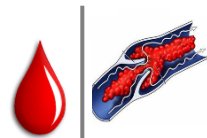




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΘΡΟΜΒΩΣΗ – ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΑ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΤΤΙΣΕΩΝ

Διπλωματική Εργασία

«Επιπολασμός της HTLV λοίμωξης σε Έλληνες αιμοδότες.

Διερεύνηση πολιτικής ελέγχου»

ΟΝΟΜΑ: Μηλαίου Αγγελική

Αριθμός Μητρώου: 20171028

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ : Πολίτου Μαριάννα

Περίληψη

Η ανακάλυψη και συσχέτιση των ρετροϊών με την ανάπτυξη όγκων αναφέρεται για πρώτη φορά το 1908 από τους Ellerman και Bang, οι οποίοι περιγράφουν την λευχαιμία των πουλερικών (ALV). Έκτοτε, ακολούθησαν εκτεταμένες έρευνες όπου αποδεικνύεται η αιτιολογική τους σχέση με την πρόκληση λευχαιμίας/λεμφώματος στα ζώα. Το 1980 απομονώνεται ο T-λεμφοτρόπος ιός ανθρώπου τύπου I (HTLV I), ο πρώτος παθογόνος ανθρώπινος ρετροϊός από τους Poiesz και Gallo, ο οποίος προκαλεί T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία ενηλίκων (ATL) και μυελοπάθεια/τροπική σπαστική παραπάρεση (HAM/TSP). Δυο χρόνια αργότερα, απομονώνεται από την ίδια ομάδα ερευνητών ο HTLV II ο οποίος συνδέεται με νευρολογικές ασθένειες και χρόνιες φλεγμονώδεις αρθροπάθειες. Η μόλυνση από HTLV παραμένει δια βίου και το 95% των μολυσμένων ατόμων παραμένουν ασυμπτωματικά.

Η μετάδοση του ιού γίνεται με μετάγγιση μολυσμένου αίματος, με σεξουαλική επαφή καθώς και από τη μητέρα στο παιδί κυρίως μέσω του θηλασμού. Ο επιπολασμός του είναι πολύπλοκος με ευρεία γεωγραφική κατανομή, ενδημεί στην Ιαπωνία, στην Καραϊβική, στην Αφρική, στην Κεντρική και Νότια Αμερική, στην Αυστραλία-Μελανησία και στη Ρουμανία. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το Δελτίο 2017 του Υπουργείου Υγείας, ο επιπολασμός του HTLV στην χώρα το 2011 ήταν 0,001%. Οι κύριες ορολογικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για ανίχνευση αντισωμάτων κατά HTLV I/II είναι, ανοσοενζυμικής τεχνικής και ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας ενώ οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες επί επαναλαμβανόμενα θετικού αποτελέσματος περιλαμβάνουν κυρίως ανοσολογική δοκιμασία αποτυπώματος. Σε απροσδιόριστα αποτελέσματα διενεργείται μοριακή εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η μοριακή μελέτη μπορεί να προσδιορίσει τον τύπο του HTLV, παρέχει ενισχυμένο προϊκό DNA για αναλύσεις αλληλουχίας και βοηθάει στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών που σχετίζονται με τον ιό.

Στο χρονικό διάστημα της παρούσας μελέτης, από τον Ιανουάριο έως και το Δεκέμβριο 2019, ελέγχθηκαν στο Κέντρο Αίματος του Ε.ΚΕ.Α, με βάση τον αλγόριθμο του ΚΕΣΥ (Κεντρικό Συμβούλιο Υγείας), 277.541 μονάδες αίματος με τη χρήση δυο διαφορετικών μεθόδων μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (CMIA). Συγκεκριμένα, με τον αναλυτή Alinity s (Abbott) 159.536 δείγματα και με τον αναλυτή PRISM nEXT (Abbott) 118.005 δείγματα. Η διερεύνηση των κριτηρίων καταλληλότητας των δυο μεθόδων ελέγχου έδειξε ότι παρουσιάζουν μεγάλη ακρίβεια, ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99,94%. Δείγματα που βρέθηκαν επαναλαμβανόμενα θετικά ελέγχθηκαν με επιβεβαιωτική δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης INNO-LIA HTLV I/II Score

