέχει το ένζυμο Στρεπταβιδίνη, συζευγμένο με το ένζυμο Υπεροξειδάση (SA-HRP) και το συντηρητικό Kathon CG*.

v. Standard reconstitution buffer A8

Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύστασης, που χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του λυοφιλιωμένου πρότυπου διαλύματος ELISA.

vi. Wash buffer concentrate 20X

Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG (χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X μετά από αραιώση με αποσταγμένο νερό).

vii. ELISA diluent

Αραιωτικό διάλυμα ELISA που περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων και του μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης. Το αραιωτικό διάλυμα ELISA εμποδίζει τις διασταυρούμενες αντιδράσεις, διότι δεσμεύεται και μπλοκάρει τα ετερόφυλα αντισώματα και αποτρέπει τα ψευδή θετικά σήματα.

viii. Streptavidin-HRP diluent

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο περιέχει το συντηρητικό Kathon CG και χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος Στρεπταβιδίνη-Υπεροξειδάση (SA-HRP).

ix. TMB substrate

Το διάλυμα περιέχει το υπόστρωμα 3,3',5,5'-Τετραμεθυλοβενζιδίνη (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin - TMB) σε συγκέντρωση <1% και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) σε συγκέντρωση <0,1%.

x. Stop solution H₂SO₄

Διάλυμα που περιέχει θειικό οξύ (0,96%), σταματάει τη χρωμογόνο αντίδραση και μετατρέπει το μπλε χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο.

xi. Αυτοκόλλητο κάλυμμα πλάκας

B) Πειραματική διαδικασία

Για την ποσοτική μέτρηση της IL-17A με το kit ELISA Pro: Human IL-17A ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) Καθορισμός της σειράς και της θέσης του κάθε δείγματος, των προτύπων και του αρνητικού μάρτυρα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης.
- 2) Προετοιμασία διαλύματος έκλυσης (Wash Buffer) 1X: Σε 950 mL dH₂O προστέθηκαν 50 mL Wash Buffer 20X (σε ογκομετρικό κύλινδρο).
- 3) Προετοιμασία αραιωμένων δειγμάτων (αραίωση ¼): Για κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf, προστέθηκαν 52,5 μL δείγμα (Stock) και 157,5 μL διαλυτικού μέσου ELISA diluent.
- 4) Προετοιμασία ELISA Standard Stock: Στο λυοφιλωμένο πρότυπο προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης ELISA. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με περιδίνηση (Vortex).
- 5) Προετοιμασία διαδοχικά αραιωμένων προτύπων Standard για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης (σταθερότητα για 30 λεπτά):
 - Αραίωση APXIKH (10 ng/mL): Σε 990 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 10 μL από το Standard Stock (αυτή η αραίωση δεν συμμετέχει στην πρότυπη καμπύλη, χρησιμοποιείται μόνο για την δημιουργία των υπολοίπων αραιώσεων).
 - Αραίωση A (1000 pg/mL): Σε 360 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 40 μL από την αραίωση APXIKH
 - Αραίωση B (316 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση A
 - Αραίωση C (100 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση B
 - Αραίωση D (31,6 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση C
 - Αραίωση E (10 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση D
 - Αραίωση F (3,16 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση E
 - Αραίωση G (1 pg/mL): Σε 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA, προστέθηκαν 125 μL από την αραίωση F
 - Blank (no standard 0 pg/mL): 270 μL αραιωτικού διαλύματος ELISA.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν πέντε εκπλύσεις της πλάκας με Wash Buffer 1X (300 μL/φρεάτιο).
- 7) Τοποθέτηση 100 μL σε κάθε φρεάτιο, των διαδοχικών αραιώσεων, του τυφλού δείγματος- Blank και έκαστο εκ των εξεταζόμενων ορών σε δύο θέσεις εξέτασης.

- 8) Κάλυψη της πλάκας με το αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.
- 9) Προετοιμασία του αραιωμένου mAb ανίχνευσης (Detection) (αραίωση 1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L detection mAb σε 12 mL αραιωτικού διαλύματος ELISA (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 10) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6
- 11) Τοποθέτηση 100 μ L Detection mAb/φρεάτιο
- 12) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα
- 13) Προετοιμασία του διαλύματος Streptavidin-HRP (1:1000): Σε ένα σωληνάριο Falcon, προστέθηκαν 12 μ L Streptavidin-HRP σε 12 mL Streptavidin-HRP diluent (το διάλυμα παραμένει σταθερό για 15 λεπτά).
- 14) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6
- 15) Τοποθέτηση 100 μ L Streptavidin-HRP/φρεάτιο
- 16) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- 17) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6
- 18) Τοποθέτηση 100 μ L TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα)
- 19) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό θάλαμο για 15 λεπτά.
- 20) Τοποθέτηση 100 μ L Stop solution/φρεάτιο
- 21) Μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο, κατευθείαν (μέσα σε 15 λεπτά) στα 450 nm με μήκος μέτρησης αναφοράς μεταξύ 570 nm και 650 nm.

Μετά την μέτρηση της απορρόφησης των 7 προτύπων (τιμές συγκέντρωσης που κυμαίνονται από 1 έως 1000 μ g/mL) και του αρνητικού μάρτυρα στο λ_{\max} (450 nm) για την ποσοτική μέτρηση των δειγμάτων δημιουργείται πρότυπη καμπύλη όπου στον άξονα x έχει τις συγκεντρώσεις των προτύπων (C μ g/mL) και στον άξονα y έχει τις αντίστοιχες μέσες τιμές των απορροφήσεων τους (OD_{mean} σε nm για κάθε duplicate προτύπου). Η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος είναι ανάλογη της τιμής της απορρόφησης και υπολογίζεται με την εξίσωση που προκύπτει με τη βοήθεια του προγράμματος Curve Expert.

Από τις απορροφήσεις του κάθε δείγματος και των προτύπων αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα. Επίσης η συγκέντρωση που υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης πολλαπλασιάζεται με τη σχετική αναλογία αραίωσης.

2.2.3.6. Έλεγχος με ELISA για την ποσοτική μέτρηση της IL-22

A) Εξοπλισμός- Αναλώσιμα- Αντιδραστήρια

- Πολυκάναλη, αυτόματη πιπέτα των 300μL (8 καναλιών)
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 10μL & 1000μL
- Tips για τις πιπέτες
- Φιαλίδια φυγοκεντρήσης (Eppendorf tubes)
- Επωαστικός κλίβανος, ρυθμισμένος σε θερμοκρασία 37 °C
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450 nm)
- Απορροφητικό χαρτί
- Αποσταγμένο νερό (dH₂O)
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 1000mL
- Σωληνάρια κωνικά (Falcon)
- Αναδευτήρας Vortex
- Εμπορικά διαθέσιμο Human IL-22 (Interleukin-22) ELISA kit της Fine Biotech

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της IL-22 των εξεταζόμενων ορών χρησιμοποιήθηκε το kit με την εμπορική ονομασία Human IL-22 (Interleukin-22) ELISA της Fine Biotech.

Τα αντιδραστήρια που περιείχε το Human IL-22 ELISA kit είναι τα ακόλουθα:

i. Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Η πλάκα αποτελείται από 8 γραμμές αριθμημένες με το γράμμα A έως το γράμμα H και 12 στήλες αριθμημένες με το γράμμα 1 έως 12. Συνολικά δηλαδή έχουμε 96 φρεάτια στην κάθε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Ο πυθμένας του κάθε φρεάτιου είναι επιστρωμένος με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της IL-22.

ii. Lyophilized Standard

Το πρότυπο διάλυμα ELISA περιέχει λυοφιλιωμένη σκόνη ανασυνδιασμένης ανθρωπίνης IL-22. Πραγματοποιείται ανασύσταση της λυοφιλιωμένης σκόνης με 1mL Sample Dilution Buffer πριν την πρώτη χρήση. Με το πέρας του πειράματος το πρότυπο διάλυμα φυλάσσεται για έως και 6 μήνες στους -20°C και αποφεύγουμε τους επανειλημμένους κύκλους ψύξης απόψυξης.

iii. Biotin-labeled Antibody (Concentrated, 100X)

Θετικός μάρτυρας του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε συμπυκνωμένο διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος ανίχνευσης (επισημασμένο με βιοτίνη) και οποίο είναι ειδικό έναντι της IL-22.

iv. HRP-Streptavidin Conjugate (SABC, 100X)

Συμπυκνωμένο διάλυμα που περιέχει Στρεπταβιδίνη, συζευγμένη με Υπεροξειδάση.

v. TMB Substrate

Διάλυμα που περιέχει το υπόστρωμα TMB

vi. Sample Dilution Buffer

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την αραιώση των δειγμάτων και του λυοφιλιωμένου προτύπου.

vii. Antibody Dilution Buffer

Αραιωτικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την αραιώση μονοκλωνικού αντισώματος (επισημασμένο με βιοτίνη).

viii. SABC Dilution Buffer

Αραιωτικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την αραιώση του διαλύματος Στρεπταβιδίνι-Υπεροξειδάση.

ix. Stop Solution

Διάλυμα που περιέχει θειικό οξύ (H_2SO_4) σταματάει τη χρωμογόνο αντίδραση και μετατρέπει το μπλε χρώμα του διαλύματος σε κίτρινο.

x. Wash Buffer(25X)

Συμπυκνωμένο διάλυμα εκπλυσης.

xi. Αυτοκόλλητο κάλυμμα πλάκας

B) Πειραματική διαδικασία

Για την ποσοτική μέτρηση της IL-22 με το Human IL-22 ELISA kit ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία :

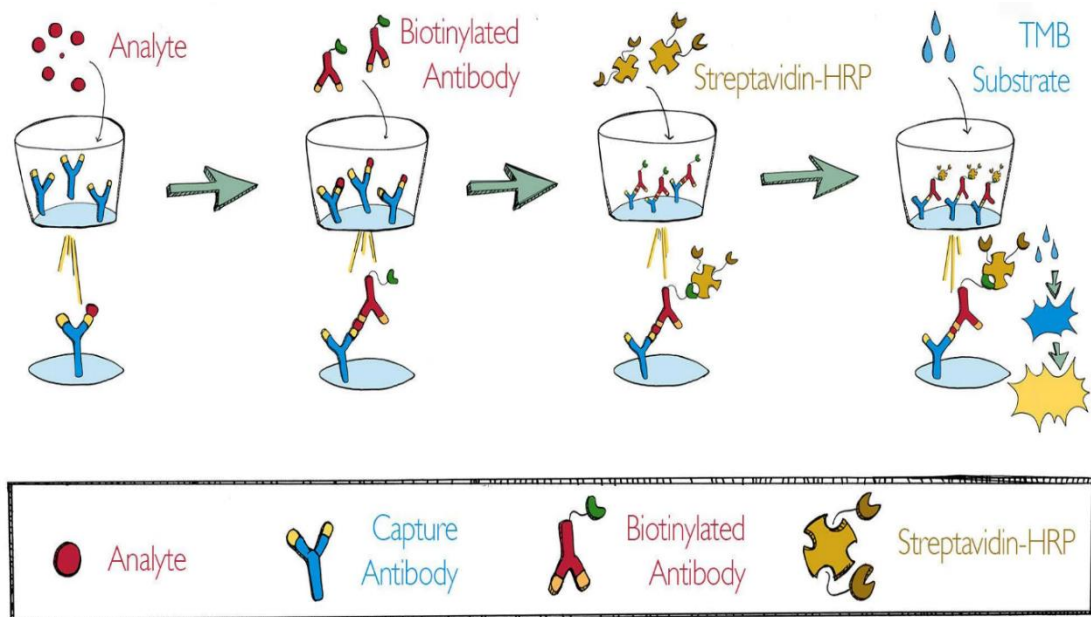
- 1) Καθορισμός της σειράς και της θέσης, του κάθε δείγματος, των προτύπων και του αρνητικού μάρτυρα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης. Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σε δύο θέσεις εξέτασης.

