



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:  
**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ  
ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ HIV-1 ΛΟΙΜΩΣΗΣ**

*Μαρία Ανδρουτσοπούλου (18678070)*

*Κλαούντια Μίλαϊ (18678269)*

Επιβλέπων: Απόστολος Μπελούκας (Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών)

Αθήνα, 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DIVISION: MEDICAL LABORATORIES

GRADUATE THESIS:  
**SCREENING & LABORATORY SURVEILLANCE  
OF HIV-1 INFECTION**

*Maria Androutsopoulou (18678070)*

*Klaudia Milaj (18678269)*

Supervisor: Apostolos Beloukas (Associate Professor, Department of Biomedical Sciences)

Athens, 2023

Μέλη Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

**Απόστολος Μπελούκας**

**Χρυσάνθη Βογιατζάκη**

**Αικατερίνη Γιώτη**

## Δήλωση συγγραφέων πτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Μαρία Ανδρουτσοπούλου του Νικολάου, με αριθμό μητρώου 18678070 και Κλαούντια Μίλαϊ του Μπασκίμ, με αριθμό μητρώου 18678269, φοιτήτριες του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνουμε ότι:

*«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε 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, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».*

Υπογραφή

## Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) του Εργαστηρίου Επιτήρησης Λοιμωδών Νοσημάτων (ΕΕΛΝΟ) του Τμήματος Πολιτικών Δημόσιας Υγείας (Σχολή Δημόσιας Υγείας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής).

Αρχικά θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, κ. Απόστολο Μπελούκα, επιβλέποντα της παρούσας εργασίας, για την εμπιστοσύνη που, από την αρχή, μας έδειξε θέτοντάς μας σε θέσεις σημαντικής εύθυνης, αλλά και για την στήριξη και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα.

Επιπλέον οφείλουμε ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Παναγιώτα Ρέστα (Μοριακή Βιολόγο-Γενετίστρια και Μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο ΕΚΑΑΝΕ) για την άψογη συνεργασία μας μαζί της, την συνεχή υποστήριξη και βοήθεια της που χωρίς αυτά θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για το όμορφο κλίμα και την πολύ καλή συνεργασία μας όλον αυτό τον καιρό.

Επίσης ευχαριστούμε την Καθηγήτρια κα. Τζωρτζίνα Τζανακάκη, Διευθύντρια του ΕΕΛΝΟ, καθώς και όλες τις συνεργαζόμενες, με το ΕΚΑΑΝΕ, Μονάδες Λοιμώξεων, τα τμήματα Αιμοδοσίας, τα δημόσια και ιδιωτικά Κέντρα Υγείας και όλες τις λοιπές Δομές Υγείας.

Τέλος, θέλουμε να ευχαριστήσουμε βαθιά τις οικογένειες και τους φίλους μας για την πίστη τους σε εμάς σε όλη αυτήν την διαδρομή.

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>Περίληψη</b>	VI
<b>Abstract</b>	VIII
<b>Συντομογραφίες</b>	IX
<b>1. Εισαγωγή</b>	1
<b>1.1. Ο ιός HIV - Επιδημιολογικά Δεδομένα</b>	1
<b>1.2. Δομή HIV</b>	8
<b>1.3. Κύκλος ζωής του ιού HIV</b>	11
<b>1.4. Μετάδοση, Παθογένεια &amp; Στάδια της HIV-1 Λοίμωξης</b>	15
<b>1.5. Διαγνωστικοί δείκτες της HIV-1 λοίμωξης</b>	20
<b>1.6. Διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης</b>	23
<b>1.6.1. Εργαστηριακές μέθοδοι αρχικού ελέγχου (screening test)</b>	23
<b>1.6.2. Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (confirmatory test)</b>	30
<b>1.6.3. Κατευθυντήριες οδηγίες (Guidelines) για εργαστηριακή διάγνωση HIV-1 λοίμωξης</b>	34
A) Έγκυες και βρέφη	37
<b>1.7. Εργαστηριακή Παρακολούθηση της HIV-1 λοίμωξης</b>	40
<b>1.7.1. Εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης του ιικού φορτίου του ιού HIV (VL Monitoring)</b>	40
<b>1.7.2. Κατευθυντήριες οδηγίες για εργαστηριακή επιτήρηση της HIV-1 λοίμωξης</b>	42
<b>2. Πειραματικό Μέρος</b>	44
<b>2.1. Σκοπός</b>	44
<b>2.2. Υλικά – Μέθοδοι</b>	44
<b>2.2.1. Συλλογή &amp; Προετοιμασία Δειγμάτων</b>	44
<b>2.2.2. Αρχικός Έλεγχος με ELISA 4ης Γενιάς</b>	45
A) Αρχή Μεθόδου	45
B) Εξοπλισμός	45
Γ) Πειραματική Διαδικασία	47
<b>2.2.3. Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Western Blot</b>	49
A) Αρχή Μεθόδου	49
B) New Lav Blot I	49
α) Εξοπλισμός	49
β) Πειραματική Διαδικασία	50
Γ) RecomLine HIV-1/2 IgG	52
α) Εξοπλισμός	52
β) Πειραματική Διαδικασία	53
<b>2.2.4. Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Geenius</b>	55

A) Αρχή Μεθόδου	55
B) Εξοπλισμός	55
Γ) Πειραματική Διαδικασία	56
<b>2.2.5. Εργαστηριακή Παρακολούθηση Ιικού Φορτίου με Real-Time RT-PCR</b>	<b>57</b>
A) Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων	57
B) Αρχή Μεθόδου	57
Γ) Εξοπλισμός	57
Δ) Πειραματική Διαδικασία	59
<b>3. Αποτελέσματα</b>	<b>63</b>
<b>4. Συζήτηση - Συμπεράσματα</b>	<b>79</b>
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>84</b>
<b>Παράρτημα</b>	<b>89</b>
Κατάλογος Εικόνων	89
Κατάλογος Πινάκων	90
Κατάλογος Γραφημάτων	91

## Περίληψη

Ο ιός HIV, ο οποίος είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του AIDS, παραμένει μέχρι και σήμερα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας με 4.000 άτομα να μολύνονται καθημερινά σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τον WHO, το 2021 υπήρξαν 1,5 εκατομμύρια νέες HIV λοιμώξεις παγκοσμίως, συνολικά 38,4 εκατομμύρια άτομα ζούσαν με τον ιό, ενώ 650.000 άνθρωποι πέθαναν από HIV- σχετιζόμενες ασθένειες. Για την ίδια χρονιά στην Ευρώπη ο ECDC κατέγραψε συνολικά 106.508 νέες HIV λοιμώξεις ενώ, με βάση τα δεδομένα του ΕΟΔΥ, στην Ελλάδα διαπιστώθηκαν 526 νέες λοιμώξεις. Έχει αποδειχθεί πως η, όσο το δυνατόν, πιο έγκαιρη διάγνωση και η χορήγηση και λήψη κατάλληλης αντιρετροϊκής θεραπείας παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της λοίμωξης και, κατά συνέπεια στην διατήρηση της ποιότητας ζωής των ατόμων που ζουν με τον ιό. Επιπλέον η τακτική παρακολούθηση του ιικού φορτίου είναι ιδιαίτερα σημαντική για την διαπίστωση της ανταπόκρισης του ατόμου στην αντιρετροϊκή θεραπεία και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας ενός θεραπευτικού σχήματος. Σήμερα ο αρχικός εργαστηριακός έλεγχος (screening) γίνεται με μεθόδους EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς υψηλής ευαισθησίας και ο επιβεβαιωτικός έλεγχος (confirmation) περιλαμβάνει κάποια επιπλέον ανοσολογική εξέταση υψηλής ειδικότητας, με συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες την Western blot και το Geenius. Επίσης για την εργαστηριακή επιτήρηση (παρακολούθηση) χρησιμοποιείται ευρέως η μέτρηση του ιικού φορτίου με Real-Time RT-PCR. Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται δεδομένα που αφορούν όλες τις νέες διαγνώσεις HIV λοίμωξης καθώς και τις εργαστηριακές παρακολουθήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος κατά την διάρκεια του 2022. Συγκεκριμένα το έτος 2022 στο ΕΚΑΑΝΕ επιβεβαιώθηκαν 288 νέες λοιμώξεις και επιπλέον πραγματοποιήθηκαν συνολικά 921 μετρήσεις ιικού φορτίου, εκ των οποίων οι 874 αφορούσαν εργαστηριακή παρακολούθηση, ενώ για 47 δείγματα ήταν πρώτη μέτρηση ιικού φορτίου μετά την διάγνωση. Μάλιστα, από τα 47 δείγματα, τα 21 είχαν διαγνωστεί στο ΕΚΑΑΝΕ εντός του ίδιου έτους. Η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων που προέκυψαν συμφωνεί με τα, μέχρι τώρα δημοσιευμένα, νεότερα ευρωπαϊκά και ελληνικά επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν την HIV-λοίμωξη.



**Λέξεις - Κλειδιά:** HIV, AIDS, αρχικός έλεγχος, επιβεβαιωτικός έλεγχος, νέες διαγνώσεις, εργαστηριακή παρακολούθηση, μέτρηση ιικού φορτίου, άτομα που ζουν με τον HIV, ELISA 4ης γενιάς, Western blot, Geenius, Real-Time RT-PCR.

## **Abstract**

Today, the HIV virus, which is the causative agent of AIDS, remains a major public health problem with 4,000 people being infected every day worldwide. According to WHO, in 2021 1.5 million new HIV infections were recorded worldwide, a total of 38.4 million people are living with HIV and 650,000 people died of HIV-related diseases. In 2021 ECDC registered a total of 106,508 new HIV infections in Europe, while, based on the data of Greek CDC, 526 new infections were recorded in Greece. It has been proven that, an early diagnosis and a proper antiretroviral treatment play a decisive role in the progression of the infection and, consequently, in maintaining the quality of life of people living with HIV. In addition, regular monitoring of the viral load is particularly essential to determine the patient's response to antiretroviral therapy and to evaluate the effectiveness of a treatment regimen. Nowadays, screening is done with highly sensitive 4th generation EIA methods and the confirmatory assay includes a highly specific immunological test, with Western blot and Geenius being the most commonly used. Moreover, measurement of the viral load with Real-Time RT-PCR is widely used for laboratory monitoring. This thesis presents data concerning all the new diagnoses of HIV infection as well as the laboratory monitoring tests carried out at the National AIDS Reference Center of Southern Greece (NARCSG) during 2022. Specifically, in 2022, 288 new cases were confirmed at NARCSG and in addition a total of 921 measurements of viral load took place, 874 of which were about laboratory monitoring and 47 cases were first viral load measurements after diagnosis (baseline viral load). In fact, 21 out of the 47 cases were diagnosed at the NARCSG within the same year. The majority of the results obtained are in agreement with the most recently published European and Greek epidemiological data about HIV.

**Key-Words:** HIV, AIDS, screening test, confirmatory test, new diagnoses, laboratory monitoring, baseline viral load measurement, people who live with HIV, 4th generation Elisa, Western Blot, Geenius, Real-Time RT-PCR

## Συντομογραφίες

<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus	Ιός της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας
<b>UNAIDS</b>	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	Κοινό Πρόγραμμα του ΟΗΕ για τον HIV/AIDS
<b>MSM</b>	Men having sex with men	Άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άντρες
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigens	Αντιγόνα ιστοσυμβατότητας
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1	Μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης -1
<b>MA</b>	Matrix Protein	Πρωτεϊνική μήτρα
<b>CA</b>	Capsid Protein	Πρωτεΐνη του καψιδίου
<b>NC</b>	Nucleocapsid	Νουκλεοκαψίδιο
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
<b>tRNA</b>	Transfer RNA	Μεταφορικό RNA
<b>gp</b>	Glycoprotein	Γλυκοπρωτεΐνη
<b>Gag</b>	Group Specific Antigen	Ειδικό αντιγόνο ομάδας
<b>Pol</b>	Polymerase	Πολυμεράση
<b>Env</b>	Envelope	Φάκελος
<b>Vif</b>	Virion infectivity Factor	Παράγοντας μολυσματικότητας του ιού
<b>Vpr</b>	Viral protein R	Ιική πρωτεΐνη R
<b>Vpu</b>	Viral protein U	Ιική πρωτεΐνη U
<b>Nef</b>	Negative regulatory Factor	Αρνητικός ρυθμιστικός παράγοντας
<b>Rev</b>	Regulator of Expression of Virion Proteins	Ρυθμιστής έκφρασης ιικών πρωτεϊνών
<b>Tat</b>	Trans-Activator of Transcription	Trans-ενεργοποιητής της μεταγραφής
<b>RT</b>	Reverse transcriptase	Αντίστροφη μεταγραφάση
<b>PR</b>	Protease	Πρωτεάση
<b>IN</b>	Integrase	Ιντεγκράση
<b>CXCR4</b>	C-X-C Chemokine Receptor Type 4	Υποδοχέας Χημειοκίνης τύπου 4
<b>CCR5</b>	C-C Chemokine Receptor Type 5	Υποδοχέας Χημειοκίνης τύπου 5
<b>RTC</b>	Reverse Transcription Complex	Σύμπλοκο αντίστροφης μετάφρασης
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

<b>cDNA</b>	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
<b>mRNA</b>	messenger RNA	Αγγελιοφόρο RNA
<b>ESCRT</b>	Endosomal Sorting Complex Required for Transport	Σύμπλεγμα ενδοσωμικής ταξινόμησης απαιτούμενο για μεταφορά
<b>LOD</b>	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
<b>LOQ</b>	Limit of Qualification	Όριο ποσοτικοποίησης
<b>PCC</b>	Probe Check Control	Έλεγχος ανίχνευσης
<b>NARCSG</b>	National AIDS Reference Center of Southern Greece	Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος
<b>RER</b>	Rough endoplasmic reticulum	Αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο
<b>HSV-2</b>	Herpes Simplex Virus-2	Έρπης τύπου -2
<b>HAART</b>	Highly Active Antiretroviral Therapy	Αντιρετροϊκή θεραπεία υψηλής δραστηριότητας
<b>SPVL</b>	Set-Point Viral Load	Καθορισμένο επίπεδο ιικού φορτίου
<b>ARS</b>	Acute Retroviral Syndrome	Οξύ Ρετροϊκό Σύνδρομο
<b>IgM</b>	Immunoglobulin M	Ανοσοσφαιρίνη M
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	Ανοσοσφαιρίνη G
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>EIA</b>	Enzyme ImmunoAssay	Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού
<b>FDA</b>	Food & Drug Administration	Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων
<b>NAAT</b>	Nucleic Acid Amplification Test	Δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική δοκιμασία ανοσοπροσρόφησης
<b>WHO</b>	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
<b>IF</b>	Indirect Immunofluorescence	Έμμεσος ανοσοφθορισμός
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate	Φθοριόχρωμα
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention	Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων
<b>ECDC</b>	European Centers for Disease Control and Prevention	Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων
<b>NASBA</b>	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification	Ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων με βάση την αλληλουχία τους
<b>TMA</b>	Transcription-Mediated Amplification	Ενίσχυση με μεσολάβηση μεταγραφής

<b>bDNA</b>	branched Deoxyribonucleic Acid	
<b>LTRs</b>	Long Terminal Repeats	Μακριές τερματικές επαναλήψεις
<b>NYSDOH AI</b>	New York State Department of Health AIDS Institute	Ινστιτούτο AIDS του Υπουργείου Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών της Πολιτείας της Νέας Υόρκης
<b>CO</b>	Cut-Off	Κατώφλι
<b>OD</b>	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
<b>HBsAg</b>	Surface Antigen of the Hepatitis B Virus	Αντιγόνο επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β
<b>anti-HCV</b>	Antibodies of the Hepatitis C Virus	Αντισώματα κατά του ιού της ηπατίτιδας C
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο φωσφορικό άλας
<b>NBT</b>	Nitroblue Tetrazolium	Χρωμογόνο
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-Τετραμεθυλβενζιδίνη
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase	Υπεροξειδάση χρένου
<b>Ct</b>	Cycle Threshold	Κύκλος κατώφλι
<b>SVA</b>	Sample Volume Adequacy	Μάρτυρας επάρκειας όγκου του δείγματος
<b>IQS-H</b>	Internal Quantitative Standard High	Εσωτερικό πρότυπο ποσοτικοποίησης: Υψηλό
<b>IQS-L</b>	Internal Quantitative Standard Low	Εσωτερικό πρότυπο ποσοτικοποίησης: Χαμηλό
<b>XEN</b>	Χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών	
<b>ΕΟΔΥ</b>	Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας	
<b>ΕΚΑΑΝΕ</b>	Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος	

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Ο ιός HIV - Επιδημιολογικά Δεδομένα

Ο ιός της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) ανήκει στην οικογένεια των Ρετροϊών, στο γένος Lentivirus και είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), το οποίο αποτελεί το τελικό στάδιο της HIV λοίμωξης. Ο HIV προσβάλλει τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα τα οποία αποτελούν κύριους ρυθμιστές της ανοσολογικής απόκρισης.[1] Έχουν ανακαλυφθεί δύο τύποι του ιού, ο HIV-1 και ο HIV-2. Ο HIV-2 ανιχνεύεται κυρίως στην Δυτική Αφρική, ενώ ο HIV-1 ευθύνεται για την πλειονότητα των επιδημιών και κατανέμεται γεωγραφικά σε όλο τον κόσμο. Ο HIV-1 ταξινομείται στις ομάδες M (Major), N (non-M, non-O) και O (Outlier) με την M να αποτελεί το πιο κοινό στέλεχος του ιού, ενώ παραπάνω από το 90% των ατόμων που ζουν με τον ιό HIV έχουν μολυνθεί από αυτό.[2] Ο HIV-1 ομάδας O ανιχνεύεται κυρίως στην Κεντρική και Δυτική Αφρική με επίκεντρο το Καμερούν και εκτιμάται ότι είχε μολύνει περίπου 100.000 άτομα έως το 2015.[3] Τέλος, το στέλεχος HIV-1 ομάδας N έχει το μικρότερο αντίκτυπο, καθώς εκτιμάται ότι λιγότερα από 20 άτομα έχουν μολυνθεί από το συγκεκριμένο στέλεχος από το 2015 έως σήμερα.[4]\_Μεταξύ του HIV-1 και HIV-2 παρατηρούνται ελάχιστες δομικές διαφορές, οι οποίες αφορούν τις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου (βλ. παρακάτω).

Ο HIV συνεχίζει να αποτελεί κύριο πρόβλημα δημόσιας υγείας όντας υπεύθυνος για συνολικά 84,2 εκατομμύρια λοιμώξεις και 40,1 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως από την αρχή της πανδημίας έως το τέλος του 2021. Μέχρι το τέλος του 2021, 38,4 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με τον ιό, εκ των οποίων τα 36,7 εκατομμύρια αφορούσαν άτομα ηλικίας 15 ετών και άνω, με το 76% αυτών να έχουν πρόσβαση σε θεραπεία. Όσον αφορά τα άτομα ηλικίας 0-14 ετών, σε αυτό το διάστημα μολύνθηκαν συνολικά 1,7 εκατομμύρια άτομα, με το 52% αυτών να λαμβάνει θεραπεία. Επί του παρόντος, το 85% των ατόμων που ζουν με τον HIV γνωρίζουν την κατάστασή τους. Παράλληλα, 28,7 εκατομμύρια άνθρωποι που ζουν με τον ιό λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία (Antiretroviral Therapy, ART), ποσοστό το οποίο αποτελεί το 75% των συνολικών κρουσμάτων. Ειδικότερα, το 2021 μολύνθηκαν 1,5 εκατομμύρια άνθρωποι και σημειώθηκαν 650.000 θάνατοι από HIV-σχετιζόμενες

ασθένειες. Το 49% των νέων λοιμώξεων που διαγνώστηκαν το 2021 ήταν γυναίκες, με το 80% αυτών να έχουν πρόσβαση στην ιατροφαρμακευτική περίθαλψη, ενώ μόνο το 70% των νέων λοιμώξεων που αφορούσε άντρες είχε την δυνατότητα να λάβει θεραπεία. [5], [6]

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

**Πίνακας 1:** Σύνοψη των παγκόσμιων επιδημιολογικών δεδομένων του 2021, σχετικά με το σύνολο των ανθρώπων που ζουν με τον HIV, τον αριθμό αυτών που μολύνθηκαν το 2021 και τους HIV-σχετιζόμενους θανάτους. [7]

Αναλυτικότερα, το 2021 μόνο στην Αφρική 25,6 εκατομμύρια άτομα ζούσαν με τον HIV, εκ των οποίων το 88% γνώριζε την κατάστασή του. Το 78%, δηλαδή 20,1 εκατομμύρια άνθρωποι, λάμβαναν θεραπεία με το 72% αυτών να λαμβάνουν αποτελεσματικό σχήμα αντιρετροϊκής θεραπείας επιτυγχάνοντας την σταθεροποίηση της ιαμίας. Σχεδόν το 60% των παγκόσμιων νέων μολύνσεων αφορούν την Αφρική. Ειδικότερα, εκτιμάται ότι το 2021 860.000 άνθρωποι μολύνθηκαν από τον ιό και 420.000 θάνατοι αποδόθηκαν σε αιτίες που σχετίζονται με τον HIV, δηλαδή υπήρξε μείωση περίπου κατά 7,1% από το 2020. [8]

Στην περιοχή της Αμερικής υπολογίζεται ότι 3,8 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με HIV το 2021, εκ των οποίων το 85% γνώριζε την κατάστασή του, το 74% ήταν υπό θεραπεία και το 66% είχε καταστείλει επιτυχώς τον ιό. Εκτιμάται ότι 2,8 εκατομμύρια άνθρωποι βρίσκονταν υπό αντιρετροϊκή θεραπεία, ενώ σημειώθηκαν 160.000 νέες λοιμώξεις το 2021. Τελικά 43.000 θάνατοι αποδόθηκαν σε αιτίες που σχετίζονταν με τον ιό, μείωση περίπου κατά 7,4% συγκριτικά με το 2020. [8]

Στην Νοτιοανατολική Ασία αριθμούνταν συνολικά 3,8 εκατομμύρια περιπτώσεις HIV λοίμωξης το 2021. Το 74% των ατόμων που ζούσαν με τον ιό γνώριζε την κατάστασή του, το 63% βρισκόταν υπό θεραπεία και το 55% είχε επιτύχει ιογενή καταστολή. Υπολογίζεται ότι 2,4 εκατομμύρια άνθρωποι υποβλήθηκαν σε αντιρετροϊκή θεραπεία το 2021. Μόνο μέσα σε αυτή τη χρονιά σημειώθηκαν 110.000 νέες λοιμώξεις, ενώ οι θάνατοι που αποδίδονται στον HIV έφτασαν τους 86.000, σημειώνοντας αύξηση περίπου κατά 2,0% σε σχέση με το 2020. [8]

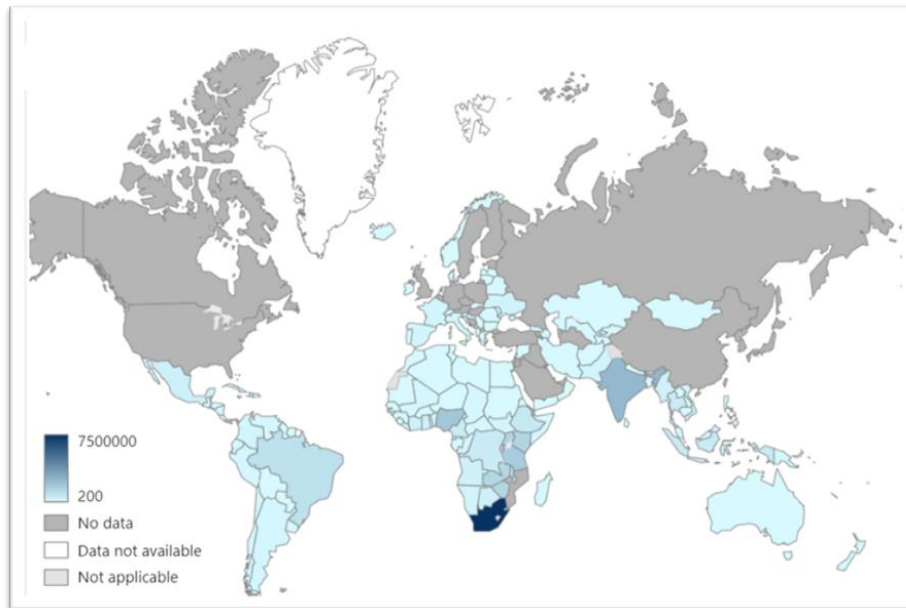
Στην Ευρωπαϊκή περιφέρεια αριθμούνταν συνολικά 2,8 εκατομμύρια κρούσματα το 2021, εκ των οποίων το 73% γνώριζε την κατάστασή του, το 63% αυτών, δηλαδή 1,8 εκατομμύρια άνθρωποι, βρισκόταν υπό θεραπεία και το 60% λάμβανε επιτυχές σχήμα αντιρετροϊκής θεραπείας. Υπολογίζεται ότι 180.000 άτομα μολύνθηκαν από τον ιό το 2021. Παράλληλα 4.000 θάνατοι αποδόθηκαν στον HIV το 2021, σημειώνοντας αύξηση περίπου κατά 0,2% από το 2020. [8]

Στην Ανατολική Μεσόγειο 430.000 άνθρωποι ζούσαν με HIV το 2021, εκ των οποίων το 41% γνώριζε την κατάστασή του, το 27% ήταν υπό θεραπεία και το 24% είχε σταθεροποιήσει την αιμία. Υπολογίζεται ότι 120.000 άτομα υποβάλλονταν σε ART το 2021. Την χρονιά αυτή 42.000 άνθρωποι μολύνθηκαν από τον ιό, ενώ 19.000 θάνατοι αποδόθηκαν σε αιτίες που σχετίζονται με τον HIV, σημειώνοντας αύξηση περίπου κατά 7,6% από το 2020. [8]

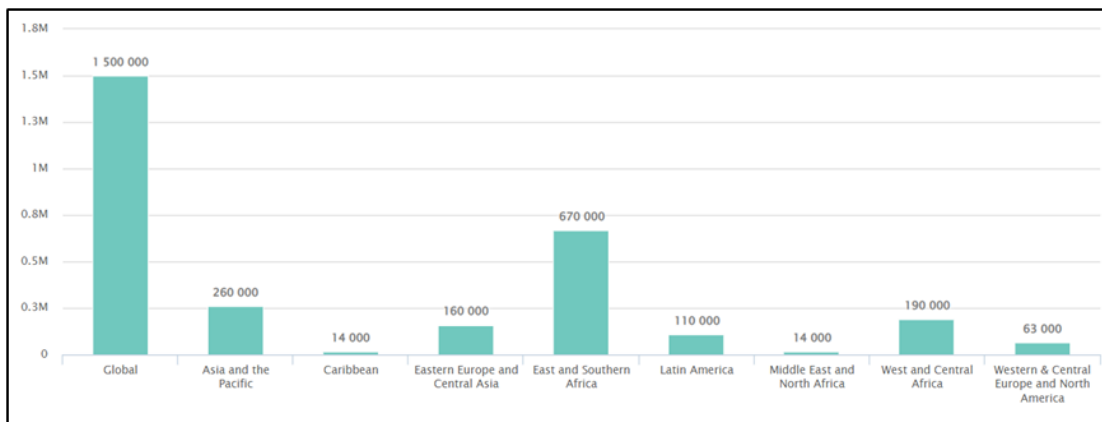
Όσον αφορά την περιοχή του Δυτικού Ειρηνικού 1,9 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με τον HIV το 2021, εκ των οποίων το 88% γνώριζε την κατάστασή του, το 79% δηλαδή 1,5 εκατομμύρια άνθρωποι ήταν υπό θεραπεία και το 76% είχε επιτύχει ιική καταστολή. Υπολογίζεται ότι 120.000 άνθρωποι μολύνθηκαν από τον HIV εντός του 2021, ενώ



αριθμούνται 42.000 θάνατοι που αποδόθηκαν στον ιό, σημειώνοντας αύξηση περίπου κατά 1,7% από το 2020. [8]



**Εικόνα 1:** Χάρτης με τον εκτιμώμενο αριθμό των ανθρώπων (όλων των ηλικιών) που ζούσαν με τον HIV έως το τέλος του 2021 σε κάθε χώρα. [8]

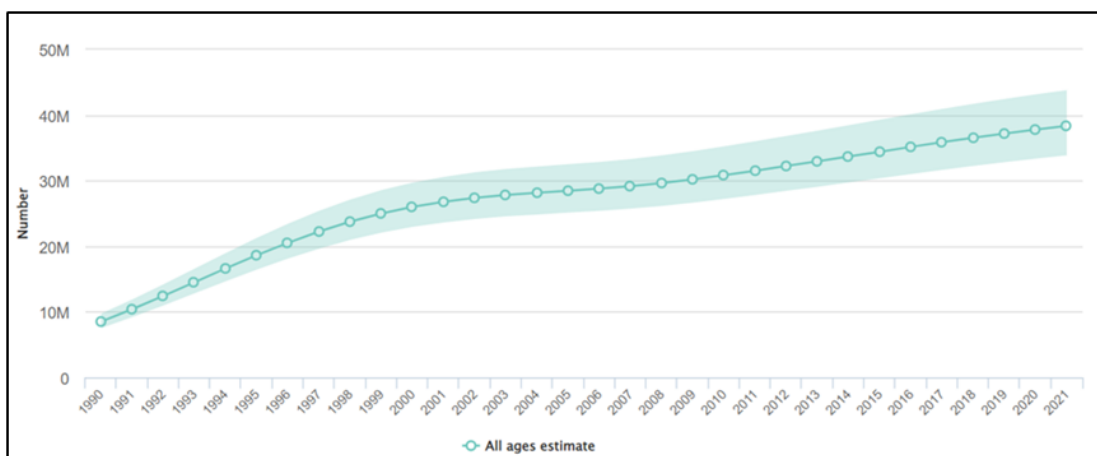


**Γράφημα 1:** Γεωγραφική κατανομή των νέων λοιμώξεων του 2021. [6]

Μελέτη για τον αριθμό των νέων λοιμώξεων που σημειώνονται ετησίως από το 1990 έως το 2021, αποδεικνύει ότι από το 1996 και έπειτα, ο αριθμός των νέων κρουσμάτων μειώνεται κάθε χρόνο. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των νέων λοιμώξεων που υπολογίστηκε το 2021 μειώθηκε κατά 29% σε σχέση με το 1990, ενώ συγκριτικά με το 2000 μειώθηκε κατά 48%, δεδομένου ότι το 2000 είχαν σημειωθεί 2,9 εκατομμύρια νέες λοιμώξεις παγκοσμίως. Την τελευταία δεκαετία, από το 2010 έως το 2021 παρατηρείται μείωση 32% με συνολικά 700.000 λιγότερες λοιμώξεις. Τα έτη 1995, 1996 και 1997 ανιχνεύθηκαν οι

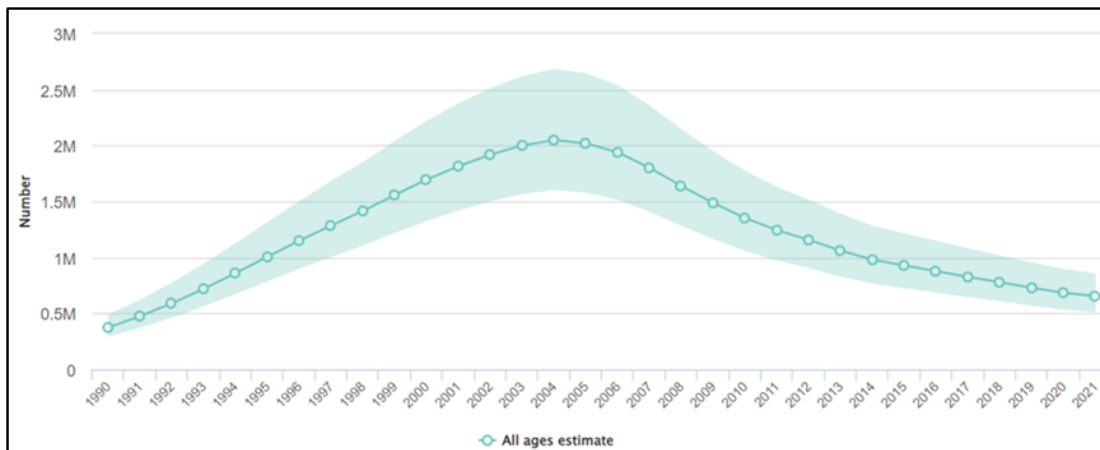
περισσότερες νέες λοιμώξεις αγγίζοντας τα 3,2 εκατομμύρια κρούσματα, τουλάχιστον διπλάσια συγκριτικά με τα δεδομένα του 2021. [6]

Αντιθέτως, η καμπύλη που υποδεικνύει τον αριθμό των ατόμων που ζουν με HIV από το 1990 έως το 2021 είναι ανοδική, δεδομένου ότι έως το τέλος του 2021 αριθμούνταν 38,4 εκατομμύρια άτομα που ζούσαν με τον ιό. Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ των δεκαετιών 1990 και 2000, όταν το 1990 τα άτομα που ζούσαν με τον ιό ήταν 8,5 εκατομμύρια, ενώ το 2000 έφτασαν τα 26 εκατομμύρια. Την δεκαετία μεταξύ 2000 και 2010 παρατηρείται αύξηση κατά 4,8 εκατομμύρια. Τελικά, από το 2010 έως το 2021 ο αριθμός των ατόμων που ζούσαν με τον ιό αυξήθηκε κατά 7,6 εκατομμύρια. Συνεπώς, κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών, οι οποίες και αφορούν συνολικά την επιδημία του HIV, ο αριθμός των ατόμων που ζουν με τον ιό, έχει αυξηθεί συνολικά κατά 29,9 εκατομμύρια άτομα (**Γράφημα 2**). [6]



**Γράφημα 2:** Αναπαράσταση του αριθμού των ατόμων (όλων των ηλικιών) που ζουν με τον HIV από το 1990 έως το 2021. [6]

Όσον αφορά τους HIV-σχετιζόμενους θανάτους που σημειώνονται κάθε χρόνο, το 2004 αποτέλεσε την αποκορύφωση φτάνοντας τους 2 εκατομμύρια θανάτους. Πιο αναλυτικά, από το 1990 έως το 2004 παρατηρήθηκε κατακόρυφη αύξηση των θανάτων, δεδομένου ότι το 1990 ήταν μόλις 370.000, ενώ το 2000 σημειώθηκαν 1,7 εκατομμύρια θάνατοι. Το 2010 ωστόσο φαίνεται ότι οι παγκόσμιες στρατηγικές πρόληψης και αντιμετώπισης της λοίμωξης άρχισαν να αποδίδουν, καθώς τότε έφτασαν τους 1,4 εκατομμύρια θανάτους, με καθοδική τάση της καμπύλης σε σχέση με την προηγούμενη δεκαετία. Τελικά ο αριθμός των θανάτων το 2021 ελαττώθηκε κατά 50% συγκριτικά με το 2010, φτάνοντας τους 650.000 (**Γράφημα 3**). [6]



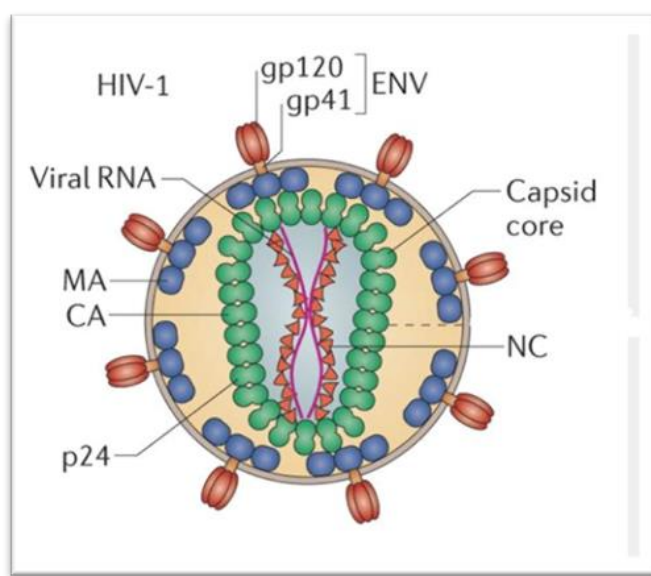
**Γράφημα 3:** Αναπαράσταση του αριθμού των παγκόσμιων HIV-σχετιζόμενων θανάτων (όλων των ηλικιών) από το 1990 έως το 2021 [6]