(Fujirebio). Από τον έλεγχο βρέθηκαν 187/277.541 αρχικά αντιδρώντα δείγματα. Από αυτά τα 163/277.541 (0,06%) δείγματα, βρέθηκαν επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα για HTLV I/II αντισώματα και συγκεκριμένα 76/118.005 με τον αναλυτή Prism nEXT και 87/159.536 με τον αναλυτή Alinity s. Τα 163 επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα δείγματα εξετάσθηκαν και με τις δυο μεθόδους και μόνο 7/163 βρέθηκαν αντιδρώντα και με τις δυο μεθόδους χημειοφωταύγειας ενώ 66 από τα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα δείγματα εξετάσθηκαν με τη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης σε ζώνες INNO-LIA όπου μόνο 2 επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για HTLV I και 1 δείγμα παρέμεινε απροσδιόριστο. Κανένα από τα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα δείγματα, στη μια μόνο από τις δυο μεθόδους χημειοφωταύγειας, δεν επιβεβαιώθηκε θετικό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ο επιπολασμός του HTLV I/II υπολογίζεται σε 0,0007% και εκτιμάται ότι είναι ιδιαίτερα χαμηλός μεταξύ των αιμοδοτών στην Ελλάδα και προφανώς η μετάδοση του ιού μέσω της μετάγγισης εξαιρετικά σπάνια. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τον HTLV I/II έχουν σημαντικές επιπτώσεις τόσο για τους δότες όσο και για τα κέντρα αίματος. Οι αιμοδότες αποκλείονται οριστικά από τη δωρεά ακυρώνοντας έτσι μια πιθανή μελλοντική επανένταξή τους ενώ οι υπηρεσίες αιμοδοσίας επιβαρύνονται με οικονομικό κόστος και απώλεια μονάδων αίματος. Προτείνεται λοιπόν, η αναθεώρηση του αλγόριθμου προς την κατεύθυνση του ελέγχου των αιμοδοτών πρώτης φοράς και ταυτόχρονα με τις κατάλληλες προϋποθέσεις να είναι εφικτή η επανείσοδος των αποκλεισμένων αιμοδοτών, με σκοπό τη διατήρηση του αριθμού των εθελοντών και την μείωση του κινδύνου λοιμώξεων από μετάγγιση.

Λέξεις κλειδιά: T-λεμφοτρόπος ιός ανθρώπου, επιπολασμός HTLV, Έλληνες αιμοδότες, εργαστηριακός έλεγχος HTLV, μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (CMIA), δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης

Summary

The discovery and the correlation of the retroviruses with the development of tumours is referred for the first time in 1908 by Ellerman and Bank, who describe the leukemia of poultry (ALV). Extensive researches have been done since then which prove their explanatory relation with the cause of leukemia/lymphoma in the animals. In 1980 Human T-cell leukemia virus type 1 - HTLV I, the first pathogenic human retrovirus which causes adult T – cell leukemia/lymphoma (ATL) and neurological disease myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), is isolated by Poizer and Gallo. HTLV II which is related to neurological diseases and chronic inflammatory arthropathy, was isolated by the same team of researchers two years later. The virus infection HTLV remains for life and 95% of infected people remains without symptoms.

The virus is spread by blood transfusions, sexual contact as well as from mother to child during breastfeeding. Its prevalence is complicated with a wide geographic allocation, it is endemic in Japan, the Caribbean, in Africa, in the central and south America, in Australia – Melanesia and in Romania. In Greece, according to the note 2017 of the Ministry of Health, the prevalence of the HTLV virus in the country in 2011 was 0.001%. The main serological testing which is used for detecting antibodies against HTLV I/II, are enzyme-linked immunoassay and immunoassay chemiluminescence while the confirmatory tests of the repeatedly reactive samples include line immunoassay. Molecular test of Polymerase Chain Reactions (PCR) being conducted in indeterminate results. The molecular study which can define the pattern of HTLV, offers enhanced proviral DNA for sequence analysis and helps with the diagnosis and observation of diseases related to the virus.