- 2) Προετοιμασία διαλύματος εκπλυσης (Wash Buffer) 1X: Σε 750 mL dH₂O προστέθηκαν 30 mL Concentrated Wash Buffer 25X (μέσα σε ογκομετρικό κύλινδρο).
- 3) Προετοιμασία αραιωμένων δειγμάτων (αραίωση 1/4): Για κάθε δείγμα σε ένα Eppendorf, προστέθηκαν 52,5 μL δείγμα (Stock) και 157,5 μL Sample Dilution Buffer.
- 4) Προετοιμασία ELISA Standard (Zero tube): Στο λυοφιλιωμένο προτυπο προστέθηκε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανασύστασης ELISA. Το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 10 λεπτά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση με περιδίνηση (Vortex) (η συγκέντρωση είναι 1000 pg/mL και δεν συμμετέχει στην πρότυπη καμπύλη, είναι μόνο για τη δημιουργία των υπολοίπων αραιώσεων).
- 5) Προετοιμασία διαδοχικά αραιωμένων Standard για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης:
 - Αραίωση 1/2 (500 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από τον Zero Tube
 - Αραίωση 1/4 (250 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από την αραιώση 1/2
 - Αραίωση 1/8 (125 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από την αραιώση 1/4
 - Αραίωση 1/16 (62,5 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από την αραιώση 1/8
 - Αραίωση 1/32 (31,25 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από την αραιώση 1/16
 - Αραίωση 1/64 (15,625 pg/mL): Σε 300 μL Sample dilution buffer, προστέθηκαν 300 μL από την αραιώση 1/32
 - Blank (no standard 0 pg/mL): 300 μL Sample dilution buffer.
- 6) Πραγματοποιήθηκαν δύο εκπλύσεις της πλάκας με Wash buffer 1X (300 μL/φρεάτιο).
- 7) Τοποθέτηση 100 μL σε κάθε φρεάτιο από το πρότυπο διαδοχικών αραιώσεων, το δείγμα- Blank και έκαστο εκ των εξεταζόμενων ορών σε δύο θέσεις εξέτασης.
- 8) Κάλυψη της πλάκας με το αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 90 λεπτά.
- 9) Προετοιμασία του αραιωμένου Biotin-labeled Antibody (αραίωση 1:100): Σε 10 mL Antibody Dilution Buffer προστέθηκαν 100 μL Biotin-detection Antibody.
- 10) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6.
- 11) Τοποθέτηση 100 μL αραιωμένου Biotin-labeled Antibody/φρεάτιο
- 12) Κάλυψη της πλάκας με αυτοκόλλητο κάλυμμα και επώαση σε κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα.
- 13) Προετοιμασία του διαλύματος SABC (1:100): Σε 10 mL SABC Dilution buffer προστέθηκαν 100 μL SABC (σε ένα σωληνάριο Falcon).

- 14) Έκπλυση της πλάκας 3 φορές όπως στο στάδιο 6 και επώαση του Wash Buffer 1-2 λεπτά σε κάθε πλύση).
- 15) Τοποθέτηση 100 μL Streptavidin-HRP σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα).
- 16) Κάλυψη της πλάκας με μεμβράνη και επώαση σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C για 30 λεπτά.
- 17) Έκπλυση της πλάκας όπως στο στάδιο 6 και επώαση του Wash Buffer για 1-2 λεπτά μετά από κάθε πλύση.
- 18) Τοποθέτηση 90 μL TMB υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο (με πολυκάναλη πιπέτα)
- 19) Κάλυψη της πλάκας με μεμβράνη και επώαση σε κλίβανο στο σκοτάδι με θερμοκρασία 37°C για περίπου 20 λεπτά.
- 20) Τοποθέτηση 50 μL Stop Solution/φρεάτιο.
- 21) Μέτρηση την απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο, σε σύντομο χρονικό διάστημα, στα 450 nm.

Από την μέτρηση της απορρόφησης των 6 προτύπων (τιμές συγκέντρωσης που κυμαίνονται από 15,625 έως 500 pg/mL) και του αρνητικού μάρτυρα στο λ_{max} (450 nm), κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας την ποσοτική μέτρηση των δειγμάτων αυτών. Στον άξονα x τοποθετούνται οι συγκεντρώσεις των προτύπων (C pg/mL) και στον άξονα y οι αντίστοιχες μέσες τιμές των απορροφήσεων τους (OD_{mean} σε nm για κάθε duplicate προτύπου). Η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος είναι ανάλογη της τιμής της απορρόφησης και υπολογίζεται με την εξίσωση της ευθείας που προκύπτει με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Microsoft Excel Office.

Από τις απορροφήσεις του κάθε δείγματος και των προτύπων αφαιρείται η τιμή του αρνητικού μάρτυρα πριν την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η συγκέντρωση που υπολογίζεται με την βοήθεια της εξίσωσης πολλαπλασιάζεται με τη σχετική αναλογία αραίωσης.



Εικόνα 15: Εικονική αναπαράσταση του κάθε σταδίου της ELISA από την εταιρεία Bioss [68].

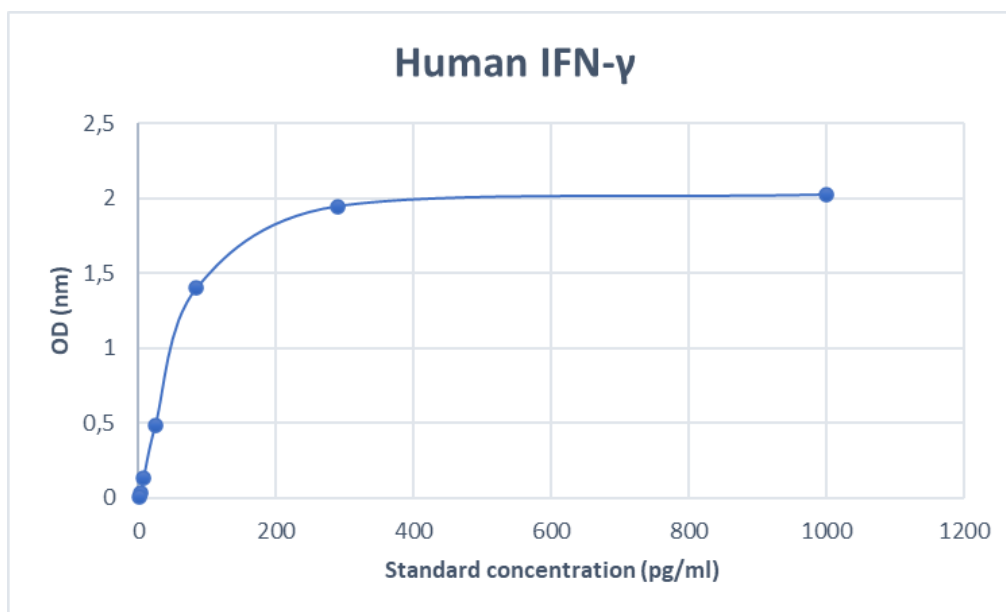
2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση όλων των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism έκδοση 8.0.1.244. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων ορών ασθενών εξετάστηκαν με one-way ANOVA. Η τιμή $p\text{-value} < 0,05$ θεωρείται στατιστικά σημαντική σε όλες τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3. Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα ELISA για την IFN- γ

Στην ELISA που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτική μέτρηση της IFN- γ εξεταστήκαν συνολικά 40 οροί από όλες τις κατηγορίες. Επιπρόσθετα, στη πλάκα τοποθετήθηκαν και 7 διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου και ο αρνητικός μάρτυρας. Με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις τιμές απορρόφησης του κάθε προτύπου του πειράματος, η οποία φαίνεται στο **Γράφημα 1**.



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη πειράματος ELISA IFN-γ.

Η εξίσωση που περιγράφει τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε με την βοήθεια του προγράμματος Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3) και ήταν της μορφής:

$$y = a(b - e^{-cx})$$

Όπου: $a = 2,037579170608912E + 00$, $b = 9,870220319517733E - 01$ και $c = 1,348943424624324E - 02$

Από τη παραπάνω εξίσωση υπολογιστήκαν οι συγκεντρώσεις των ορών, τοποθετώντας όπου y την τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος. Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης και τα δείγματα ορού που μπήκαν από κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

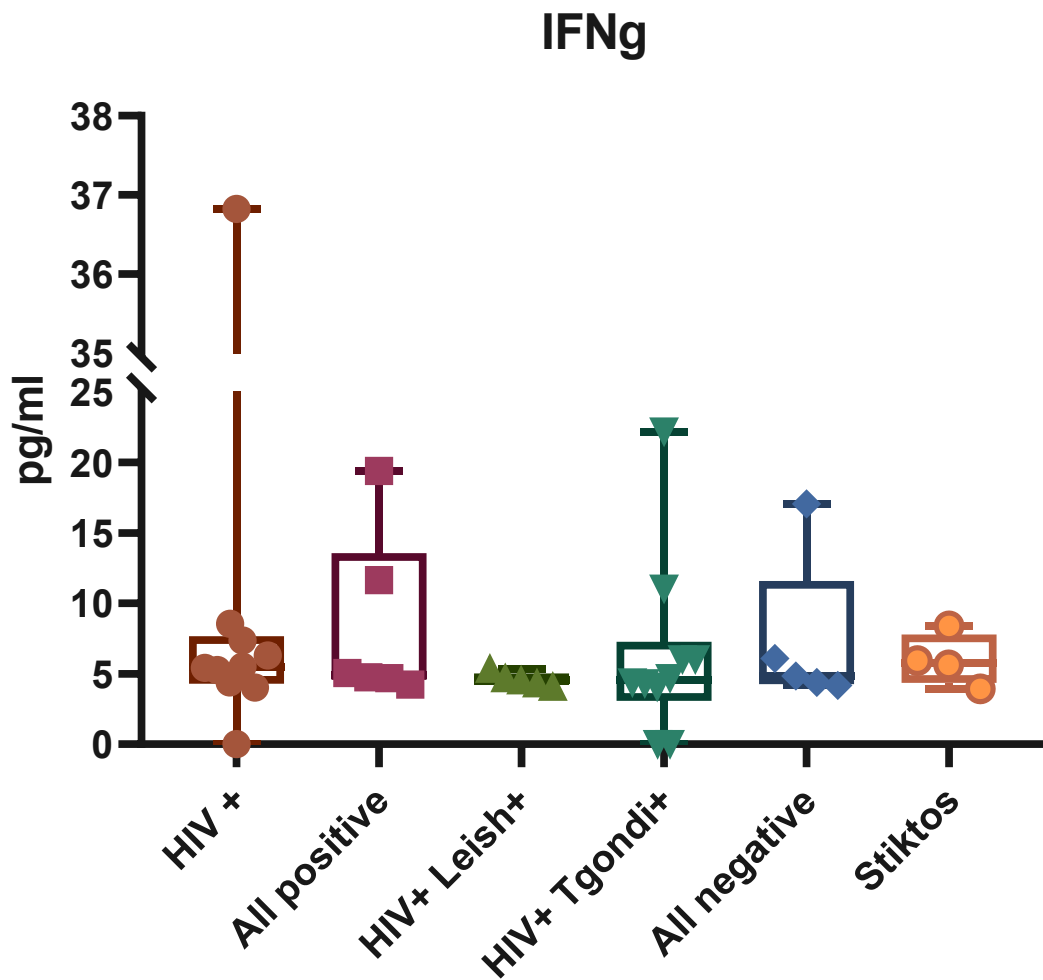
Κατηγορία δείγματος	Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση (pg/mL)
HIV(+)	KASU	5,500
	ΠΑΧΡ	6,316
	ΣΟΑΛ	36,822
	BANI	8,555
	ΚΟΑΡ	5,276
	1	7,359
	4	4,021
	6	0

	7	5,426
	17	4,390
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+), <i>L.infantum</i> (+)	HAAB	11,641
	BOAR	19,385
	LEAS	4,759
	72	4,686
	73	5,055
	85	4,242
HIV (+), <i>L.infantum</i> (+)	19	4,538
	ΛΕΚΩ	4,316
	ΜΠΚΩ	4,686
	ΑΘΙΩ	5,352
	ΠΑΘΩ	4,095
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	16	0
	32	4,095
	39	0
	42	6,019
	54	4,390
	65	11,037
	66	6,019
	70	4,686
	OGIM	4,316
	ΤΡΛΑ	22,195
HIV (-), <i>T.gondii</i> (-), <i>L.infantum</i> (-)	5	4,169
	10	6,093

	21	4,833
	24	4,390
	40	17,064
HIV (+), <i>L.infantum</i> (στικτού φθορισμού)	DAJA	5,445
	71	5,648
	15	3,947
	35	8,405

Πίνακας 1: Η συγκέντρωση IFN-γ του κάθε δείγματος και η κατηγορία στην οποία ανήκει.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κάθε κατηγορίας, παρουσιάζονται στο **Γράφημα 2**