Ενδιαφέρον έχει η μελέτη του επιπολασμού του ιού σε κάθε ομάδα υψηλού κινδύνου σε παγκόσμιο επίπεδο. Το UNAIDS έχει ορίσει ως ομάδες υψηλού κινδύνου τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (XEN), τους εργαζόμενους στο σεξ, τους άντρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άντρες (Men having sex with men, MSM), τα τρανς άτομα και τα φυλακισμένα άτομα. Ο HIV φαίνεται πως μεταδίδεται μεταξύ των XEN συχνότερα στην Ρωσία, την Ανατολική Ευρώπη, τον Καναδά και σε χώρες του Ειρηνικού. Το 2016 στην Ελλάδα το ποσοστό επιπολασμού στους XEN έφτανε το 5%. Η Εσθονία παρουσιάζει παγκοσμίως το μεγαλύτερο ποσοστό επιπολασμού φτάνοντας το 51,4% το 2018. Όσον αφορά τους εργαζόμενους στο σεξ στην Ευρώπη, ο μεγαλύτερος επιπολασμός αυτής της πληθυσμιακής ομάδας παρουσιάζεται στην Λιθουανία και στην Εσθονία. Ενώ σε παγκόσμιο επίπεδο, η μετάδοση του HIV μεταξύ εργαζόμενων στο σεξ φαίνεται να είναι συχνότερη στις χώρες της Νοτιοανατολικής Αφρικής. Συγκεκριμένα, η χώρα με το μεγαλύτερο ποσοστό επιπολασμού είναι το Λεσότο με 71,9% το 2014. Αμέσως μετά ακολουθεί η Νότια Αφρική με ποσοστό 62,3% το 2021. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για την Ελλάδα δεν έχουν καταγραφεί ακόμη δεδομένα για τη συγκεκριμένη πληθυσμιακή ομάδα. Ως προς τους άνδρες που έχουν σεξουαλική επαφή με άνδρες, ο επιπολασμός του ιού ξεπερνά το 10% στην πλειονότητα των περιοχών της Αμερικής, στην κεντρική και δυτική Ευρώπη, καθώς και στην νότια και δυτική Αφρική. Τα πιο πρόσφατα δεδομένα που συλλέχθηκαν από το UNAIDS για την Ελλάδα αφορούσαν το 2011 με το ποσοστό να φτάνει το 12,7%. Ενώ η Ιταλία αποτελεί την χώρα με το μεγαλύτερο ποσοστό επιπολασμού στην Ευρώπη με 30% το 2019. Σε παγκόσμιο επίπεδο στην Γκάμπια παρατηρούνται τα περισσότερα περιστατικά μετάδοσης του ιού ανάμεσα στους MSM με 41,2% το 2018. Για τα τρανς άτομα δεν έχουν συλλεχθεί δεδομένα από την Ευρώπη και τις περισσότερες χώρες

της Ασίας. Σε παγκόσμιο επίπεδο η Νότια Αφρική εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό επιπολασμού με 58% το 2019. Τέλος, ο επιπολασμός ανάμεσα στα φυλακισμένα άτομα φαίνεται να είναι υψηλότερος στην περιοχή της Νότιας Αφρικής και συγκεκριμένα στη Σουαζιλάνδη φτάνοντας το 34,9% το 2015. Όσον αφορά την Ελλάδα, η τελευταία επιδημιολογική παρατήρηση έγινε το 2016 και έδειξε ότι ο επιπολασμός έφτανε μόνο το 1%. [9]

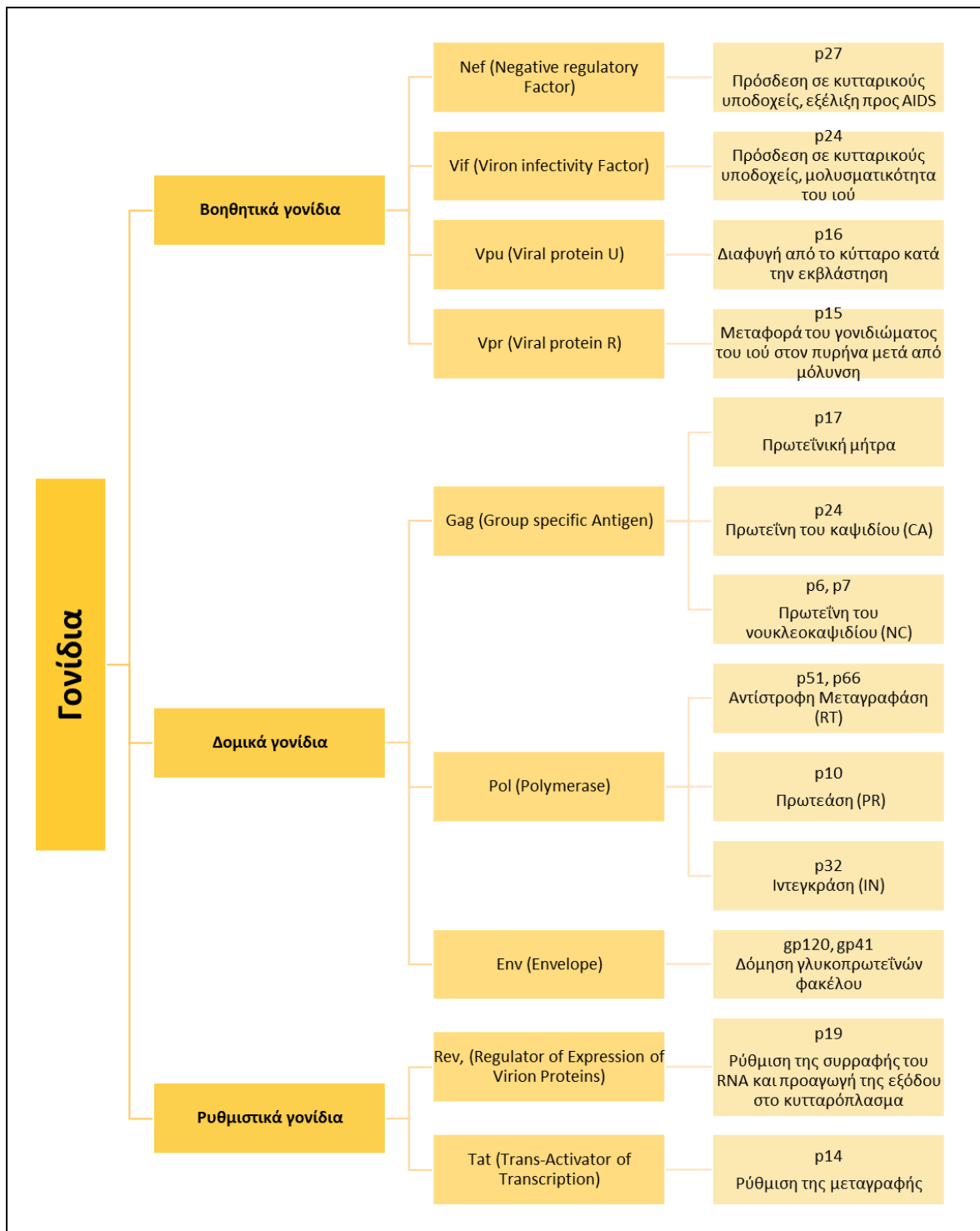
## 1.2. Δομή HIV

Ένα κοινό ιοσωμάτιο HIV-1 είναι σφαιρικό, έχει διάμετρο περίπου 100 nm και περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία ονομάζεται φάκελος (**Εικόνα 2**). Προκειμένου να σχηματιστεί ο φάκελος, η εξωτερική επιφάνεια της γλυκοπρωτεΐνης gp120 συνδέεται με την διαμεμβρανική gp41 και σχηματίζουν ετεροδιμερή. Στην επιφάνεια του φακέλου παρατηρούνται πρωτεΐνες οι οποίες προέρχονται από την εκβλάστηση του ιοσωματίου από το κύτταρο ξενιστή, όπως οι πρωτεΐνες του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA τάξης I και II), ή πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως το ICAM-1 που μπορεί να διευκολύνει την προσκόλληση του ιού σε άλλα κύτταρα στόχους. [10] Εσωτερικά του φακέλου εντοπίζεται η πρωτεϊνική μήτρα (matrix protein, MA) p17 η οποία περιβάλλει ένα κωνικό καψίδιο. Η κύρια πρωτεΐνη του καψιδίου (capsid protein, CA) είναι η p24. Στο νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid, NC) περιέχεται το γενετικό υλικό του ιού, που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα αντίγραφα ενός μονόκλωνου γραμμικού μορίου RNA θετικής πολικότητας μήκους 9-10 kb, στο οποίο είναι συνδεδεμένη η αντίστροφη μεταγραφάση, η ιντεγκράση και ένα μόριο tRNA που φέρει το αμινοξύ λυσίνη, απαραίτητο για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής. [11] Το νουκλεοκαψίδιο σχηματίζεται από περίπου 1000-1500 αντίγραφα πρωτεϊνών. [12]



**Εικόνα 2:** Σχηματική αναπαράσταση του ιού HIV-1, που απεικονίζει τον πρωτεϊνικό φάκελο του ιού, που αποτελείται από τις υπομονάδες gp120 και gp41, και την πρωτεϊνική μήτρα, το καψίδιο και το νουκλεοκαψίδιο που προέρχονται από το πολυπεπίδιο Gag. (ENV: Πρωτεϊνικός φάκελος, Viral RNA: Ιικό RNA, MA: Πρωτεϊνική μήτρα, CA: Καψίδιο, NC: Νουκλεοκαψίδιο) [1]

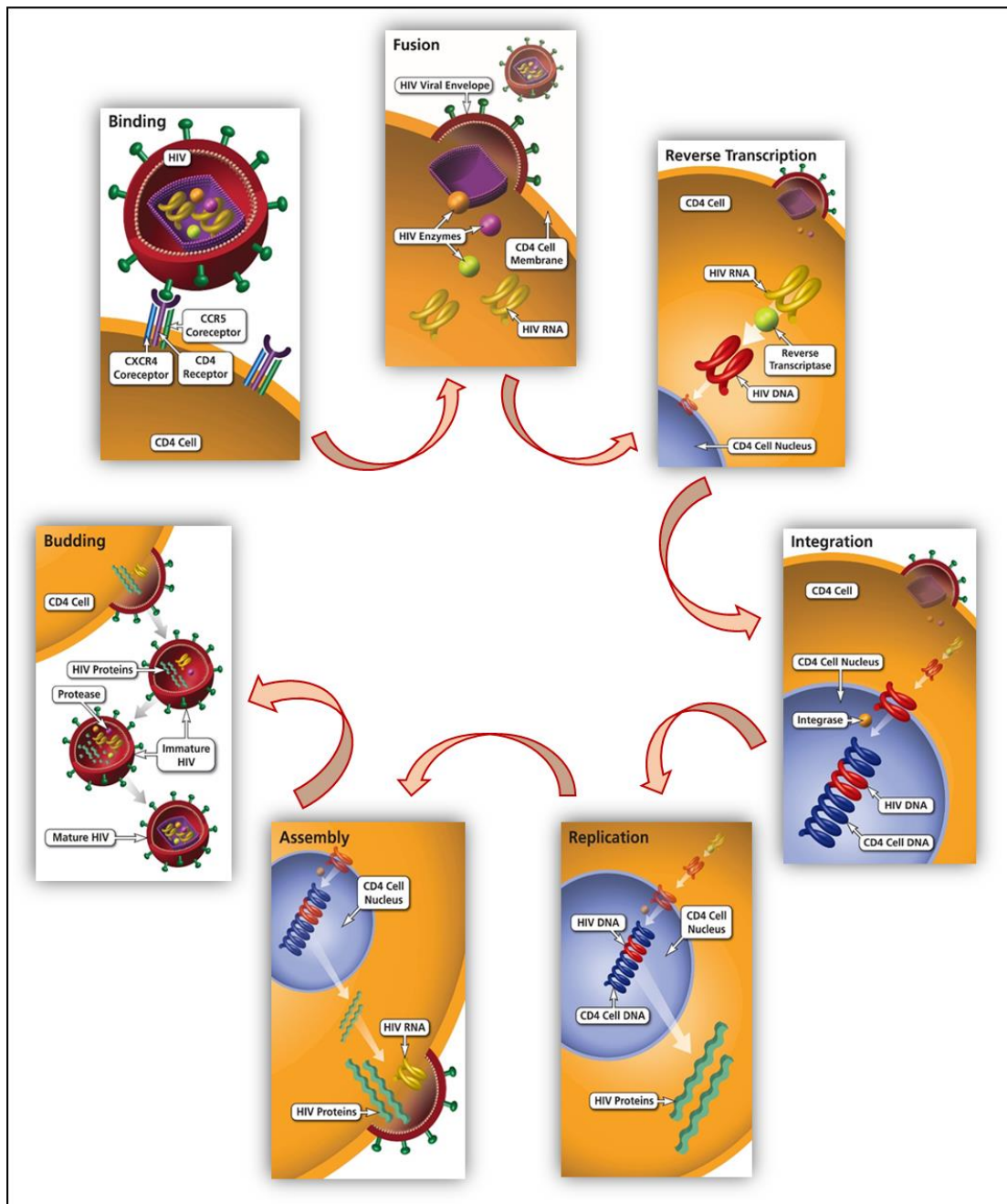
Το γονιδίωμα του ιού HIV χαρακτηρίζεται από τρία βασικά δομικά γονίδια, τα Gag (Group Specific Antigen), Pol (Polymerase) και Env (Envelope), τα οποία είναι παρόντα στο γονιδίωμα όλων των ρετροϊών και κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ένζυμα απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Το γονίδιο Gag κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου p24, p7, p6 και την πρωτεϊνική υπομονάδα της μήτρας, p17. Το γονίδιο Pol κωδικοποιεί ένζυμα απαραίτητα για τον ιικό πολλαπλασιασμό, όπως είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, η ιντεγκράση και η πρωτεάση. [10] Η p10, η πρωτεάση του ιού, συμβάλλει στην ωρίμανση του ιοσωματίου HIV, καθώς οι πρωτεΐνες του HIV δομούνται αρχικά ως μακριές πολυπρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια πρέπει να διασπαστούν στα κατάλληλα λειτουργικά τμήματα με την βοήθεια της πρωτεάσης. Το γονίδιο Env κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41, οι οποίες απαρτίζουν τον ιικό φάκελο. [13] Πέραν των δομικών γονιδίων, το γονιδίωμα του HIV περιλαμβάνει τα βοηθητικά γονίδια Vif, Vpr, Vpu, Nef και τα ρυθμιστικά γονίδια Rev και Tat (**Εικόνα 3**). Τα βοηθητικά και ρυθμιστικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν ρυθμιστικό ρόλο στα διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του ιού. [10] Τέλος, δομικά η κυριότερη διαφορά μεταξύ του HIV-1 και HIV-2 είναι ότι στον HIV-2 η γλυκοπρωτεΐνη gp120 αντικαθίσταται από την gp105, και η gp41 αντικαθίσταται από την gp35.



**Εικόνα 3:** Τα δομικά, ρυθμιστικά και βοηθητικά γονίδια που περιλαμβάνονται στο γονιδίωμα του HIV. Οι κωδικοποιούσες πρωτεΐνες και η λειτουργία τους. [13]

### 1.3. Κύκλος ζωής του ιού HIV

Ο ιός HIV μολύνει τα CD4+ κύτταρα με σκοπό την αναπαραγωγή του στον ξενιστή. Ο κύκλος ζωής του ιού χωρίζεται σε επτά στάδια: 1) πρόσδεση, 2) είσοδος στο κύτταρο-ξενιστή, 3) αντίστροφη μεταγραφή, 4) ενσωμάτωση στο DNA του κυττάρου-ξενιστή, 5) σύνθεση ισοσωματίων, 6) εκβλάστηση και 7) ωρίμανση (Εικόνα 4). [14]



**Εικόνα 4:** Ο κύκλος ζωής του HIV-1: α) πρόσδεση (binding), β) είσοδος στο κύτταρο-ξενιστή (fusion), γ) αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription), δ) ενσωμάτωση στο DNA του κυττάρου ξενιστή (integration), ε) σύνθεση ισοσωματίων (replication), στ) εκβλάστηση (assembly) και ζ) ωρίμανση (budding). [14]

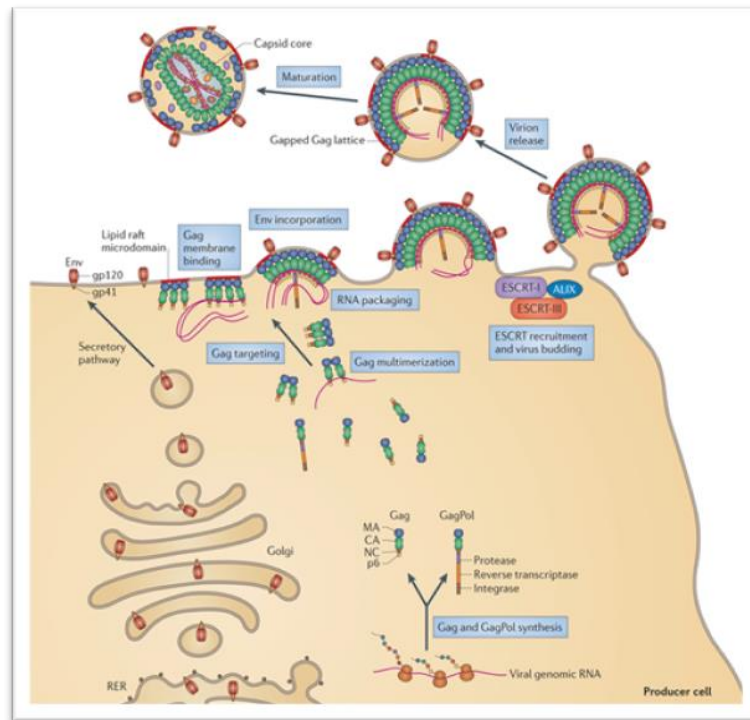


Για να μολύνει ο HIV ένα νέο CD4+ κύτταρο, θα πρέπει πρώτα να προσδεθεί σε αυτό και στη συνέχεια ο φακέλος του να συντηχθεί με την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Η gp120, που αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου του ιού, σχηματίζει σύμπλοκο με την αμινοτελική περιοχή των CD4+ υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των CD4+ κυττάρων. Το σύμπλοκο αυτό επάγει την δομική αναδιάταξη του ιικού φακέλου, επιτρέποντας την σύντηξη της gp120 με την κυτταρική μεμβράνη. Εκτίθεται λοιπόν μία συγκεκριμένη περιοχή της gp120, ικανή να προσδεθεί σε συν-υποδοχείς (π.χ. χημειοκίνες). Οι πιο συνηθισμένοι συν-υποδοχείς χημειοκινών που αναγνωρίζονται από τον HIV είναι οι CXCR4 και CCR5. Οι συν-υποδοχείς CXCR4 εκφράζονται σε πολλά κύτταρα, ενώ οι CCR5 εκφράζονται κυρίως σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα. [10], [15] Αφότου η gp120 συνδεθεί με τον συν-υποδοχέα, η κυτταρική μεμβράνη συντήκεται με την ιική μεμβράνη. Με την σύντηξη των μεμβρανών το ιικό καψίδιο εισέρχεται εντός του CD4+ κυττάρου και οι πρωτεΐνες και το γονιδίωμα του HIV απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. [14]

Κατά την είσοδο στο κύτταρο, το καψίδιο αποσυντίθεται και το σύμπλοκο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription Complex, RTC) απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, έτοιμο να μεταγράψει το ιικό RNA σε DNA. Το σύμπλοκο RTC αποτελείται από το ιικό RNA συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου, tRNA, τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση, ιντεγκράση και πρωτεάση και τις πρωτεΐνες VPR και MA. Αφότου ολοκληρωθεί η μεταγραφή του ιικού RNA σε cDNA καθιστώντας εφικτή την είσοδο του προϊόντος στον πυρήνα του CD4+ κυττάρου, το RTC μειώνεται σε μέγεθος και αποτελείται πια από το ιικό cDNA, τις πρωτεΐνες NC, MA, VPR, την αντίστροφη μεταγραφάση και την ιντεγκράση. Σε αυτό το στάδιο, το σύμπλοκο είναι έτοιμο να ενσωματώσει το cDNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή. [16]

Για τον σκοπό αυτό, η ιντεγκράση διασπά τα νουκλεοτίδια κάθε 3' άκρου της διπλής έλικας του DNA δημιουργώντας δύο κολλώδη άκρα, στα οποία μεταφέρεται το ιικό cDNA με σκοπό να διευκολυνθεί η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή. Με τον μηχανισμό μεταγραφής του ξενιστή, το cDNA μεταγράφεται σε πολλαπλά αντίγραφα νέου ιικού RNA. Ταυτόχρονα, συντίθενται πρώιμες ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ιού, όπως η Tat και η Rev. Η Tat διεγείρει τη μεταγραφή και τον σχηματισμό αντιγράφων RNA. Η Rev διευκολύνει τη μεταγραφή του RNA και την έκφραση δομικών και ενζυμικών γονιδίων και

αναστέλλει την παραγωγή ρυθμιστικών πρωτεϊνών, προάγοντας επομένως τον σχηματισμό ώριμων ιοσωματίων. Μέρος του παραγόμενου ιικού RNA αποτελεί το γονιδίωμα ενός νέου ιού, ενώ το κύτταρο χρησιμοποιεί άλλα αντίγραφα του RNA για να συνθέσει νέες ιικές πρωτεΐνες [10], [14], [17]. Προκειμένου να ξεκινήσει η συναρμολόγηση του ιοσωματίου, πρέπει να ολοκληρωθεί πρώτα η μεταγραφή των ιικών γονιδίων και η μετάφραση του ιικού RNA. Για να γίνει αυτό, το mRNA εξάγεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου συντίθενται οι ιικές πρωτεΐνες. Η πολυπρωτεΐνη Gag κατευθύνει σε μεγάλο βαθμό τη συναρμολόγηση του ιοσωματίου. Συγκεκριμένα η Gag παράγεται πρώτα ως πρόδρομη πρωτεΐνη μεγέθους ~ 55 kDa, η οποία αποτελείται από τις πρωτεΐνες MA, CA, NC και p6. Η MA επάγει την σύνδεση του ενός άκρου της πρόδρομης Gag στην πλασματική μεμβράνη και η NC καθοδηγεί το ιικό RNA στην πλασματική μεμβράνη, ώστε να συνδεθεί με το άλλο ελεύθερο άκρο της πρόδρομης Gag. [18] Στη θέση αυτή, συσσωρεύονται οι γλυκοπρωτεΐνες Env και χιλιάδες Gags, οι οποίες συγκεντρώνονται γύρω από το ιικό RNA και, συνδεόμενες στενά μεταξύ τους, σχηματίζουν το καψίδιο του ιού. [10] Έπειτα, η συσσώρευση των πολυπρωτεϊνών οδηγεί στην διόγκωση της πλασματικής μεμβράνης προς τα έξω, σχηματίζοντας τελικά ένα σφαιρικό σωματίδιο που μοιάζει με γλειφιτζούρι. [19] Στη συνέχεια η Gag μέσω της p6 στρατολογεί το ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport, ESCRT), το οποίο καταλύει το στάδιο σχάσης της μεμβράνης, για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκβλάστησης απελευθερώνοντας τον ιό από το κύτταρο. [18] Κατά την εκβλάστηση, οι λιπιδικές μεμβράνες του ιού ενσωματώνουν διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή και, έτσι εμπλουτίζονται με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. [10], [11]



**Εικόνα 5:** Τα τελευταία στάδια αναπαραγωγής του ιού HIV-1.

Οι γλυκοπρωτεΐνες του ιικού φακέλου (Env) κυκλοφορούν μέσω της εκκριτικής οδού, από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi και, στη συνέχεια σε κυστίδια μέχρι να φτάσουν στην πλασματική μεμβράνη. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη Gag — η οποία περιέχει τμήματα MA, CA, NC, πρωτεάση, αντίστροφη μεταγραφή και ιντεγκράση — συντίθεται στο κυτταρόπλασμα ως αποτέλεσμα ενός προγραμματισμένου γεγονότος μετατόπισης πλαισίου κατά τη μετάφραση του ιικού RNA που κωδικοποιεί την Gag. Η Gag στρατολογεί το ικό γενωμικό RNA, αρχίζει να πολυμερίζεται και φτάνει στην πλασματική μεμβράνη μέσω μιας απροσδιόριστης ακόμη οδού. Έπειτα συνδέεται στη πλασματική μεμβράνη σε μικροπεριοχές λιπιδικής σχεδίας. Το σωματίδιο συναρμολόγησης ενσωματώνει την Env και στη συνέχεια στρατολογεί το σύμπλοκο ESCRT. Η ωρίμανση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του κωνικού πυρήνα του καψιδίου, πυροδοτείται από την πρωτεολυτική διάσπαση των προδρόμων πολυπρωτεϊνών Gag από την ιική πρωτεάση.

[18]

Μετά την απελευθέρωση του ιού, η πρωτεάση διασπά την πρόδρομη Gag στις ώριμες πρωτεΐνες Gag MA, CA, NC και p6. Η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης Gag πυροδοτεί την ωρίμανση του ιού, δηλαδή τον μορφολογικό μετασχηματισμό της δομής του. [18], [19] Πιο αναλυτικά, η διάσπαση της πρόδρομης Gag έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση της MA, η οποία συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη και είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση της Env στη θέση εκβλάστησης, της CA, της NC και των πρωτεϊνών p6. [19] Κατά την ωρίμανση, περίπου 1200 αντίγραφα της CA σχηματίζουν ένα κωνικό περίβλημα γύρω από το γονιδίωμα του HIV [11], ενώ η MA θεωρείται ότι παραμένει συνδεδεμένη με την ιική μεμβράνη. Η αναδιάταξη των γλυκοπρωτεϊνών στην επιφάνεια των ιοσωματίων, θεωρείται ότι καθιστά το ιοσωμάτιο μολυσματικό. [20]

## 1.4. Μετάδοση, Παθογένεια & Στάδια της HIV-1 Λοίμωξης

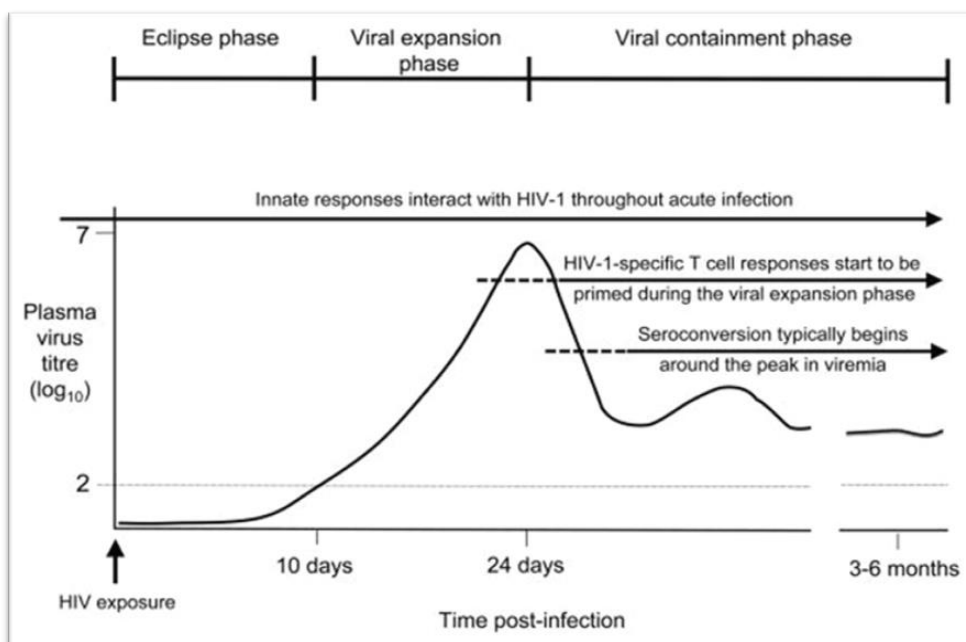
Ο HIV μεταδίδεται μέσω σωματικών υγρών όπως είναι το αίμα, τα κολλικά, σπερματικά και προσπερματικά υγρά και το γάλα θηλασμού. Προκειμένου να μεταδοθεί ο ιός, θα πρέπει να υπάρχει σε κάποιο από τα παραπάνω σωματικά υγρά και να μπορεί να προσβάλλει τον βλεννογόνο. [21] Ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης του ιού είναι η απροφύλακτη σεξουαλική επαφή, ενώ φαίνεται ότι οι XEN παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην συχνότητα μετάδοσης της νόσου. Αντικείμενα, όπως οι μολυσμένες σύριγγες, μπορούν να οδηγήσουν σε λοίμωξη λόγω κοινής χρήσης τους από XEN ή εξαιτίας επαγγελματικής έκθεσης, Παράλληλα η χρήση βελόνας που δεν χρησιμοποιείται με βάση τις προδιαγραφές υγιεινής, για τατουάζ ή τρύπημα αυτιών μπορεί να αποτελέσει αιτία λοίμωξης. Επιπλέον, η κάθετη μετάδοση, κατά την οποία η μητέρα μεταδίδει τον ιό στο βρέφος στο στάδιο της εγκυμοσύνης, του τοκετού ή του θηλασμού, αποτελεί έναν ακόμα τρόπο μόλυνσης με τον HIV. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, οι XEN, οι εργαζόμενοι στο σεξ και οι MSM αποτελούν ομάδες υψηλού κινδύνου (high risk groups) και παίζουν κεντρικό ρόλο στην διατήρηση και την εξέλιξη της επιδημίας HIV. [22], [23] Μάλιστα έχει φανεί πως η παρουσία λοίμωξης από σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, όπως ο έρπης τύπου 2 (Herpes Simplex Virus-2, HSV-2) ή η σύφιλη, αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης από HIV. Αυτό οφείλεται στις βλάβες στο βλεννογόνο που προκαλεί ο HSV-2, καθώς επίσης στην αυξημένη παρουσία T-λεμφοκυττάρων στην περιοχή της αλλοίωσης, τα οποία αποτελούν στόχο του HIV και μπορούν να οδηγήσουν σε ταχύτερη εγκαθίδρυση της λοίμωξης. [24] Η παθογένεση της HIV λοίμωξης οδηγεί σε ανοσοανεπάρκεια και αποτελεί συνάρτηση του κύκλου ζωής του ιού, του κυτταρικού περιβάλλοντος του ξενιστή και του πλήθους των ισοματιών στο μολυσμένο άτομο. Ο HIV δεν μπορεί να επιβιώσει εκτός της κυκλοφορίας του αίματος ή του λεμφικού ιστού. Έτσι, προκειμένου να μεταδοθεί, απαιτείται έκθεση σε μολυσμένα σωματικά υγρά παρουσία δερματικής βλάβης.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, κύριος στόχος του HIV είναι τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Τα μολυσμένα με HIV-1 κύτταρα μπορούν να μεταφέρουν τον ιό σε κύτταρα του περιφερικού ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα), καθώς και σε κύτταρα του βλεννογόνου του κόλπου και του πρωκτού. Στην περίπτωση μόλυνσης μέσω ετεροφυλοφιλικής επαφής, ο βλεννογόνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο πρώτος ιστός που μολύνεται. Συγκεκριμένα τα δενδριτικά κύτταρα και

τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα μολύνονται, επιτρέποντας την εξάπλωση του ιού στους περιφερικούς λεμφαδένες και στη συνέχεια στην κυκλοφορία του αίματος. Ο πολλαπλασιασμός του ιού εντός του λεμφικού ιστού των μολυσμένων βλεννογόνων και των περιφερικών λεμφαδένων είναι εκτεταμένος ήδη από τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, καθώς ο ιός μπορεί να εντοπιστεί μέσα στα δενδριτικά κύτταρα, στα μακροφάγα και στα ενεργοποιημένα CD4+ T-λεμφοκύτταρα. Τα μολυσμένα κύτταρα θα υποστούν λύση ή θα επιτρέψουν την εγκατάσταση της λοίμωξης (λανθάνουσα φάση) αποτελώντας μόνιμες ικές δεξαμενές. Οι ικές δεξαμενές αποτελούν ένα μεγάλο εμπόδιο στην προσπάθεια της πλήρους εξάλειψης της λοίμωξης, καθώς επιτρέπουν την επιβίωση του ιού στον ξενιστή, παρά την παρουσία αποτελεσματικών σχημάτων αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART). [10], [25], [26]

Αναλυτικότερα, η HIV-1 λοίμωξη διακρίνεται σε 3 βασικά στάδια: α) στην πρώιμη λοίμωξη, β) στη χρόνια ή λανθάνουσα λοίμωξη και γ) στην τελικού-σταδίου λοίμωξη – AIDS.

Η πρώιμη φάση της λοίμωξης ξεκινά από την στιγμή της μόλυνσης με τον ιό μέχρι την σταθεροποίηση της ιαμίας σε ένα καθορισμένο επίπεδο (set-point viral load – SPVL) και διαρκεί κατά μέσο όρο 52 μέρες (7-8 εβδομάδες). Κατά την περίοδο αυτή ο ιός πολλαπλασιάζεται και παράλληλα, αναπτύσσεται η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού μειώνοντας τον αριθμό των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. [27], [28] Ειδικότερα, η πρώιμη φάση της λοίμωξης χωρίζεται σε επιμέρους περιόδους οι οποίες παρουσιάζονται στο διάγραμμα της **Εικόνας 6**.