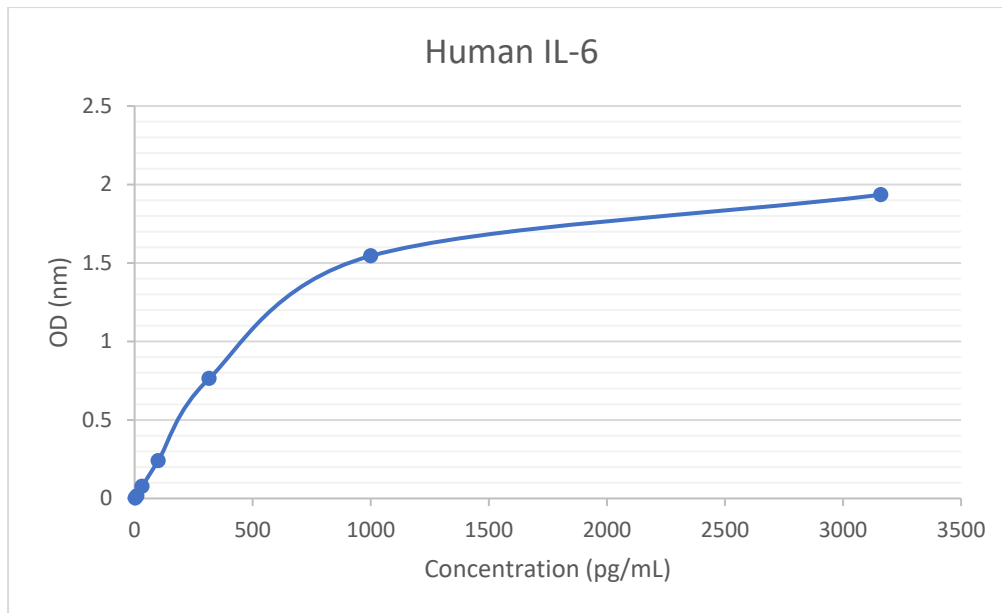
Γράφημα 2: Συγκεντρωτική απεικόνιση επιπέδων της κυτταροκίνης IFN-γ σε κάθε κατηγορία.

IFN- γ	HIV (+)	All positive	HIV (+), <i>Leishmania</i> (+)	HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	All negative	Στικτός
Μέση τιμή (mean) συγκεντρώσεων (pg/mL)	8,367	8,295	4,597	6,276	7,310	5,986
Τυπική απόκλιση (SD)	9,737	5,577	0,427	6,080	4,922	1,591
Διάμεσος (median)	5,463	4,908	4,538	4,538	4,834	5,797
Πλήθος δειγμάτων (n)	10	6	5	10	5	4
Μέγιστη τιμή	36,822	19,385	5,352	22,195	17,064	8,405
Ελάχιστη τιμή	0	4,242	4,095	0	4,169	3,947
Πρώτο τεταρτημόριο (Q1)	4,298	4,575	4,206	3,071	4,279	4,373
Τρίτο τεταρτημόριο (Q3)	7,658	13,577	5,019	7,274	11,579	7,790

Πίνακας 2: Απαραίτητες στατιστικές τιμές για την περιγραφή του Γραφηματος 2 και των αποτελεσμάτων του πειράματος ELISA IFN- γ .

3.2. Αποτελέσματα ELISA για την IL-6

Στην ELISA που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτική μέτρηση της IL-6 εξεταστήκαν συνολικά 24 οροί από όλες τις κατηγορίες. Επιπρόσθετα, στη πλάκα τοποθετήθηκαν και 7 διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου και ο αρνητικός μάρτυρας. Με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις τιμές απορρόφησης του κάθε πειράματος, η οποία φαίνεται στο **Γράφημα 3**.



Γράφημα 3: Πρότυπη καμπύλη πειράματος ELISA IL-6

Η εξίσωση που περιγράφει τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε με την βοήθεια του προγράμματος Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3) και ήταν της μορφής:

$$y = \frac{a + bx}{1 + cx + dx^2}$$

Όπου: $a = -1,319282591673917E - 02$, $b = 3,045346040942620E - 03$, $c = 8,184132946767502E - 04$ και $d = 1,385204694294465E - 07$

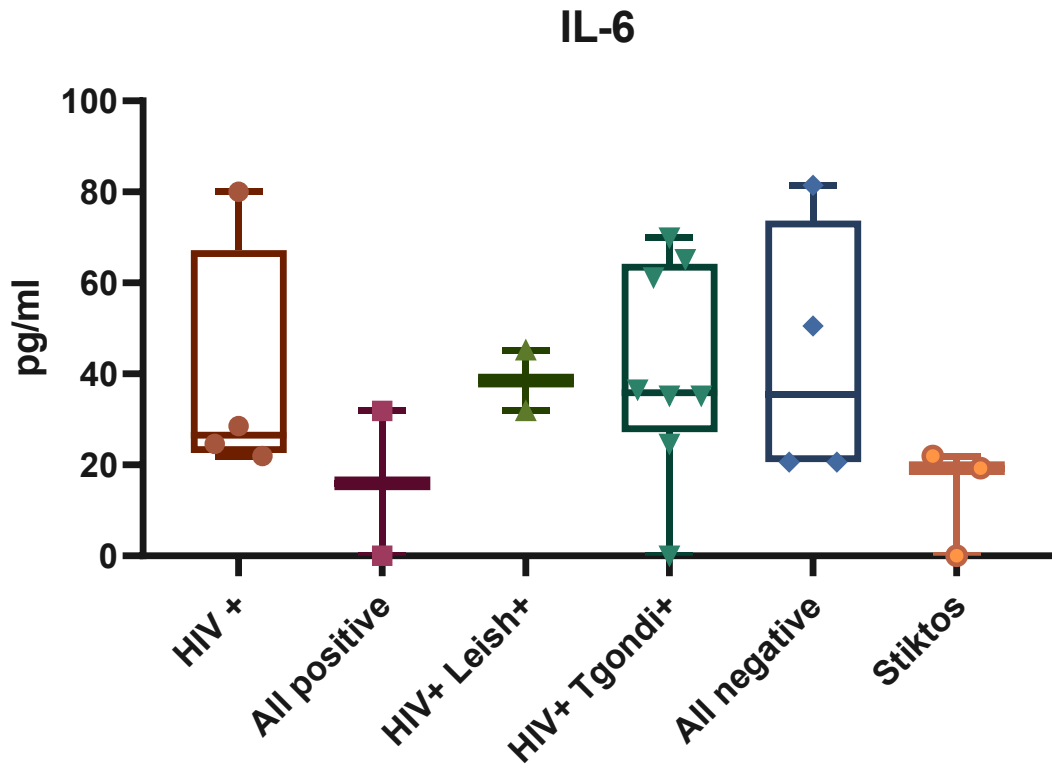
Από τη παραπάνω εξίσωση υπολογιστήκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ορού, τοποθετώντας όπου y την τιμή της απορρόφησης του κάθε ορού. Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης και τα δείγματα ορού που μπήκαν από κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**.

Κατηγορία δείγματος	Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση (pg/mL)
HIV (+)	7	21,946
	1	80,077
	4	28,558
	6	24,589
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+), <i>L.infantum</i> (+)	72	31,871
	85	0
HIV (+), <i>L.infantum</i> (+)	19	31,871

	ΛΕΚΩ	45,167
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	16	36,516
	32	35,188
	39	24,589
	42	69,956
	54	0
	65	65,247
	66	35,188
	70	61,218
	HIV (-), <i>T.gondii</i> (-), <i>L.infantum</i> (-)	5
10		81,430
21		20,626
24		20,626
40		50,505
HIV (+), <i>L.infantum</i> (στικτού φθορισμού)	71	0
	15	19,306
	35	21,946

Πίνακας 3: Η συγκέντρωση IL-6 του κάθε δείγματος και η κατηγορία στην οποία ανήκει.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κάθε κατηγορίας, παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4**



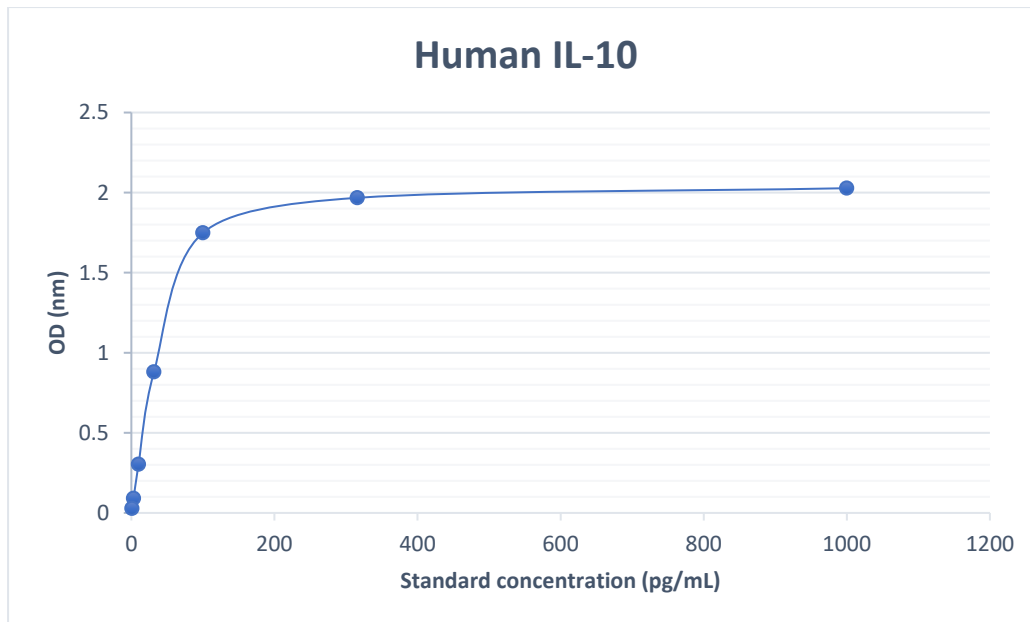
Γράφημα 4: Συγκεντρωτική απεικόνιση επιπέδων της κυτταροκίνης IL-6 σε κάθε κατηγορία.

IL-6	HIV (+)	All positive	HIV (+), <i>Leishmania</i> (+)	HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	All negative	Στικτός
Μέση τιμή (mean) συγκεντρώσεων (pg/mL)	38,793	15,936	38,519	40,988	43,297	13,751
Τυπική απόκλιση (SD)	23,951	15,936	6,648	22,003	25,169	9,783
Διάμεσος (median)	26,574	15,936	38,519	35,852	50,506	19,3065
Πλήθος δειγμάτων (n)	4	2	2	8	5	3
Μέγιστη τιμή	80,077	31,871	45,167	69,956	181,526	21,946
Ελάχιστη τιμή	21,946	0	31,871	0	20,626	0
Πρώτο τεταρτημόριο (Q1)	22,607	-	-	27,239	20,626	0
Τρίτο τεταρτημόριο (Q3)	67,197	-	-	64,240	131,478	21,946

Πίνακας 4: Απαραίτητες στατιστικές τιμές για την περιγραφή του Γραφηματος 4 και των αποτελεσμάτων του πειράματος ELISA IL-6.

3.3. Αποτελέσματα ELISA για την IL-10

Στην ELISA που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτική μέτρηση της IL-10 εξεταστήκαν συνολικά 39 δείγματα από όλες τις κατηγορίες. Επιπρόσθετα, στη πλάκα τοποθετήθηκαν και 7 διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου και το αρνητικού μάρτυρα. Με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις τιμές απορρόφησης του κάθε προτύπου του πειράματος, η οποία φαίνεται στο **Γράφημα 5**.



Γράφημα 5: Πρότυπη καμπύλη πειράματος ELISA IL-10.

Η εξίσωση που περιγράφει τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε με την βοήθεια του προγράμματος Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3) και ήταν της μορφής:

$$y = a(b - e^{-cx})$$

Όπου: $a = 2,032166220604441E + 00$, $b = 9,891400427074089E - 01$ και $c = 1,909659678993561E - 02$

Από τη παραπάνω εξίσωση υπολογιστήκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ορού, τοποθετώντας όπου y την τιμή της απορρόφησης του κάθε ορού. Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης και τα δείγματα που μπήκαν από κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5**.

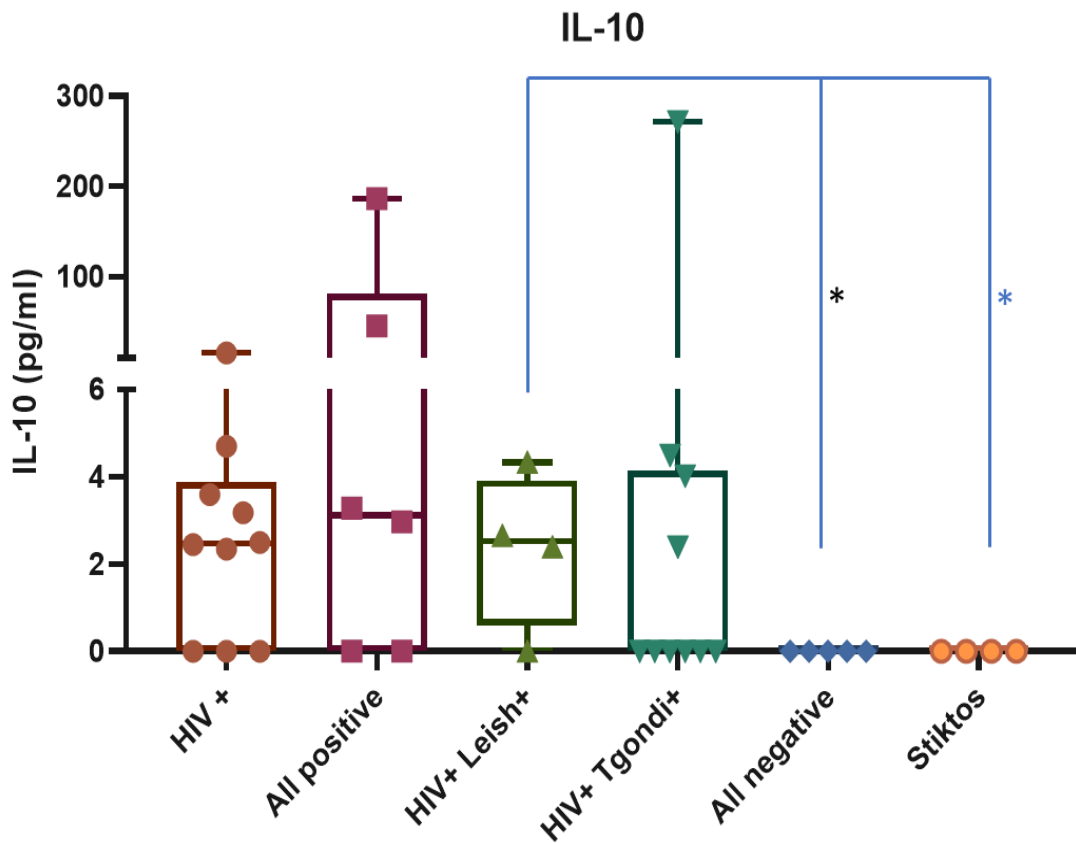
Κατηγορία δείγματος	Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση (pg/mL)
HIV (+)	KASU	2,339
	ΠΑΧΡ	3,175
	ΣΟΑΛ	2,443
	BANI	0
	ΚΟΑΡ	0
	1	4,698
	4	3,594

	6	2,496
	7	0
	17	15,513
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+), <i>L.infantum</i> (+)	HAAB	186,402
	BOAR	2,966
	LEAS	3,279
	72	0
	73	45,537
	85	0
	HIV (+), <i>L.infantum</i> (+)	19
ΛΕΚΩ		2,652
ΑΘΙΩ		0
ΠΑΘΩ		4,329
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	16	0
	32	0
	39	0
	42	2,391
	54	0
	65	0
	66	4,014
	70	4,487
	OGIM	0
	ΤΡΛΑ	271,633
	HIV (-), <i>T.gondii</i> (-), <i>L.infantum</i> (-)	5
10		0

	21	0
	24	0
	40	0
HIV (+), <i>L.infantum</i> (στικτού φθορισμού)	DAJA	0
	71	0
	15	0
	35	0

Πίνακας 5: Η συγκέντρωση IL-10 του κάθε δείγματος και η κατηγορία στην οποία ανήκει.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κάθε κατηγορίας, παρουσιάζονται στο **Γράφημα 6**



Γράφημα 6: Συγκεντρωτική απεικόνιση επιπέδων της κυτταροκίνης IL-10 σε κάθε κατηγορία, * p-value=0,0201, * p-value=0,0391.

IL-10	HIV (+)	All positive	HIV (+), <i>Leishmania</i> (+)	HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	All negative	Στικτός
Μέση τιμη (mean) συγκεντρώσεων (pg/mL)	3,426	39,697	2,343	28,252	0	0
Τυπική απόκλιση (SD)	4,313	67,557	1,544	81,144	0	0
Διάμεσος (median)	2,470	3,123	2,522	0	0	0
Πλήθος δειγμάτων (n)	10	6	4	10	5	4
Μέγιστη τιμη	15,513	186,402	4,329	271,633	0	0
Ελάχιστη τιμη	0	0	0	0	0	0
Πρώτο τεταρτημόριο (Q1)	0	0	0,598	0	0	0
Τρίτο τεταρτημόριο (Q3)	3,870	80,753	3,910	4,132	0	0

Πίνακας 6: Απαραίτητες στατιστικές τιμές για την περιγραφή του Γραφηματος 6 και των αποτελεσμάτων του πειράματος ELISA IL-10.

3.4. Αποτελέσματα ELISA για την IL-17A

Στην ELISA που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτική μέτρηση της IL-17A εξεταστήκαν συνολικά 38 δείγματα από όλες τις κατηγορίες. Επιπρόσθετα, στη πλάκα τοποθετήθηκαν και 7 διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου και ο αρνητικός μάρτυρας. Με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις τιμές απορρόφησης του κάθε προτύπου του πειράματος, η οποία φαίνεται στο **Γράφημα 7**.



Γράφημα 7: Πρότυπη καμπύλη πειράματος ELISA IL-17A.

Η εξίσωση που περιγράφει τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε με την βοήθεια του προγράμματος Curve Expert Professional (έκδοση 2.5.3) και ήταν της μορφής:

$$y = \frac{a + bx}{1 + cx + dx^2}$$

Όπου: $a = 2,000568392012775E - 03$, $b = 1,244963125578520E - 02$, $c = 2,904472848922724E - 03$ και $d = 2,136459234489341E - 06$

Από τη παραπάνω εξίσωση υπολογιστήκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ορού, τοποθετώντας όπου y την τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος. Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης και τα δείγματα που μπήκαν από κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

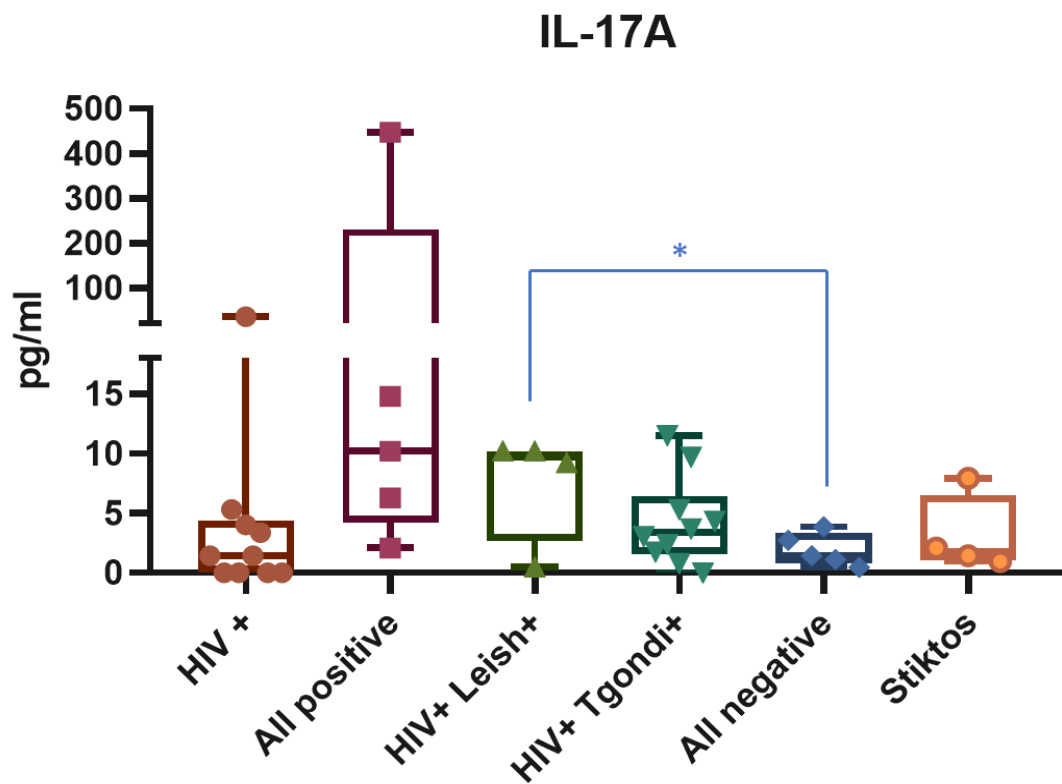
Κατηγορία δείγματος	Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση (pg/mL)
HIV (+)	KASU	4,030
	ΠΑΧΡ	5,324
	ΣΟΑΛ	1,448
	BANI	1,448
	ΚΟΑΡ	0
	1	0
	4	0

	6	0
	7	35,112
	17	3,383
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+), <i>L.infantum</i> (+)	HAAB	447,256
	LEAS	2,092
	72	10,200
	73	14,783
	85	6,297
HIV (+), <i>L.infantum</i> (+)	19	0,482
	ΛΕΚΩ	10,200
	ΑΘΙΩ	9,222
	ΠΑΘΩ	10,200
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	16	3,706
	32	5,324
	39	1,770
	42	0
	54	0,804
	65	4,353
	66	2,415
	70	3,060
	OGIM	9,711
	ΤΡΛΑ	11,507
	HIV (-), <i>T.gondii</i> (-), <i>L.infantum</i> (-)	5
10		1,125
21		0,482

	24	1,448
	40	3,868
HIV (+), <i>L.infantum</i> (στικτού φθορισμού)	DAJA	2,092
	71	7,920
	15	0,964
	35	1,448

Πίνακας 7: Η συγκέντρωση IL-17A του κάθε δείγματος και η κατηγορία στην οποία ανήκει.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κάθε κατηγορίας, παρουσιάζονται στο **Γράφημα 8**.



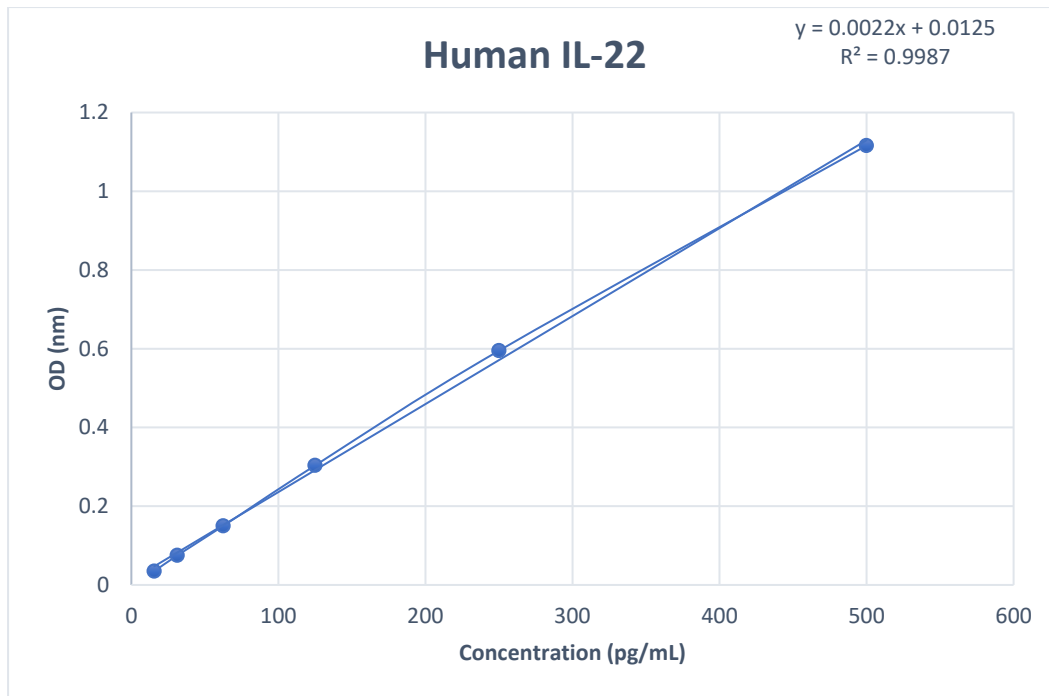
Γράφημα 8: Συγκεντρωτικά απεικόνιση της κυτταροκίνης IL-17A σε κάθε κατηγορία, * p -value=0,0375.