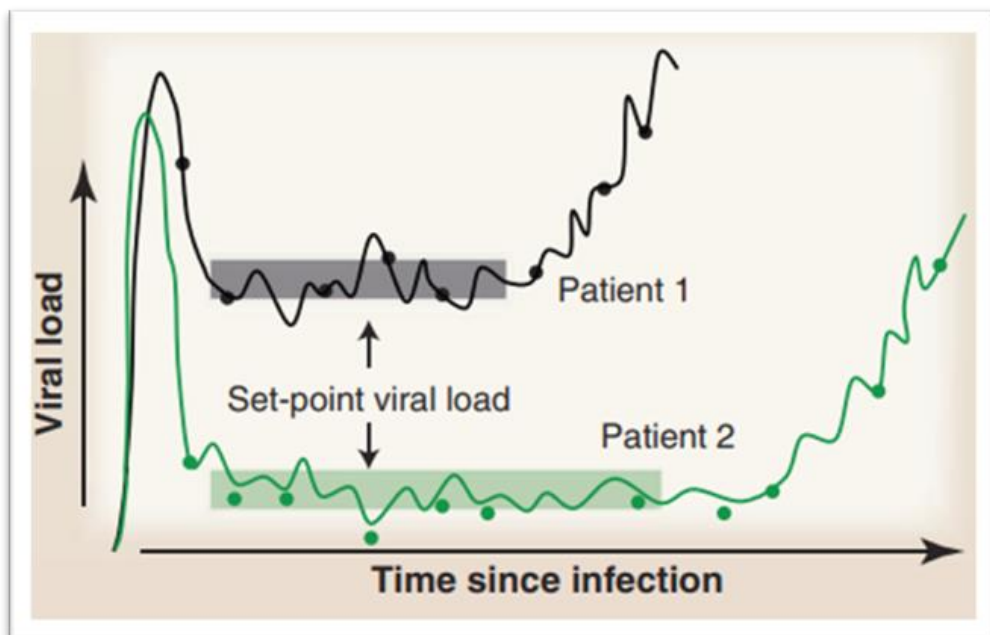


Εικόνα 6: Διαγραμματική απεικόνιση των διακριτών φάσεων της πρώιμης HIV-1 λοίμωξης. [28]

Συγκεκριμένα, το χρονικό διάστημα από την μόλυνση του ατόμου με τον HIV-1 έως την στιγμή που το ικό φορτίο (HIV-1 RNA) βρίσκεται πλέον σε ανιχνεύσιμα επίπεδα στο αίμα διαρκεί κατά μέσο όρο 10 μέρες (1-3 εβδομάδες) ενώ, σε εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να διαρκέσει έως και μήνες. [28], [29], [30], [31] Ακολουθεί η οξεία φάση της λοίμωξης που περιγράφει το χρονικό διάστημα μεταξύ της έκθεσης στον ιό και της εμφάνισης ειδικών αντι-HIV-1 αντισωμάτων (IgM). Χαρακτηρίζεται από ταχεία αύξηση του ικού φορτίου στο αίμα των μολυσμένων ατόμων (έως και περισσότερα από  $10^6$  ικά αντίγραφα/ml αίματος) και δραματική μείωση του αριθμού των CD4<sup>+</sup> T-λεμφοκυττάρων και διαρκεί περίπου 24 μέρες (3-4 εβδομάδες). [26], [30], [31], [32] Να σημειωθεί πως, κατά την οξεία φάση, η πλειοψηφία των μολυσμένων ατόμων αναπτύσσουν Οξύ Ρετροϊκό Σύνδρομο (Acute Retroviral Syndrome, ARS) με την κλινική τους εικόνα να περιλαμβάνει συμπτώματα όμοια με γρίπης ή λοιμώδους μονοπυρήνωσης, όπως πυρετό, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, στοματικά έλκη, λεμφαδενοπάθεια, αρθραλγία, φαρυγγίτιδα, κακουχία, απώλεια βάρους και μυαλγία. Αυτά τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι αρκετά ετερογενή και έχει αναφερθεί ότι τα άτομα που εμφανίζουν σοβαρά συμπτώματα που δεν υποχωρούν κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης τείνουν να οδηγούνται γρηγορότερα στο τελικό στάδιο (AIDS). Το ARS διαρκεί από 7 έως 10 ημέρες και σπάνια περισσότερο από 14 ημέρες. [26], [33] Τέλος, πραγματοποιείται σταδιακή μείωση του ικού φορτίου μέχρι ένα επίπεδο, γνωστό ως set-point. Το SPVL επιτυγχάνεται στο διάστημα μεταξύ 12<sup>ης</sup> και

20<sup>ης</sup> εβδομάδας της λοίμωξης και διατηρείται σχετικά σταθερό για μεγάλο διάστημα στην πορεία της νόσου. [30]

Η λανθάνουσα λοίμωξη περιγράφει την περίοδο που έπεται της πρώιμης λοίμωξης. Διαρκεί από κάποιους μήνες έως χρόνια και χαρακτηρίζεται από απουσία συμπτωμάτων (ασυμπτωματική φάση), κατά την οποία όμως ο ιός συνεχίζει να αναπαράγεται. Παράλληλα παρατηρείται αυξημένη παραγωγή αντισωμάτων ειδικών έναντι του HIV-1, ως εκ τούτου το ιικό φορτίο διατηρείται σε σταθερά, και συνήθως σχετικά χαμηλά, επίπεδα (SPVL) στο αίμα (Εικόνα 7). [34] Κατά την περίοδο αυτή ο HIV αναπαράγεται συνεχώς, εξουδετερώνοντας σταδιακά την αντιϊκή ανοσία του ξενιστή και προκαλώντας μια κατάσταση χρόνιας συστηματικής φλεγμονής. Ακόμη παρατηρείται αργή αλλά προοδευτική απώλεια των CD4+ T-λεμφοκυττάρων και εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η εξέλιξη της νόσου χαρακτηρίζεται από την καταστροφή της δομής του λεμφικού ιστού, η οποία είναι συνέπεια της αντιγραφής του ιού και της χρόνιας ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της διάχυσης του ιού στα γύρω CD4+ T-λεμφοκύτταρα και ευνοεί την εξάπλωση του HIV-1 στο τοπικό και περιφερικό λεμφικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα σε αυτό το στάδιο, η HIV-1 λοίμωξη σχετίζεται με εκτεταμένο πολλαπλασιασμό του ιού στον εντερικό βλεννογόνο, στον υποβλεννογόνο χιτώνα και στους λεμφαδένες παροχέτευσης με τοπική εξάντληση των CD4+ T-λεμφοκυττάρων. [10], [25], [26]





**Εικόνα 7:** Σταθερό ιικό φορτίο κατά την λανθάνουσα φάση της HIV-1 λοίμωξης.

Στην εικόνα παρουσιάζεται το ιικό φορτίο (viral load) δύο διαφορετικών ατόμων (patient 1 & 2) κατά την εξελικτική πορεία της HIV-1 λοίμωξης (time since infection) χωρίς θεραπεία. Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρείται απότομη και ταχεία αύξηση του ιικού φορτίου αμέσως μετά την μόλυνση (πρώιμη λοίμωξη), σταθεροποίηση της ιαμίας σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο ιικού φορτίου (set-point viral load) και διατήρησή του για αρκετό διάστημα (λανθάνουσα λοίμωξη) και τέλος, αύξηση του ιικού φορτίου και ανάπτυξη AIDS (τελικού σταδίου λοίμωξης). [35] Σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία, ο SPVL είναι προγνωστικός δείκτης της ταχύτητας εξέλιξης της λοίμωξης και του κινδύνου μετάδοσης HIV-1. [26], [30]

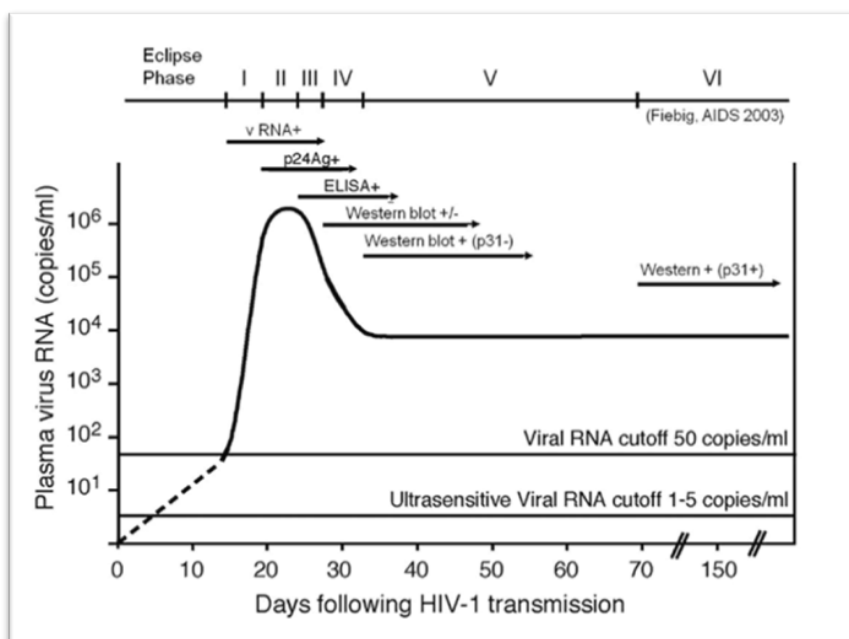
Απουσία αντιρετροϊκής θεραπείας, η συντριπτική πλειοψηφία των ατόμων οδηγείται σε προοδευτική μείωση των CD4+ T- λεμφοκυττάρων, σε επίπεδα κάτω των 200 κυττάρων ανά mm<sup>3</sup>, και τελικά αναπτύσσει AIDS (τελικό στάδιο). [26], [36] Πιο συγκεκριμένα, ελλείψει περιορισμού του ιού, η καταστροφή του λεμφικού συστήματος εξελίσσεται και ο αριθμός των CD4+ T-λεμφοκυττάρων συνεχίζει να μειώνεται σε επίπεδα χαμηλότερα από 200 κύτταρα/mm<sup>3</sup> σηματοδοτώντας την έναρξη του τελικού σταδίου της λοίμωξης και αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ευκαιριακών μικροβιακών λοιμώξεων και κακοηθειών, ως συνέπεια σοβαρής βλάβης του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι πιο κοινές ευκαιριακές λοιμώξεις, που παρατηρούνται στο στάδιο του AIDS, προκαλούνται από απειλητικά για την ζωή παθογόνα, όπως μύκητες (*Microcystis carinii*, *Candida albicans*), ιούς (κυτταρομεγαλοϊός, έρπης ζωστήρας) και εντερικά παράσιτα (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Isospora belli*). Η κλινική εικόνα του ατόμου συνήθως χαρακτηρίζεται από διάχυτο οίδημα των λεμφαδένων, σοβαρή μείωση του σωματικού βάρους, πυρετό και αναπνευστικά και γαστρεντερικά συμπτώματα. Επίσης οι νεοπλασματικές ασθένειες, όπως το σάρκωμα Kaposi και τα λεμφώματα, που πιθανότατα εμφανίζονται ως συνέπεια της ανοσοανεπάρκειας, εξασθενούν σοβαρά τον οργανισμό, επιδεινώνοντας την κλινική πορεία της νόσου. Σε κάθε περίπτωση, η εξέλιξη της νόσου είναι εξαιρετικά μεταβλητή, ανάλογα με την απόκριση στην λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας και την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. [10], [25], [26]



## 1.5. Διαγνωστικοί δείκτες της HIV-1 λοίμωξης

Συνοπτικά ως δείκτες της HIV-1 λοίμωξης μπορούν να χρησιμοποιηθούν το HIV-1 RNA, το ιικό αντιγόνο p24, τα ειδικά αντισώματα έναντι του ιού και τα CD4+ κύτταρα. Θεωρώντας την ορομετατροπή (εμφάνιση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού HIV-1 στον ορό) ως χρονικό σημείο αναφοράς, η HIV-1 λοίμωξη μπορεί να διακριθεί σε δύο φάσεις: α) στην φάση πριν την ορομετατροπή και β) στην φάση μετά την ορομετατροπή. Η περίοδος πριν από την ορομετατροπή διαρκεί περίπου 2-4 εβδομάδες και χαρακτηρίζεται από την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων του HIV-1 RNA και του p24, οι οποίοι θεωρούνται οι δύο βασικότεροι διαγνωστικοί δείκτες της πρώιμης HIV-1 λοίμωξης. Κατά την φάση μετά την ορομετατροπή, πρώτα εμφανίζονται τα IgM και στην συνέχεια τα IgG αντισώματα έναντι του ιού.

Σύμφωνα με τους Fiebig et. al., η HIV-1 λοίμωξη μπορεί να ταξινομηθεί σε έξι διακριτά στάδια με βάση τη διαδοχική εμφάνιση θετικών διαγνωστικών δοκιμών για τον HIV-1. (Εικόνα 8)



**Εικόνα 8:** Κατηγοριοποίηση της HIV-1 λοίμωξης σε στάδια I, II, III, IV, V και VI κατά Fiebig.

Η επιλογή της κατάλληλης εργαστηριακής τεχνικής για την έγκαιρη διάγνωση της HIV λοίμωξης εξαρτάται από την φάση της μόλυνσης σε κάθε περίπτωση. [32]

Αρχικά κατά το στάδιο I είναι ανιχνεύσιμο μόνο το ιικό RNA στο αίμα, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με τεχνικές μέτρησης ιικού φορτίου, όπως είναι η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Στο στάδιο II εκτός από το

HIV-1 RNA, ανιχνεύεται το αντιγόνο p24 του ιού με τεχνικές που διαθέτουν αυτήν την δυνατότητα όπως οι 4<sup>ης</sup> γενιάς Ανοσοενζυμικές Μέθοδοι Προσδιορισμού (Enzyme ImmunoAssay, EIA). Στο στάδιο III σε ανιχνεύσιμα επίπεδα βρίσκονται πλέον και τα αντισώματα τάξης IgM χρησιμοποιώντας κατάλληλες τεχνικές EIA (3<sup>ης</sup> και 4<sup>ης</sup> γενιάς). Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) δίνει ακόμα αρνητικό αποτέλεσμα ως προς την παρουσία ειδικών αντι-HIV-1 αντισωμάτων. Το στάδιο IV είναι όμοιο με το III με μόνη διαφορά την παρουσία απροσδιόριστων αποτελεσμάτων Western Blot, εφόσον δεν πληρούνται τα κριτήρια που ορίζει ο Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων (Food & Drug Administration, FDA). Έπειτα κατά το στάδιο V η Western Blot δίνει πια θετικά αποτελέσματα, με μοναδική εξαίρεση την απουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου p31. Τελικά στο στάδιο VI όλες οι διαγνωστικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμής Western Blot για p31, δίνουν θετικό αποτέλεσμα επιβεβαιώνοντας την μόλυνση από τον HIV-1. Αυτή η κατηγοριοποίηση σε στάδια I-VI κατά Fiebig παίζει σημαντικό ρόλο στην διευκόλυνση της εργαστηριακής διάγνωσης της πρώιμης λοίμωξης. [32]

Η έγκαιρη εργαστηριακή διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης είναι υψίστης σημασίας για την χορήγηση κατάλληλης θεραπείας σε άτομα που ζουν με τον HIV-1 καθώς επίσης, για την επιτήρηση και τον έλεγχο της επιδημιολογίας της λοίμωξης σε παγκόσμιο επίπεδο. Ιδανική θεωρείται η επίτευξη της διάγνωσης κατά την οξεία φάση της πρώιμης HIV-1 λοίμωξης, τότε που παρατηρείται πολύ υψηλή συγκέντρωση του ιού (HIV-1 RNA) στο αίμα και σε άλλα βιολογικά υγρά των μολυσμένων ατόμων, αυξάνοντας τον κίνδυνο μετάδοσης. Μελέτες έχουν δείξει πως ο κίνδυνος μετάδοσης κατά την οξεία φάση είναι 26 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το διάστημα που η HIV-1 λοίμωξη είναι πλέον σε προχωρημένο στάδιο. [37] Επιπλέον έχει φανεί πως άτομα που βρίσκονται στην οξεία φάση και δεν το γνωρίζουν παίζουν κυρίαρχο αιτιολογικό ρόλο στις επιδημίες HIV-1, εξαιτίας της υψηλής μεταδοτικότητάς τους. [38] Μάλιστα εκτιμάται πως για ένα ποσοστό 38-50% των συνολικών μεταδόσεων HIV-1 υπεύθυνα είναι άτομα που βρίσκονται στην πρώιμη φάση της λοίμωξης, και πιθανά δεν γνωρίζουν την θετικότητά τους. [33], [39]

Τόσο το HIV-1 RNA όσο και το p24 θεωρούνται δείκτες που με την ανίχνευσή τους μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματική διάγνωση κατά την οξεία φάση. Κατ' αρχάς, το HIV-1 RNA ανιχνεύεται στο αίμα περίπου την 10<sup>η</sup> μέρα μετά την μόλυνση και για περίπου 1-5

μέρες είναι ο μοναδικός ανιχνεύσιμος διαγνωστικός δείκτης ειδικός για τον ιό. Κατόπιν το p24 είναι ο δεύτερος δείκτης που ανιχνεύεται, μετά την 14<sup>η</sup> ημέρα της λοίμωξης, όταν πια το ιικό RNA έχει φτάσει τα  $10^4$  ή και περισσότερα ιικά αντίγραφα ανά ml αίματος. [29] Όμως, όπως έχει αποδειχθεί, μια δοκιμασία ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Amplification Test, NAAT) μπορεί να ανιχνεύσει τον HIV-1 έως και 7 μέρες νωρίτερα από ό,τι μια δοκιμασία ανίχνευσης p24, καθιστώντας το HIV-1 RNA ιδανικότερο διαγνωστικό δείκτη της πρώιμης λοίμωξης (**Εικόνα 8**). Σύμφωνα με τους Fiebig et al., στην θεωρητική περίπτωση ύπαρξης κάποιας μεθόδου NAAT με δυνατότητα αξιόπιστης ανίχνευσης ενός ιικού αντιγράφου ανά ml δείγματος, τότε θα μπορούσε να επιτευχθεί ανίχνευση του HIV-1 έως και 11 μέρες νωρίτερα από ό,τι με μια δοκιμασία ανίχνευσης p24. [32]

Εντούτοις η διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης βασίζεται στην χρήση ανοσολογικών, και όχι μοριακών, δοκιμασιών, με εξαίρεση συγκεκριμένες μόνο περιπτώσεις. Παρ' όλα αυτά, όπως αναλύεται παρακάτω, η μέτρηση του ιικού φορτίου αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους εργαστηριακής παρακολούθησης της αποτελεσματικότητας της ART που λαμβάνουν άτομα που ζουν με τον HIV-1. [34]

## 1.6. Διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης

Από το 1981, οπότε αναφέρονται τα πρώτα έξι περιστατικά AIDS στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής έχοντας ως υπεύθυνο αιτιολογικό παράγοντα τον ιό HIV, έως σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές διαφορετικές εργαστηριακές τεχνικές με στόχο την διάγνωση της HIV λοίμωξης, μεταξύ των οποίων οι Western blot, EIA, ELISA, έμμεσος ανοσοφθορισμός, NAAT, PCR, κ.λπ. Συνηθέστερα η διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης ξεκινά με τον αρχικό έλεγχο με μια μέθοδο EIA υψηλής ευαισθησίας. Εφόσον το αποτέλεσμα είναι θετικό, ακολουθεί ο επιβεβαιωτικός έλεγχος με κάποια ανοσοδοκιμασία υψηλής ειδικότητας, όπως είναι η Western blot. [40], [41], [42]

### 1.6.1. Εργαστηριακές μέθοδοι αρχικού ελέγχου (screening test)

Η μέθοδος EIA ή ELISA είναι κοινώς αποδεκτή ως πρότυπη μέθοδος (gold standard method) για τον αρχικό έλεγχο της HIV μόλυνσης παγκοσμίως χάρη στην αποδεδειγμένα πολύ υψηλή ευαισθησία της. [43]

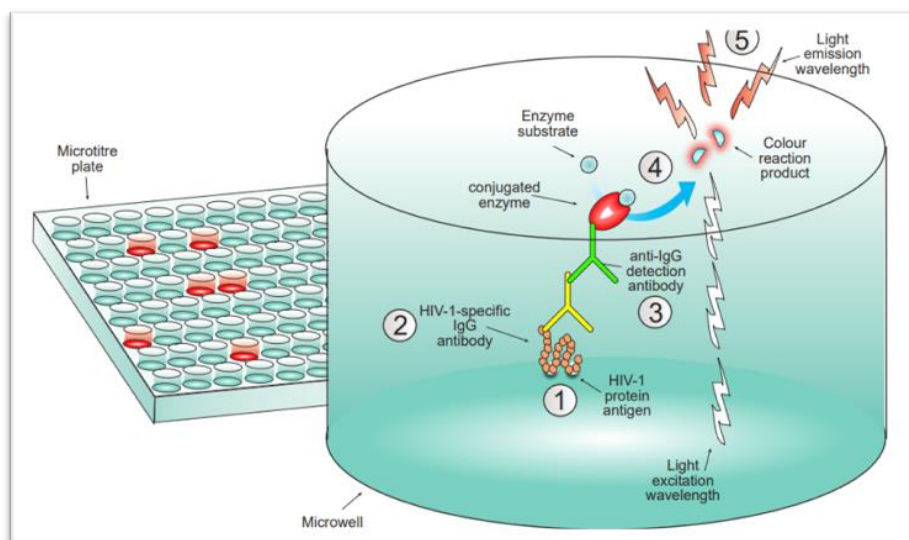
Κάνοντας μια σύντομη ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη των EIA από 1<sup>ης</sup> έως 5<sup>ης</sup> γενιάς, με τις EIA 1<sup>ης</sup> γενιάς ανιχνεύονταν αποκλειστικά τα IgG αντισώματα έναντι του HIV-1, καθλώνοντας ολόκληρα ιοσωμάτια HIV-1 (σε ρόλο αντιγόνου) στην στερεά φάση της μεθόδου. Σε μια πιο εξελιγμένη μορφή, οι EIA 2<sup>ης</sup> γενιάς έδιναν την δυνατότητα ανίχνευσης IgG αντισωμάτων έναντι τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2 χρησιμοποιώντας συνθετικά ή ανασυνδυασμένα πεπτιδικά ικά αντιγόνα στην στερεά φάση. Προχωρώντας σε πιο βελτιωμένες μορφές EIA, οι μέθοδοι 3<sup>ης</sup> γενιάς μπορούσαν πλέον να ανιχνεύουν και IgM αντισώματα, εκτός από IgG, των HIV-1 και HIV-2. Η καινοτομία των EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς, που χρησιμοποιούνται κατά κόρον σήμερα, είναι πως για πρώτη φορά επιτρέπουν, μαζί με την ανίχνευση των IgM και IgG, την ταυτόχρονη ανίχνευση του ιικού καψιδικού αντιγόνου p24. Τέλος, φτάνοντας στις μεθόδους 5<sup>ης</sup> γενιάς, που είναι οι πιο πρόσφατα εγκεκριμένες από τον FDA, δίνεται η δυνατότητα διαφοροποίησης των αντι-HIV-1, αντι-HIV-2 και p24 του HIV-1 στα υπό εξέταση δείγματα. [41]

#### EIA 1ης Γενιάς

Πιο αναλυτικά, η χρήση ανοσοενζυμικών μεθόδων προσδιορισμού στην διάγνωση της HIV λοίμωξης χρονολογείται πριν από περισσότερα από 30 χρόνια, όταν το 1985

χρησιμοποιείται για πρώτη φορά EIA 1<sup>ης</sup> γενιάς, εγκεκριμένη από τον FDA, για τον screening έλεγχο των υποψήφιων αιμοδοτών και την διάγνωση όσων είχαν μολυνθεί με τον HIV. [41]

Η αρχή μεθόδου της έμμεσης ανοσοενζυμικής δοκιμασίας 1<sup>ης</sup> γενιάς βασίζεται στην καθήλωση ολόκληρων HIV-1 ιοσωματίων, παραγόμενων από κυτταρικές καλλιέργειες, στην στερεά φάση της μικροπλάκας, στα οποία συνδέονταν τα αντι-HIV-1 τάξης IgG που περιέχονταν στο δείγμα. Έπειτα ειδικά αντι-IgG ένζυμο-συζευγμένα αντισώματα συνδέονται ειδικά με τα IgG αντι-HIV-1, και με την προσθήκη κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος παρατηρείται αλλαγή χρώματος επιβεβαιώνοντας το θετικό αποτέλεσμα (Εικόνα 9). [44]

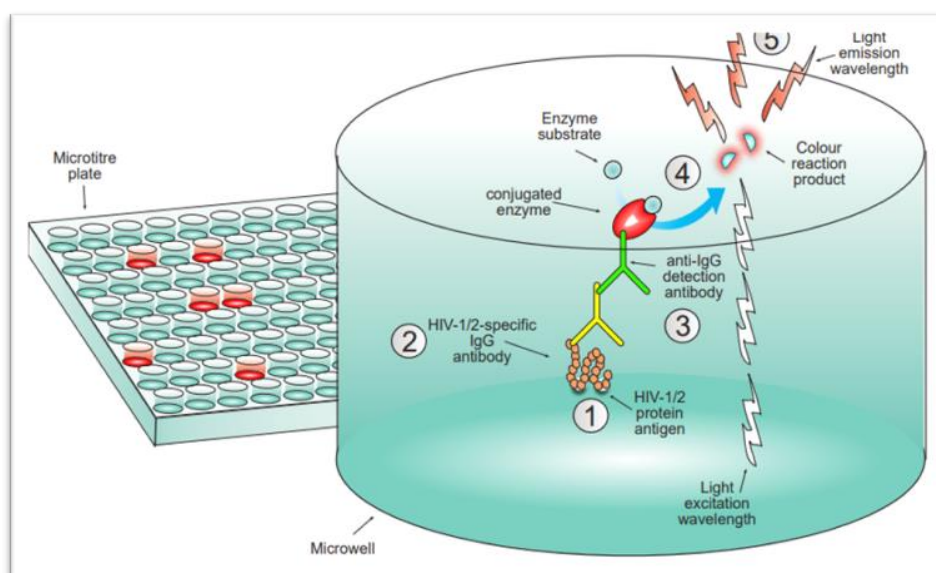


Εικόνα 9: Αρχή μεθόδου της έμμεσης ELISA 1<sup>ης</sup> γενιάς για την ανίχνευση IgG για τη διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης. [44]

Στα μειονεκτήματα αυτής της πρώτης προσπάθειας ανίχνευσης του ιού HIV με ανοσοενζυμικές μεθόδους ήταν η αδυναμία ανίχνευσης του HIV-2 καθώς και άλλων υποομάδων του ιού HIV-1, πέραν των αντιγόνων της ομάδας M. Επίσης ήταν πολύ συχνή η παρουσία διασταυρούμενων αντιδράσεων λόγω μη-ειδικής σύνδεσης IgG αντισωμάτων στα καθηλωμένα αντιγόνα δίνοντας έτσι πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. [41] Τέλος, σημαντικό μειονέκτημα ήταν η μεσολάβηση μεγάλου διαστήματος μεταξύ εμφάνισης του HIV RNA στο αίμα και ανίχνευσης των ειδικών αντισωμάτων, γνωστό ως διαγνωστικό «παράθυρο», δίνοντας θετικό αποτέλεσμα μόλις 8-10 εβδομάδες μετά την μόλυνση. [36]

## EIA 2ης Γενιάς

Μέσα σε 2 χρόνια από την εμφάνιση των EIA για τη διάγνωση του ιού HIV, το 1987, αναπτύσσονται νεότερες τεχνικές EIA, 2<sup>ης</sup> γενιάς, που πλέον ανιχνεύουν τα IgG αντισώματα έναντι, όχι μόνο του HIV-1, αλλά και του HIV-2. Συγκεκριμένα, στην στερεά φάση είναι καθηλωμένα συνθετικά ή ανασυνδυασμένα ιικά πεπτιδικά αντιγόνα των ομάδων M, N και O. Με την επώαση θετικού δείγματος στον HIV, αντι-HIV αντισώματα που περιέχονται στον ορό/πλάσμα συνδέονται ειδικά στα καθηλωμένα αντιγόνα. Στην συνέχεια προστίθενται ειδικά αντι-IgG αντισώματα σημασμένα με ένζυμο που συνδέονται στο σχηματισμένο ανοσοσύμπλοκο (καθηλωμένο αντιγόνο – IgG). Η θετική αντίδραση γίνεται ορατή μέσω του αποχρωματισμού που επιτυγχάνεται προσθέτοντας το κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα (**Εικόνα 10**). [41], [44]



**Εικόνα 10:** Αρχή μεθόδου της έμμεσης ELISA 2<sup>ης</sup> γενιάς για την ανίχνευση IgG για τη διάγνωση της HIV-1 και HIV-2 λοίμωξης. [44]

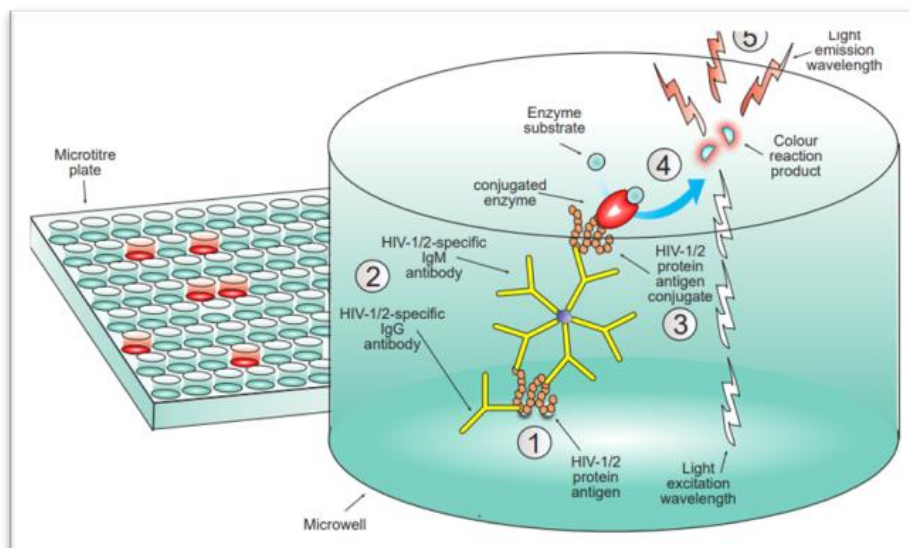
Χάρη στην χρήση ανασυνδυασμένων ή συνθετικών πρωτεϊνικών ιικών αντιγόνων, σε αντίθεση με τα ολόκληρα ισωμάτια που χρησιμοποιούνταν στην αντίστοιχη μέθοδο 1<sup>ης</sup> γενιάς, αυξήθηκε κατά πολύ η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου. Ως αποτέλεσμα υπήρξε αισθητή μείωση της περιόδου «παραθύρου» στις 33-35 μέρες, δίνοντας θετικό αποτέλεσμα έως και μια εβδομάδα νωρίτερα από τις μεθόδους 1<sup>ης</sup> γενιάς. Παρόλα αυτά, και σε αυτήν τη μέθοδο παρατηρήθηκαν πολλές διασταυρούμενες αντιδράσεις οδηγώντας σε υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. [39], [41]



### EIA 3ης Γενιάς

Βασικός στόχος των EIA 3<sup>ης</sup> γενιάς ήταν η ανίχνευση του HIV σε όσο το δυνατόν νωρίτερα στάδια της λοίμωξης, με σκοπό την μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων των EIA 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. Έτσι, το 1994 αναπτύσσονται οι EIA 3<sup>ης</sup> γενιάς οι οποίες δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης τόσο IgG όσο και IgM αντι-HIV αντισωμάτων. Εφόσον τα IgM είναι τα πρώτα αντισώματα που δημιουργούνται μετά την έκθεση στον ιό, αυξήθηκε επιπλέον η ευαισθησία της τεχνικής μειώνοντας το διαγνωστικό «παράθυρο» στις περίπου 22 μέρες (2-4 εβδομάδες) μετά την μόλυνση. [36], [39], [41]

Η EIA 3<sup>ης</sup> γενιάς ακολουθεί μεθοδολογία τύπου sandwich. Και σε αυτήν την περίπτωση, στην στερεά επιφάνεια της πλάκας βρίσκονται καθηλωμένες ανασυνδυασμένες αντιγονικές πρωτεΐνες των HIV-1 και HIV-2 στις οποίες συνδέονται ειδικά αντισώματα τάξης IgG και IgM που πιθανόν υπάρχουν στο προστιθέμενο δείγμα. Αντίθετα με τις μεθόδους των δύο προγενέστερων γενεών, χρησιμοποιείται πλέον σύζευγμα αντιγόνου-ενζύμου, και όχι αντισώματος-ενζύμου, το οποίο συνδέεται με τα δεσμευμένα αντι-HIV αντισώματα παίρνοντας μια μορφή που δίνει την εντύπωση «sandwich» (καθηλωμένο αντιγόνο – IgG/IgM – ενζυμοσυζευγμένο αντιγόνο). Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος, με την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος πραγματοποιείται η αναμενόμενη αλλαγή χρώματος (Εικόνα 11). [41], [44]



**Εικόνα 11:** Αρχή μεθόδου της ELISA 3<sup>ης</sup> γενιάς, τύπου sandwich, για την ανίχνευση IgG και IgM στην διάγνωση της HIV λοίμωξης. [44]

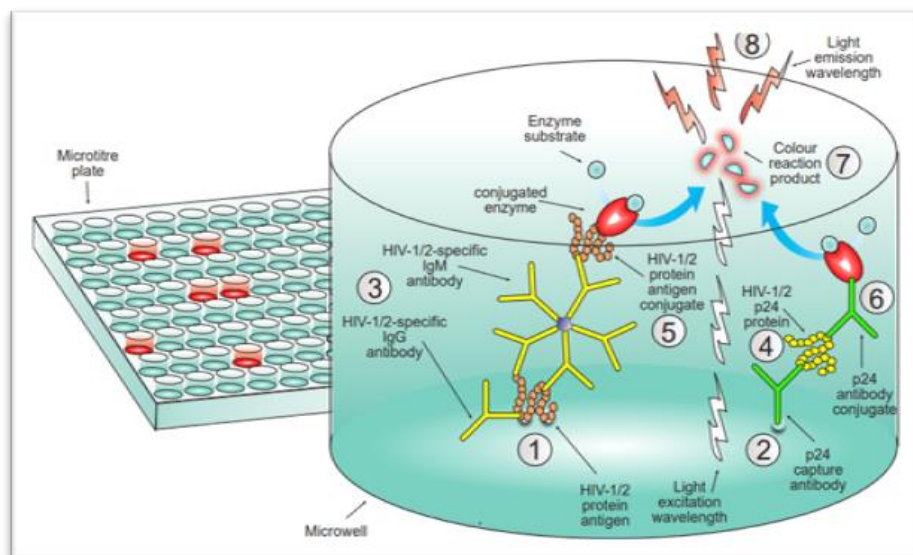
Σε αρκετές αναπτυσσόμενες χώρες χρησιμοποιούνται, ακόμα και σήμερα, μέθοδοι EIA 3<sup>ης</sup> γενιάς για τον screening έλεγχο στην διάγνωση του HIV. [41]

### **EIA 4ης Γενιάς**

Παρά τις αρχικές προσδοκίες, οι EIA 3<sup>ης</sup> γενιάς δεν κατάφεραν να μειώσουν αποτελεσματικά το χρονικό διάστημα μεταξύ μόλυνσης και εργαστηριακής διάγνωσης περισσότερο από 3-4 εβδομάδες, ως εκ τούτου το 1997 αντικαταστάθηκαν από τεχνικές EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς. [38], [41]

Στην στερεά φάση των EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς είναι καθηλωμένα τόσο ανασυνδυασμένα αντιγόνα όσο και μονοκλωνικά αντισώματα με στόχο την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgG και IgM αντισωμάτων και του αντιγόνου p24, αντίστοιχα. Όπως παρουσιάζεται και στην **Εικόνα 12**, χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά συζεύγματα που συνδέονται στα δεσμευμένα αντι-HIV αντισώματα και στο p24. Στην περίπτωση των αντισωμάτων η διαδικασία είναι ίδια με τις τεχνικές 3<sup>ης</sup> γενιάς με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό «sandwich» (καθηλωμένο αντιγόνο – IgG/IgM – ενζυμοσυζευγμένο αντιγόνο). Όσον αφορά την ανίχνευση του p24, γίνεται χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του p24, τα οποία είναι σημασμένα με ένζυμο, και δημιουργείται «sandwich» της μορφής: καθηλωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα – p24 – ενζυμοσυζευγμένο αντίσωμα. Τελικά με την προσθήκη κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος γίνεται αλλαγή χρώματος, η οποία μετράται μέσω φασματοφωτομετρίας. [41], [44]

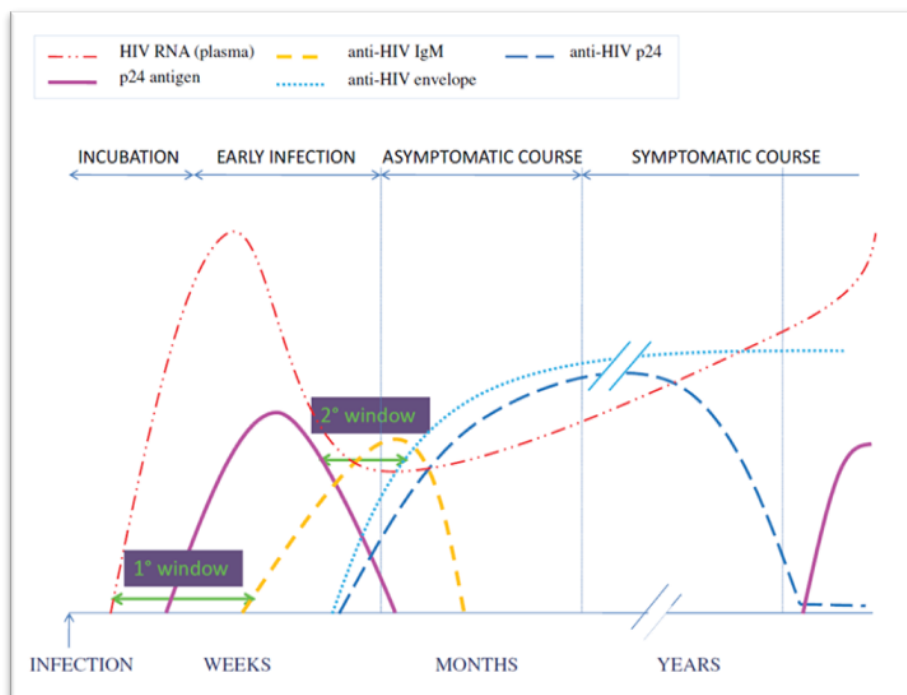




Εικόνα 12: Αρχή μεθόδου της ELISA 4<sup>ης</sup> γενιάς, τύπου sandwich, για την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgG & IgM αντισωμάτων και του p24 αντιγόνου στην διάγνωση της HIV λοίμωξης. [44]