IL-17A	HIV (+)	All positive	HIV (+), <i>Leishmania</i> (+)	HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	All negative	Στικτός
Μέση τιμή (mean) συγκεντρώσεων (pg/mL)	5,075	96,126	7,526	4,265	1,932	3,106
Τυπική απόκλιση (SD)	10,176	175,615	4,087	3,533	1,215	2,808
Διάμεσος (median)	1,448	10,200	9,712	3,383	1,448	1,770
Πλήθος δειγμάτων (n)	10	5	4	10	5	4
Μέγιστη τιμή	35,112	447,256	10,201	11,507	3,868	7,921
Ελάχιστη τιμή	0	2,092	0,482	0	0,482	0,965
Πρώτο τεταρτημόριο (Q1)	0	4,195	2,667	1,528	0,804	1,086
Τρίτο τεταρτημόριο (Q3)	4,353	231,019	10,201	6,421	3,303	6,464

Πίνακας 8: Απαραίτητες στατιστικές τιμές για την περιγραφή του Γραφήματος 8 και των αποτελεσμάτων του πειράματος ELISA IL-17A.

3.5. Αποτελέσματα ELISA για την IL-22

Στην ELISA που πραγματοποιήθηκε για την ποσοτική μέτρηση της IL-22 εξεταστήκαν συνολικά 30 δείγματα από της της κατηγορίες. Επιπρόσθετα, στη πλάκα τοποθετήθηκαν και 6 διαδοχικές αραιώσεις του προτύπου και ο αρνητικός μάρτυρας. Με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office, δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη με βάση τις τιμές απορρόφησης του κάθε προτύπου του πειράματος, η οποία φαίνεται στο **Γράφημα 9**.



Γράφημα 9: Πρότυπη καμπύλη πειράματος ELISA IL-22.

Η εξίσωση ευθείας που περιγράφει τη πρότυπη καμπύλη προέκυψε με την βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel office και είναι:

$$y = 0,0022x + 0,0125$$

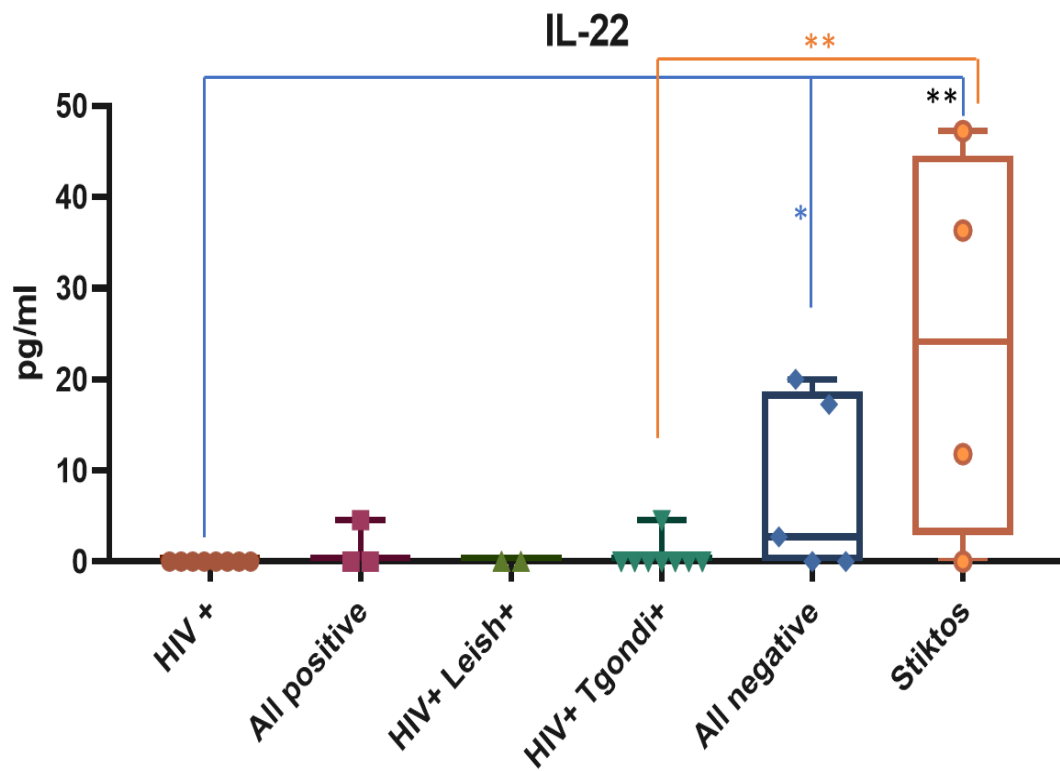
Από τη παραπάνω εξίσωση υπολογιστήκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ορού, τοποθετώντας όπου y την τιμή της απορρόφησης του κάθε δείγματος. Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης και τα δείγματα που μπήκαν από κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

Κατηγορία δείγματος	Όνομα δείγματος	Συγκέντρωση (pg/mL)
HIV (+)	ΠΑΧΡ	0
	ΣΟΑΛ	0
	ΒΑΝΙ	0
	1	0
	4	0
	6	0
	7	0
	17	0

HIV (+), <i>T.gondii</i> (+), <i>L.infantum</i> (+)	LEAS	0
	72	4,545
	85	0
HIV (+), <i>L.infantum</i> (+)	19	0
	ΛΕΚΩ	0
HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	16	0
	32	0
	39	0
	42	0
	54	0
	65	0
	66	4,545
	70	0
HIV (-), <i>T.gondii</i>(-), <i>L.infantum</i>(-)	5	0
	10	20,000
	21	0
	24	17,273
	40	2,723
HIV (+), <i>L.infantum</i> (στικτού φθορισμού)	DAJA	0
	71	36,363
	15	47,272
	35	11,818

Πίνακας 9: Η συγκέντρωση IL-22 του κάθε δείγματος και η κατηγορία στην οποία ανήκει.

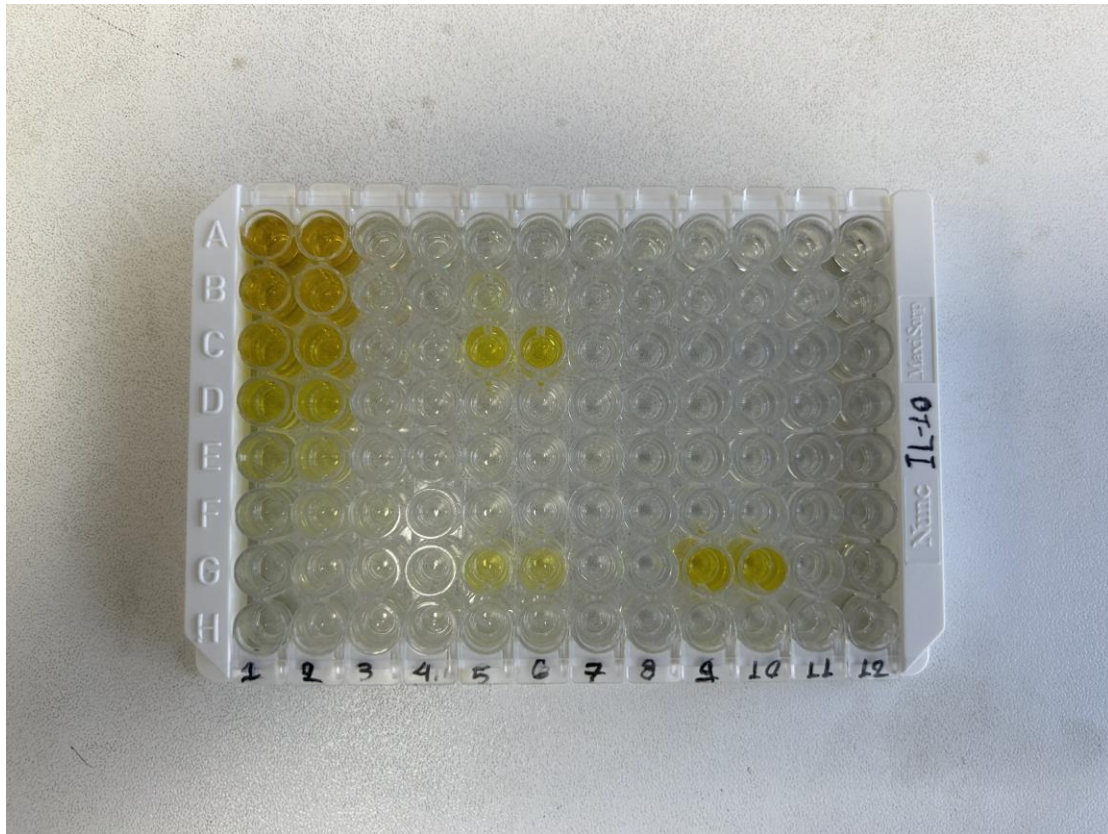
Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων κάθε κατηγορία, παρουσιάζονται στο **Γράφημα 10**.



Γράφημα 10: Συγκεντρωτική απεικόνιση της κυτταροκίνης IL-22 για κάθε κατηγορία, * p-value=0,0372, ** p-value=0,0084, **p-value=0,0099 .

IL-22	HIV (+)	All positive	HIV (+), <i>Leishmania</i> (+)	HIV (+), <i>T.gondii</i> (+)	All negative	Στικτός
Μέση τιμη (mean) συγκεντρώσεων (pg/mL)	0	1,515	0	0,568	8,000	23,864
Τυπική απόκλιση (SD)	0	2,143	0	1,503	8,784	18,833
Διάμεσος (median)	0	0	0	0	2,727	24,091
Πλήθος δειγμάτων (n)	8	3	2	8	5	4
Μέγιστη τιμη	0	4,546	0	4,546	20,000	47,273
Ελάχιστη τιμη	0	0	0	0	0	0
Πρώτο τεταρτημόριο (Q1)	0	0	0	0	0	2,954
Τρίτο τεταρτημόριο (Q3)	0	4,546	0	0	18,636	44,545

Πίνακας 10: Απαραίτητες στατιστικές τιμές για την περιγραφή του Γραφηματος 10 και των αποτελεσμάτων του πειράματος ELISA IL-22.



Εικόνα 16: Πείραμα ELISA IL-10. Στη στήλη 1 και 2 έχουν τοποθετηθεί τα πρότυπα, ξεκινώντας από την Α γραμμή το πυκνότερο μέχρι την Γ γραμμή το πιο αραιό ενώ στην Η έχει τοποθετηθεί το τυφλό δείγμα. Τα δείγματα της θέσεις C5,6, G5,6 και G9,10 έχουν υψηλές απορροφήσεις και κατά συνέπεια και συγκεντρώσεις IL-10.

4. Συζήτηση – Συμπέρασμα

Από το πείραμα ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IFN- γ παρατηρήθηκε ότι την μεγαλύτερη μέση τιμή την εμφανίζει η ομάδα δειγμάτων ορών HIV(+), με μέγιστη τιμή 36,822 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD=9,737, n=10) και παραπλήσια μέση τιμή παρουσιάζει και η ομάδα δειγμάτων όπου οι ασθενείς νοσούν και με τα τρία παθογόνα [HIV(+)/*L.infantum*(+)/*T.gondii*(+)], με μέγιστη τιμή τα 19,385 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 4,242 pg/mL (SD=5,577, n=6). Στη συνέχεια ακολουθεί με την σειρά η μέση τιμή των δειγμάτων όπου είναι αρνητικά για όλα τα παθογόνα [HIV(-)/*T.gondii*(-)/*L.infantum*(-)], με μέγιστη τιμή τα 17,064 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 4,169 pg/mL (SD=4,922, n=5), η μέση τιμή των δειγμάτων με HIV(+)/*T.gondii*(+), με μέγιστη τιμή τα 22,195 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD=6,080, n=10), η μέση τιμή των ορών με το στικτό ανοσοφθορισμό στο παράσιτο *Leishmania*, με μέγιστη τιμή τα 8,405 pg/mL και ελάχιστη τιμή 3,947 pg/mL (SD=1,591, n=4) και τέλος την μικρότερη μέση τιμή παρουσιάζουν τα δείγματα HIV(+)/*Leishmania*(+), με μέγιστη τιμή τα 5,352 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 4,095 pg/mL (SD=0,425, n=5) (Γράφημα 2, Πίνακας 2). Από τα παραπάνω προκύπτει πως γενικότερα δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση της IFN- γ μεταξύ

των ομάδων δειγμάτων ορών και παρατηρούνται ορισμένες ακραίες τιμές στη συγκέντρωση IFN- γ με την μεγαλύτερη να παρουσιάζεται στο δείγμα ΣΟΑΛ (HIV+), με συγκέντρωση 36,822 pg/mL και ΤΡΛΑ (HIV+/T.gondii+) με συγκέντρωση 22,195 pg/mL, τα οποία και επηρεάζουν την τιμή της τυπικής απόκλισης των ομάδων αυτών. Τόσο η ομάδα δειγμάτων HIV(+)/T.gondii(+) όσο και η ομάδα HIV(+)/Leishmania(+) παρουσιάζουν χαμηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης IFN- γ συγκριτικά με την ομάδα δειγμάτων που είναι αρνητική και για τα τρία παθογόνα καθώς και με την ομάδα δειγμάτων HIV(+). Αυτή η παρατήρηση μας βρίσκει συμφώνους με την βιβλιογραφία καθώς από διαφορά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα IFN- γ σε ασθενείς με συλλοίμωση HIV(+)/T.gondii(+) σε σχέση με HIV(+) ασθενείς και από τους υγιείς μάρτυρες, μετά από διέγερση και αυτό είναι πιθανό να υποδηλώνει μια καταπίεση της Th1 με μια ταυτόχρονη ενίσχυση της Th2 [61], [65]. Επίσης παρόμοια ευρήματα αναφέρονται στη βιβλιογραφία και για τους ασθενείς με συλλοίμωση HIV(+)/Leishmania(+) καθώς έχει διαπιστωθεί ότι γενικότερα η συγκέντρωση της IFN- γ παραμένει χαμηλή σε αυτούς τους πληθυσμούς σε σύγκριση με τους ασθενείς HIV(+). Ωστόσο υπάρχουν ευρήματα που υποστηρίζουν ότι η IFN- γ είναι πιθανό να μην παρουσιάζει σημαντική αύξηση συγκριτικά με τους HIV(+) ασθενείς, αλλά περισσότερο μια στροφή των κυτταροκινών προς την Th2 [54], [56]. Ακόμα η ομάδα δειγμάτων που νοσεί και με τα τρία παθογόνα είχε παραπλήσια μέση τιμή με την ομάδα HIV(+) και μικρότερη από την ομάδα ασθενών που ήταν αρνητικοί και για τα τρία παθογόνα αλλά όχι με σημαντικές διαφορές. Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι τα Ελληνικά δεδομένα με βάση τα συγκεκριμένα δείγματα που παραχωρήθηκαν από το ΕΚΑΑΝΕ συμφωνούν και ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τις έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες χώρες καθώς και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Από το πείραμα ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-6 παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες σημαντική ανομοιογένεια στις συγκεντρώσεις των δειγμάτων τους και σημαντική αύξηση στη τιμή της τυπικής απόκλισης. Την μεγαλύτερη μέση τιμή παρουσιάζει η ομάδα δειγμάτων η οποία ήταν αρνητική για όλα τα παθογόνα, με μέγιστη τιμή τα 181,526 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 20,626 pg/mL (SD= 25,169, n= 5). Στη συνέχεια ακολουθούν με την σειρά η μέση τιμή της ομάδας δειγμάτων HIV(+)/T.gondii(+), με μέγιστη συγκέντρωση τα 69,956 pg/mL και ελάχιστη συγκέντρωση τα 0 pg/mL (SD= 22,003, n= 8), η ομάδα δειγμάτων HIV(+), με μέγιστη τιμή τα 80,077 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 21,946 pg/mL (SD= 23,951, n= 4), παραπλήσια μέση τιμή της ομάδας δειγμάτων HIV(+)/Leishmania(+), με μέγιστη τιμή τα 45,165 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 31,871 pg/mL (SD= 6,648, n= 2). Τέλος ακολουθεί η ομάδα δειγμάτων που ήταν θετική και για τα τρία παθογόνα, με μέγιστη τιμή τα 31,871 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 15,936, n=2) και η ομάδα ορών με αποτελέσματα στικτού ανοσοφθορισμού για το παράσιτο *Leishmania*, με μέγιστη τιμή τα 21,946 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 9,786, n= 3) (**Γράφημα 4, Πίνακας 4**). Εξαιτίας του μεγάλου εύρους κατανομής των συγκεντρώσεων των δειγμάτων στις περισσότερες ομάδες είναι δύσκολο να ληφθεί συμπέρασμα για το αν η IL-6 αυξάνεται στον πληθυσμούς δειγμάτων με συλλοίμωση

σε σχέση με τους ασθενείς HIV(+) όπως υποστηρίζει η βιβλιογραφία. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις IL-6 σε κάποια από τα δείγματα με συλλοίμωξη θα μπορούσε να συσχετιστεί με παρασιτική ενίσχυση και περαιτέρω εξέλιξη του HIV και γενικότερα η συγκέντρωση της έχει αρνητική συσχέτιση με τον αριθμό των CD4⁺ Τ κυττάρων [54], [65], [69].

Από το πείραμα ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-10 παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, με εξαίρεση την κατηγορία των δειγμάτων που ήταν αρνητικά για όλα τα παθογόνα και του στικτού ανοσοφθορισμού στο παράσιτο *Leishmania*, παρουσιάζεται ανομοιογενής κατανομή συγκεντρώσεων. Την υψηλότερη μέση τιμή παρουσιάζει η κατηγορία των δειγμάτων που ήταν θετικά για όλα τα παθογόνα, με μέγιστη τιμή τα 186,402 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL και έχει μια σημαντικά αυξημένη τιμή SD=67,557. Η τιμή της τυπικής απόκλισης οφείλεται στην ακραία συγκέντρωση που παρατηρείται στο δείγμα HAAB (186,402 pg/mL) καθώς και στην αυξημένη συγκέντρωση του δείγματος 73 (45,537 pg/mL) αυτής της ομάδας. Η αμέσως επόμενη μεγαλύτερη μέση τιμή παρατηρείται στην ομάδα δειγμάτων HIV(+)/*T.gondii*(+), με μέγιστη τιμή τα 271,633 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL και τιμή SD= 81,144. Η αυξημένη τιμή τυπικής απόκλισης οφείλεται στην ακραία τιμή του δείγματος ΤΡΛΑ (271,633 pg/mL) η οποία είναι και η μεγαλύτερη που παρατηρείται σε όλο το πείραμα. Η αμέσως επόμενες μέσες τιμές που ακολουθούν με την σειρά είναι της ομάδας των HIV(+), με μέγιστη τιμή τα 15,513 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 4,313) και της ομάδας HIV(+)/*Leishmania*(+), με μέγιστη τιμή τα 4,329 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 1,544). Τέλος, η μέση τιμή της ομάδας δειγμάτων που είναι αρνητικοί για όλα τα παθογόνα και του στικτού ανοσοφθορισμού για το παράσιτο *Leishmania* που παρουσιάζουν συγκέντρωση 0 pg/mL (δεν ανιχνεύεται IL-10 σε αυτές τις δυο ομάδες δειγμάτων) (**Γράφημα 6, Πίνακας 6**). Πρέπει να αναφερθεί ότι η ομάδα δειγμάτων με αποτελέσματα στικτού ανοσοφθορισμού για το παράσιτο *Leishmania*, όπως και η ομάδα δειγμάτων που ήταν αρνητική για όλα τα παθογόνα, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα δειγμάτων HIV(+)/*Leishmania*(+) (p-value=0,0391 και p-value=0,0201 αντίστοιχα). Τόσο η κατηγορία δειγμάτων HIV(+)/*T.gondii*(+) όσο και η HIV(+)/*Leishmania*(+) παρουσιάζουν αύξηση της συγκέντρωσης της IL-10 σε σύγκριση με την κατηγορία δειγμάτων που ήταν αρνητικοί και για τα τρία παθογόνα. Από την υπάρχουσα βιβλιογραφία επιβεβαιώνεται ότι η συγκέντρωση της IL-10 τόσο σε ασθενείς με συλλοίμωξη HIV(+)/*T.gondii*(+) όσο και σε ασθενείς HIV(+)/*Leishmania*(+) αυξάνεται, φανερώνοντας μια ενίσχυση της Th2 απόκρισης. Ωστόσο έχει τονιστεί ότι και στις δύο περιπτώσεις συλλοίμωξης οι συμπτωματικοί ασθενείς με χαμηλό αριθμό CD4⁺ Τ λεμφοκυττάρων παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση IL-10 σε σύγκριση με τους συμπτωματικούς ασθενείς με χαμηλό αριθμό CD4⁺, κάτι που θα μπορούσε εν μέρει να δικαιολογεί τις έντονες διακυμάνσεις που παρατηρούνται μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας ομάδας [56], [61], [65], [69]. Η ομάδα HIV(+)/*T.gondii*(+) παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση και από την ομάδα HIV(+), ωστόσο η αύξηση του μέσου ορού προκλήθηκε από την ακραία τιμή που παρουσίασε το δείγμα ΤΡΛΑ και οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων δειγμάτων παραμένουν σχετικά

χαμηλές (median= 0 pg/mL). Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι γενικότερα η συγκέντρωση της IL-10 παρουσιάζει αυξητική τάση σε όλες τις ομάδες που είναι θετικές για τουλάχιστον ένα από τα παθογόνα αλλά παρουσιάζονται σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων της ίδιας ομάδας, το οποίο γεγονός δυσχεραίνει την σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους και την αιτιολόγηση των αποτελεσμάτων με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Από το πείραμα ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-17A βρέθηκε ότι η κατηγορία δειγμάτων που ήταν θετικοί και για τα τρία παθογόνα παρουσιάζει την μεγαλύτερη μέση τιμή, με μέγιστη συγκέντρωση τα 447,256 pg/mL και ελάχιστη συγκέντρωση τα 2,092 pg/mL (SD= 175,615, n=5). Στη συνέχεια ακολουθεί η κατηγορία δειγμάτων HIV(+)/*Leishmania*(+), με μέγιστη τιμή τα 10,201 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0,482 pg/mL (SD= 4,087, n= 4), η κατηγορία δειγμάτων HIV(+), με μέγιστη τιμή τα 35,112 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 10,176, n= 10), η κατηγορία δειγμάτων HIV(+)/*T.gondii*(+), με μέγιστη συγκέντρωση τα 11,507 pg/mL και ελάχιστη συγκέντρωση τα 0 pg/mL (SD= 3,533, n= 10), η κατηγορία δειγμάτων του στικτού ανοσοφθορισμού για το παράσιτο *Leishmania*, με μέγιστη τιμή τα 7,921 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0,965 pg/mL (SD= 2,808, n= 4) και τελευταία έρχεται η κατηγορία δειγμάτων που είναι αρνητικά για όλα τα παθογόνα, με μέγιστη τιμή τα 3,868 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0,482 pg/mL (SD= 1,215, n=5) (**Γράφημα 8, Πίνακας 8**). Πρέπει να αναφερθεί ότι η ομάδα δειγμάτων που είναι αρνητική για όλα τα παθογόνα παρουσιάζει στατικά σημαντική διαφορά από την ομάδα δειγμάτων HIV(+)/*Leishmania*(+) (p-value=0,0375). Η κατηγορία δειγμάτων που είναι θετικά για όλα τα παθογόνα παρουσιάζει μια εξαιρετικά αυξημένη τιμή τυπικής απόκλισης καθώς οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων αυτής της ομάδας κατανέμονται σε ένα μεγάλο εύρος, ενώ ταυτόχρονα σε αυτή την κατηγορία παρουσιάζεται και μια ακραία τιμή συγκέντρωσης του δείγματος HAAB (447,256 pg/mL). Οι ασθενείς της κατηγορίας HIV(+)/*Leishmania*(+) παρουσιάζουν μια αύξηση στη συγκέντρωση της IL-17A τόσο σε σύγκριση με τους ασθενείς που είναι αρνητικοί σε για όλα τα παθογόνα τόσο και με τους HIV(+) ασθενείς. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι ασθενείς με συλλοίμωση HIV(+)/*Leishmania*(+) παρουσιάζουν αυξημένη IL-17A όταν είναι συμπτωματικοί με ενεργό VL, ενώ όταν είναι ασυμπτωματικοί παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις [69]. Συνεπώς, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η IL-17A αυξάνεται στα δείγματα του πειράματος εξαιτίας του επιβαρυσμένου ανοσοποιητικού συστήματος των ασθενών καθώς και ότι θα μπορούσε να φανερώνει μια προσπάθεια περιορισμού του παράσιτου και της ιαμίας. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν επαρκεί για να αιτιολογήσει τα αποτελέσματα σε αυτή την ομάδα ασθενών και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Επίσης η κατηγορία ασθενών HIV(+)/*T.gondii*(+) παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση IL-17A από τους ασθενείς που είναι αρνητικοί για όλα τα παθογόνα αλλά μικρότερη από τους HIV(+). Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι η κατηγορία των δειγμάτων HIV(+) παρουσιάζει μια αυξημένη μέση τιμή εξαιτίας του δείγματος 7 (35,112 pg/mL), το οποίο επηρεάζει και την τιμή της τυπικής απόκλισης, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα έχουν χαμηλή συγκέντρωση (median= 1,448 pg/mL). Η αυξημένη συγκέντρωση IL-17A της ομάδας

δειγμάτων με συλλοίμωξη είναι πιθανό να οφείλεται σε μια προσπάθεια του ανοσοποιητικού συστήματος να περιορίσει το παράσιτο. Δεν υπάρχει αρκετή βιβλιογραφία που να αναφέρεται στη συγκέντρωση και τη λειτουργία της IL-17A σε ασθενείς με συλλοίμωξη HIV(+)/*T.gondii*(+).