Να σημειωθεί πως στην περίπτωση της ELISA 4ης γενιάς, *GS HIV-1/2 Ag/Ab* της Bio-Rad, που χρησιμοποιείται στο ΕΚΑΑΝΕ, με την προσθήκη θετικού δείγματος το p24 συνδέεται με τρία καθηλωμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Επίσης, χρησιμοποιείται το σύστημα βιοτίνης-στρεπταβιδίνης για αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Συγκεκριμένα, μόρια βιοτίνης, συνδεδεμένα με τα πολυκλωνικά δευτερογενή αντισώματα έναντι του p24, αντιδρούν με υψηλή συγγένεια με μόρια ενζυμοσυζευγμένης, με υπεροξειδάση, στρεπταβιδίνης αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό τα μόρια ενζύμου που αντιστοιχούν σε κάθε ανοσοσύμπλοκο, καθώς ένα μόριο στρεπταβιδίνης δεσμεύει έως και τέσσερα μόρια βιοτίνης. [45], [46], [47]

Οι EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς βασιζόμενες στην ταυτόχρονη ανίχνευση των αντι-HIV αντισωμάτων (IgM & IgG) και του p24 αντιγόνου, προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία και μείωση του διαγνωστικού «παραθύρου» σε 11-14 μέρες μετά την μόλυνση. [36] Επιπρόσθετα, η εμφάνιση ενός ακόμα διαγνωστικού παραθύρου (Εικόνα 13) που αφορά το χρονικό διάστημα κατά το οποίο παρατηρείται μείωση της αντιγοναιμίας και παράλληλα τα ειδικά αντισώματα βρίσκονται ακόμα σε μη ανιχνεύσιμες τιμές στο αίμα αντιμετωπίστηκε αποτελεσματικά με τις σύγχρονες EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς (που κατασκευάστηκαν μετά το έτος 2000). [38], [48]



**Εικόνα 13:** Τα δυο διαγνωστικά «παράθυρα» της HIV-1 λοίμωξης, που ευθύνονται για την ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Η δυνατότητα ανίχνευσης του p24 και των IgM, που προσφέρουν οι EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς, μειώνει αποτελεσματικά την εμφάνιση αυτών των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων εξαιτίας του 1<sup>ου</sup> και 2<sup>ου</sup> διαστήματος παραθύρου (window period), αντίστοιχα. [38]

### EIA 5ης Γενιάς

Το 2015 η εταιρία Bio-Rad ανέπτυξε μια πιο σύνθετη μέθοδο EIA, 5<sup>ης</sup> γενιάς, η οποία ανιχνεύει τόσο το p24 του HIV-1 όσο και τα αντισώματα των HIV-1 και HIV-2 και επιπλέον διαχωρίζει τα αποτελέσματα σε αντι-HIV-1 και αντι-HIV-2 αντισώματα. Ωστόσο, η EIA 5ης Γενιάς, αν και υπερτερεί έναντι της μεθόδου 4<sup>ης</sup> γενιάς χάρη στην ικανότητα διαφοροποίησης των τριών αυτών διαγνωστικών δεικτών, δεν έχει ενσωματωθεί ακόμα στην ρουτίνα των διαγνωστικών εξετάσεων. [36], [41], [49]

### NAAT & Κάθετη Μετάδοση

Ο όρος «κάθετη μετάδοση» αφορά βρέφη που μολύνονται απευθείας από την μητέρα πριν, κατά την διάρκεια ή μετά την γέννησή τους και, κατά συντριπτική πλειοψηφία, παρατηρείται σε χώρες της Υποσαχάριας Αφρικής. Μελέτες έχουν δείξει πως βρέφη μολυσμένα με HIV μέσω κάθετης μετάδοσης που δεν λαμβάνουν θεραπεία αναπτύσσουν ραγδαία AIDS και πεθαίνουν πριν κλείσουν τα ένα ή δύο έτη ζωής, σε ποσοστό 35% και

52%, αντίστοιχα. Μάλιστα, φαίνεται ότι η εξέλιξη της νόσου στα βρέφη σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα ιικού φορτίου της μητέρας. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία η, κατά το δυνατόν συντομότερη, εργαστηριακή διάγνωση των βρεφών. [34], [50]

Εξαιτίας της παθητικής μεταφοράς των αντισωμάτων της μητέρας στο έμβρυο, για την διάγνωση των βρεφών χρησιμοποιούνται κατ' εξαίρεση εργαστηριακές μέθοδοι που ανιχνεύουν απευθείας το ιικό φορτίο του HIV, και όχι οι ανοσοενζυμικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται γενικά για την διάγνωση των ενηλίκων και των παιδιών άνω των 18 μηνών. [51] Οι πρώτες εμπορικά διαθέσιμες μοριακές δοκιμασίες NAAT για την ανίχνευση του HIV-1 RNA αναπτύχθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και εφαρμόστηκαν αρχικά για screening των αιμοδοτών. [29] Η πρώτη ποιοτική μέθοδος μέτρησης ιικού φορτίου για την διάγνωση της πρώιμης λοίμωξης εγκρίθηκε από τον FDA το 2006. [37], [52] Σήμερα, για την διάγνωση των βρεφών ο WHO προτείνει την χρήση μοριακών μεθόδων που ανιχνεύουν απευθείας το ιικό RNA ή cDNA, όπως είναι η PCR. [51]

### **1.6.2. Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (confirmatory test)**

Εξαιτίας της πολύ υψηλής ευαισθησίας των μεθόδων EIA, ειδικότερα των νεότερων γενεών, που χρησιμοποιούνται για αρχικό έλεγχο, αυξήθηκαν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Κατά συνέπεια δημιουργήθηκε η ανάγκη χρήσης συμπληρωματικών εργαστηριακών δοκιμών, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα της διάγνωσης και η ορθή εκτίμηση του επιπολασμού του HIV. [34], [43] Πιο συγκεκριμένα, όσα δείγματα δίνουν θετικό αποτέλεσμα κατά την αρχική εξέταση με EIA θεωρούνται δραστικά και θα πρέπει να υποβάλλονται σε συμπληρωματικό εργαστηριακό έλεγχο με χρήση κάποιας μεθόδου υψηλής ειδικότητας, που θα ανιχνεύει και θα διαχωρίζει τα ειδικά αντισώματα έναντι του ιού. Η διάγνωση της HIV-1 μόλυνσης επιβεβαιώνεται μόνο εφόσον το αποτέλεσμα είναι θετικό τόσο στην αρχική όσο και στην επιβεβαιωτική εξέταση. [34]

Η Western blot και ο ανοσοφθορισμός ήταν οι πρώτες μέθοδοι που εγκρίθηκαν από τον FDA ως εξετάσεις για την επιβεβαίωση της HIV λοίμωξης. Μέσω των μεθόδων αυτών ανιχνεύονταν αρχικά, αποκλειστικά τα αντι-HIV-1 αντισώματα (όταν ως screening μέθοδοι χρησιμοποιούνταν οι EIA 1<sup>ης</sup> γενιάς), ενώ στην συνέχεια ανιχνεύονταν επιπλέον τα αντι-HIV-2 αντισώματα (όταν ως screening μέθοδοι χρησιμοποιούνταν οι EIA 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς).

Σε κάθε περίπτωση, σύμφωνα με τον τότε εργαστηριακό αλγόριθμο η επιβεβαίωση με Western blot ή ανοσοφθορισμό πραγματοποιούνταν εφόσον το δείγμα έδινε επαναλαμβανόμενα ( $\geq 2$  φορές) θετικό αποτέλεσμα με την εκάστοτε μέθοδο αρχικού ελέγχου. Κατόπιν, η άφιξη των μεθόδων EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς οδήγησε στην αντικατάσταση των συμβατικών επιβεβαιωτικών δοκιμών (Western blot) με νέες πιο εξελιγμένες επιβεβαιωτικές μεθόδους, οι οποίες διαφοροποιούν τα αντισώματα έναντι των HIV-1 και HIV-2. Στην περίπτωση δείγματος με επαναλαμβανόμενα θετικό αποτέλεσμα EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς, αλλά αρνητικό στην επιβεβαιωτική διαφοροποιητική μέθοδο αντισωμάτων, απαιτείται ποιοτική εξέταση με PCR για την διαπίστωση της παρουσίας του HIV-1 RNA. [37], [53]

### **Έμμεσος ανοσοφθορισμός**

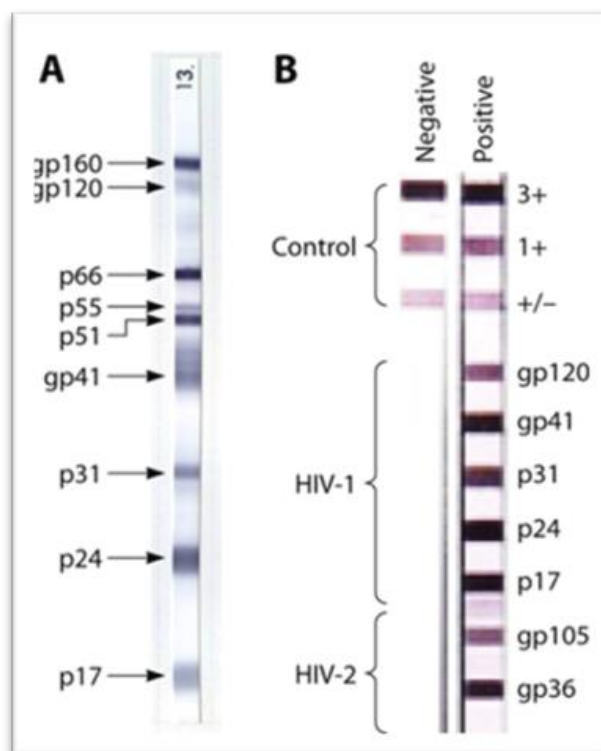
Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Immunofluorescence, IF) αναφέρεται ενδεικτικά ως μια από τις διάφορες εναλλακτικές μεθόδους επιβεβαιωτικού ελέγχου που έχουν χρησιμοποιηθεί στην πορεία του χρόνου, πέραν της Western blot. Βασίζεται στην προσθήκη δείγματος, που περιέχει αντισώματα έναντι του HIV-1 τάξης IgG, σε κύτταρα μολυσμένα με τον ιό οπότε, τα αντισώματα συνδέονται ειδικά με τα ιικά αντιγόνα δημιουργώντας ανοσοσύμπλοκα. Έπειτα με την προσθήκη αντι-IgG αντισωμάτων σημασμένων με φθοριόχρωμα (π.χ. FITC), τα κύτταρα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού και, σε περίπτωση θετικού δείγματος, φθορίζουν. [54]

### **Western blot**

Η συνηθέστερη εργαστηριακή μέθοδος επιβεβαίωσης είναι η Western blot, κατά την οποία τα αντιγόνα του ιού διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σχηματίζοντας διακριτές ζώνες οι οποίες στην συνέχεια, μεταφέρονται σε λωρίδες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης δημιουργώντας στύπωμα. Με την προσθήκη θετικού δείγματος τα αντισώματα προσδένονται ειδικά στα αντίστοιχα αντιγόνα σχηματίζοντας ανοσοσύμπλοκα (αντιγόνο-αντίσωμα). Στην συνέχεια προστίθενται ειδικά αντι-αντισώματα σημασμένα με ένζυμο τα οποία αναγνωρίζουν και προσδένονται ειδικά στα δεσμευμένα αντι-HIV αντισώματα. Τελικά με την προσθήκη κατάλληλου ενζυμικού υποστρώματος πραγματοποιείται αντίδραση που χρωματίζει τις ανάλογες αντιγονικές ζώνες,

υποδηλώνοντας θετικό αποτέλεσμα ως προς την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου που αντιπροσωπεύει η εκάστοτε ζώνη. [34], [55]

Έπειτα σύγχρονες και πιο εξελιγμένες μορφές Western blot, με καθηλωμένα ανασυνδυασμένα αντιγόνα τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2 ταυτόχρονα στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αντικατέστησαν την συμβατική Western blot η οποία ευθυνόταν για πολλά αδιευκρίνιστα ή/και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα καθώς αδυνατούσε να διαφοροποιεί τα δύο στελέχη του ιού (**Εικόνα 14**).



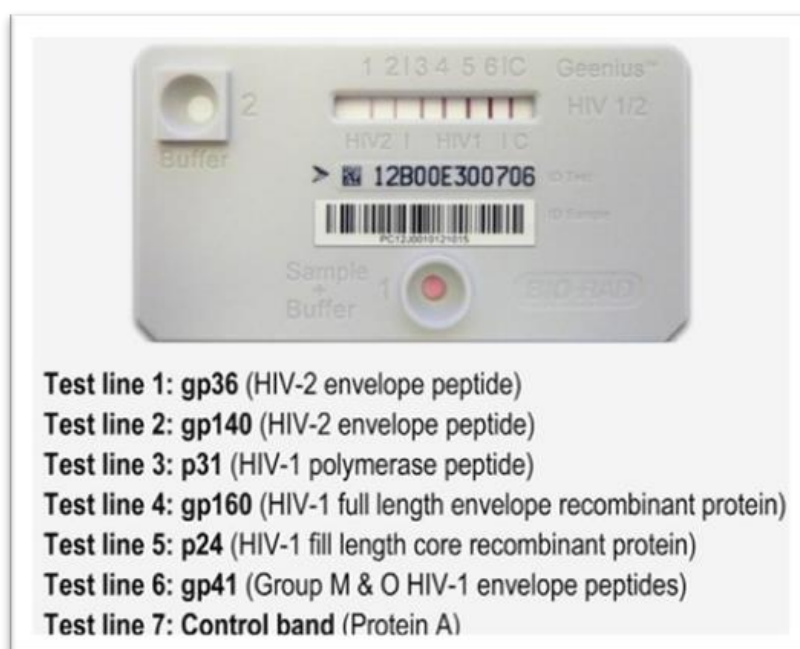
**Εικόνα 14:** Λωρίδες Western blot.

A) Λωρίδα συμβατικής μεθόδου Western blot με αντιγονικές ζώνες μόνο για τον HIV-1, και B) εξελιγμένη μορφή Western blot με ανασυνδυασμένα αντιγόνα τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2 στην ίδια λωρίδα (πλεονεκτεί ως προς την δυνατότητα διαφοροποίησης των δύο στελεχών). [34]

Όσον αφορά τις μεθόδους Western blot που χρησιμοποιούνται για επιβεβαίωση της HIV-1 λοίμωξης στο ΕΚΑΑΝΕ, και τα δύο kits *New Lav Blot I* της Bio-Rad και *RecomLine HIV-1/2 IgG* της Mikrogen διαθέτουν έτοιμες λωρίδες νιτροκυτταρίνης στις οποίες έχουν ήδη μεταφερθεί ηλεκτροφορητικά συγκεκριμένα ιικά αντιγόνα. Στην πρώτη περίπτωση τα ενζυμοσυζευγμένα αντι-ανθρώπινα αντισώματα είναι σημασμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση ενώ, στην δεύτερη περίπτωση είναι σημασμένα με υπεροξειδάση. Απαραίτητη είναι η εμφάνιση των ζωνών του εσωτερικού προτύπου ελέγχου, η οποία επιβεβαιώνει την εγκυρότητα της εξέτασης.

## Geenius

Η διαφοροποιητική δοκιμασία HIV-1/2 Geenius (Ανοσοδοκιμασία γραμμής ή κουκίδας) αποτελεί «rapid test» εγκεκριμένο από τον FDA για την επιβεβαίωση των θετικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από screening έλεγχο με EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς. [43], [53], [56] Πρόκειται για κασέτες ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής σε δύο επίπεδα με την οποία ανιχνεύονται αντισώματα έναντι συνθετικών ή ανασυνδυασμένων αντιγόνων έναντι του HIV-1 και του HIV-2 (Εικόνα 15). [34] Αναλυτικότερα, στην περιοχή δοκιμασίας της λωρίδας νιτροκυτταρίνης (στερεή φάση) της κασέτας Geenius βρίσκονται καθηλωμένα αντιγόνα του HIV-1 (gp160, gp41, p31 και p25) και του HIV-2 (gp140 και gp34) και στην περιοχή ελέγχου καθηλωμένα μόρια πρωτεΐνης A. Παράλληλα, στην περιοχή προσθήκης του ρυθμιστικού διαλύματος βρίσκονται μόρια πρωτεΐνης A συζευγμένα με χρωμοφόρα σωματίδια κολλοειδούς χρυσού. Με την προσθήκη θετικού δείγματος τα αντισώματα έναντι του ιού συνδέονται ειδικά με τα καθηλωμένα αντιγόνα. Έπειτα το σύζευγμα πρωτεΐνη A - χρωμοφόρο αναγκάζεται σε ροή, αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά στα σχηματισμένα ανοσοσύμπλοκα αντιγόνου – αντι-HIV, χρωματίζοντας τα αντίστοιχα σημεία και υποδεικνύοντας θετικό αποτέλεσμα. [57]



Εικόνα 15: Η κασέτα Geenius.

Χρησιμοποιείται ως επιβεβαιωτική μέθοδος μετά από θετικό αποτέλεσμα screening με EIA 4<sup>ης</sup> γενιάς. [57]



Η συγκεκριμένη μέθοδος υπερτερεί έναντι άλλων επιβεβαιωτικών δοκιμασιών HIV, διότι είναι λιγότερο πολύπλοκη (διαδικασία τριών βημάτων), απαιτεί μικρότερο χρόνο ανάλυσης (συνολικά 30 λεπτά), έχει την ικανότητα διαφοροποίησης των HIV-1 και HIV-2 και διαθέτει την δυνατότητα ερμηνείας του αποτελέσματος με την βοήθεια αυτόματου αναγνώστη (Geenius Reader) μηδενίζοντας τα σφάλματα λόγω υποκειμενικότητας στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. [34], [43], [56], [58]

### **1.6.3. Κατευθυντήριες οδηγίες (Guidelines) για εργαστηριακή διάγνωση HIV-1 λοίμωξης**

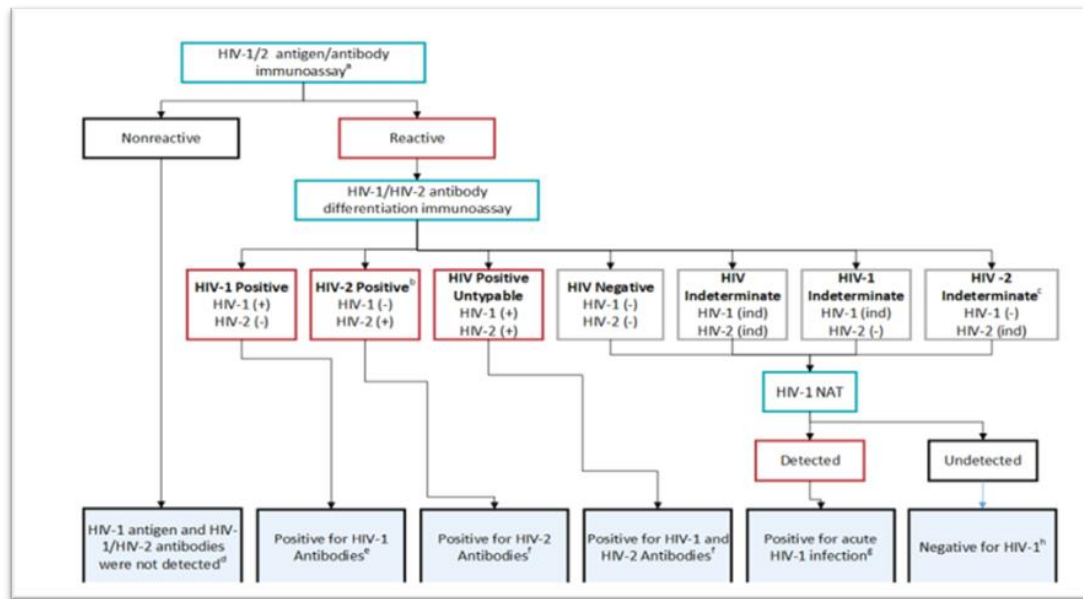
Ο αλγόριθμος που ακολουθεί το EKAANE για την διάγνωση και παρακολούθηση του HIV, βασίζεται στις παγκόσμιες και εθνικές κατευθυντήριες οδηγίες που δίνονται από τους αρμόδιους οργανισμούς. Τον Δεκέμβριο του 2020 το UNAIDS καθόρισε νέους στόχους για την χρονική περίοδο 2021- 2025 που αφορούν την επίτευξη του 95-95-95, σύμφωνα με το οποίο:

- Το 95% των ατόμων που έχουν μολυνθεί από τον HIV, πρέπει να γνωρίζουν ότι ζουν με τον ιό.
- Το 95% των ατόμων που έχουν διαγνωστεί ως θετικοί για τον HIV, πρέπει να λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία.
- Το 95% των ατόμων που λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία, πρέπει να έχουν μηδενίσει το ιικό τους φορτίο έως το 2025.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, στο επίκεντρο της προσοχής των Συστημάτων Υγείας παγκοσμίως θα πρέπει να τεθούν οι ομάδες υψηλού κινδύνου. [22], [23]

Το Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) προτείνει τον παρακάτω αλγόριθμο για την εργαστηριακή διάγνωση της HIV λοίμωξης (**Εικόνα 16**). Με βάση αυτόν, για τον αρχικό έλεγχο το δείγμα (ορός ή πλάσμα) ελέγχεται με ανοσοενζυμική μέθοδο συνδυαστικής ανίχνευσης HIV-1/2 Ag/Ab. Αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνει απουσία HIV λοίμωξης. Στην περίπτωση θετικού αποτελέσματος ακολουθεί εργαστηριακός έλεγχος με χρήση επιβεβαιωτικής εξέτασης που διαφοροποιεί την HIV-1 από την HIV-2 λοίμωξη. Εφόσον το δείγμα είναι θετικό, επιβεβαιώνεται η παρουσία της HIV λοίμωξης ενώ, αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ή ακαθόριστο, απαιτείται περαιτέρω έλεγχος. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αυτά εξετάζονται με

μοριακές μεθόδους NAAT, που ανιχνεύουν το HIV-1 RNA. Τελικά η ανίχνευση του ιικού HIV-1 RNA, οδηγεί σε θετική απάντηση για HIV λοίμωξη. Αντίθετα, η απουσία ανιχνεύσιμου ιικού φορτίου στο δείγμα υποδηλώνει πως, ο ασθενής δεν έχει προσβληθεί από τον HIV. Συμπερασματικά, για να θεωρηθεί ένα δείγμα αρνητικό, θα πρέπει η εξέταση ανίχνευσης Ag/Ab ή η εξέταση ανίχνευσης του HIV-1 RNA να είναι αρνητικές. Διαφορετικά το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό. [59]

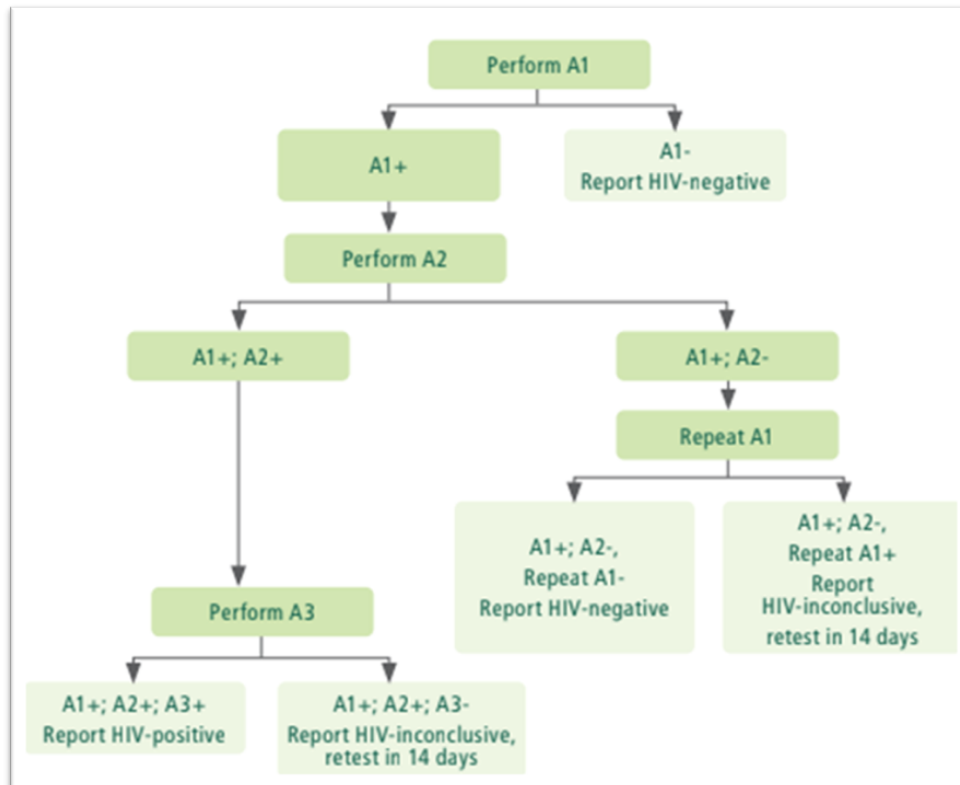


Εικόνα 16: Αλγόριθμος του CDC για την διάγνωση της HIV λοίμωξης. [59]

Ο WHO προτείνει έναν διαφορετικό εργαστηριακό αλγόριθμο (Εικόνα 17), ώστε να επιτύχει 99% εγκυρότητα της διάγνωσης, ο οποίος ξεκινά με την πρώτη εξέταση ανίχνευσης A1. Η A1 αποτελεί αρχικό έλεγχο με πάρα πολύ υψηλή ευαισθησία. Δείγματα τα οποία εξετάζονται με την A1 και είναι μη δραστικά λαμβάνουν αρνητική απάντηση. Τα δραστικά δείγματα εξετάζονται σε επόμενο στάδιο με την εξέταση A2, η οποία διαθέτει υψηλή ειδικότητα. Τα δείγματα που είναι θετικά στην A2 εξετάζονται με την A3. Δείγματα θετικά στην A1, A2, A3 διαγιγνώσκονται ως θετικά. Δείγματα που είναι θετικά στις A1 και A2 αλλά αρνητικά στην A3 λαμβάνουν ακαθόριστο αποτέλεσμα και συστήνεται επανεξέταση σε 14 ημέρες. Στα δείγματα που είναι αρνητικά στην A2, επαναλαμβάνεται η A1. Εάν η επαναληπτική εξέταση A1 είναι αρνητική, δίνεται αρνητικό τελικό αποτέλεσμα ενώ, σε περίπτωση που η A1 είναι θετική, το τελικό αποτέλεσμα θεωρείται ακαθόριστο και ο ασθενής θα πρέπει να επανεξεταστεί σε 14 ημέρες. Ο επανέλεγχος ατόμων με ακαθόριστο αποτέλεσμα είναι απαραίτητος, ώστε να εξεταστεί η πιθανότητα ορομετατροπής στο μεσοδιάστημα. Ακολουθείται ο ίδιος εργαστηριακός αλγόριθμος (Εικόνα 17). Εάν μετά τον



επανελέγχο το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ή παραμένει το ίδιο, δίνεται αρνητική διάγνωση στον ασθενή. Εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό, ο ασθενής έχει προσβληθεί από τον ιό και δίνεται θετική διάγνωση. [60]



Εικόνα 17: Αλγόριθμος του WHO για την διάγνωση της HIV λοίμωξης.

(A1: Assay 1), (A2: Assay 2), (A3: Assay 3). [60]

Βασιζόμενο στις κατευθυντήριες οδηγίες του WHO [60], το Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων (European Centers for Disease Control and Prevention, ECDC) προτείνει συγκεκριμένες εξετάσεις για κάθε στάδιο της διάγνωσης και παρακολούθησης της HIV λοίμωξης. Συγκεκριμένα, το ECDC προτείνει την ELISA 4<sup>ης</sup> γενιάς ως εξέταση A1 με δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης του αντιγόνου και των αντισωμάτων έναντι του ιού HIV. Δίνεται έτσι η δυνατότητα διάγνωσης ακόμη και της οξείας λοίμωξης, αφού η εξέταση μπορεί να ανιχνεύσει τα αντιγόνα του ιού. Έπειτα τα rapid tests και η Western Blot μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της λοίμωξης ως εξετάσεις A2. Το ECDC προωθεί περισσότερο τα rapid tests, καθώς η διάγνωση μπορεί να γίνει την ίδια μέρα παραλαβής του δείγματος. Επιπλέον καθοριστικό για την πορεία της νόσου είναι η απάντηση της οριστικής διάγνωσης να δίνεται το συντομότερο δυνατό, ώστε ο ασθενής να λάβει έγκαιρα αντιρετροϊκή θεραπεία, πριν

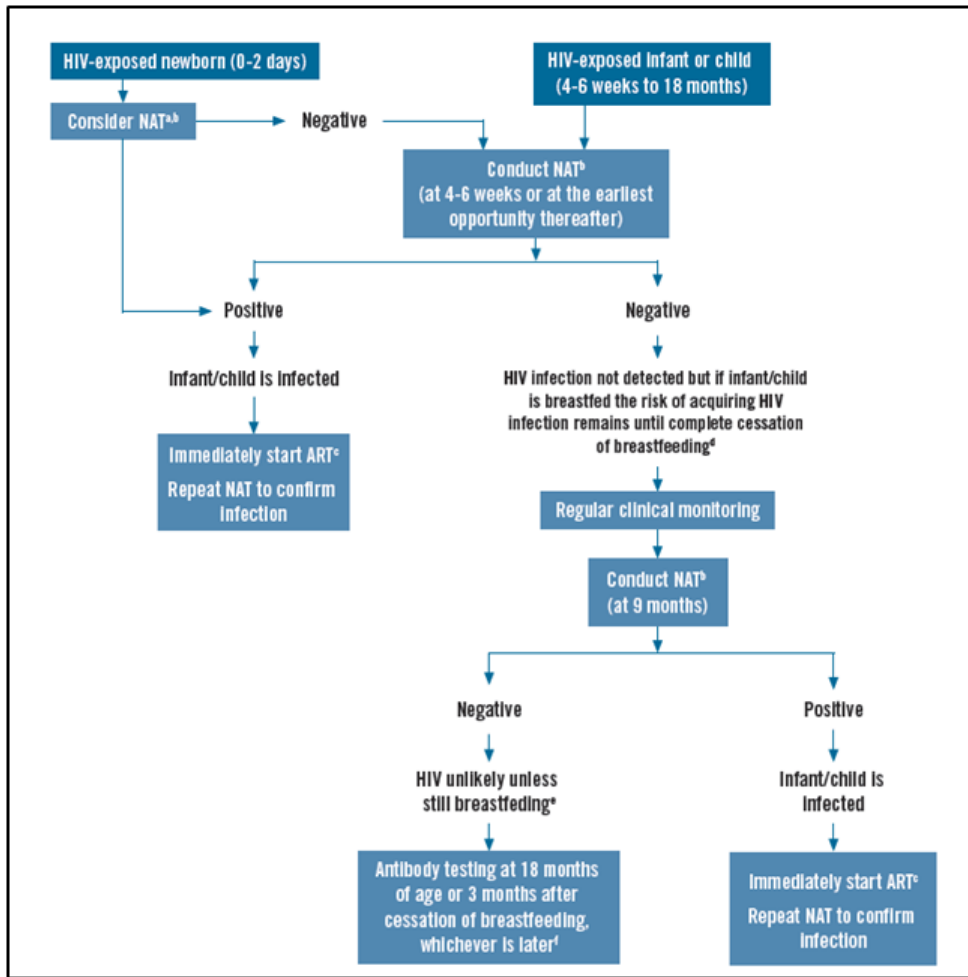
εξελιχθεί η λοίμωξη. Γι' αυτόν τον λόγο το ECDC αναφέρει ότι τα rapid tests μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη κι ως εξέταση ανίχνευσης στα Point of Care. [61]

Τελικά, ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ), βασιζόμενος στις διεθνείς και ευρωπαϊκές οδηγίες, για τον αρχικό έλεγχο προτείνει την ανοσοενζυμική δοκιμασία 4<sup>ης</sup> γενιάς για ταυτόχρονη ανίχνευση των IgM και IgG αντισωμάτων HIV-1/2 και του αντιγόνου p24 του HIV-1. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ακολουθεί επιβεβαιωτική δοκιμασία. Εάν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ή ακαθόριστο, υπάρχει πιθανότητα οξείας λοίμωξης ή ψευδώς θετικού αποτελέσματος κατά την δοκιμασία ανίχνευσης. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να ακολουθήσει μοριακός έλεγχος για την ανίχνευση του γενετικού υλικού του ιού και επιβεβαίωση της διάγνωσης. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος κατά την αρχική δοκιμασία ανίχνευσης, δεν είναι απαραίτητη η επανάληψη της δοκιμασίας. [62]

### A) Έγκυες και βρέφη

Σύμφωνα με τον WHO, έως το 2019 είχαν σημειωθεί περισσότερα από 1,4 εκατομμύρια περιστατικά HIV λοίμωξης σε μητέρες και βρέφη παγκοσμίως συνεπώς ο περιορισμός της κάθετης μετάδοσης του HIV αποτελεί παγκόσμια προτεραιότητα. Αρχικά, η εξέταση των εγκύων στις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης μειώνει τον κίνδυνο κάθετης μετάδοσης. Ακόμη η λήψη αντιρετροϊκής θεραπείας πριν ή κατά τις πρώτες εβδομάδες της εγκυμοσύνης θεωρείται αποτελεσματική, ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση του ιού στο έμβryo. Γι' αυτό, συνίσταται η εξέταση για HIV λοίμωξη κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, και ειδικότερα κατά τον πρώτο κύκλο εξετάσεων της εγκύου. [60] Ο αλγόριθμος που ακολουθείται για την εργαστηριακή διάγνωση είναι ίδιος με αυτόν των ενηλίκων ατόμων. Επιπλέον κατά τον τοκετό οι έγκυες θα πρέπει να υποβάλλονται σε rapid tests με σκοπό την ταχεία διάγνωση της HIV λοίμωξης. [63] Σε περίπτωση αυξημένου κινδύνου HIV λοίμωξης συνίσταται επανεξέταση της μητέρας τόσο κατά το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης όσο και κατά την περίοδο του θηλασμού. Μητέρες οι οποίες ζουν με τον ιό και λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία θα πρέπει να υποβληθούν σε μέτρηση του ιικού φορτίου στο πρώτο και τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης αλλά και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, ώστε να εξεταστεί εάν το ιικό φορτίο είναι σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα τους. [60]