Από το πείραμα ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της IL-22 προέκυψε ότι την υψηλότερη μέση τιμή συγκέντρωσης, την παρουσιάζει με την σειρά η κατηγορία δειγμάτων με σικτό ανοσοφθορισμό για το παράσιτο *Leishmania*, με μέγιστη τιμή τα 47,273 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 18,833, n= 4) και η κατηγορία δειγμάτων που είναι αρνητική και για τα τρία παθογόνα, με μέγιστη τιμή τα 20 pg/mL και ελάχιστη τιμή τα 0 pg/mL (SD= 2,727, n= 5). Επίσης η κατηγορία δειγμάτων που είναι θετική για όλα τα παθογόνα και HIV(+)/*T.gondii*(+) παρουσιάζουν μια πολύ μικρή μέση τιμή συγκέντρωσης IL-22, ενώ τα περισσότερα δείγματα έχουν συγκέντρωση 0 pg/mL. Τέλος, οι κατηγορίες δειγμάτων HIV(+) και HIV(+)/*Leishmania*(+) βρέθηκε ότι δεν παράγουν IL-22 σε όλα τα δείγματα (**Γράφημα 10, Πίνακας 10**). Πρέπει να αναφερθεί ότι η ομάδα δειγμάτων με σικτό ανοσοφθορισμό για *Leishmania* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα δειγμάτων HIV(+)/*T.gondii*(+) (p-value=0,0099). Επίσης, η ομάδα δειγμάτων με σικτό ανοσοφθορισμό για το παράσιτο *Leishmania*, όπως και η ομάδα δειγμάτων που είναι αρνητική και για τα τρία παθογόνα, παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα δειγμάτων HIV(+) (p-value=0,0084 και p-value=0,0372 αντίστοιχα). Από το πείραμα ELISA IL-22 που πραγματοποιήθηκε στη παρούσα πτυχιακή παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της IL-22 δεν αυξάνεται σε ασθενείς με συλλοίμωξη ή HIV(+) ασθενείς. Επομένως, φαίνεται πως δεν εκκρίνεται IL-22 στα μολυσμένα άτομα με τα συγκεκριμένα παθογόνα, υποδηλώνοντας πως ενδεχομένως έχει περιορισμένη δράση κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Λίγα είναι γνωστά για τη λειτουργία της IL-22 και δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία για τη συγκέντρωση ή τη λειτουργία της σε ασθενείς με συλλοίμωξη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τιμές των δειγμάτων HAAB και ΤΡΛΑ καθώς εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις σε όλα τα πειράματα που τοποθετήθηκαν. Συγκεκριμένα το δείγμα HAAB ανήκει στην κατηγορία των ασθενών που είναι θετικοί και για τα τρία παθογόνα και παρουσίασε συγκέντρωση IFN- γ = 11,641, IL-10= 186,402 και IL-17A= 447,256 pg/mL. Ακόμα το δείγμα ΤΡΛΑ ανήκει στην κατηγορία HIV(+)/*T.gondii*(+) και παρουσίασε συγκέντρωση IFN- γ = 22,195, IL-10= 271,633, IL-17A= 11,507 pg/mL (**Πίνακας 1, Πίνακας 5, Πίνακας 7**). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι σε αυτούς τους δυο ασθενείς κάποια κύτταρα τους έχουν στραφεί προς την Th1 απόκριση και παράγουν την IFN- γ , ενώ άλλα έχουν στραφεί προς την Th2 απόκριση και παράγουν την IL-10. Για να μπορέσουμε να βγάλουμε ένα ασφαλές συμπέρασμα για το ποια από τις δυο αποκρίσεις υπερισχύει σε αυτή την σύνθετη απέκκριση Th1/Th2 απαιτούνται τα επιδημιολογικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπου δυστυχώς δεν είχαμε στη διάθεση μας. Η σημαντική παραγωγή και των τριών κυτταροκινών είναι πιθανό να συμβαίνει διότι και οι δυο ασθενείς έχουν εξαιρετικά χαμηλό αριθμό CD4⁺ T λεμφοκυττάρων

και κατά επέκταση να είναι συμπτωματικοί με προχωρημένη παρασιτική και ιϊκή επιβάρυνση [61], [69]. Αξίζει να αναφερθεί ότι εξίσου σημαντικό ρολό στην επιδείνωση των ασθενειών διαδραματίζει και ο χαμηλός αριθμός των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων και των κυττάρων NK. Η σχέση μεταξύ συλλοίμωσης και ανοσοποιητικού συστήματος μας είναι ελάχιστα κατανοητή και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση [54], [64]. Δεν πρέπει να παραληφθεί ότι ισορροπία Th1/Th2 μπορεί να επηρεαστεί εκτός από τον αριθμό των CD4⁺ κυττάρων και από άλλους παράγοντες όπως το παρασιτικό φορτίο, η διατροφική κατάσταση, το γενετικό υπόβαθρο καθώς και την ηλικία του ξενιστή [69].

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη παρούσα ερευνητική πτυχιακή, συμπεραίνουμε ότι γενικά στις ομάδες των ασθενών με συλλοίμωση παρατηρείται μια στροφή της Th1 σε Th2 ανοσολογική απόκριση. Αυτό το συμπέρασμα αιτιολογείται από τα αποτελέσματα που σημειώθηκαν στα πειράματα ELISA για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της IL-10 και IFN- γ . Από τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με συλλοίμωση δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις της IFN- γ συγκριτικά με τους ασθενείς που είναι αρνητικοί για όλα τα παθογόνα και HIV(+) (**Γράφημα 2, Πίνακας 2**). Αντιθέτως, οι ασθενείς με συλλοίμωση όπως και οι ασθενείς HIV(+) φαίνεται να παρουσιάζουν σημαντική αύξηση της IL-10 συγκριτικά με τους ασθενείς που είναι αρνητικοί για όλα τα παθογόνα κάτι που υποδεικνύει μια τάση προς την Th2 απόκριση (**Γράφημα 6, Πίνακας 6**). Αυτά τα ευρήματα μας βρίσκουν σύμφωνους με την βιβλιογραφία όπου τονίζει ότι στους ασθενείς με συλλοίμωση HIV(+)/*T.gondii*(+) παρουσιάζεται σημαντική ανισορροπία μεταξύ της Th1/Th2 καθώς και με το γεγονός ότι οι ασθενείς με συλλοίμωση HIV(+)/*Leishmania*(+) εμφανίζουν μια μετάβαση των χημειοκινών/κυτταροκινών από την Th1 προς την Th2 [54], [65]. Ωστόσο δεν πρέπει να παραληφθεί ότι πολλά από τα δείγματα των ασθενών με συλλοίμωση δεν συμφωνούσαν με αυτή την παρατήρηση και βρέθηκε ότι δεν παράγουν καθόλου IL-10. Σημαντικό ρόλο σε αυτή την διαφοροποίηση των συγκεντρώσεων μεταξύ της ίδιας κατηγορίας δειγμάτων ορών μπορεί να έχει το γεγονός ότι οι ασθενείς με συλλοίμωση ενδεχομένως να βρίσκονται σε άλλο στάδιο της νόσου (είτε του ιού HIV είτε του παράσιτου). Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την πλήρη κατανόηση της ανοσολογικής απόκρισης των ασθενών με συλλοιμώσεις καθώς οι έως τώρα έρευνες έχουν επικεντρωθεί στον προσδιορισμό της ιϊκού και παρασιτικού φορτίου καθώς και στην ανταπόκριση αυτών των ασθενών στη θεραπεία, παρά στην ανάλυση και επεξήγηση της ανοσολογικής απόκρισης και της έκκρισης κυτταροκινών. Τέλος, σημαντικό είναι η αξιολόγηση του σταδίου στο οποίο βρίσκεται τόσο το παράσιτο όσο και ο HIV ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να συμπεριληφθεί και η ετερογένεια των ιών για να επιτευχθεί καλύτερος προσδιορισμός των κυτταροκινών στους ασθενείς με συλλοιμώσεις HIV(+)/*T.gondii*(+) και HIV(+)/*Leishmania*(+) [54].

Βιβλιογραφία

- [1] M. Akhouni *et al.*, “Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis,” *Mol Aspects Med*, vol. 57, pp. 1–29, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.
- [2] E. Handman, “Cell Biology of Leishmania,” 1999, pp. 1–39. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60229-8.
- [3] A.-L. Bañuls, M. Hide, and F. Prugnolle, “Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans,” 2007, pp. 1–458. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
- [4] “CDC - Leishmaniasis - Epidemiology & Risk Factors.” Accessed: Oct. 31, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>
- [5] I. A. Giantsis *et al.*, “Sand Fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Population Dynamics and Natural Leishmania Infections in Attica Region, Greece,” *J Med Entomol*, Aug. 2020, doi: 10.1093/jme/tjaa158.
- [6] “World Health Organization-Leishmaniasis.” Accessed: Oct. 31, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- [7] “CDC - Leishmaniasis.” Accessed: Oct. 31, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>
- [8] “CDC - DPDx - Leishmaniasis.” Accessed: Mar. 02, 2024. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- [9] C. Chicharro, M. A. Morales, T. Serra, M. Ares, A. Salas, and J. Alvar, “Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools,” *Trans R Soc Trop Med Hyg*, vol. 96, pp. S93–S99, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0035-9203(02)90058-1.
- [10] A. GIANNAKOPOULOS *et al.*, “Environmental parameters as risk factors for human and canine *Leishmania* infection in Thessaly, Central Greece,” *Parasitology*, vol. 143, no. 9, pp. 1179–1186, Aug. 2016, doi: 10.1017/S0031182016000378.
- [11] E. A. Fotakis *et al.*, “Identification of *Leishmania* Species in Naturally Infected Sand Flies from Refugee Camps, Greece,” *Emerg Infect Dis*, vol. 25, no. 2, pp. 361–364, Feb. 2019, doi: 10.3201/eid2502.181359.
- [12] D. E. Teixeira, M. Benchimol, J. C. F. Rodrigues, P. H. Crepaldi, P. F. P. Pimenta, and W. de Souza, “The cell biology of *Leishmania*: how to teach using

- animations.,” *PLoS Pathog*, vol. 9, no. 10, p. e1003594, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.
- [13] A. Mirzaei, M. Maleki, E. Masoumi, and N. Maspi, “A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis.,” *Cytokine*, vol. 145, p. 155297, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.cyto.2020.155297.
- [14] D. Liu and J. E. Uzonna, “The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response.,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 2, p. 83, 2012, doi: 10.3389/fcimb.2012.00083.
- [15] P. J. Quinn and B. M. McCraw, “Current status of toxoplasma and toxoplasmosis: a review.,” *Can Vet J*, vol. 13, no. 11, pp. 247–62, Nov. 1972.
- [16] Q. Liu, Z.-D. Wang, S.-Y. Huang, and X.-Q. Zhu, “Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*.,” *Parasit Vectors*, vol. 8, p. 292, May 2015, doi: 10.1186/s13071-015-0902-6.
- [17] S. Almeria and J. P. Dubey, “Foodborne transmission of *Toxoplasma gondii* infection in the last decade. An overview.,” *Res Vet Sci*, vol. 135, pp. 371–385, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.019.
- [18] “CDC - Toxoplasmosis - Epidemiology & Risk Factors.” Accessed: Nov. 12, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/epi.html>
- [19] Y. Zhang, B. S. Lai, M. Juhas, and Y. Zhang, “*Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis.,” *Microbiol Res*, vol. 227, p. 126293, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.micres.2019.06.003.
- [20] J. F. Dubremetz, “Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*.,” *Trends Microbiol*, vol. 6, no. 1, pp. 27–30, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0966-842X(97)01165-7.
- [21] M. Attias, D. E. Teixeira, M. Benchimol, R. C. Vommaro, P. H. Crepaldi, and W. De Souza, “The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations.,” *Parasit Vectors*, vol. 13, no. 1, p. 588, Nov. 2020, doi: 10.1186/s13071-020-04445-z.
- [22] J. K. Frenkel, “Pursuing toxoplasma.,” *J Infect Dis*, vol. 122, no. 6, pp. 553–9, Dec. 1970, doi: 10.1093/infdis/122.6.553.
- [23] J. P. Dubey, “Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*.,” *Int J Parasitol*, vol. 28, no. 7, pp. 1019–24, Jul. 1998, doi: 10.1016/s0020-7519(98)00023-x.
- [24] “CDC - DPDx - Toxoplasmosis.” Accessed: Nov. 12, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>
- [25] I. Symeonidou, G. Sioutas, T. Lazou, A. I. Gelasakis, and E. Papadopoulos, “A Review of *Toxoplasma gondii* in Animals in Greece: A FoodBorne Pathogen of Public Health Importance.,” *Animals (Basel)*, vol. 13, no. 15, Aug. 2023, doi: 10.3390/ani13152530.