Βρέφη τα οποία έχουν μολυνθεί από τον HIV και δεν λαμβάνουν θεραπεία παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο θανάτου κατά τον πρώτο χρόνο της ζωής τους, με το ποσοστό θνησιμότητας να φτάνει το 30%. Συνεπώς κρίνεται αναγκαία η, κατά το δυνατόν, συντομότερη διάγνωση και έναρξη θεραπείας του βρέφους. Η διάγνωση των βρεφών γίνεται με μοριακό έλεγχο. Οι ανοσοενζυμικές δοκιμασίες δεν ενδείκνυνται, καθώς μπορεί να ανιχνεύσουν τα αντισώματα της μητέρας που μεταδίδονται κάθετα στο βρέφος κατά τη διάρκεια του τοκετού ή του θηλασμού, δίνοντας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ο πρώτος μοριακός έλεγχος σε νεογέννητο το οποίο έχει εκτεθεί στον HIV γίνεται τις πρώτες δύο ημέρες μετά την γέννηση. Εάν ανιχνευθεί το γενετικό υλικό του ιού, το βρέφος πρέπει να λάβει άμεσα αντιρετροϊκή θεραπεία. Σε αντίθετη περίπτωση, ο μοριακός έλεγχος επαναλαμβάνεται στις 4-6 εβδομάδες.. Εφόσον το αποτέλεσμα της εξέτασης είναι πάλι αρνητικό, το βρέφος θα πρέπει να συνεχίσει να εξετάζεται, καθώς κινδυνεύει να μολυνθεί κατά τη διάρκεια του θηλασμού. Προτείνεται επανάληψη της εξέτασης όταν τα βρέφος θα είναι 9 μηνών. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος ακολουθεί επανέλεγχος όταν το βρέφος θα είναι 18 μηνών ή τρεις μήνες μετά την παύση του θηλασμού. Σε κάθε περίπτωση θετικό αποτέλεσμα μοριακού ελέγχου οδηγεί σε θετική διάγνωση, και το βρέφος πρέπει να λάβει άμεσα αντιρετροϊκή αγωγή και να επαναληφθεί η εξέταση για να επιβεβαιωθεί η λοίμωξη (Εικόνα 18). [60], [62]



**Εικόνα 18:** Αλγόριθμος του WHO για την εργαστηριακή διάγνωση και παρακολούθηση της λοίμωξης σε βρέφη. [60]

## 1.7. Εργαστηριακή Παρακολούθηση της HIV-1 λοίμωξης

Το ικό HIV-1 RNA χρησιμοποιείται επίσης, στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της αντιρετροϊκής θεραπείας. Ήδη από το 1995 είχε αποδειχθεί πως με την μέτρηση του ικού φορτίου με RT-PCR μπορούσε να προβλεφθεί η έκβαση της νόσου σε διάστημα έως και 6 μηνών μετά την ορομετατροπή. Μάλιστα το HIV-1 RNA θεωρείται ο ιδανικότερος προγνωστικός δείκτης της επιβίωσης των ατόμων με HIV λοίμωξη, και ειδικά όσων λαμβάνουν HAART, καθώς έχει φανεί πως η διατήρηση του κάτω από  $10^5$  copies/ml πλάσματος σχετίζεται με βραδύτερη εξέλιξη σε AIDS. Σε αντίθετη περίπτωση υπάρχει έως και 10 φορές μεγαλύτερος κίνδυνος υποτροπής της νόσου εντός των επόμενων 5 ετών. Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως με την μέτρηση του ικού φορτίου μπορεί να προβλεφθεί η έκβαση της νόσου έως και 10 χρόνια μετά. Συνεπώς η τακτική μέτρηση του ικού RNA επιτρέπει την παρακολούθηση της ανταπόκρισης στην ART, διαπιστώνοντας έγκαιρα την επιτυχία ή αποτυχία ενός αντιρετροϊκού σχήματος. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένου του αυξημένου κινδύνου επικράτησης ικών στελεχών ανθεκτικών στα διαθέσιμα σχήματα ART. [64], [65] Πέραν αυτού, η μέτρηση του ικού φορτίου είναι καθοριστική για την σεξουαλική συμπεριφορά των ατόμων που ζουν με τον ιό. Μελέτες που αφορούσαν ομοφυλόφιλα και ετεροφυλόφιλα ζευγάρια αποδεικνύουν ότι άτομα υπό θεραπεία που έχουν καταστείλει τον ιό και κατά την μέτρηση του ικού φορτίου εμφανίζουν ικό φορτίο  $< 200$  αντίγραφα/ml αίματος και διαθέτουν αριθμό CD4+ T-λεμφοκυττάρων  $> 350/\text{mm}^3$ , δεν μεταδίδουν τον ιό σε HIV-αρνητικό σύντροφο μέσω ελεύθερης σεξουαλικής επαφής (U=U, Undetectable=Untransmittable). [66], [67] Για τους παραπάνω λόγους η μέτρηση του ικού φορτίου έχει ενσωματωθεί στις οδηγίες για την έναρξη και την παρακολούθηση της αντιρετροϊκής θεραπείας και κατ'επέκταση, όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να μετρούν το ικό τους φορτίο κάθε τρεις έως έξι μήνες ανεξάρτητα της λήψης αντιρετροϊκής θεραπείας. [64], [65]

### 1.7.1. Εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης του ικού φορτίου του ιού HIV (VL Monitoring)

Στην αρχή της πανδημίας του AIDS η πρώτη προσπάθεια για ποσοτική μέτρηση του ικού φορτίου έγινε με καλλιέργειες μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος. Ωστόσο η δυσκολία της μεθόδου, η έλλειψη επαναληψιμότητας και η παρουσία αρνητικών

αποτελεσμάτων σε άτομα με λιγότερα από 200 CD4+ κύτταρα/mm<sup>3</sup> οδήγησαν στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων, μεγαλύτερης ακρίβειας και αξιοπιστίας, και πολύ σύντομα στην ανάπτυξη μοριακών μεθόδων μέτρησης ιικού φορτίου. [34]

Από την πρώτη μοριακή μέθοδο (NAAT) μέτρησης ιικού φορτίου, η οποία ήταν εμπορικά διαθέσιμη το 1996, μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί πολλές διαφορετικές μοριακές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων των Real-time RT-PCR, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), TMA (Transcription-Mediated Amplification) και bDNA. Κάθε NAAT μπορεί να διαφέρει ως προς την μεθοδολογία και τα τεχνικά χαρακτηριστικά της (περιοχές ανίχνευσης, γονίδια-στόχοι, χρόνος εκτέλεσης δοκιμασίας, απαιτούμενος όγκος πλάσματος, κ.ά.) όμως, το τελικό αποτέλεσμα για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου εκφράζεται, κατά σύμβαση, με κοινό τρόπο: είτε ως τα αντίγραφα RNA είτε ως ο λογάριθμος  $\log_{10}$  ανά ml πλάσματος. [34]

Η Real-Time RT-PCR, η οποία χρησιμοποιείται και στο ΕΚΑΑΝΕ, είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος μέτρησης ιικού φορτίου στο πλάσμα. [36] Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην μετατροπή του ιικού RNA σε cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Έπειτα το cDNA ενισχύεται μέσω PCR χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητών ειδικά για τον HIV, που προέρχονται από LTRs (Long Terminal Repeats) των γονιδιακών περιοχών gag, env και pol. Η ενίσχυση του cDNA πραγματοποιείται σε 40 θερμοκούς κύκλους ακολουθώντας τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA με αύξηση της θερμοκρασίας.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών στα άκρα του cDNA με μείωση της θερμοκρασίας.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών και σύνθεση νέας αλυσίδας DNA μέσω της Taq DNA-πολυμεράσης με αύξηση της θερμοκρασίας.

Η παραγωγή κάθε μορίου DNA που προκύπτει στο τέλος κάθε κύκλου ενίσχυσης μετράται σε πραγματικό χρόνο (real time RT-PCR) χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές που φθορίζουν οι οποίοι δεσμεύονται μη ειδικά στο παραγόμενο δίκλωνο cDNA. Όσο περισσότερο αντιγράφεται το επιθυμητό δίκλωνο cDNA, τόσο μεγαλύτερος είναι ο εκπεμπόμενος φθορισμός. Εξάγονται έτσι αποτελέσματα για την ποσότητα των αντιγράφων HIV-1 RNA ανά mL πλάσματος, κάθε στιγμή κατά την διάρκεια της εξέτασης. [34]

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως η ποσοτική μέτρηση του ιικού φορτίου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ανοσοενζυμική μέθοδο μετρώντας αρχικά, την ενζυμική δραστικότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης που περιέχεται στα ιοσωμάτια HIV με ELISA και μετατρέποντάς την στην συνέχεια, σε αντίγραφα ιικού RNA. [34]

### **1.7.2. Κατευθυντήριες οδηγίες για εργαστηριακή επιτήρηση της HIV-1 λοίμωξης**

Όπως προαναφέρθηκε, η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου είναι καθοριστικής σημασίας για την εκτίμηση και παρακολούθηση της πορείας της θεραπείας, και κατά συνέπεια της λοίμωξης, όσων ζουν με τον HIV. Από το 2013 ο WHO συστήνει έντονα την χρήση της μέτρησης του ιικού φορτίου για την παρακολούθηση της αντιρετροϊκής θεραπείας στοχεύοντας στην εκτίμηση και επιβεβαίωση της επιτυχίας ή της αποτυχίας ενός σχήματος ART, καθώς έχει αποδειχθεί πως το ιικό φορτίο είναι πρωιμότερος και ακριβέστερος δείκτης συγκριτικά με άλλους ανοσολογικούς (αριθμός CD4+ κυττάρων) και κλινικούς δείκτες (κλινικά συμπτώματα) που χρησιμοποιούνται γενικά για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. [34]

Σύμφωνα με τον WHO η μέτρηση του ιικού φορτίου, για κάθε άτομο που ζει με τον HIV, θα πρέπει να πραγματοποιείται στους 6 και 12 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας και από εκεί και έπειτα μία φορά κάθε χρόνο. [68] Το New York State Department of Health AIDS Institute (NYSDOH AI) δίνει σαφέστερες οδηγίες και προτείνει συχνότερη διεξαγωγή εξετάσεων με σκοπό την ακριβέστερη παρακολούθηση της θεραπείας και κατά συνέπεια της λοίμωξης. [69] Με βάση αυτό, μόλις γίνει η διάγνωση και ο ασθενής ενταχθεί σε μονάδα θεραπείας, γίνεται η πρώτη μέτρηση του ιικού φορτίου (baseline viral load). Η επόμενη μέτρηση του ιικού φορτίου για την παρακολούθηση της λοίμωξης γίνεται τέσσερις εβδομάδες μετά την έναρξη της ART. Η ίδια οδηγία δίνεται για ασθενείς που ξεκινούν νέο σχήμα ART, λόγω αποτυχίας προηγούμενου σχήματος. Στις περιπτώσεις αυτές αναμένεται το ιικό φορτίο των ασθενών να έχει μειωθεί κατά μία λογαριθμική μονάδα ( $\log_{10}$ ) (Πίνακας 2) ύστερα από τέσσερις εβδομάδες. [70]

<b>Αριθμός αντιγράφων HIV-1 RNA (copies/mL)</b>	<b>Log10</b>
1.000.000	6.0
100.000	5.0
10.000	4.0
1.000	3.0
100	2.0

**Πίνακας 2:** Λογαριθμική αποτύπωση του αριθμού αντιγράφων του ιικού RNA.

Σε ασθενείς χωρίς ιστορικό αντοχής στην ART, αναμένεται μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο (<50 copies/mL) ύστερα από τρίμηνη θεραπεία. Εξαίρεση αποτελούν οι ασθενείς με αρχικό αριθμό αντιγράφων ιικού φορτίου >10<sup>5</sup> copies/mL, οι οποίοι αναμένεται να εμφανίζουν μη ανιχνεύσιμο ικό φορτίο ύστερα από 6 μήνες αποτελεσματικής λήψης ART. Η μέτρηση του ιικού φορτίου επαναλαμβάνεται κάθε οχτώ εβδομάδες, έως ότου να βρσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (20-50 copies/mL). Από εκεί και έπειτα, η μέτρηση του ιικού φορτίου επαναλαμβάνεται κάθε τέσσερις με έξι μήνες, ανάλογα την κλινική εικόνα και την σταθερότητα που εμφανίζουν τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Επίσης η μέτρηση του αριθμού των CD4+ T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για την παρακολούθηση της κλινικής πορείας της λοίμωξης. Εφόσον το εκάστοτε εργαστήριο έχει επιλέξει να παρακολουθεί την HIV λοίμωξη μέσω της μέτρησης των CD4+ κυττάρων, η πρώτη μέτρηση γίνεται κατά την εισαγωγή του ασθενούς στην μονάδα θεραπείας. Δώδεκα εβδομάδες ύστερα από την έναρξη της αντιρετροϊκής θεραπείας επαναλαμβάνεται η μέτρηση. Ο ασθενής προτείνεται να υποβάλλεται σε εξέταση κάθε τέσσερις μήνες, έως ότου ο αριθμός των CD4+ κυττάρων ξεπεράσει τα 200 κύτταρα/mm<sup>3</sup>. Αφότου τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείξουν > 200 CD4+ κύτταρα/mm<sup>3</sup>, η μέτρηση επαναλαμβάνεται κάθε έξι μήνες. [69]



## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση, επιβεβαίωση καθώς και η επιδημιολογική επιτήρηση της HIV-1 λοίμωξης στην Ελλάδα για το έτος 2022, αντλώντας δεδομένα που αφορούν τις νέες διαγνώσεις και τους εργαστηριακούς ελέγχους (μέτρηση ιικού φορτίου) που πραγματοποιήθηκαν στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) για το ημερολογιακό έτος 2022.

### 2.2. Υλικά – Μέθοδοι

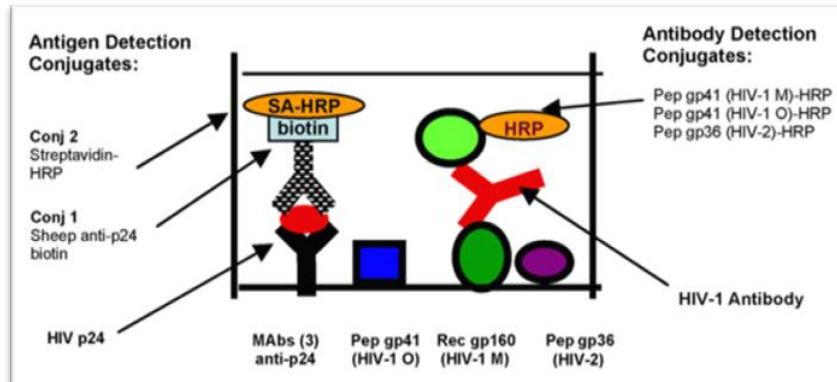
#### 2.2.1. Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων

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

## 2.2.2. Αρχικός Έλεγχος με ELISA 4ης Γενιάς

### A) Αρχή Μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της ELISA 4ης γενιάς συνοψίζεται στην **Εικόνα 20** ενώ, περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.6.1. “Εργαστηριακές μέθοδοι αρχικού ελέγχου (screening test)”.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση των βιολογικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται με την μέθοδο *GS HIV-1/2 Ag/Ab* της Bio-Rad. [47]

### B) Εξοπλισμός

- Αυτόματες ρυθμιζόμενες πιπέτες των 200μL & 1000μL
- Δοσομετρική πιπέτα πολλαπλών ρίψεων
- Αυτόματος επωαστήρας για μικροπλάκες, ρυθμισμένος στους 37 °C ± 1 °C
- Αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για μικροπλάκες
- Φασματοφωτόμετρο για μικροπλάκες (450nm, 620nm)
- Εμπορικά διαθέσιμο kit *GENSCREEN™ ULTRA HIV Ag-Ab* της Bio-Rad

Για τον αρχικό έλεγχο των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το kit με εμπορική ονομασία *GENSCREEN™ ULTRA HIV Ag-Ab* της *Bio-Rad*, εγκεκριμένο από τον FDA το 2011. [53]

Τα αντιδραστήρια που περιέχονται στο kit είναι τα ακόλουθα:

#### I. R1: Πλάκα μικροτιτλοδότησης

Αποτελείται από 12 λωρίδες με 8 πηγάδια η καθεμία. Στον πυθμένα κάθε πηγαδιού βρίσκονται καθηλωμένα:

- μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του καψιδικού αντιγόνου p24 του HIV (προερχόμενα από ποντίκια)
- αντιγόνα των HIV-1 και HIV-2 (τα οποία έχουν υποστεί καθαρισμό)

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

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

Συντηρητικό: *ProClin*<sup>TM</sup> 300 0,04%

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

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

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

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

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

Συντηρητικό: *ProClin*<sup>TM</sup> 300 < 0,1%

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

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

**VI. R6: Διάλυμα σύζευξης 1**

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

Συντηρητικό: *ProClin*<sup>TM</sup> 300 0,5%

**VII. R7a<sup>1</sup>: Διάλυμα σύζευξης 2**

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

**VIII. R7b<sup>1</sup>: Αραιωτικό διάλυμα για το διάλυμα σύζευξης 2<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Την πρώτη φορά που ανοίγουμε ένα νέο Kit *GENSCREEN*<sup>TM</sup> *ULTRA HIV Ag-Ab* απαιτείται ανάμιξη των R7a και R7b.

Διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος, κόκκινου χρώματος

Συντηρητικό: *ProClin*<sup>TM</sup> 300 0,5%

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

Διάλυμα οξικού νατρίου και κιτρικού οξέος (pH=4,0) που περιέχει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,015%) and DMSO (4%)

**X. R9: Χρωμογόνο (11X)**

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

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

Διάλυμα θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N)

### Γ) Πειραματική Διαδικασία

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

- 1) Οργάνωση της σειράς τοποθέτησης των δειγμάτων και των μαρτύρων στα πηγάδια.
- 2) Ρύθμιση του επωαστήρα στους 37 °C.
- 3) Προετοιμασία του διαλύματος έκπλυσης (R2) (Αραίωση 1:20)
- 4) Τοποθέτηση 1 λωρίδας στην βάση της πλάκας μικροτιτλοδότησης
- 5) Προσθήκη 25 μL διαλύματος σύζευξης 1 (R6) σε κάθε πηγάδι (προτιμάται η πολυεπαναληπτική πιπέτα)
- 6) Προσθήκη 75 μL από κάθε δείγμα σε ξεχωριστό πηγάδι (σε μία λωρίδα 8 θέσεων τρέχουν συνολικά 6 διαφορετικά δείγματα ασθενών) και ήπια ανάδευση με την πιπέτα
- 7) Προσθήκη 75 μL θετικού και αρνητικού μάρτυρα στα δύο πηγάδια που απομένουν και ήπια ανάδευση
- 8) Επώαση της πλάκας για 60 λεπτά στους ~37 °C στον αυτόματο επωαστήρα
- 9) Πλύσεις των πηγαδιών στο αυτόματο μηχάνημα πλύσεων (x5 επαναλήψεις με ενδιάμεση αναμονή 40 δευτερόλεπτα, 500 μL διαλύματος έκπλυσης σε κάθε πηγάδι)
- 10) Προσθήκη 100 μL διαλύματος σύζευξης 2 (R7) σε κάθε πηγάδι (προτιμάται η πολυεπαναληπτική πιπέτα)
- 11) Αναμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (~25 °C)

- 12) Προετοιμασία του διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος (Αραίωση 1:11 του R9 με το R8)
- 13) Πλύσεις των πηγαδιών στο αυτόματο μηχάνημα πλύσεων (5 επαναλήψεις χωρίς αναμονή, 800  $\mu$ L διαλύματος έκπλυσης σε κάθε πηγάδι)
- 14) Προσθήκη 80  $\mu$ L διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος σε κάθε πηγάδι
- 15) Επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ( $\sim 25$   $^{\circ}$ C) στο σκοτάδι
- 16) Προσθήκη 100  $\mu$ L διαλύματος διακοπής της αντίδρασης σε κάθε πηγάδι
- 17) Φωτομέτρηση στα 450/620 nm
- 18) Υπολογισμός cut-off (CO) μετρήσεων:  $CO = OD_{Neg} + 0,200$

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

$$OD_{\text{δείγματος}} > CO$$

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

$$OD_{\text{δείγματος}} \leq CO$$

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

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

## 2.2.3. Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Western Blot

### A) Αρχή Μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της Western blot που χρησιμοποιείται στο ΕΚΑΑΝΕ περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.6.2. “Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (*confirmatory test*)”.

Αν και οι δοκιμασίες *Western Blot*, *New Lav Blot I* και *RecomLine HIV-1/2 IgG*, δίνουν την δυνατότητα ανίχνευσης αντισωμάτων τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2, στην παρούσα εργασία εξετάζεται μόνο η διάγνωση του HIV-1.

### B) New Lav Blot I

#### α) Εξοπλισμός

- Αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα των 20μL
- Τσιμπίδα
- Αυτόματο μηχάνημα πλύσεων για τους δίσκους της Western Blot
- Εμπορικά διαθέσιμο kit *New Lav Blot I* kit της Bio-Rad

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

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

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

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

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

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

Ανθρώπινος ορός αρνητικός για αντισώματα HBsAg, anti-HIV-1 και anti-HIV-2 καθώς και anti-HCV.

*Συντηρητικό:* Αζίδιο του νατρίου <0,1%

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

Ανθρώπινος ορός θετικός για αντισώματα anti-HIV-1, αρνητικός για αντισώματα anti-HCV και HBsAg, αδρανοποιείται με θερμότητα.

Συντηρητικό: Αζίδιο του νατρίου <0,1%

**V. R5: Διάλυμα σύζευξης**

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

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

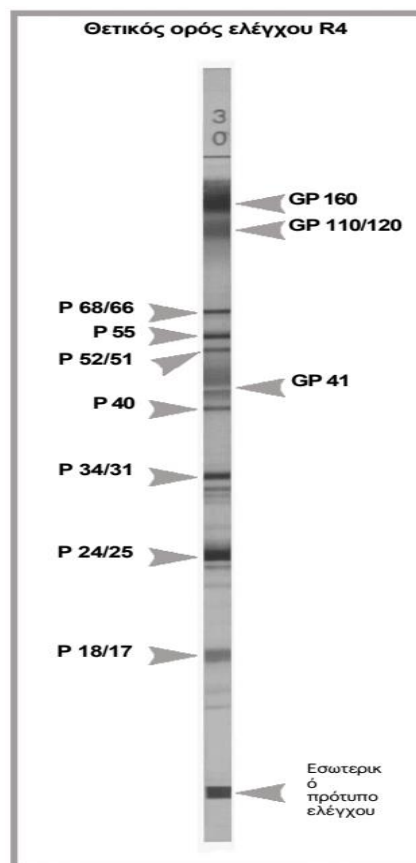
Το διάλυμα αποτελείται από 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλφωσφορικό (BCIP) και νιτροκυανού του τετραζολίου (NBT) ως ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος.

*β) Πειραματική Διαδικασία*

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

- 1) Έλεγχος λειτουργίας κάθε αντλίας του πλυστικού μηχανήματος.
- 2) Τοποθέτηση των ταινιών (R1) στις υποδοχές του δίσκου. Οι ταινίες πρέπει να τοποθετηθούν προσεκτικά με την χρήση τσιμπίδας, ώστε να μην διαταραχθούν οι ζώνες των πρωτεϊνών.
- 3) Προσθήκη 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2) σε κάθε υποδοχή όπου είναι τοποθετημένη η ταινία.
- 4) Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ταυτόχρονη ανάδευση του δίσκου.
- 5) Προσθήκη 20μL δείγματος στην υποδοχή.
- 6) Επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Απορρόφηση του ρυθμιστικού διαλύματος και του ορού μέσω της αντλίας κενού που περιέχει απολυμαντικό.
- 8) Πλύση των ταινιών με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2), χωρίς επώαση. Η πλύση των ταινιών πραγματοποιείται συνολικά 3 φορές.
- 9) Προσθήκη 2mL διαλύματος σύζευξης (R5) σε κάθε υποδοχή, για να απορριφθούν τα αντισώματα που δεν έχουν προσδεθεί στο αντιγόνο.
- 10) Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11) Απορρόφηση του συζεύγματος μέσω της αντλίας κενού που περιέχει απολυμαντικό.

- 12) Πλύση των ταινιών με 2mL ρυθμιστικού διαλύματος (R2), χωρίς επώαση. Η πλύση των ταινιών πραγματοποιείται συνολικά 3 φορές.
- 13) Προσθήκη 2mL διαλύματος ανάπτυξης χρώματος (R6) σε κάθε υποδοχή, προκειμένου να χρωματιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών πάνω στις οποίες έχουν προσδεθεί τα αντισώματα. Το διάλυμα ανάπτυξης χρώματος αποτελείται από 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ φωσφορικό (BCIP) και νιτροκυανού του τετραζωλίου (NBT) ως ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης.
- 14) Επώαση με ταυτόχρονη ανάδευση για τουλάχιστον 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση παρατηρείται η εμφάνιση των ζωνών στις ταινίες.
- 15) Για την παύση της αντίδρασης αφαιρείται το διάλυμα ανάπτυξης και ακολουθούν 3 πλύσεις των ταινιών με απεσταγμένο νερό χωρίς επώαση.
- 16) Αφότου στεγνώσουν οι μεμβράνες, αρχιεοθετούνται και αξιολογείται το αποτέλεσμα της δοκιμασίας.



**Εικόνα 20:** Λωρίδα με θετικό ορό ελέγχου του kit *New Lav Blot I*.

Στην ταινία της εικόνας έχει χρησιμοποιηθεί ο θετικός ορός ελέγχου, υποδεικνύοντας πώς αναμένεται να αποτυπώνονται οι ζώνες στην περίπτωση δείγματος που διαθέτει αντισώματα έναντι όλων των πρωτεϊνών του HIV-1.



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

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

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

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

### Γ) *RecomLine HIV-1/2 IgG*

#### *α) Εξοπλισμός*

- Αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα των 20μL
- Πλαστική τσιμπίδα
- Μηχάνημα για ανάδευση πλακών
- Εμπορικά διαθέσιμο kit *RecomLine HIV-1/2 IgG* της εταιρίας Mikrogen

Το kit *RecomLine HIV-1/2 IgG* της Mikrogen περιέχει:

- I. Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης A (10X):** ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (phosphate buffer), NaCl, KCl, απορρυπαντικό, *Συντηρητικά:* MIT 0,1% & Oxyrygion 0,1%
- II. Χρωμογόνο υπόστρωμα τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB)**
- III. Σκόνη άπαχου γάλακτος**
- IV. Διάλυμα σύζευξης αντι-ανθρώπινων IgG** προερχόμενο από κουνέλι, σημασμένο με υπεροξειδάση (Horseradish peroxidase- HRP)  
*Συντηρητικά:* NaN<sub>3</sub> (<0,1%), MIT (0,1%) και χλωροακεταμίδιο (0,1%)

- V. Διάλυμα ελέγχου θετικού μάρτυρα :** ορός ανθρώπινης προέλευσης θετικός για IgG αντισώματα, αρνητικός στα αντι-HCV και HBs Ag.  
Συντηρητικά: MIT 0,1% & Οxyrygion 0,1%
- VI. Διάλυμα ελέγχου αρνητικού μάρτυρα :** ορός ανθρώπινης προέλευσης αρνητικός για IgG αντι-HIV-1/2, αρνητικός στα αντι-HCV και HBs Ag.  
Συντηρητικά: MIT 0,1% & Οxyrygion 0,1%
- VII. Ταινίες νιτροκυτταρίνης:** με καθηλωμένα αντιγόνα των HIV-1 και HIV-2

### *β) Πειραματική Διαδικασία*

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- 1) Τοποθέτηση των ταινιών στα ειδικά υποδοχείς της βάσης με την βοήθεια πλαστικής τσιμπίδας
- 2) Προσθήκη 2 ml διαλύματος έκπλυσης A σε κάθε ταινία. Για την προετοιμασία του έτοιμο-για-χρήση διαλύματος έκπλυσης A γίνεται ανάμιξη:
  - Αριθμός ταινιών x 0,1 g σκόνη άπαχου γάλακτος
  - Αριθμός ταινιών x 2 ml συμπυκνωμένου διαλύματος έκπλυσης A
  - Αριθμός ταινιών x 18 ml απιονισμένο νερό
- 3) Προσθήκη 20 μl δείγματος και ήπια ανάδευση
- 4) Επώαση της πλάκας για 3 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (πλάκα: κλειστή με καπάκι)
- 5) Πλύση (x 3 φορές):
  - Απόρριψη του δείγματος
  - Προσθήκη 2 ml διαλύματος έκπλυσης A
  - Αναμονή για 5 λεπτά υπό ανάδευση
  - Απόρριψη του διαλύματος
- 6) Προσθήκη 2 ml διαλύματος σύζευξης, το οποίο ετοιμάζεται ακριβώς πριν την χρήση με ανάμιξη:
  - Αριθμός ταινιών x 20 μl συμπυκνωμένου διαλύματος σύζευξης
  - Αριθμός ταινιών x 2 ml διαλύματος έκπλυσης A
- 7) Επώαση της πλάκας για 45 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση (πλάκα: κλειστή με καπάκι)
- 8) Πλύσεις (επανάληψη του βήματος 7)
- 9) Προσθήκη 1,5 ml χρωμογόνου υποστρώματος

- 10) Επώαση της πλάκας για 8 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση (πλάκα: κλειστή με καπάκι)
- 11) Τερματισμός της αντίδρασης με τουλάχιστον 3 πλύσεις με απιονισμένο νερό
- 12) Ανάλυση αποτελεσμάτων 2 ώρες μετά

Σε κάθε ταινία είναι καθηλωμένες, σχηματίζοντας διακριτές ζώνες, οι ενν γλυκοπρωτεΐνες του HIV-1 gp120 και gp41, οι gag πρωτεΐνες p24 και p17, και οι pol πρωτεΐνες p51, p31<sup>2</sup>. Επίσης υπάρχουν 3 μπάντες ελέγχου:

- μια ζώνη ελέγχου της αντίδρασης (reaction control band), η οποία θα πρέπει πάντα να χρωματίζεται για να θεωρείται έγκυρη η εξέταση
- μια ζώνη ελέγχου του διαλύματος σύζευξης (conjugate control band), με την οποία ελέγχεται η τάξη των αντισωμάτων (IgG) που ανιχνεύονται με την εξέταση.
- μια ζώνη - “κατώφλι” (“cut-off control” band). Η ένταση του χρωματισμού της συγκεκριμένης ζώνης συγκρίνεται με την ένταση κάθε αντιγονικής μπάντας εξέτασης επιτρέποντας την εκτίμηση της ισχύος της αντίδρασης, όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3**.

Ένταση χρώματος ζώνης	Αξιολόγηση ισχύος αντίδρασης
Απουσία χρώματος	-
Πολύ χαμηλή ένταση (<cut-off)	-/+
Χαμηλή ένταση (≈cut-off)	+
Υψηλή ένταση (>cut-off)	++
Πολύ υψηλή ένταση	+++

**Πίνακας 3:** Εκτίμηση της ισχύος της αντίδρασης του kit *RecomLine HIV-1/2 IgG* ανάλογα την ένταση χρώματος της κάθε ζώνης.

<sup>2</sup> Επιπλέον στο strip της *RecomLine HIV-1/2 IgG* είναι καθηλωμένα και τα αντιγόνα gp105 και gp36 του HIV-2, όμως στην παρούσα εργασία μελετάται αποκλειστικά ο HIV-1.

Θετικό αποτέλεσμα προκύπτει εφόσον τηρείται ένα από τα ακόλουθα κριτήρια:

- Έχουν σχηματιστεί τουλάχιστον δύο μπάντες, με ένταση  $\geq$  cut-off, που αντιστοιχούν στις δυο ενν πρωτεΐνες του HIV-1 (gp120 + gp41)
- Έχουν σχηματιστεί τουλάχιστον δύο μπάντες, με ένταση  $\geq$  cut-off, από τις οποίες η μία υποχρεωτικά αντιστοιχεί στην gp41 και η άλλη αντιστοιχεί είτε σε μία gag (p24 ή p17)) είτε σε μία pol πρωτεΐνη (p51 ή p31).

Αν στην ταινία έχουν σχηματιστεί μπάντες αλλά, δεν πληρείται καμία από τις παραπάνω προϋποθέσεις, το αποτέλεσμα θεωρείται ακαθόριστο.

Τέλος, η απουσία κάποιας μπάντας με ένταση  $\geq$  cut-off ή η παρουσία μόνο της gp120 υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα.

## 2.2.4. Επιβεβαιωτικός έλεγχος με Geenius

### A) Αρχή Μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής, που ακολουθεί το Geenius περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.6.2. “Εργαστηριακές μέθοδοι επιβεβαιωτικού ελέγχου (*confirmatory test*)”.

### B) Εξοπλισμός

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

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

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

Πρόκειται για μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με:

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

#### **II. Ρυθμιστικό διάλυμα**

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

### Γ) Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- 1) Αφαίρεση της συσκευής δοκιμασίας *Geenius* και τοποθέτησή της σε οριζόντια επιφάνεια.  
Σημ.: Παρουσία 6 μπλε γραμμών στην περιοχή δοκιμασίας (Test) και καμίας γραμμής στην περιοχή ελέγχου (Control)
- 2) Σημείωση του αναγνωριστικού αριθμού EKAANE που αντιστοιχεί στο δείγμα.
- 3) Προσθήκη 5  $\mu\text{L}$  δείγματος και στην θέση 1 (SAMPLE + BUFFER) (βλ. Εικόνα)
- 4) Προσθήκη 2 σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος στην θέση 1 (SAMPLE + BUFFER)
- 5) Αναμονή για 5-7 λεπτά.  
Σημ.: Μετά το πέρας της αναμονής οι μπλε γραμμές στην περιοχή δοκιμασίας (Test) θα πρέπει να έχουν εξαφανιστεί.
- 6) Προσθήκη 5 σταγόνων ρυθμιστικού διαλύματος στην θέση 2 (BUFFER).
- 7) Αναμονή για 20-30 min.
- 8) Ανάγνωση του αποτελέσματος με την βοήθεια *Geenius Reader*.

Για να θεωρηθεί έγκυρη η εξέταση θα πρέπει να σχηματιστεί μια ροζ γραμμή στην περιοχή ελέγχου (Control), ανεξάρτητα από την παρουσία ροζ γραμμών στην περιοχή δοκιμασίας (Test).

Αν και η δοκιμασία *Geenius* δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης αντισωμάτων τόσο του HIV-1 όσο και του HIV-2, στην παρούσα εργασία εξετάζεται μόνο η διάγνωση του HIV-1.

Θετικό αποτέλεσμα θεωρείται η παρουσία δύο ή περισσότερων ροζ γραμμών εξέτασης, από τις οποίες τουλάχιστον μία να αντιστοιχεί σε παρουσία αντισωμάτων έναντι αντιγόνου Eρν, δηλαδή έναντι της gp160 (λωρίδα 4) ή της gp41 (λωρίδα 6).

Ακαθόριστο αποτέλεσμα προκύπτει από την παρουσία:

- μόνο μιας λωρίδας pol (λωρίδα 3)
- μόνο μιας λωρίδας env (λωρίδα 4 ή 6)
- μόνο μιας λωρίδας gag (λωρίδα 5)
- μιας λωρίδας pol και μιας λωρίδας gag

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

## **2.2.5. Εργαστηριακή Παρακολούθηση Ιικού Φορτίου με Real-Time RT-PCR**

### A) Συλλογή & Προετοιμασία Δειγμάτων

Στο ΕΚΑΑΝΕ, πέρα από την ανίχνευση της HIV-1 λοίμωξης, πραγματοποιείται και η παρακολούθηση της με μέτρηση του ιικού φορτίου. Για τον μοριακό έλεγχο χρησιμοποιείται το πλάσμα των ασθενών. Στην περίπτωση δειγμάτων ολικού αίματος, τα σωληνάρια (που περιέχουν EDTA), φυγοκεντρώνται για 15 λεπτά στις 3200 rpm. Στη συνέχεια το πλάσμα μεταφέρεται σε κρυσταλλικά χωρητικότητας 2mL. Τα κρυσταλλικά αποθηκεύονται στους -20 °C και μακροπρόθεσμα στους -80 °C. Εφόσον είναι δυνατόν, η εξέταση γίνεται αμέσως μετά την φυγοκέντρηση του ολικού αίματος, προκειμένου να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της μέτρησης του ιικού φορτίου.