- [26] F. Robert-Gangneux and M.-L. Dardé, "Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis.," *Clin Microbiol Rev*, vol. 25, no. 2, pp. 264–96, Apr. 2012, doi: 10.1128/CMR.05013-11.
- [27] D. E. Hill, S. Chirukandoth, and J. P. Dubey, "Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals.," *Anim Health Res Rev*, vol. 6, no. 1, pp. 41–61, Jun. 2005, doi: 10.1079/ahr2005100.
- [28] M. Fernández-Escobar, G. Schares, P. Maksimov, M. Joeres, L. M. Ortega-Mora, and R. Calero-Bernal, "Toxoplasma gondii Genotyping: A Closer Look Into Europe.," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, p. 842595, 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.842595.
- [29] L. A. LIEBERMAN and C. A. HUNTER, "THE ROLE OF CYTOKINES AND THEIR SIGNALING PATHWAYS IN THE REGULATION OF IMMUNITY TO *Toxoplasma gondii*," *Int Rev Immunol*, vol. 21, no. 4–5, pp. 373–403, Jan. 2002, doi: 10.1080/08830180213281.
- [30] M. Sasai, A. Pradipta, and M. Yamamoto, "Host immune responses to *Toxoplasma gondii*," *Int Immunol*, vol. 30, no. 3, pp. 113–119, Mar. 2018, doi: 10.1093/intimm/dxy004.
- [31] F. Yarovinsky, "Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection," *Nat Rev Immunol*, vol. 14, no. 2, pp. 109–121, Feb. 2014, doi: 10.1038/nri3598.
- [32] M. H. Beaman, S.-Y. Wong, and J. S. Remington, "Cytokines, *Toxoplasma* and Intracellular Parasitism," *Immunol Rev*, vol. 127, no. 1, pp. 97–117, Jun. 1992, doi: 10.1111/j.1600-065X.1992.tb01410.x.
- [33] G. K. Nikolopoulos, E.-G. Kostaki, and D. Paraskevis, "Overview of HIV molecular epidemiology among people who inject drugs in Europe and Asia," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 46, pp. 256–268, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.meegid.2016.06.017.
- [34] N. Klimas, A. O. Koneru, and M. A. Fletcher, "Overview of HIV.," *Psychosom Med*, vol. 70, no. 5, pp. 523–30, Jun. 2008, doi: 10.1097/PSY.0b013e31817ae69f.
- [35] E. Fanales-Belasio, M. Raimondo, B. Suligoj, and S. Buttò, "HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview.," *Ann Ist Super Sanita*, vol. 46, no. 1, pp. 5–14, 2010, doi: 10.4415/ANN_10_01_02.
- [36] G. Maartens, C. Celum, and S. R. Lewin, "HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention.," *Lancet*, vol. 384, no. 9939, pp. 258–71, Jul. 2014, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60164-1.
- [37] M. Saha and S. Bhattacharya, "A Brief Overview on HIV Infection, Diagnosis and Treatment.," *Curr Top Med Chem*, vol. 19, no. 30, pp. 2739–2741, 2019, doi: 10.2174/156802661930200103091335.

- [38] L. Kleiman, “tRNALys3: The Primer tRNA for Reverse Transcription in HIV-1,” *IUBMB Life*, vol. 53, no. 2, pp. 107–114, Feb. 2002, doi: 10.1080/15216540211469.
- [39] “WHO-HIV.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: https://www.who.int/health-topics/hiv-aids#tab=tab_1
- [40] “Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet | UNAIDS.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
- [41] “WHO-HIV data and statistics.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics>
- [42] “World Health Organization-HIV and AIDS- Key facts.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids?gclid=CjwKCAiAvJarBhA1EiwAGgZl0KNMm9bR1-idTRr5T2zXbMJb5WGDfMPfbIKIURk_UtGO8T7nPpTfihCuCoQAvD_BwE
- [43] “ECDC-Facts about HIV/AIDS.” Accessed: Nov. 29, 2023. [Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/infectious-disease-topics/z-disease-list/hiv-infection-and-aids/facts-about-hiv-aids>
- [44] “HIV/AIDS surveillance in Europe 2023 (2022 data)- ECDC.” Accessed: Dec. 09, 2023. [Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hiv-aids-surveillance-europe-2023-2022-data>
- [45] “ΕΤΗΣΙΑ ΕΚΔΟΣΗ ΤΟΥ ΕΘΝΙΚΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ (ΕΟΔΥ) ANNUAL EDITION OF THE NATIONAL PUBLIC HEALTH ORGANIZATION (NPHO) Ελληνική Δημοκρατία / Υπουργείο Υγείας Hellenic Democracy / Ministry of Health”, Accessed: Dec. 09, 2023. [Online]. Available: <https://eody.gov.gr>
- [46] E. Rossi, M. E. Meuser, C. J. Cunanan, and S. Cocklin, “Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein.,” *Life (Basel)*, vol. 11, no. 2, Jan. 2021, doi: 10.3390/life11020100.
- [47] J. Hokello, A. L. Sharma, M. Dimri, and M. Tyagi, “Insights into the HIV Latency and the Role of Cytokines,” *Pathogens*, vol. 8, no. 3, p. 137, Sep. 2019, doi: 10.3390/pathogens8030137.
- [48] K. Kedzierska and S. M. Crowe, “Cytokines and HIV-1: Interactions and Clinical Implications,” *Antivir Chem Chemother*, vol. 12, no. 3, pp. 133–150, Jun. 2001, doi: 10.1177/095632020101200301.
- [49] C. Vandergeeten, R. Fromentin, and N. Chomont, “The role of cytokines in the establishment, persistence and eradication of the HIV reservoir,” *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 23, no. 4–5, pp. 143–149, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.05.001.

- [50] “Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: WHO publishes new guideline with region-specific treatment recommendations.” Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://www.who.int/news/item/08-06-2022-visceral-leishmaniasis-and-hiv-coinfection-who-publishes-new-guideline-with-region-specific-treatment-recommendations>
- [51] “Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV-Leishmaniasis- CLINICAL INFO HIV.” Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/leishmaniasis>
- [52] P. Desjeux and J. Alvar, “Leishmania /HIV co-infections: epidemiology in Europe,” *Ann Trop Med Parasitol*, vol. 97, no. sup1, pp. 3–15, Oct. 2003, doi: 10.1179/000349803225002499.
- [53] B. Monge-Maillo, F. F. Norman, I. Cruz, J. Alvar, and R. López-Vélez, “Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region.,” *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 8, no. 8, p. e3021, Aug. 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0003021.
- [54] S. Maksoud and J. El Hokayem, “The cytokine/chemokine response in Leishmania/HIV infection and co-infection.,” *Heliyon*, vol. 9, no. 4, p. e15055, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e15055.
- [55] I. Okwor and J. E. Uzonna, “The immunology of Leishmania/HIV co-infection,” *Immunol Res*, vol. 56, no. 1, pp. 163–171, May 2013, doi: 10.1007/s12026-013-8389-8.
- [56] M. Olivier, R. Badaró, F. J. Medrano, and J. Moreno, “The pathogenesis of Leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms,” *Ann Trop Med Parasitol*, vol. 97, no. sup1, pp. 79–98, Oct. 2003, doi: 10.1179/000349803225002561.
- [57] J. E. Vidal, “HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease.,” *J Int Assoc Provid AIDS Care*, vol. 18, p. 2325958219867315, 2019, doi: 10.1177/2325958219867315.
- [58] “Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in Adults and Adolescents with HIV-Toxoplasma gondii Encephalitis- CLINICAL INFO HIV.” Accessed: Jan. 10, 2024. [Online]. Available: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/hiv-clinical-guidelines-adult-and-adolescent-opportunistic-infections/toxoplasma-gondii>
- [59] A. Rostami *et al.*, “Seroprevalence Estimates of Latent and Acute Toxoplasma Infections in HIV+ People-Call for Action in Underprivileged Communities.,” *Microorganisms*, vol. 9, no. 10, Sep. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9102034.

- [60] S. Dian, A. R. Ganiem, and S. Ekawardhani, "Cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients: a review.," *Pathog Glob Health*, vol. 117, no. 1, pp. 14–23, Feb. 2023, doi: 10.1080/20477724.2022.2083977.
- [61] E. E. Escobar-Guevara, M. E. de Quesada-Martínez, Y. B. Roldán-Dávila, B. Alarcón de Noya, and M. A. Alfonzo-Díaz, "Defects in immune response to *Toxoplasma gondii* are associated with enhanced HIV-1-related neurocognitive impairment in co-infected patients.," *PLoS One*, vol. 18, no. 5, p. e0285976, 2023, doi: 10.1371/journal.pone.0285976.
- [62] Y. Zhou, Y. Liu, and Y. Wen, "Primary *Toxoplasma gondii* infection-associated with hemophagocytic syndrome in a man with HIV infection: a case report.," *BMC Infect Dis*, vol. 22, no. 1, p. 35, Jan. 2022, doi: 10.1186/s12879-021-07022-6.
- [63] M. Lejeune *et al.*, "Restoration of T Cell Responses to *Toxoplasma gondii* after Successful Combined Antiretroviral Therapy in Patients with AIDS with Previous Toxoplasmic Encephalitis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 52, no. 5, pp. 662–670, Mar. 2011, doi: 10.1093/cid/ciq197.
- [64] O. Beran *et al.*, "The Effect of Latent *Toxoplasma gondii* Infection on the Immune Response in HIV-Infected Patients.," *Biomed Res Int*, vol. 2015, p. 271842, 2015, doi: 10.1155/2015/271842.
- [65] J.-R. LI, R.-Y. GONG, Y.-P. LI, Y. BAI, F. YOU, and S. DENG, "Research on HIV/*Toxoplasma gondii* co-infection and cytokine levels among intravenous drug users," *Parasite Immunol*, vol. 32, no. 2, pp. 161–164, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01174.x.
- [66] A. Δ. Ζαρέ Χορμιζί, "Διερεύνηση συλλοίμωξης HIV - πρωτόζωων παρασίτων σε ορούς HIV+ ασθενών," 2022, doi: 10.26265/POLYNOE-3087.
- [67] "ELISA Pro: Human IFN- γ - Mabtech." Accessed: Feb. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.mabtech.com/products/elisa-pro-human-ifn-g-3420-1hp>
- [68] "Human IFN- γ ELISA Kit – Bioss." Accessed: Feb. 08, 2024. [Online]. Available: <https://www.biossusa.com/products/bskh1013>
- [69] D. L. Guedes *et al.*, "Comparison of serum cytokine levels in symptomatic and asymptomatic HIV-*Leishmania* coinfecting individuals from a Brazilian visceral leishmaniasis endemic area," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 16, no. 6, p. e0010542, Jun. 2022, doi: 10.1371/journal.pntd.0010542.