### B) Αρχή Μεθόδου

Η αρχή μεθόδου της Real-Time RT-PCR περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1.7.1. “*Εργαστηριακές μέθοδοι μέτρησης ιικού φορτίου HIV (VL Monitoring)*”.

Η Real-Time RT-PCR με σύστημα GeneXpert® Dx της Cepheid Xpert® μπορεί να ανιχνεύσει τον HIV-1 ομάδας M και υπότυπο A, B, C, D, F, G, H, CRF A/G, και A/E, τον HIV-1 ομάδας N και O.

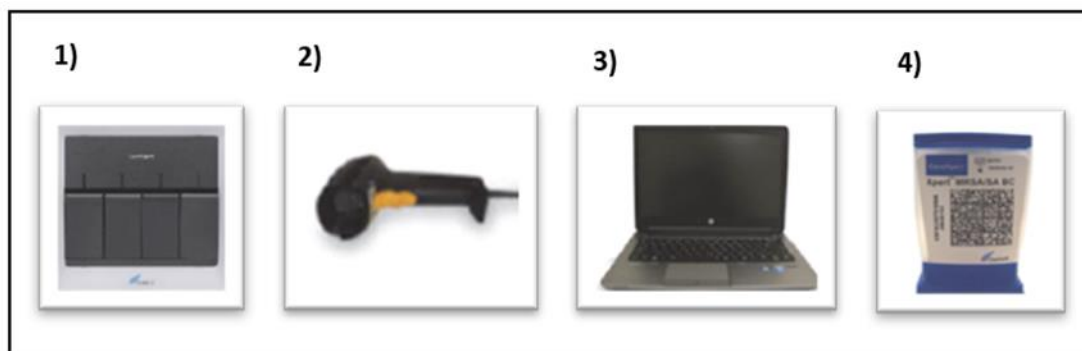
### Γ) Εξοπλισμός

- Αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα των 1000μL
- Σύστημα GeneXpert® Dx της Cepheid Xpert®
- Δοχείο Ανάλυσης GeneXpert® της Cepheid Xpert®

Το σύστημα GeneXpert® Dx αυτοματοποιεί την προετοιμασία του δείγματος, την ενίσχυση του γενετικού υλικού και την ανίχνευση της αλληλουχίας – στόχου που πρόκειται να υβριδοποιηθεί μέσω της real time RT-PCR. Το σύστημα GeneXpert® Dx χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το δοχείο ανάλυσης GeneXpert® της Cepheid Xpert®.

#### **Σύστημα GeneXpert® Dx & Δοχείο ανάλυσης GeneXpert® (Εικόνα 21):**

- I. Θερμικός Κυκλοποιητής GeneXpert GX-IV Instrument: αποτελείται από 4 εισόδους, σε κάθε είσοδο μπορεί να εξετάζεται μόνο ένα δείγμα κάθε φορά. Εισάγεται στον θερμικό κυκλοποιητή το δοχείο ανάλυσης που περιέχει 1,8 mL πλάσματος. Έτσι ο θερμικός κυκλοποιητής απομονώνει το RNA και υβριδοποιεί τις αλληλουχίες-στόχους.
- II. Σαρωτής γραμμικού κώδικα
- III. Φορητός ηλεκτρονικός υπολογιστής: διαθέτει το λογισμικό GeneXpert® Dx και την βάση δεδομένων των αποτελεσμάτων
- IV. Δοχείο ανάλυσης GeneXpert: είναι μίας χρήσης και περιέχει το δείγμα και τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την εκτέλεση της real time RT-PCR. Αποτελείται από τα επιμέρους τμήματα:
  - Θάλαμοι επεξεργασίας: Στους θαλάμους επεξεργασίας αποθηκεύονται ξεχωριστά το δείγμα, τα αντιδραστήρια, το επεξεργασμένο δείγμα και τα απόβλητα. Ένας ξεχωριστός θάλαμος είναι υπεύθυνος για την εξισορρόπηση της πίεσης στο δοχείο ανάλυσης.
  - Σώμα βαλβίδας: Επιτρέπει στα υγρά που βρίσκονται στο εσωτερικό των θαλάμων, να περιστρέφονται μέσα σε αυτόν και στο σωληνάριο δοκιμασίας. Μέσα στο σώμα βαλβίδας το δείγμα παραμένει απομονωμένο, οι αναστολείς της PCR απενεργοποιούνται και το δείγμα λύεται μέσω υπερήχων. Στη συνέχεια το δείγμα αναμειγνύεται με τα αντιδραστήρια της PCR και μεταφέρεται στο σωληνάριο δοκιμασίας.
  - Σωληνάριο δοκιμασίας: Ενεργοποιεί την γρήγορη θερμική κυκλοποίηση και την οπτική ανίχνευση του περιεχομένου του σωληναρίου. Μόλις το δοχείο ανάλυσης εισαχθεί στον θερμικό κυκλοποιητή GeneXpert, το σωληνάριο δοκιμασίας εισάγεται αυτόματα στην είσοδο I-CORE.



**Εικόνα: 21:** 1) Θερμικός Κυκλοποιητής GeneXpert GX-IV Instrument, 2) Σαρωτής γραμμικού κώδικα, 3) Φορητός ηλεκτρονικός υπολογιστής με το λογισμικό GeneXpert® Dx, 4) Δοχείο ανάλυσης GeneXpert.

#### Δ) Πειραματική Διαδικασία

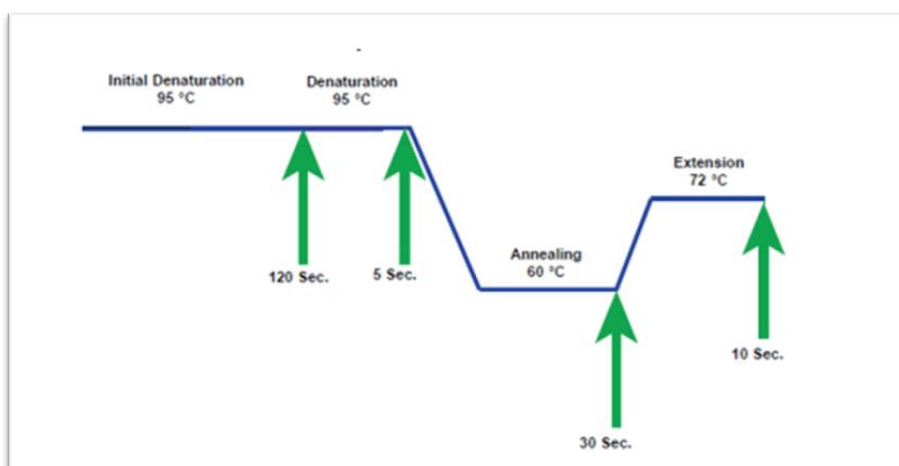
- 1) Προσθήκη 1,2mL δείγματος στην υποδοχή του σωληναρίου ανάλυσης.
- 2) Το δοχείο ανάλυσης εισάγεται στην διαθέσιμη υποδοχή του θερμικού κυκλοποιητή.
- 3) Κατά τη διάρκεια της εξέτασης, μέσω του συστήματος GeneXpert® Dx πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:
  - A. Μετακίνηση του δείγματος και των αντιδραστηρίων σε διαφορετικούς θαλάμους επεξεργασίας στο δοχείο ανάλυσης για την προετοιμασία του δείγματος.
  - B. Ενυδάτωση των αντιδραστηρίων που βρίσκονται σε μορφή σφαιριδίων.
  - C. Πραγματοποίηση δοκιμασιών ελέγχου για την επιβεβαίωση της σωστής εισαγωγής του δοχείου ανάλυσης.
  - D. Μετακίνηση του δείγματος και των αντιδραστηρίων (περιέχεται η αντίστροφη μεταγραφάση) στο σωληνάριο δοκιμασίας.
  - E. Διενέργεια RT-PCR σε πραγματικό χρόνο.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η θερμική κυκλοποίηση, το σύστημα GeneXpert® Dx χρησιμοποιεί την λειτουργία I-CORE®, για να αυξήσει και να μειώσει τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

Μόλις ξεκινήσει η RT-PCR επαναλαμβάνονται σε 40 θερμικούς κύκλους κατά σειρά:



1. Αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C για 120 δευτερόλεπτα, με σκοπό την αντιγραφή του δίκλωνου μορίου.
2. Αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 95°C για 5 δευτερόλεπτα.
3. Υβριδισμός των εκκινητών στα άκρα του cDNA με μείωση της θερμοκρασίας στους 60°C για 30 δευτερόλεπτα.
4. Επιμήκυνση των εκκινητών και σύνθεση νέας αλυσίδας DNA με αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα. **(Εικόνα 22)**



**Εικόνα 22:** Εικονική αναπαράσταση της θερμικής κυκλοποίησης με αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας για την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA, τον υβριδισμό και την επιμήκυνση των εκκινητών με σκοπό την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA.

Κάθε εξέταση διαθέτει τρεις μάρτυρες για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητάς της:

- Μάρτυρας επάρκειας όγκου του δείγματος (Sample Volume Adequacy, SVA) ο οποίος ελέγχει και επιβεβαιώνει, εάν προστέθηκε ο σωστός όγκος δείγματος με κατάλληλο τρόπο στο δοχείο ανάλυσης.
- Εσωτερικό ποσοτικό πρότυπο ελέγχου υψηλό και χαμηλό (Internal Quantitative Standard High and Low IQS-H and IQS-L) το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του HIV-1 RNA και την ποσοτικοποίηση του. Τα IQS-H and IQS-L πρότυπα ελέγχου έχουν βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του WHO και μπορούν ακόμη να προβλέψουν εάν κατά την διάρκεια της εξέτασης, πρόκειται η RT-PCR να παρεμποδιστεί και να είναι ανεπιτυχής.

→ Ο έλεγχος ανίχνευσης (Probe Check Control, PCC) συμβαίνει πριν την έναρξη της εξέτασης και ελέγχει εάν το ολικό σύστημα της GeneXpert λειτουργεί κατάλληλα για να ολοκληρώσει την αντίδραση. Έτσι ελέγχεται το σήμα φθορισμού, η ενυδάτωση των αντιδραστηρίων που βρίσκονται σε μορφή σε μορφή σφαιριδίων, η πλήρωση του σωληναρίου δοκιμασίας και η ακεραιότητα του ανιχνευτή φθορισμού.

Η Real Time PCR χρησιμοποιεί φθορισμό για να ανιχνεύσει το σύνολο των αντιγράφων του cDNA που παράγονται. Με αυτόν τον τρόπο, οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της εξέτασης, είναι εφικτή η παρακολούθηση της πορείας της εξέτασης.

Η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου αναπαρίσταται με μία καμπύλη ανάπτυξης, όπου:

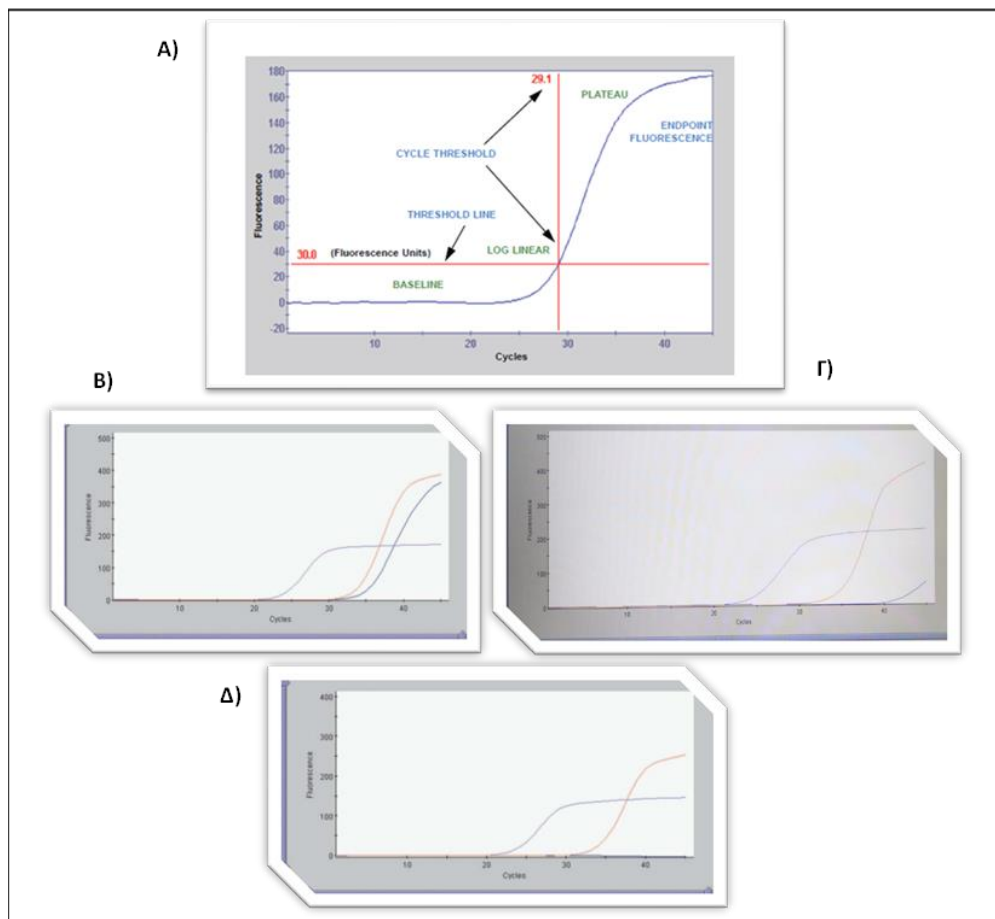
- Στον x άξονα βρίσκεται ο αριθμός των κύκλων
- Στον y άξονα βρίσκεται το σήμα φθορισμού

Ο θερμικός κύκλος στον οποίο το σήμα φθορισμού γίνεται ανιχνεύσιμο, αποτελεί τον κύκλο κατώφλι (cycle threshold, Ct) και ορίζεται συνήθως στον 30ο θερμικό κύκλο (Εικόνα 23). Σε αυτό το σημείο αρχίζει να αυξάνεται η καμπύλη ανάπτυξης, εφόσον ανιχνεύεται το HIV-1 RNA. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του αριθμού αντιγράφων που παράγονται. Στο σημείο όπου όλο το mRNA στο πλάσμα του ασθενούς έχει μεταγραφεί σε cDNA και αυτό έχει επιμηκυνθεί, η καμπύλης ανάπτυξης αρχίζει να γίνεται επίπεδη. Έτσι καθορίζεται το αποτέλεσμα σε αριθμό αντιγράφων γενετικού υλικού ανά mL πλάσματος (copies/mL). Σε περίπτωση που δεν ανιχνεύεται το γενετικό υλικό του ιού, η καμπύλη ανάπτυξης είναι εξαρχής επίπεδη.

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) για την Real-Time RT-PCR, αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο. Το LOD της εξέτασης ορίζεται στα 18,3 copies/mL. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Qualification, LOQ) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο. Το LOQ της εξέτασης ορίζεται στα 40 copies/mL.

Με βάση τα LOD και LOQ της εξέτασης προκύπτουν τέσσερα είδη αποτελεσμάτων:

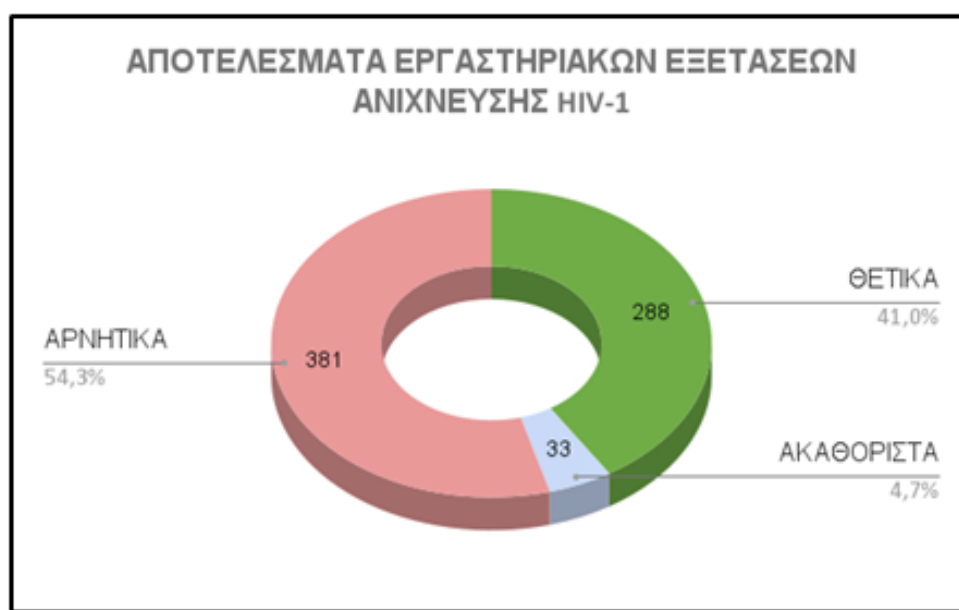
- Θετικό αποτέλεσμα – ακριβής αριθμός copies/mL πλάσματος. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο και ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται εντός του εύρους αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη βρίσκεται πάνω από το Ct.
- Θετικό αποτέλεσμα / υκό φορτίο  $> 1 \times 10^7$  copies/mL. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, αλλά μη ποσοτικοποιήσιμο και βρίσκεται πάνω από το εύρος αναλυτικών μετρήσεων.
- Θετικό αποτέλεσμα – υκό φορτίο  $< 40$  copies/mL. Το HIV-1 RNA είναι ανιχνεύσιμο, ωστόσο βρίσκεται κάτω του εύρους αναλυτικών μετρήσεων, ταυτόχρονα η καμπύλη παραμένει κάτω από το Ct, επομένως δεν μπορεί να δοθεί ακριβής ποσοτική απάντηση για τον αριθμό αντιγράφων/mL πλάσματος.
- Αρνητικό αποτέλεσμα - Not Detected: Το HIV-1 RNA είναι μη ανιχνεύσιμο.



**Εικόνα 23:** Α) Καμπύλη ανάπτυξης Real-time RT-PCR, Β) Θετικό αποτέλεσμα ως προς την ανίχνευση HIV-1 RNA με Real-time RT-PCR, Γ) Θετικό αποτέλεσμα, μη ποσοτικοποιήσιμο και Δ) Αρνητικό αποτέλεσμα - μη ανιχνεύσιμο HIV-1 RNA.

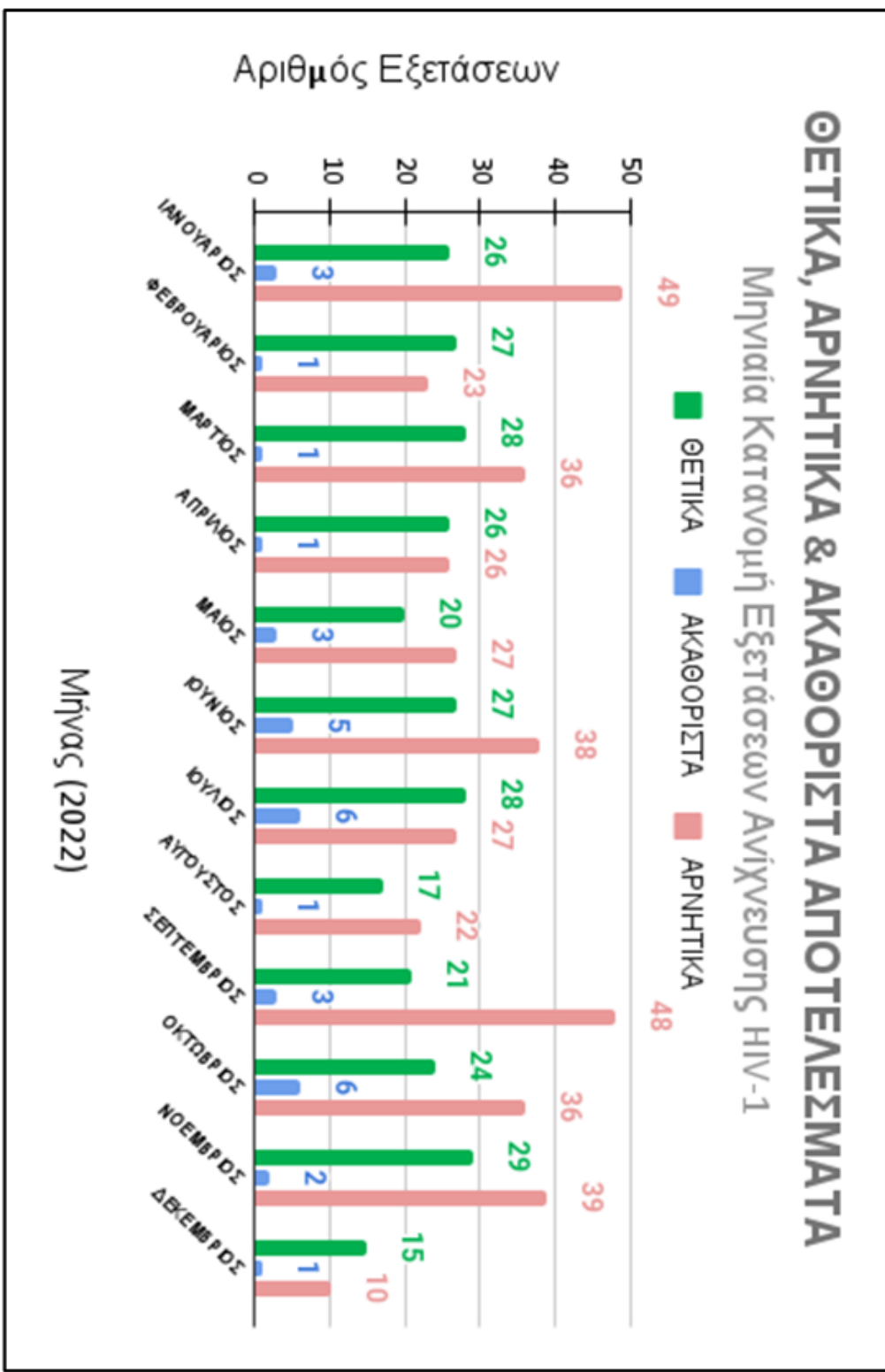
### 3. Αποτελέσματα

Το έτος 2022 στο ΕΚΑΑΝΕ πραγματοποιήθηκαν συνολικά 711 εργαστηριακοί έλεγχοι ανίχνευσης του ιού HIV-1, από τις οποίες το 54,3% έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα ως προς την ανίχνευση του HIV-1, το 4,7% των αποτελεσμάτων ήταν ακαθόριστο ενώ, τα δείγματα με θετικό αποτέλεσμα ανήλθαν σε ποσοστό 41%. (Γράφημα 4)



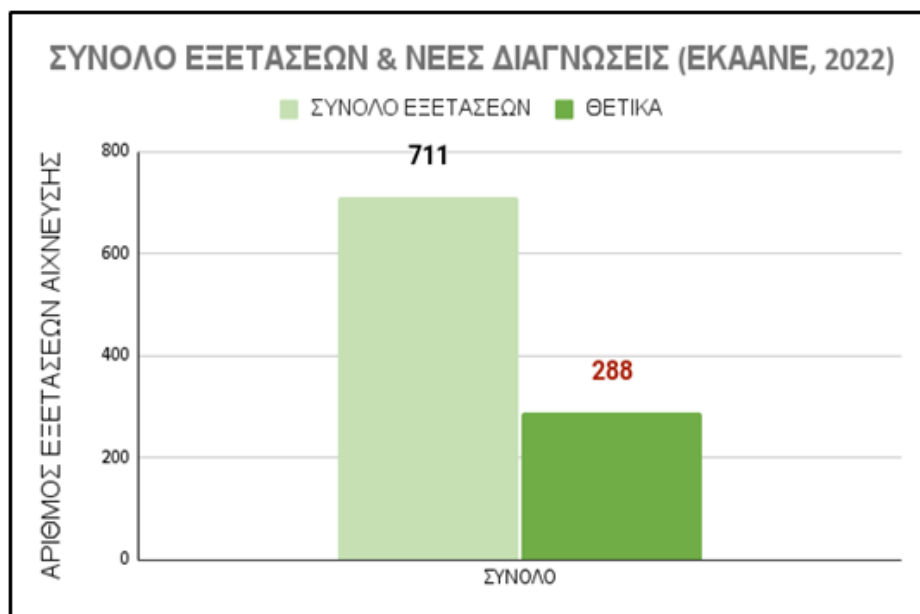
Γράφημα 4: Αποτελέσματα συνολικών εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Στο Γράφημα 5 παρουσιάζονται αναλυτικά τα θετικά, τα αρνητικά και τα ακαθόριστα αποτελέσματα κάθε μήνα για όλο το έτος 2022.



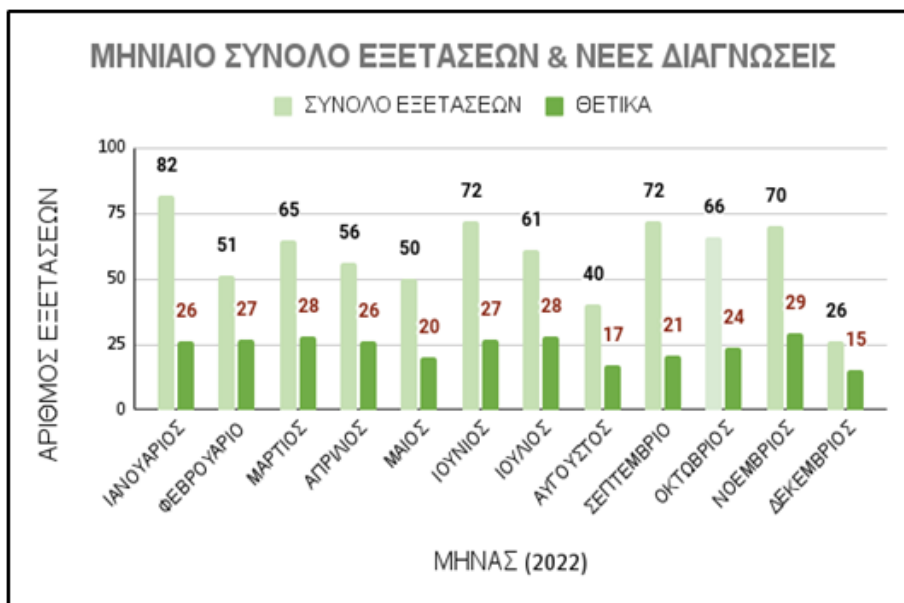
Γράφημα 5: Μηνιαία θετικά, αρνητικά και ακαθόριστα αποτελέσματα των εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Πιο αναλυτικά, το 41% των θετικών αποτελεσμάτων αντιστοιχεί σε συνολικά 288 νέες διαγνώσεις. (Γράφημα 6)



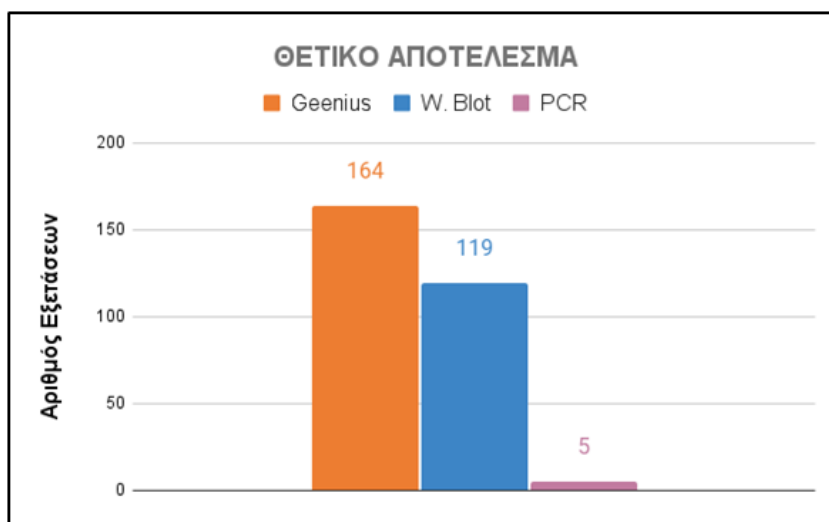
**Γράφημα 6:** Συνολικά αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 και συνολικά θετικά αποτελέσματα (νέες διαγνώσεις) (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 7**, οι περισσότερες μηνιαίες εξετάσεις ανίχνευσης πραγματοποιήθηκαν τον Ιανουάριο του 2022 και οι λιγότερες των Δεκεμβρίου του 2022. Οι νέες διαγνώσεις κάθε μήνα ήταν, κατά μέσο όρο, 24. Πιο αναλυτικά, ο μήνας με τις περισσότερες νέες διαγνώσεις ήταν ο Νοέμβριος, με 29 θετικά αποτελέσματα. Έπειτα ακολουθούν ο Μάρτιος και ο Ιούλιος με 28 νέες διαγνώσεις ο καθένας, ο Φεβρουάριος και ο Ιούνιος με 27 νέες διαγνώσεις, ο Απρίλιος με 26, ο Οκτώβριος με 24 και ο Μάιος με 20. Τέλος, οι λιγότερες μηνιαίες διαγνώσεις παρατηρήθηκαν τον Αύγουστο και τον Δεκέμβριο, με συνολικά 17 και 15 θετικά αποτελέσματα, αντίστοιχα.



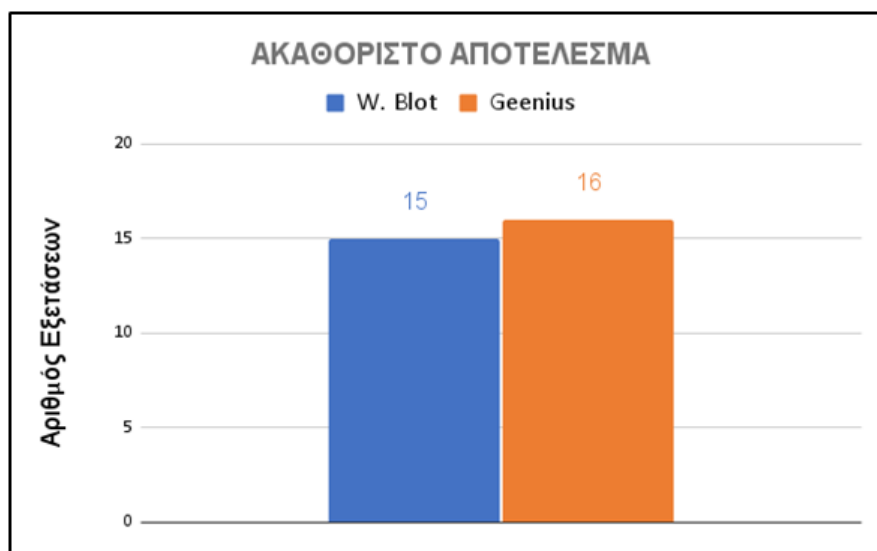
**Γράφημα 7:** Μηνιαίο σύνολο εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 και νέες διαγνώσεις (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Το Geenius ήταν η συχνότερα χρησιμοποιούμενη επιβεβαιωτική μέθοδος στο ΕΚΑΑΝΕ για το 2022 με την οποία επιβεβαιώθηκε το 57% των νέων διαγνώσεων (164 δείγματα). Ακολουθεί η Western blot με την οποία επιβεβαιώθηκαν συνολικά 119 δείγματα. Τέλος υπήρξαν 5 περιπτώσεις ατόμων που επιβεβαιώθηκαν με μοριακό έλεγχο. (Γράφημα 8)



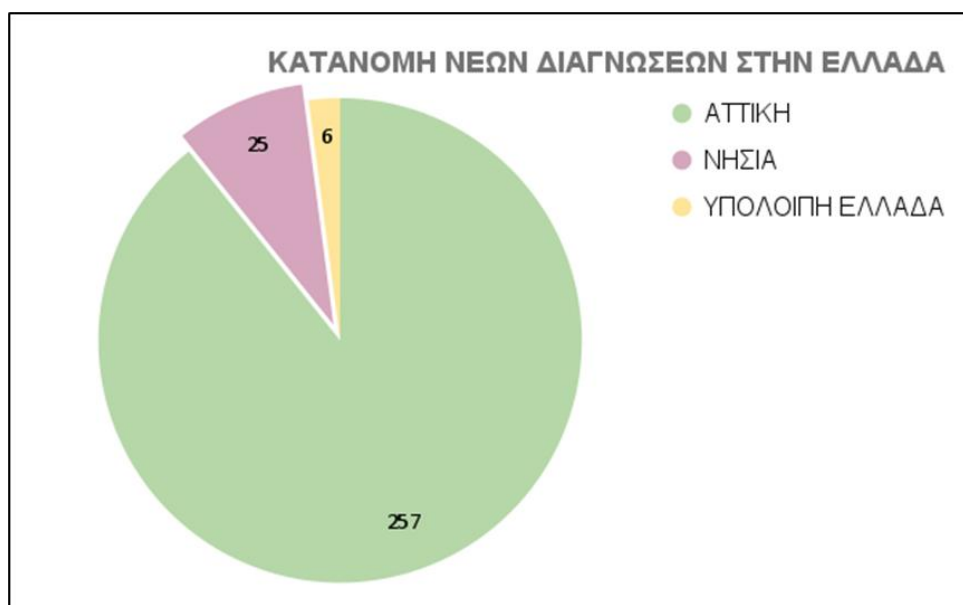
**Γράφημα 8:** Κατανομή των νέων διαγνώσεων ανάλογα την εργαστηριακή εξέταση επιβεβαίωσης που χρησιμοποιήθηκε (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Όσον αφορά τα ακαθόριστα αποτελέσματα, πρόκειται για συνολικά 31 περιπτώσεις από τις οποίες οι 15 αφορούσαν την Western blot και οι υπόλοιπες 16 το Geenius. (Γράφημα 9)



**Γράφημα 9:** Κατανομή των ακαθόριστων αποτελεσμάτων ανάλογα την εργαστηριακή εξέταση επιβεβαίωσης που χρησιμοποιήθηκε (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

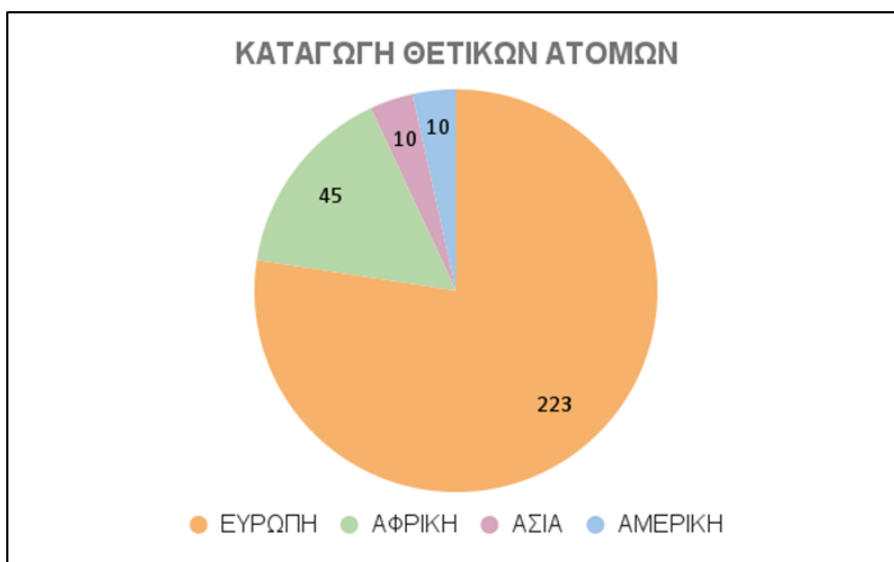
Δεδομένου ότι το ΕΚΑΑΝΕ λαμβάνει δείγματα από τη Νότια Ελλάδα, η πλειοψηφία των θετικών αποτελεσμάτων αφορούσαν δείγματα από την Αττική, ενώ υπήρξαν 25 περιπτώσεις θετικών ατόμων από τα νησιά και 6 από την υπόλοιπη Νότια Ελλάδα. (Γράφημα 10) Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στις 15 από τις συνολικά 25 νέες διαγνώσεις στα νησιά πρόκειται για άτομα που διέμεναν σε δομές φιλοξενίας μεταναστών (hot-spots) στην Μυτιλήνη και στην Σάμο.



**Γράφημα 10:** Κατανομή των νέων διαγνώσεων στις περιοχές της Ελλάδας (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

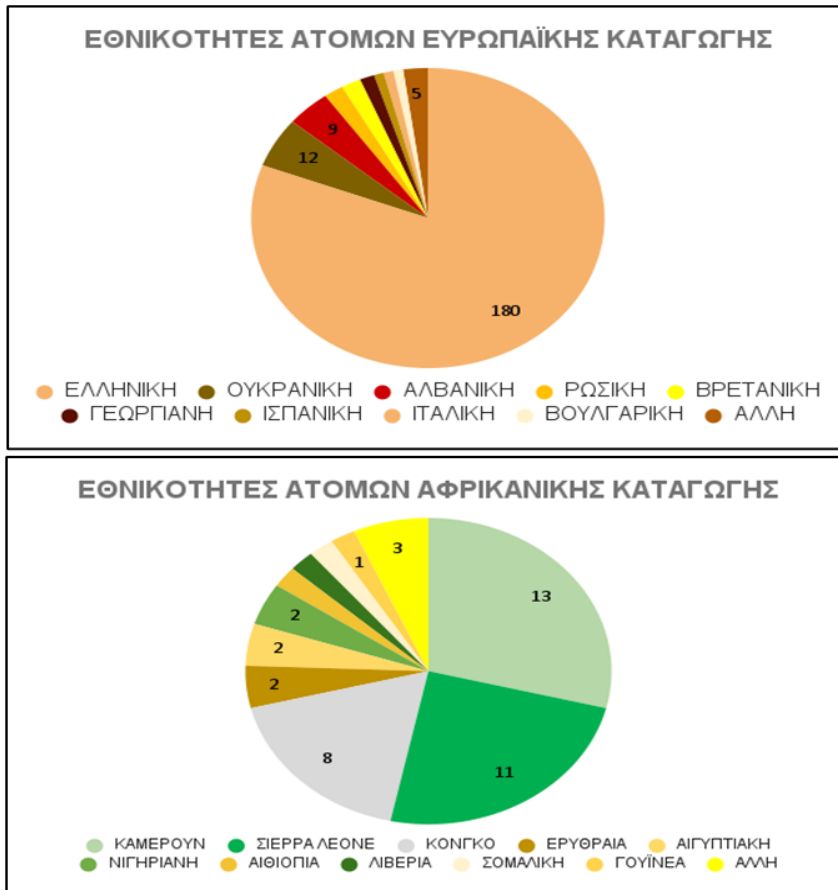


Σχετικά με την καταγωγή των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων, ως επί το πλείστον πρόκειται για άτομα Ευρωπαϊκής καταγωγής (223 περιπτώσεις) σε ποσοστό που ανήλθε στο 77%. Το 16% αφορούσε άτομα Αφρικανικής καταγωγής ενώ ακόμα, διαγνώστηκαν συνολικά 10 άτομα με προέλευση από την Ασία και 10 από την Αμερική. **(Γράφημα 11)** Πιο αναλυτικά, το 81% των ατόμων Ευρωπαϊκής καταγωγής ήταν Έλληνες (180 άτομα) ενώ, το 5% αφορούσε Ουκρανούς (45 άτομα). Να σημειωθεί πως όλες οι περιπτώσεις με καταγωγή από την Ουκρανία επιβεβαιώθηκαν στο ΕΚΑΑΝΕ μετά την έναρξη του πολέμου, στις 24 Φεβρουαρίου 2022, και στην πλειοψηφία τους αφορούσαν ήδη γνωστές περιπτώσεις HIV-1 λοίμωξης<sup>3</sup>. Στην συνέχεια, η πλειοψηφία της Αφρικανικής προέλευσης αφορούσε το Καμερούν (13 άτομα), τη Σιέρα Λεόνε (11 περιπτώσεις) και το Κονγκό (8 περιπτώσεις). **(Γράφημα 12)** Από την Ασία, υπήρξαν 3 άτομα Αρμενικής και 2 άτομα Πακιστανικής καταγωγής. Τέλος, τα 6 από τα 10 συνολικά άτομα Αμερικανικής καταγωγής προέρχονταν από την Κούβα. **(Γράφημα 13)**

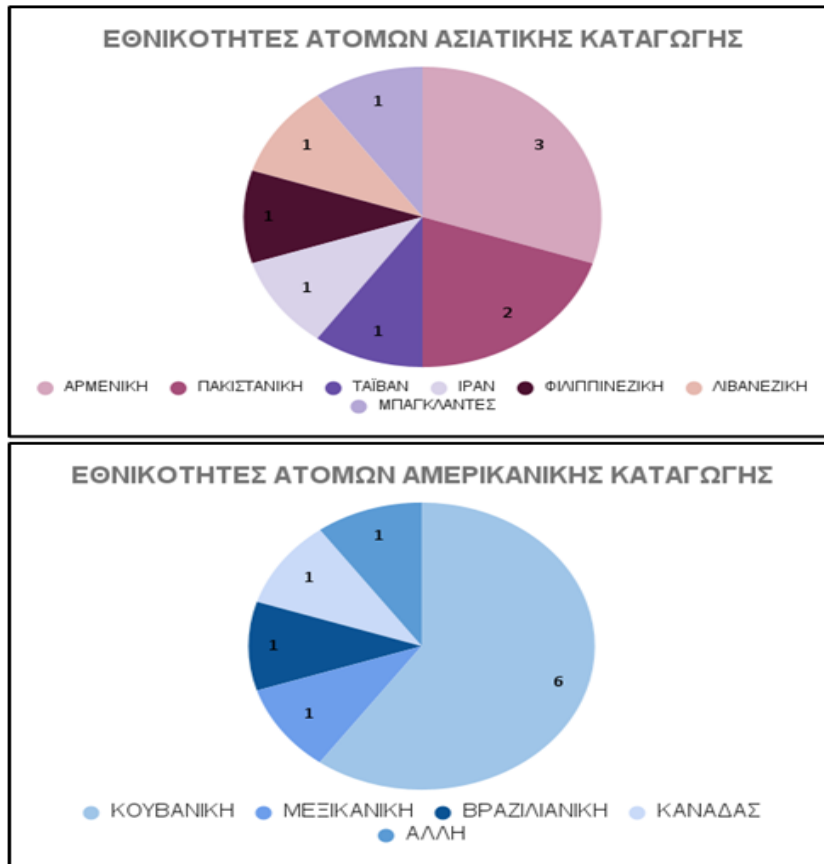


**Γράφημα 11:** Καταγωγή των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

<sup>3</sup> Απαιτούνταν επιβεβαίωση της HIV-1 λοίμωξης από κάποιο ελληνικό φορέα προκειμένου τα άτομα αυτά να έχουν πρόσβαση στην αντιρετροϊκή θεραπεία.

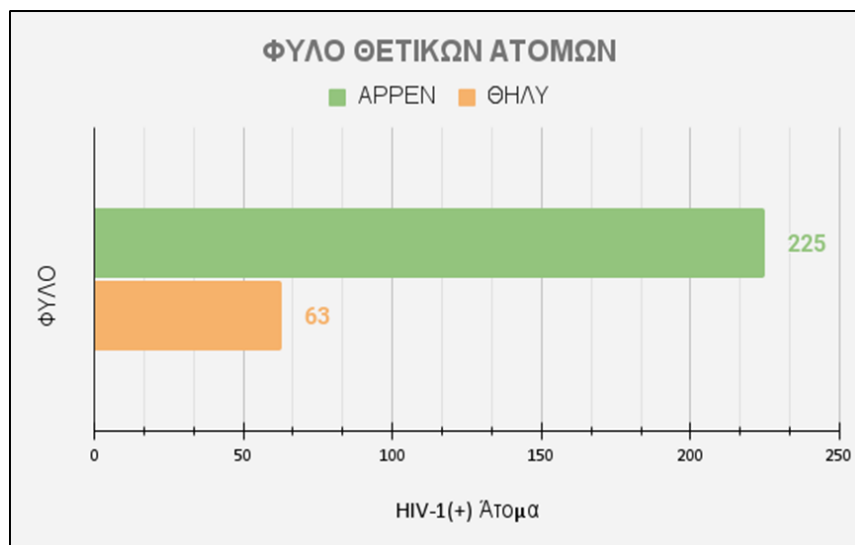


Γράφημα 12: Εθνικότητες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων Ευρωπαϊκής και Αφρικανικής καταγωγής (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).



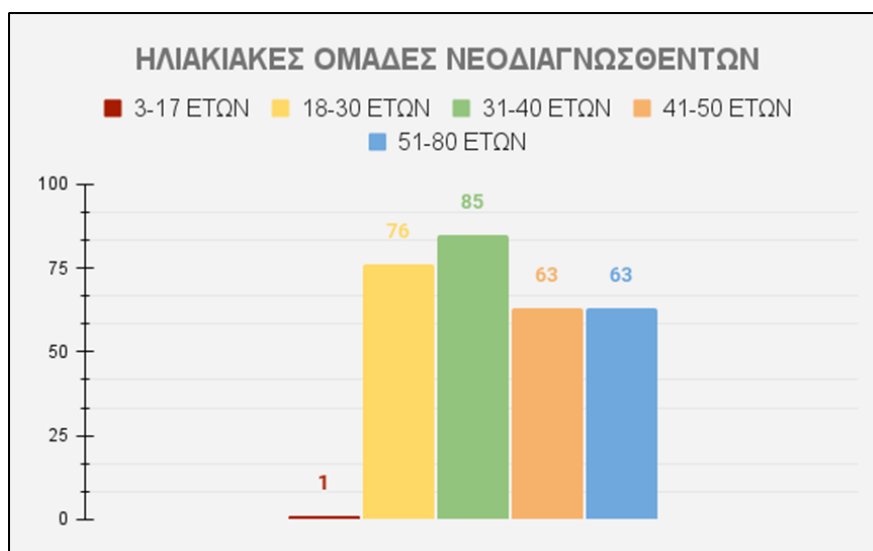
**Γράφημα 13:** Εθνικότητες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων Ασιατικής και Αμερικανικής καταγωγής (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Ως προς άλλα δημογραφικά χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία), η συντριπτική πλειοψηφία των νεοδιαγνωσθέντων αφορούσε άνδρες ηλικίας 30 έως 40 ετών. Αναλυτικότερα από τα 288 άτομα που βρέθηκαν θετικά, τα 225 ήταν άνδρες και μόνο τα 63 ήταν γυναίκες. (Γράφημα 14)



**Γράφημα 14:** Φύλο νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Η επικρατέστερη ηλικιακή ομάδα ήταν αυτή μεταξύ 31 και 40 ετών συσσωρεύοντας 85 συνολικά άτομα. Ακολουθούν οι ηλικίες 18-30 ετών στις οποίες ανήκαν 76 άτομα. Στην συνέχεια, καθεμία από τις ομάδες 41-50 ετών και 51-80 αποτελούνταν από 63 νέες διαγνώσεις και τέλος, υπήρξε μία μοναδική περίπτωση θετικού ατόμου κάτω των 17 ετών και συγκεκριμένα, ηλικίας 3 ετών. **(Γράφημα 15)**



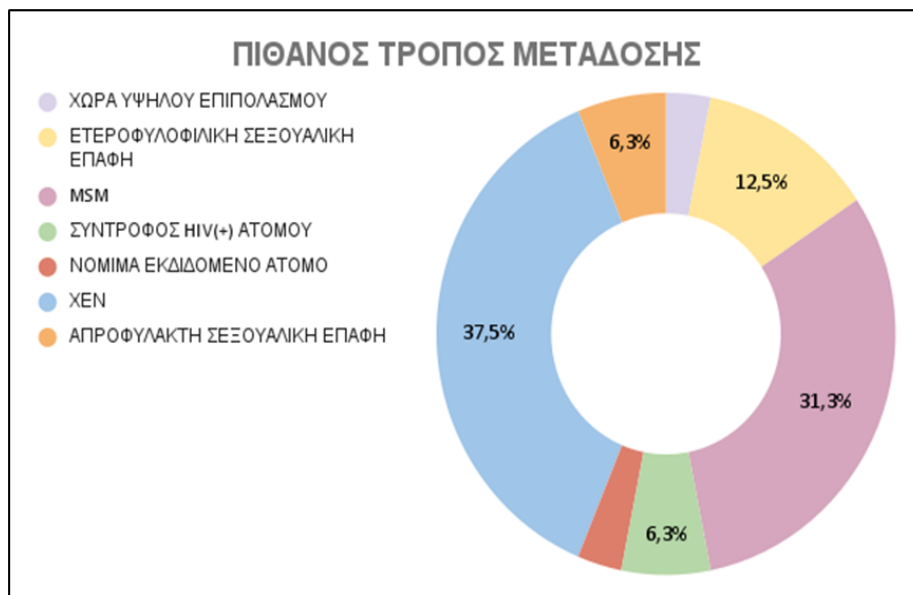
**Γράφημα 15:** Ηλικιακές ομάδες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Έπειτα οι λόγοι εξέτασης των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων, όπως δηλώθηκαν στα συνοδευτικά δελτία των δειγμάτων όταν προσήλθαν στο εργαστήριο, παρουσιάζονται στο ακόλουθο Γράφημα. Στη συντριπτική πλειοψηφία (222 περιπτώσεις) ως λόγος εξέτασης αναφέρθηκε ο διαγνωστικός. Έπειτα 20 άτομα διαγνώστηκαν θετικά μετά από προληπτικό έλεγχο και 16 άτομα διέμεναν σε κέντρα κράτησης ή δομές φιλοξενίας. Επιπλέον, υπήρξαν 9 περιστατικά δοτών και 8 ΧΕΝ που βρέθηκαν θετικά στον ιό. Στη συνέχεια 4 άτομα γνώριζαν την θετικότητά τους καθώς είχαν διαγνωσθεί ήδη σε άλλη χώρα και τέλος, διαπιστώθηκαν 4 θετικές περιπτώσεις προγεννητικού και 4 προεγχειρητικού ελέγχου. **(Γράφημα 16)**



**Γράφημα 16:** Λόγοι εξέτασης για HIV-1 λοίμωξη (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Επιπλέον το 37,5% όσων δήλωσαν πιθανό τρόπο μετάδοσης (συνολικά 31 άτομα) αφορούσε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών (XEN), το 31,3% άνδρες που είχαν σεξουαλική επαφή με άνδρες (MSM) ενώ, οι σύντροφοι HIV(+) ατόμων ανήλθαν σε ποσοστό 6,3%. Ακολουθεί η ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή, που δηλώθηκε ως πιθανός τρόπος μετάδοσης από το 12,5% των ατόμων, και η απροφύλακτη σεξουαλική επαφή (χωρίς περαιτέρω διευκρινήσεις) με ποσοστό 6,3%. Τέλος τα νόμιμα εκδιδόμενα άτομα και όσοι προέρχονταν από χώρες υψηλού επιπολασμού αποτέλεσαν ένα ποσοστό 6,2% συνολικά. **(Γράφημα 17)**



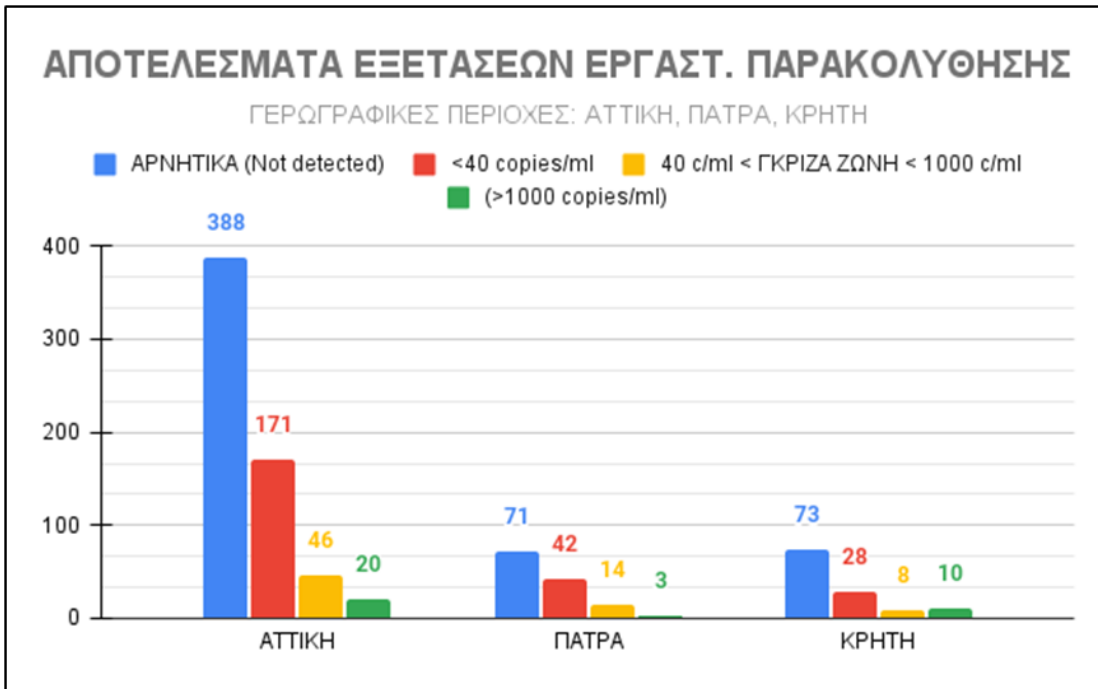
**Γράφημα 17:** Πιθανός τρόπος μετάδοσης HIV-1(ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Συνεχίζοντας με τα αποτελέσματα που αφορούν το κομμάτι της εργαστηριακής παρακολούθησης της HIV-1 λοίμωξης, στο **Γράφημα 18** παρουσιάζονται οι εξετάσεις μοριακού ελέγχου μέτρησης του HIV-1 RNA που πραγματοποιήθηκαν συνολικά το 2022 στο ΕΚΑΑΝΕ. Συγκεκριμένα, από τις συνολικά 921 εξετάσεις, οι 47 αφορούσαν πρώτη μέτρηση ιικού φορτίου (αρχικός εργαστηριακός έλεγχος) και οι 874 αφορούσαν εργαστηριακή παρακολούθηση της πορείας της λοίμωξης.



**Γράφημα 18:** Συνολικές εξετάσεις μοριακού ελέγχου για ανίχνευση του HIV-1 RNA που αφορούν είτε πρώτη μέτρηση ιικού φορτίου είτε εργαστηριακή παρακολούθηση (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Σχετικά με τις εργαστηριακές παρακολουθήσεις, στο **Γράφημα 19** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των εξετάσεων ανά γεωγραφική περιοχή (Αττική, Πάτρα, Κρήτη). Και στις τρεις περιπτώσεις η πλειοψηφία των αποτελεσμάτων έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο, σε ποσοστό που ξεπερνούσε το 50% των συνολικών εξετάσεων κάθε περιοχής. Έπειτα το ανιχνεύσιμο μη ποσοτικοποιήσιμο ιικό φορτίο (<40 αντίγραφα/ml πλάσματος) ήταν το δεύτερο συχνότερο αποτέλεσμα και στις τρεις περιοχές. Όσον αφορά τα θετικά αποτελέσματα >40 αντίγραφα/ml πλάσματος, στην Αττική αποτελούσαν ένα ποσοστό 10,5% (66 συνολικά περιπτώσεις), ενώ στην Πάτρα και στην Κρήτη ένα 13,1% (17 περιπτώσεις) και 15,2% (18 περιπτώσεις), αντίστοιχα. Στην Αττική και στην Πάτρα η πλειοψηφία αυτών κυμάνθηκε σε τιμές μεταξύ 40 και 1000 αντιγράφων/ml πλάσματος όμως, στην Κρήτη παρατηρήθηκε επικράτηση των τιμών που ξεπερνούσαν τα 1000 αντίγραφα/ml πλάσματος μεταξύ των θετικών αποτελεσμάτων.



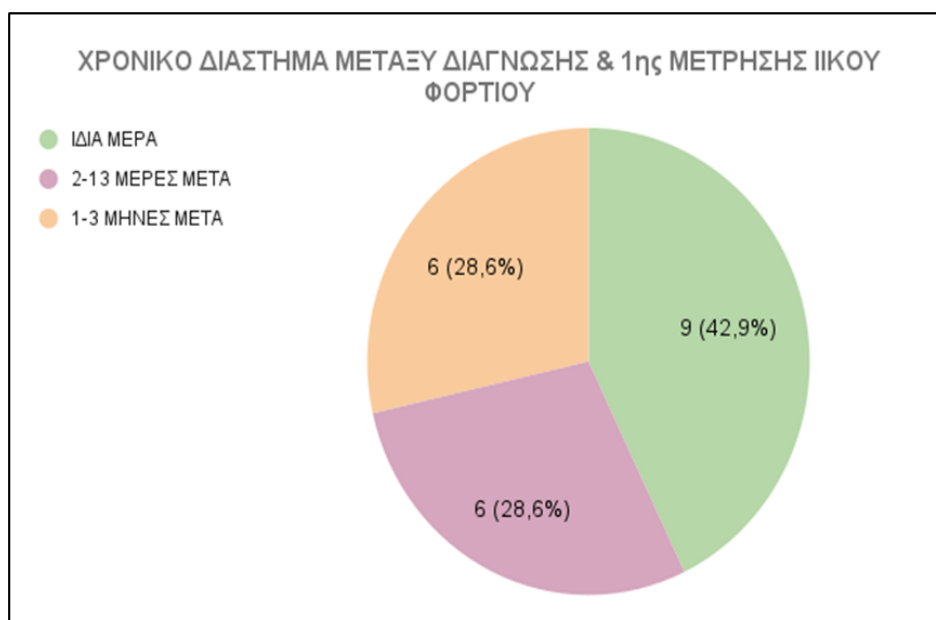
**Γράφημα 19:** Αποτελέσματα εξετάσεων εργαστηριακής παρακολούθησης στην Αττική, την Πάτρα και την Κρήτη (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Έπειτα οι αρχικοί εργαστηριακοί έλεγχοι που αφορούσαν την πραγματοποίηση της πρώτης μέτρησης ιικού φορτίου (baseline viral load) ήταν συνολικά 47 από τους οποίους οι 21 περιπτώσεις ήταν άτομα που διαγνώστηκαν θετικά στον HIV-1 στο ΕΚΑΑΝΕ. (Γράφημα 20)



**Γράφημα 20:** Συνολικές εξετάσεις πρώτης μέτρησης ιικού φορτίου και περιπτώσεις που η διάγνωση των ατόμων έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

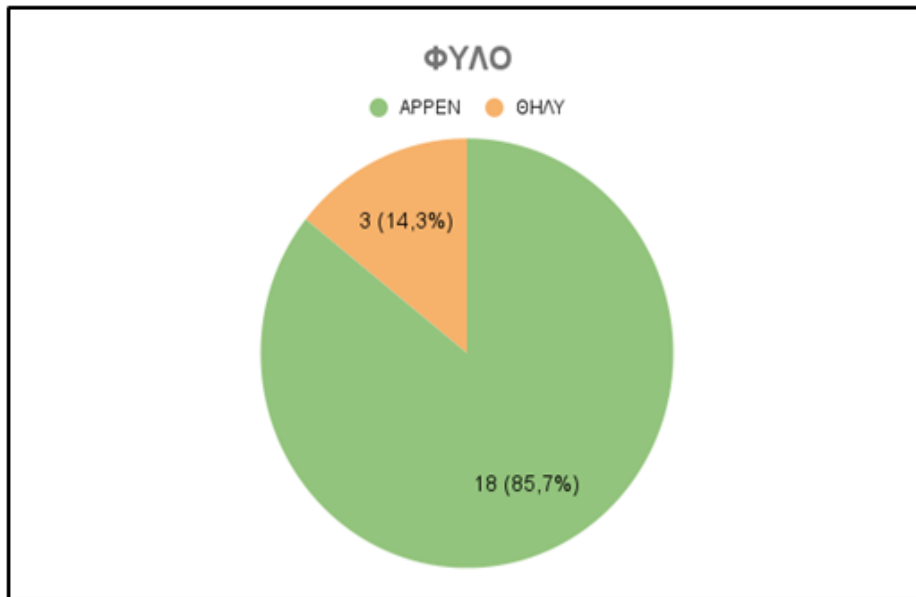
Από τα 21 άτομα, στα 9 η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε την ίδια μέρα με την επιβεβαίωση της διάγνωσης τους, 6 άτομα μέτρησαν το ιικό τους φορτίο 2 έως και 13 μέρες μετά την διάγνωση ενώ, διαπιστώθηκαν ακόμα 6 περιπτώσεις που υποβλήθηκαν σε μέτρηση ιικού φορτίου 1 έως 3 μήνες αφότου επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά ως HIV(+). (Γράφημα 21)



Γράφημα 21: Χρονικό διάστημα μεταξύ διάγνωσης και 1ης μέτρησης ιικού φορτίου (EKAANE, 2022).

Πιο αναλυτικά, τα 18 από τα 21 άτομα ήταν άνδρες και τα 3 ήταν γυναίκες. (Γράφημα 22) ελληνικής εθνικότητας ήταν συνολικά οι 15 ενώ, με εξαίρεση 1 Ρωσίδα και 1 Κουβανό, οι άλλες 4 περιπτώσεις αφορούσαν αφρικανικές εθνικότητες. (Γράφημα 23) Ως προς την ηλικία, 6 άτομα ήταν κάτω των 30 ετών, 7 άτομα ήταν μεταξύ 30 και 40 ετών, 5 άτομα ήταν μεταξύ 41 και 50 ετών και τέλος, υπήρξαν 3 περιπτώσεις ατόμων ηλικίας άνω των 50 ετών. (Γράφημα 24)

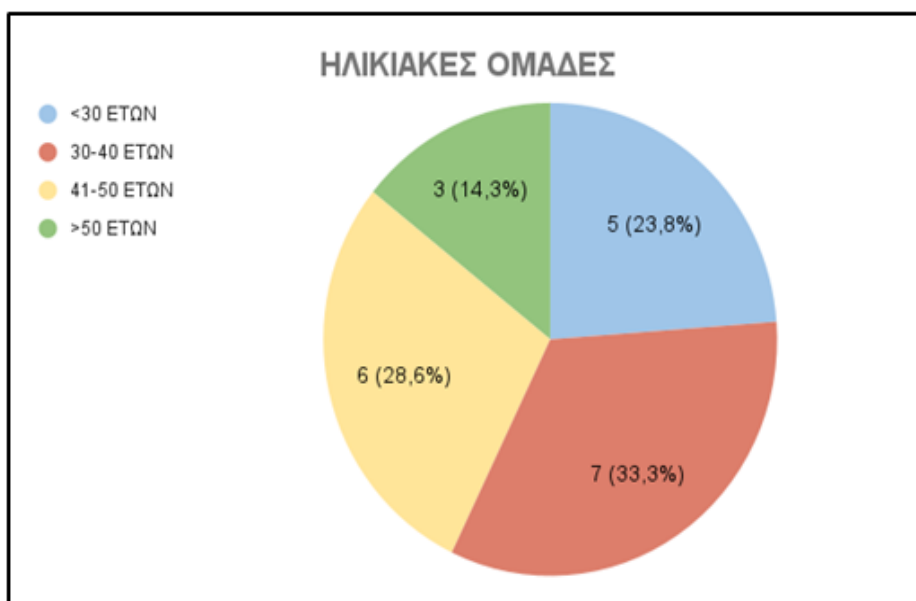




**Γράφημα 22:** Φύλο των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).



**Γράφημα 23:** Καταγωγή των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).



**Γράφημα 24:** Ηλικιακές ομάδες των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

Στον **Πίνακα 4** που ακολουθεί βρίσκονται αναλυτικά όλα τα δεδομένα που αφορούν τις 21 αυτές περιπτώσεις.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ & 1η ΜΕΤΡΗΣΗ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΤΟ ΕΚΑΑΝΕ							
	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΛΟΓΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	ΠΙΘΑΝΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ	ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ 1ης ΜΕΤΡΗΣΗΣ HIV-1 RNA	ΤΙΜΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1.	ΑΡΡΕΝ	28	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ	MSM	0	4,08E+04
2.	ΑΡΡΕΝ	29	ΚΟΥΒΑΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	0	1,94E+06
3.	ΑΡΡΕΝ	40	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ	MSM	0	2,28E+05
4.	ΑΡΡΕΝ	48	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	0	<40
5.	ΑΡΡΕΝ	37	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	0	7,03E+04
6.	ΑΡΡΕΝ	53	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΤΥΧΑΙΟ ΕΥΡΗΜΑ	ΔΟΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	0	1,27E+06

7.	APPEN	46	ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	-	0	9,19E+05
8.	APPEN	42	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	-	0	3,89E+06
9.	APPEN	49	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	-	0	7,00E+05
10.	ΘΗΛΥ	37	ΚΑΜΕΡΟΥΝ	ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ	ΕΤΕΡΟΦΥΛΟΦΙΛΙΚΗ ΣΕΞΟΥΑΛΙΚΗ ΕΠΑΦΗ	2 ΜΕΡΕΣ	1,39E+05
11.	APPEN	55	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	4 ΜΕΡΕΣ	5,43E+04
12.	APPEN	27	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	-	6 ΜΕΡΕΣ	2,82E+05
13.	APPEN	27	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	7 ΜΕΡΕΣ	1,48E+05
14.	APPEN	50	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	7 ΜΕΡΕΣ	1,96E+05
15.	APPEN	38	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΤΥΧΑΙΟ ΕΥΡΗΜΑ	MSM	13 ΜΕΡΕΣ	2,14E+05
16.	APPEN	39	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	MSM	1 ΜΗΝΑΣ	7,81E+05
17.	APPEN	45	ΑΙΓΥΠΤΙΑΚΗ	ΤΥΧΑΙΟ ΕΥΡΗΜΑ	ΔΟΤΗΣ ΑΙΜΑΤΟΣ	1 ΜΗΝΑΣ	2,16E+06
18.	APPEN	34	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΧΕΝ	-	1 ΜΗΝΑΣ	5,92E+05
19.	ΘΗΛΥ	70	ΡΩΣΙΚΗ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	-	1ΜΙΣΗ ΜΗΝΑΣ	1,40E+05
20.	APPEN	27	ΣΙΕΡΡΑ ΛΕΟΝΕ	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΣ	ΧΩΡΑ ΥΨΗΛΟΥ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ	2 ΜΗΝΕΣ	2,17E+04
21.	ΘΗΛΥ	35	ΕΛΛΗΝΙΚΗ	ΧΕΝ	-	3 ΜΗΝΕΣ	1,36E+03

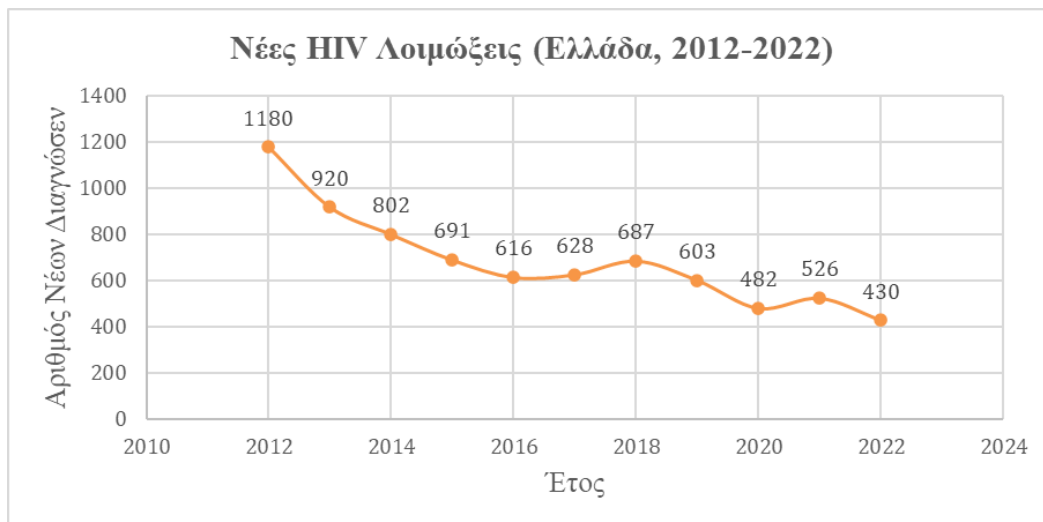
**Πίνακας 4:** Δεδομένα των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).

## 4. Συζήτηση - Συμπεράσματα

### Ελλάδα

Σύμφωνα με το ετήσιο Δελτίο Επιδημιολογικής Επιτήρησης HIV του ΕΟΔΥ 2021 στην Ελλάδα έγιναν συνολικά 526 νέες διαγνώσεις, με το 44,1% να ανήκουν στην ομάδα των MSM και το 16,3% στους XEN. Έως το τέλος του 2021 στην Ελλάδα 19.265 άτομα ζούσαν με τον ιό, εκ των οποίων το 82,5% ήταν άντρες και το 17,3% ήταν γυναίκες. Συνολικά το ποσοστό των νέων διαγνώσεων που αφορούσε στους άντρες ήταν πάνω από 80%, με την πλειοψηφία να ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα των 30-39 ετών. Σε γενικές γραμμές λοιπόν, φαίνεται πως τα δεδομένα του ΕΚΑΑΝΕ για το 2022 συμβαδίζουν με αυτά του ΕΟΔΥ για το 2021 σχετικά το φύλο και την επικρατέστερη ηλικιακή ομάδα των νεοδιαγνωσθέντων. [71]

Όσον αφορά το 2022 μέχρι στιγμής στον ΕΟΔΥ έχουν καταγραφεί δεδομένα που αφορούν στην HIV λοίμωξη έως τις 31/10/2022. Οι νέες λοιμώξεις για αυτή την χρονική περίοδο φτάνουν τις 430. Το ΕΚΑΑΝΕ έως τις 31/10/2022 επιβεβαίωσε 225 νέες διαγνώσεις, οι οποίες αποτελούν το 52,3% των νέων λοιμώξεων στην Ελλάδα. Από τις 430 λοιμώξεις το 79,8% αφορά στους άντρες και το 20,2% στις γυναίκες. Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα του ΕΚΑΑΝΕ, για το σύνολο του ημερολογιακού έτους 2022, όπου συνολικά για την χρονιά 2022 έγιναν 288 νέες διαγνώσεις εκ των οποίων το 78,1% ήταν άντρες και το 21,9% ήταν γυναίκες. Όσον αφορά τον τρόπο μετάδοσης της λοίμωξης, με βάση τα δεδομένα του ΕΟΔΥ, στους MSM οφείλεται το 46,98% των νέων λοιμώξεων, στους XEN το 12,09% και το 21,86% οφείλεται στην απροφύλακτη ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή. Τέλος, τα δεδομένα του ΕΚΑΑΝΕ όπως και του ΕΟΔΥ συμφωνούν ότι η πλειονότητα των νεοδιαγνωσθέντων ήταν ελληνικής καταγωγής, ενώ σε μικρότερο ποσοστό διαγιγνώσκονται άτομα ευρωπαϊκής και αφρικανικής καταγωγής. [71], [72], [73]



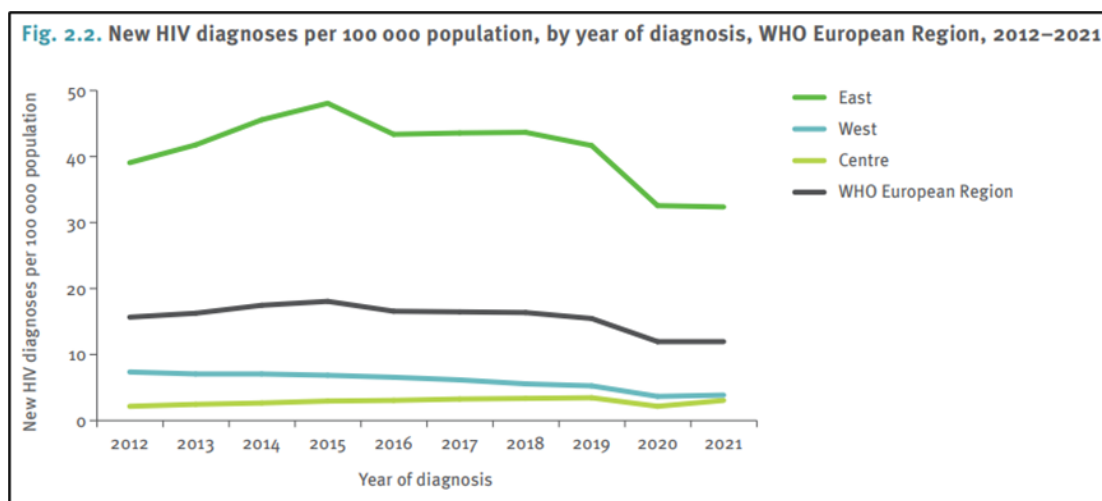
**Γράφημα 25:** Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων στην Ελλάδα κατά το διάστημα 2012-2022 (ΕΟΔΥ).

Μελετώντας την πορεία της HIV λοίμωξης στην Ελλάδα παρατηρούνται αλλαγές στα δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας (2012-2022). Καθοριστικό ρόλο σε αυτό είχε η επιδημία HIV του 2012-2014 στην Ελλάδα, η οποία αφορούσε ως επί το πλείστον τους XEN, με αποτέλεσμα να σημειωθεί ο μεγαλύτερος αριθμός ετήσιων νέων διαγνώσεων HIV, φτάνοντας τις 1.180 το 2012. Ο κυριότερος τρόπος μετάδοσης την χρονιά εκείνη ήταν η κοινή χρήση μολυσμένων συρίγγων με ποσοστό 44,2% και στην συνέχεια ακολουθούσαν οι MSM με ποσοστό 25,8%. Η επιδημία HIV στους XEN συνεχίστηκε και για το 2013 με συνολικά 920 νέες λοιμώξεις εκ των οποίων το 28,5% να οφείλεται στην κοινή χρήση μολυσμένων συρίγγων. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκαν μελέτες με σκοπό την παρατήρηση της μετάδοσης του ιού στην επιδημία HIV στους XEN κατά τα έτη 2012-2020. Χρησιμοποιήθηκαν στοιχεία της διετίας 2012-2013 τα οποία συγκρίθηκαν με δεδομένα της τριετίας 2018-2020. Σύμφωνα με αυτά φαίνεται ότι οι κοινωνικοοικονομικές συνθήκες επιδεινώθηκαν το 2018-2020 για τους XEN. Η μετάδοση του ιού ανάμεσα στους XEN παρέμεινε στα ίδια επίπεδα κατά τις χρονιές 2012-2020, παράλληλα η φυλογενετική ανάλυση των ικών αλληλουχιών που είχαν μεταδοθεί ανάμεσα στους XEN απέδειξε ότι το 2018-2020 δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με την διετία 2012-2013. Συμπερασματικά, οι XEN συνεχίζουν να αποτελούν high risk group συμβάλλοντας στην μετάδοση του ιού, αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι πλέον άτομα μικρότερης ηλικίας με χαμηλότερο μορφωτικό επίπεδο που κάνουν καθημερινή ενδοφλέβια χρήση ναρκωτικών είναι πιο εύκολο να μολυνθούν και να μεταδώσουν τον ιό. [74] Το 2014 ορίστηκε η λήξη της επιδημίας, καθώς το ποσοστό των XEN που διαγνώστηκαν θετικοί μειώθηκε στο 13,2% φτάνοντας στα αναμενόμενα επίπεδα για τα δεδομένα της Ελλάδας (~ 10%). Από το 2015

έως το 2019 τα δεδομένα παρέμειναν σε σχετικά σταθερά επίπεδα με, κατά μέσο όρο, 645 νέες λοιμώξεις ετησίως. Παρόλα αυτά, το 2020, την χρονιά που ξεκίνησε η πανδημία COVID-19, υπήρξε σημαντική μείωση των συνολικών νέων διαγνώσεων που δηλώθηκαν στον ΕΟΔΥ (482 νέες λοιμώξεις). Ωστόσο, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση της πτωτικής αυτής πορείας, η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή δεδομένου ότι, το διάστημα αυτό υπήρξε περιορισμένη πρόσβαση στον έλεγχο για HIV λοίμωξη. [71]

## Ευρώπη

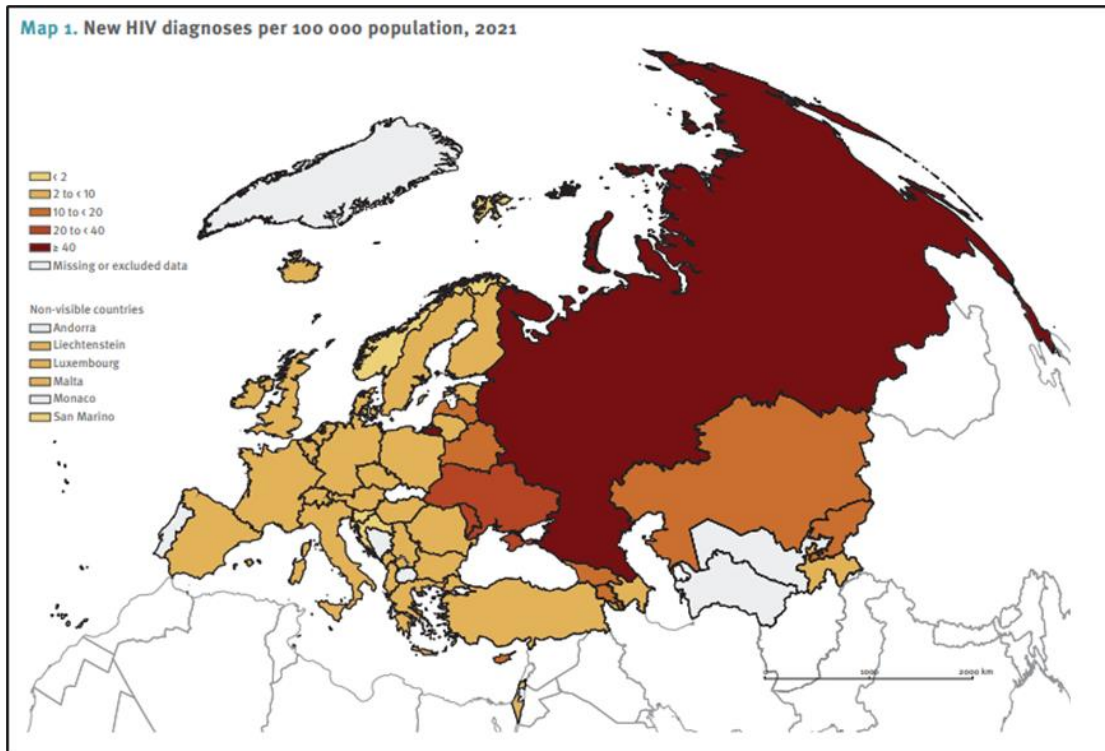
Όσον αφορά την Ευρώπη δεν έχουν δημοσιευθεί ακόμη δεδομένα σχετικά με το 2022 από τους παγκόσμιους και ευρωπαϊκούς οργανισμούς WHO, ECDC και UNAIDS, τα πιο πρόσφατα δεδομένα αφορούν 2021. Συνολικά κατά την τελευταία δεκαετία οι ετήσιες νέες διαγνώσεις HIV διατηρήθηκαν σε σχετικά σταθερά επίπεδα (16,0-18,0 νέες διαγνώσεις ανά πληθυσμό 100.000 ατόμων) το χρονικό διάστημα 2012-2019, μέχρι το 2020-2021 που παρατηρήθηκε απότομη μείωση (12,0 νέες διαγνώσεις ανά 100.000 άτομα). (Γράφημα 26) [75]



Γράφημα 26: Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων στην Ευρώπη κατά το διάστημα 2012-2021 (ECDC). [75]

Αναφορικά με το 2021, στην Ευρώπη (46 χώρες συνολικά) υπήρξαν 106.508 νέες HIV διαγνώσεις (12,0 νέες διαγνώσεις ανά 100.000 άτομα), μειωμένες κατά 24% σε σχέση με το 2019. Συγκεκριμένα, το 78% των νέων διαγνώσεων αφορούσαν την Ανατολική Ευρώπη, το 16% την Δυτική Ευρώπη και το 6% την Κεντρική Ευρώπη. Οι περισσότερες διαγνώσεις αφορούσαν την Ρωσία (40,2 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα) και σε δεύτερη

φάση την Ουκρανία (37,1 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα), ενώ τις λιγότερες νέες διαγνώσεις είχαν η Σλοβενία, η Κροατία και η Νορβηγία. Σημαντικά υψηλές ήταν και οι νέες διαγνώσεις στην Κύπρο με 16,5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. [75]

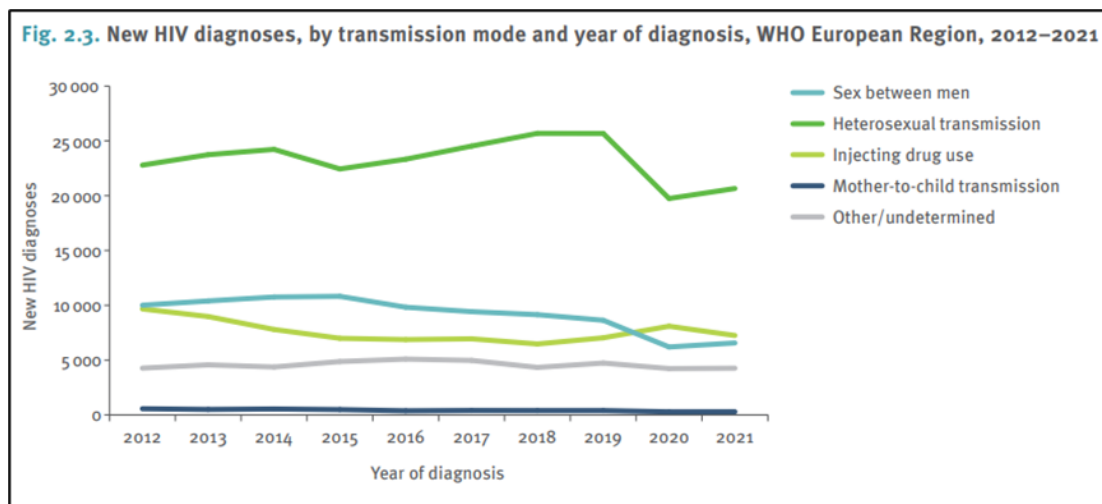


Εικόνα 24: Χάρτης νέων διαγνώσεων ανά 100.000 στην Ευρώπη το 2021 (ECDC). [75]

Οι περισσότερες νέες διαγνώσεις του 2021 αφορούσαν σε ποσοστό 60% άνδρες και 40% γυναίκες ενώ, το ποσοστό άνδρες/γυναίκες ήταν μεγαλύτερο στην Κεντρική Ευρώπη και μικρότερο στην Ανατολική Ευρώπη. Έπειτα η πλειοψηφία των νέων διαγνώσεων ανήκαν στην ηλικιακή ομάδα 30-39 ετών σε ποσοστό 38%, το 15% ήταν άτομα μεγαλύτερα από 50 ετών ενώ, ένα ποσοστό 6% ήταν νέοι ηλικίας 15-24 ετών. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα του ΕΚΑΑΝΕ για το 2022. Τέλος, έχει ενδιαφέρον πως το 19% των ατόμων που διαγνώστηκαν στην Ευρώπη το 2021, και ήταν γνωστή η εθνικότητά τους, ήταν μετανάστες (δηλαδή κατάγονταν από άλλη χώρα από αυτήν στην οποία διαγνώστηκαν). [75]

Για το 2021 ο τρόπος μετάδοσης για το 9% των νέων διαγνώσεων (εκ των οποίων 3% στην Ανατολική, 24% στην Δυτική και 48% στην Κεντρική Ευρώπη) ήταν άγνωστος. Όσον αφορά τις περιπτώσεις που ο τρόπος μετάδοσης ήταν γνωστός η ετεροφυλοφιλική σεξουαλική επαφή ήταν η επικρατέστερη με ποσοστό 63% (Το 6% αυτών αφορούσε άτομα μη Ευρωπαϊκής καταγωγής, προερχόμενα από χώρες με HIV επιδημία). Έπειτα ως δεύτερος

πιο συχνός τρόπος μετάδοσης αναφέρθηκε η κοινή χρήση μολυσμένων συρίγγων από XEN σε ποσοστό 25%, ενώ ένα 11% αφορούσε τους MSM. Η κάθετη μετάδοση βρέθηκε σε ποσοστό 0,5% των συνολικών περιπτώσεων (Γράφημα 27). [75]



Γράφημα 27: Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων, με βάση τον τρόπο μετάδοσης, στην Ευρώπη κατά το διάστημα 2012-2021 (ECDC). [75]

Δεδομένα σχετικά με τον τρόπο μετάδοσης που αφορούσαν το χρονικό διάστημα 2012-2021 υπήρξαν για τις 37, από τις 46 συνολικά, χώρες και σύμφωνα με αυτά, το ποσοστό των ετήσιων διαγνώσεων που αφορούσε μετάδοση μέσω ετεροφυλοφιλικής σεξουαλικής επαφής αυξήθηκε από 48% το 2012 σε 53% το 2021. Η μετάδοση μέσω κοινής χρήσης μολυσμένων συρίγγων είχε σταθερή μείωση το διάστημα 2012-2019, το 2020 παρατηρήθηκε απότομη αύξηση κατά 15% συγκριτικά με το 2019 και τελικά, μείωση κατά 11% το 2021. Συνολικά δηλαδή για αυτόν τον τρόπο μετάδοσης υπήρξε μείωση από 20% σε 19% το διάστημα 2012-2021. Έπειτα το ποσοστό που αφορούσε τους MSM μειώθηκε από 21% σε 17% μέσα σε αυτό το διάστημα, και οι κάθετες μεταδόσεις μειώθηκαν από 1,2% το 2012 σε 0,7% το 2021. Τέλος, το ποσοστό όπου ήταν άγνωστος ο τρόπος μετάδοσης αυξήθηκε από 9% το 2012 στο 11% των συνολικών νέων διαγνώσεων του 2021. [75]



# Βιβλιογραφία

1. Campbell, E. M., & Hope, T. J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 471-483.
2. Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., ... & Lemey, P. (2014). The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *science*, 346(6205), 56-61.
3. D'arc, M., Ayouba, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., Liegeois, F., ... & Peeters, M. (2015). Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1343-E1352.
4. Mourez, T., Simon, F., & Plantier, J. C. (2013). Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 448-461.
5. World Health Organization. (2022, November 9). HIV. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
6. UNAIDS (<https://aidsinfo.unaids.org/>)
7. World Health Organization. (2022, July). Summary of the global HIV epidemic, 2021. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids>
8. World Health Organization. (2023). Estimated number of people (all ages) living with HIV. <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people--living-with-hiv>
9. [The Key Populations Atlas, UNAIDS, https://kpatlas.unaids.org/dashboard](https://kpatlas.unaids.org/dashboard)
10. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoj, B., & Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 46, 5-14.
11. Sundquist, W. I., & Kräusslich, H. G. (2012). HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006924.
12. Chen, B. (2016). HIV capsid assembly, mechanism, and structure. *Biochemistry*, 55(18), 2539-2552.
13. Swanson, C. M., & Malim, M. H. (2008). SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*, 133(4), 742-742.
14. The HIV Life Cycle. (2021, August 4). [https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-life-cycle#:~:text=What%20are%20the%20seven%20stages,assembly%2C%20and%207\)%20budding](https://hivinfo.nih.gov/understanding-hiv/fact-sheets/hiv-life-cycle#:~:text=What%20are%20the%20seven%20stages,assembly%2C%20and%207)%20budding).
15. Turner, B. G., & Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology*, 285(1), 1-32.
16. Bukrinskaya, A. (2007). HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus research*, 124(1-2), 1-11.
17. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2018, June 19). HIV Replication Cycle. <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>
18. Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 484-496.
19. Science of HIV (<https://scienceofhiv.org/wp/life-cycle/>)
20. Qu, K., Ke, Z., Zila, V., Anders-Össwein, M., Glass, B., Mücksch, F., ... & Briggs, J. A. (2021). Maturation of the matrix and viral membrane of HIV-1. *Science*, 373(6555), 700-704.

21. Θετική Φωνή, Σύλλογος Οροθετικών Ελλάδος, <https://positivevoice.gr/hiv-aids/transmission>
22. UNAIDS. (2020). Prevailing Against Pandemics by Putting People at the Centre, World Aids Day Report.
23. World Health Organization. (2022). Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030.
24. Morrow, G., Vachot, L., Vagenas, P., & Robbiani, M. (2007). Current concepts of HIV transmission. *Current HIV/AIDS Reports*, 4(1), 29-35.
25. Oladipo, E. K., & Awoyelu, E. H. (2015). Pathogenesis of HIV: Pathway to eradication. *Advances in Applied Science Research*, 6(5), 81-87.
26. Moir, S., Chun, T. W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 6, 223-248.
27. Suthar, A. B., Granich, R. M., Kato, M., Nsanzimana, S., Montaner, J. S., & Williams, B. G. (2015). Programmatic implications of acute and early HIV infection. *The Journal of infectious diseases*, 212(9), 1351-1360.
28. Borrow, P. (2011). Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, 6(5), 353.
29. Weber, B. (2006). Screening of HIV infection: role of molecular and immunological assays. *Expert review of molecular diagnostics*, 6(3), 399-411.
30. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 11-23.
31. Cohen, M. S., Shaw, G. M., McMichael, A. J., & Haynes, B. F. (2011). Acute HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine*, 364(20), 1943-1954.
32. Fiebig, E. W., Wright, D. J., Rawal, B. D., Garrett, P. E., Schumacher, R. T., Peddada, L., ... & Busch, M. P. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*, 17(13), 1871-1879.
33. Henn, A., Flateau, C., & Gallien, S. (2017). Primary HIV infection: clinical presentation, testing, and treatment. *Current infectious disease reports*, 19(10), 1-10.
34. Parekh, B. S., Ou, C. Y., Fonjungo, P. N., Kalou, M. B., Rottinghaus, E., Puren, A., ... & Nkengasong, J. N. (2018). Diagnosis of human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews*, 32(1), e00064-18.
35. Fraser, C., Lythgoe, K., Leventhal, G. E., Shirreff, G., Hollingsworth, T. D., Alizon, S., & Bonhoeffer, S. (2014). Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: an evolutionary perspective. *Science*, 343(6177), 1243727.
36. Kabir, M. A., Zilouchian, H., Caputi, M., & Asghar, W. (2020). Advances in HIV diagnosis and monitoring. *Critical reviews in biotechnology*, 40(5), 623-638.
37. Branson, B. M. (2010). The future of HIV testing. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 55, S102-S105.
38. Vallefucio, L., Mazzarella, C., & Portella, G. (2016). Fourth generation assays for HIV testing. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(7), 723-732.
39. Cornett, J. K., & Kirn, T. J. (2013). Laboratory diagnosis of HIV in adults: a review of current methods. *Clinical infectious diseases*, 57(5), 712-718.
40. Greene, W. C. (2007). A history of AIDS: looking back to see ahead. *European journal of immunology*, 37(S1), S94-S102.
41. Barik, S.K., Mohanty, K.K., Bisht, D., Joshi, B., Jena, S., & Tripathy, S. (2018). An Overview of Enzyme Immunoassay: The Test Generation Assay in HIV/AIDS Testing. *Journal of AIDS and Clinical Research*, 9, 1-5.

42. Lang, R., Charlton, C., Beckthold, B., Kadivar, K., Lavoie, S., Caswell, D., ... & Gill, M. J. (2017). HIV misdiagnosis: A root cause analysis leading to improvements in HIV diagnosis and patient care. *Journal of Clinical Virology*, *96*, 84-88.
43. Augusto, Â. D. R., Iriemenam, N. C., Kohatsu, L., de Sousa, L., Maueia, C., Hara, C., ... & Parekh, B. S. (2020). High level of HIV false positives using EIA-based algorithm in survey: Importance of confirmatory testing. *PLoS One*, *15*(10), e0239782.
44. International Union of Immunological Societies. (2017, February 9). HIV ELISA Generation 1-4. <https://www.immunopaedia.org.za/download/hiv-elisa-generation-1-4/>
45. Gould, E. A., Buckley, A., & Cammack, N. (1985). Use of the biotin-streptavidin interaction to improve flavivirus detection by immunofluorescence and ELISA tests. *Journal of virological methods*, *11*(1), 41-48.
46. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., & Salemme, F. R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, *243*(4887), 85-88.
47. Bentsen, C., McLaughlin, L., Mitchell, E., Ferrera, C., Liska, S., Myers, R., ... & Shriver, M. K. (2011). Performance evaluation of the Bio-Rad Laboratories GS HIV Combo Ag/Ab EIA, a 4th generation HIV assay for the simultaneous detection of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1 (groups M and O) and HIV-2 in human serum or plasma. *Journal of Clinical Virology*, *52*, S57-S61.
48. Gray, E. R., Bain, R., Varsaneux, O., Peeling, R. W., Stevens, M. M., & McKendry, R. A. (2018). p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis. *AIDS (London, England)*, *32*(15), 2089.
49. Tucker, M. (2015, July 23). FDA Approves First Assay That Differentiates HIV Types. <https://www.medscape.com/viewarticle/848576>
50. Newell, M. L., Coovadia, H., Cortina-Borja, M., Rollins, N., Gaillard, P., & Dabis, F. (2004). Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *The Lancet*, *364*(9441), 1236-1243.
51. Celletti, F., Sherman, G., & Mazanderani, A. H. (2017). Early infant diagnosis of HIV: review of current and innovative practices. *Current Opinion in HIV and AIDS*, *12*(2), 112-116.
52. Branson, B. M. (2007). State of the art for diagnosis of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, *45*(Supplement\_4), S221-S225.
53. Alexander, T. S. (2016). Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. *Clinical and Vaccine Immunology*, *23*(4), 249-253.
54. Carlson, J. R., Yee, J., Hinrichs, S. H., Bryant, M. L., Gardner, M. B., & Pedersen, N. C. (1987). Comparison of indirect immunofluorescence and Western blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies. *Journal of clinical microbiology*, *25*(3), 494-497.
55. Papadopoulos-Eleopoulos, E., Turner, V. F., & Papadimitriou, J. M. (1993). Is a positive western blot proof of HIV infection? *Biotechnology*, *11*(6), 696-707.
56. Montesinos, I., Eykmans, J., & Delforge, M. L. (2014). Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 test as a confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology*, *60*(4), 399-401.
57. McPhee, C. F., Álvarez, P., Prieto, L., Obiang, J., Avedillo, P., Vargas, A., ... & Holguín, A. (2015). HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. *Journal of Clinical Virology*, *63*, 66-69.

58. Wong, C. C., Lim, S. H., Tan, C. T., Lui, S. Y., Lee, Y. L., & Chan, K. P. (2018). Performance of the HIV Blot 2.2, INNO-LIA HIV I/II score, and Geenius HIV 1/2 confirmatory assay for use in HIV confirmation. *PLoS One*, *13*(6), e0199502.
59. Centers for Disease Control and Prevention. (2022, March 28). HIV Guidelines. <https://www.cdc.gov/hiv/guidelines/index.html>
60. World Health Organization. (2020). Consolidated guidelines on HIV testing services, 2019: web annex H. Considerations for monitoring HIV testing services programmes.
61. European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). Public health guidance on HIV, hepatitis B and C testing in the EU/EEA: An integrated approach. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/public-health-guidance-hiv-hepatitis-b-and-c-testing-eueea>
62. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. (2020). Κατευθυντήριες Οδηγίες, Αρχές και μεθοδολογία για την εργαστηριακή διάγνωση της HIV λοίμωξης. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/10/arxes-method-erg-diag-hiv.pdf>
63. Owens, D. K., Davidson, K. W., Krist, A. H., Barry, M. J., Cabana, M., Caughey, A. B., ... & US Preventive Services Task Force. (2019). Screening for HIV infection: US preventive services task force recommendation statement. *Jama*, *321*(23), 2326-2336.
64. Helbert, M., & Breuer, J. (2000). Monitoring patients with HIV disease. *Journal of clinical pathology*, *53*(4), 266-272.
65. Ceffa, S., Luhanga, R., Andreotti, M., Brambilla, D., Erba, F., Jere, H., ... & Marazzi, M. C. (2016). Comparison of the Cepheid GeneXpert and Abbott M2000 HIV-1 real time molecular assays for monitoring HIV-1 viral load and detecting HIV-1 infection. *Journal of virological methods*, *229*, 35-39.
66. Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Van Lunzen, J., ... & PARTNER Study Group. (2016). Sexual activity without condoms and risk of HIV transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. *Jama*, *316*(2), 171-181.
67. Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Degen, O., ... & Pechenot, V. (2019). Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study. *The Lancet*, *393*(10189), 2428-2438.
68. World Health Organization. (2013, June 1). Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach, 2nd edition. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549684>
69. Radix, M. D., Rodrigues, J., Hoffmann, C. J., Charles, J., & Gonzalez, M. D. (2022). Virologic and Immunologic Monitoring in HIV Care. *MEDICAL CARE*, *2*.
70. Haubrich, R. H., Riddler, S. A., Ribaud, H., DiRenzo, G., Klingman, K. L., Garren, K. W., ... & AIDS Clinical Trials Group. (2011). Initial viral decay to assess the relative antiretroviral potency of protease inhibitor-sparing, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing, and nucleoside reverse transcriptase inhibitor-sparing regimens for first-line therapy of HIV infection. *AIDS*, *25*(18), 2269-2278.
71. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης HIV/AIDS. (2022). Ετήσια Επιδημιολογική Έκθεση για τον αρχικό έλεγχο και τη διάγνωση του HIV για το έτος 2021. <https://eody.gov.gr/disease/aids/>

72. Ρέστα, Π., Κοτσιανοπούλου Μ., Ανδρουτσοπούλου Μαρία., Μίλαϊ Κ., Πρόκτερ Κ., Τζανακάκη Τ. & Μπελούκας Α. (2022). Νέες HIV Λοιμώξεις Κατά Τη Διάρκεια Του Τελευταίου Έτους Στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος. *10η Πανελλήνια Συνάντηση AIDS, Ηπατίτιδες & Αναδυόμενα Νοσήματα*.
73. Πρόκτερ Κ., Ρέστα, Π., Κοτσιανοπούλου Μ., Τζανακάκη Τ. & Μπελούκας Α. (2022). Επιδημιολογικά Χαρακτηριστικά Νέων Διαγνώσεων Και Επιτήρηση Μεταδιδόμενης Αντοχής: Δεδομένα Του Εθνικού Κέντρου Αναφοράς AIDS Νοτίου Ελλάδος (ΕΚΑΑΝΕ) Για Το 2022. *34ο Πανελλήνιο Συνέδριο AIDS*.
74. Roussos, S., Paraskevis, D., Psychogiou, M., Kostaki, E. G., Flountzi, E., Angelopoulos, T., ... & Sypsa, V. (2022). Ongoing HIV transmission following a large outbreak among people who inject drugs in Athens, Greece (2014–20). *Addiction*, *117*(6), 1670-1682.
75. European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. (2022, November 30). HIV/AIDS surveillance in Europe 2022 – 2021 data. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/hiv-aids-joint-report-surveillance-2021-data>

# Παράρτημα

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b>	Χάρτης με τον εκτιμώμενο αριθμό των ανθρώπων (όλων των ηλικιών) που ζούσαν με τον HIV έως το τέλος του 2021 σε κάθε χώρα.
<b>Εικόνα 2:</b>	Σχηματική αναπαράσταση του HIV-1.
<b>Εικόνα 3:</b>	Τα δομικά, ρυθμιστικά και βοηθητικά γονίδια που περιλαμβάνονται στο γονιδίωμα του HIV. Οι κωδικοποιούσες πρωτεΐνες και η λειτουργία τους.
<b>Εικόνα 4:</b>	Ο κύκλος ζωής του HIV-1.
<b>Εικόνα 5:</b>	Τα τελευταία στάδια αναπαραγωγής του HIV-1.
<b>Εικόνα 6:</b>	Διαγραμματική απεικόνιση των διακριτών φάσεων της πρώιμης HIV-1 λοίμωξης.
<b>Εικόνα 7:</b>	Σταθερό ικό φορτίο κατά την λανθάνουσα φάση της HIV-1 λοίμωξης.
<b>Εικόνα 8:</b>	Κατηγοριοποίηση της HIV-1 λοίμωξης σε στάδια I, II, III,IV, V και VI κατά Fiebig.
<b>Εικόνα 9:</b>	Αρχή μεθόδου της έμμεσης ELISA 1 <sup>ης</sup> γενιάς για την ανίχνευση IgG στη διάγνωση της HIV-1 λοίμωξης.
<b>Εικόνα 10:</b>	Αρχή μεθόδου της έμμεσης ELISA 2 <sup>ης</sup> γενιάς για την ανίχνευση IgG στη διάγνωση της HIV-1 και HIV-2 λοίμωξης.
<b>Εικόνα 11:</b>	Αρχή μεθόδου της ELISA 3 <sup>ης</sup> γενιάς, τύπου sandwich, για την ανίχνευση IgG και IgM στην διάγνωση της HIV λοίμωξης.
<b>Εικόνα 12:</b>	Αρχή μεθόδου της ELISA 4 <sup>ης</sup> γενιάς, τύπου sandwich, για την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgG & IgM αντισωμάτων και του p24 αντιγόνου στην διάγνωση της HIV λοίμωξης.



<b>Εικόνα 13:</b>	Τα δυο διαγνωστικά «παράθυρα» της HIV-1 λοίμωξης, που ευθύνονται για την υπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.
<b>Εικόνα 14:</b>	Λωρίδες Western blot.
<b>Εικόνα 15:</b>	Η κασέτα Geenius.
<b>Εικόνα 16:</b>	Αλγόριθμος του CDC για την διάγνωση της HIV λοίμωξης.
<b>Εικόνα 17:</b>	Αλγόριθμος του ΠΟΥ για την διάγνωση της HIV λοίμωξης.
<b>Εικόνα 18:</b>	Αλγόριθμος του ΠΟΥ για την εργαστηριακή διάγνωση και παρακολούθηση της λοίμωξης σε βρέφη.
<b>Εικόνα 19:</b>	Σχηματική απεικόνιση των βιολογικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται με την μέθοδο <i>GS HIV-1/2 Ag/Ab</i> της Bio-Rad.
<b>Εικόνα 20:</b>	Λωρίδα με θετικό ορό ελέγχου του kit <i>New Lav Blot I</i> .
<b>Εικόνα 21:</b>	1) Θερμικός Κυκλοποιητής GeneXpert GX-IV Instrument, 2) Σαρωτής γραμμικού κώδικα, 3) Φορητός ηλεκτρονικός υπολογιστής με το λογισμικό GeneXpert® Dx, 4) Δοχείο ανάλυσης GeneXpert.
<b>Εικόνα 22:</b>	Εικονική αναπαράσταση της θερμικής κυκλοποίησης με αύξηση και μείωση της θερμοκρασίας για την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου cDNA, τον υβριδισμό και την επιμήκυνση των εκκινητών με σκοπό την σύνθεση νέας αλυσίδας DNA.
<b>Εικόνα 23:</b>	Α)Καμπύλη ανάπτυξης Real-time RT-PCR, Β) Θετικό αποτέλεσμα ως προς την ανίχνευση HIV-1 RNA με Real-time RT-PCR, Γ) Θετικό αποτέλεσμα, μη ποσοτικοποιήσιμο και Δ) Αρνητικό αποτέλεσμα - μη ανιχνεύσιμο HIV-1 RNA.
<b>Εικόνα 24:</b>	Χάρτης νέων διαγνώσεων ανά 100.000 στην Ευρώπη το 2021 (ECDC).

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b>	Σύνοψη των παγκόσμιων επιδημιολογικών δεδομένων του 2021, σχετικά με το σύνολο των ανθρώπων που ζουν με τον HIV, τον αριθμό αυτών που μολύνθηκαν το 2021 και τους HIV-σχετιζόμενους θανάτους.
<b>Πίνακας 2:</b>	Λογαριθμική αποτύπωση του αριθμού αντιγράφων του ιικού RNA.
<b>Πίνακας 3:</b>	Εκτίμηση της ισχύος της αντίδρασης του kit RecomLine HIV-1/2 IgG ανάλογα την ένταση χρώματος της κάθε ζώνης.
<b>Πίνακας 4:</b>	Δεδομένα των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο EKAANE (EKAANE, 2022).

## Κατάλογος Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1:</b>	Γεωγραφική κατανομή των νέων λοιμώξεων του 2021.
<b>Γράφημα 2:</b>	Αναπαράσταση του αριθμού των ατόμων (όλων των ηλικιών) που ζουν με τον HIV από το 1990 έως το 2021.
<b>Γράφημα 3:</b>	Αναπαράσταση του αριθμού των παγκόσμιων HIV-σχετιζόμενων θανάτων (όλων των ηλικιών) από το 1990 έως το 2021.
<b>Γράφημα 4:</b>	Αποτελέσματα συνολικών εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 στο EKAANE, 2022.
<b>Γράφημα 5:</b>	Μηνιαία θετικά, αρνητικά και ακαθόριστα αποτελέσματα των εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 6:</b>	Συνολικά αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 και συνολικά θετικά αποτελέσματα (νέες διαγνώσεις) (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 7:</b>	Μηνιαίο σύνολο εργαστηριακών εξετάσεων ανίχνευσης HIV-1 και νέες διαγνώσεις στο (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 8:</b>	Κατανομή των νέων διαγνώσεων ανάλογα την εργαστηριακή εξέταση επιβεβαίωσης που χρησιμοποιήθηκε (EKAANE, 2022).



<b>Γράφημα 9:</b>	Κατανομή των ακαθόριστων αποτελεσμάτων ανάλογα την εργαστηριακή εξέταση επιβεβαίωσης που χρησιμοποιήθηκε (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 10:</b>	Κατανομή των νέων διαγνώσεων στις περιοχές της Ελλάδας (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 11:</b>	Καταγωγή των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 12:</b>	Εθνικότητες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων Ευρωπαϊκής και Αφρικανικής καταγωγής (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 13:</b>	Εθνικότητες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων Ασιατικής και Αμερικανικής καταγωγής (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 14:</b>	Φύλο νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 15:</b>	Ηλικιακές ομάδες νεοδιαγνωσθέντων ατόμων (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 16:</b>	Λόγοι εξέτασης για HIV-1 λοίμωξη (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 17:</b>	Πιθανός τρόπος μετάδοσης HIV-1 (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 18:</b>	Συνολικές εξετάσεις μοριακού ελέγχου για ανίχνευση του HIV-1 RNA που αφορούν είτε πρώτη μέτρηση ιικού φορτίου είτε εργαστηριακή παρακολούθηση (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 19:</b>	Αποτελέσματα εξετάσεων εργαστηριακής παρακολούθησης στην Αττική, την Πάτρα και την Κρήτη (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 20:</b>	Συνολικές εξετάσεις πρώτης μέτρησης ιικού φορτίου και περιπτώσεις που η διάγνωση των ατόμων έγινε στο EKAANE (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 21:</b>	Χρονικό διάστημα μεταξύ διάγνωσης και 1ης μέτρησης ιικού φορτίου (EKAANE, 2022).
<b>Γράφημα 22:</b>	Φύλο των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο EKAANE (EKAANE, 2022).

<b>Γράφημα 23:</b>	Καταγωγή των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).
<b>Γράφημα 24:</b>	Ηλικιακές ομάδες των ατόμων που η διάγνωση και η 1η μέτρηση του ιικού τους φορτίου έγινε στο ΕΚΑΑΝΕ (ΕΚΑΑΝΕ, 2022).
<b>Γράφημα 25:</b>	Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων στην Ελλάδα κατά το διάστημα 2012-2022 (ΕΟΔΥ).
<b>Γράφημα 26:</b>	Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων στην Ευρώπη κατά το διάστημα 2012-2021 (ECDC).
<b>Γράφημα 27:</b>	Αριθμός των ετήσιων νέων HIV λοιμώξεων, με βάση τον τρόπο μετάδοσης, στην Ευρώπη κατά το διάστημα 2012-2021 (ECDC).