From January to December 2019, 277.541 blood units in total were checked in the Nation Centre of Blood (E.KE.A) on the basis of algorithm of Centre Council of Health during the current study with the use of two different methods chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) technology. Specifically, were checked 159.536 samples with Alinity s (Abbott) and 118.005 samples with PRISM nEXT (Abbott). The examination of the criteria of suitability of both methods showed that they have great accuracy, sensitivity 100% and specificity 99,94%. The samples which were found repeated reactive were confirmed with a Line

Immunoassay the INNO-LIA HTLV I/II Score (Fujirebio). The initial reactive (IR) samples found, were 187/277.541 the 163/277.541 (0,06%) samples were repeated reactive (RR) samples for HTLV I/II antibodies and precisely 76/118.005 with Prism nEXT and 87/159.536 for Alinity s. From 163 repeated reactive (RR) samples were examined with both of these methods only 7/163 were found reactive with the two methods. Also, 66/163 RR samples were examined with Line Immunoassay INNO-LIA and only two of them were confirmed as positive for HTLV I while one sample remains indeterminate for HTLV antibodies. None of the repeated reactive samples, in only one of the two methods chemiluminescent microparticle immunoassay, was confirmed.

According to the results of the present task, the prevalence of HTLV I/II is estimated in 0,007% and considered to be fairly low among the blood donors in Greece and probably the infection of the virus through blood transfusion is immensely rare. The false positive results about HTLV I/II have important effects not only on the donors but also on the blood centers. The blood donors are excluded definitely from the blood donation, annullating in this way, a possible future reintegration while services of blood donation are charged with a great deal of money and loss of blood units. So, it is suggested the algorithm should be reconsidered as far as first time blood donators are concerned, and at the same time under proper preconditions, the excluded blood donators can have reentry to blood donation. As a result, the number of volunteers blood donators will be remained and the risk of blood transfusion infection will be decreased.

Key Words: Human T-cell leukemia virus, prevalence HTLV, Greek blood donors, screening tests for HTLV, chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), Line Immunoassay

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της. Ευχαριστώ τον υπεύθυνο του εργαστηρίου ορολογικού ελέγχου του ΕΚΕΑ κ. Ζευγώλη Βασίλη για την πολύτιμη καθοδήγηση του, τις σημαντικές υποδείξεις του, το αμείωτο ενδιαφέρον του και τη συμπαράστασή που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Ευχαριστώ τον επιστημονικό Διευθυντή του ΕΚΕΑ κ. Σταμούλη Κωνσταντίνο για την υποστήριξή του και την ενθάρρυνση που μου έδωσε, καθώς επίσης και όσους συναδέλφους μου στο εργαστήριο ορολογικού ελέγχου βοήθησαν όποτε χρειάστηκε.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας κ. Πολίτου Μαριάννα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την επιστημονική της καθοδήγηση και τις εποικοδομητικές της υποδείξεις καθώς και την άριστη συνεργασία που υπήρξε για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τις κόρες μου Κατερίνα και Μελίνα για την κατανόηση και την υπομονή που έδειξαν.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	9
1.1 Γενικά για τους ρετροϊούς	9
1.2 Μοριακή οργάνωση ρετροϊών	11
1.3 Κύκλος ζωής ρετροϊού	13
1.4 Ενδογενείς και εξωγενείς ρετροϊοί	14
2. HTLV I/II	16
2. Τ-λεμφοτρόπος ιός ανθρώπου HTLV I/II	17
2.1 HTLV I	20
2.2 HTLV II	24
3. Τρόποι μόλυνσης και μετάδοσης του ιού	25
4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	28
4.1 Μοριακή επιδημιολογία	28
4.2 Γεωγραφική επιδημιολογία	29
4.3 Επιπολασμός HTLV I/II στον Ελληνικό πληθυσμό	34
5. Εργαστηριακός έλεγχος	38
5.1 Ορολογικές και Μοριακές μέθοδοι μελέτης anti-HTLV I/II	38
5.2 Ερμηνεία αποτελεσμάτων και κριτήρια θετικότητας ενός δείγματος	39
6. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
6.1 Οργάνωση του Εργαστηρίου Ορολογικού Ελέγχου του Κέντρου Αίματος του Ε.ΚΕ.Α	45
6.2 Μέθοδοι ορολογικού ελέγχου	45

6.2.1 Βιολογικές αρχές της διαδικασίας του αναλυτή Alinity s (Abbott)	46
6.2.2 Βιολογικές αρχές της διαδικασίας του αναλυτή Prism nEXT (Abbott)	46
6.2.3 Βιολογικές αρχές της επιβεβαιωτικής διαδικασίας Ανοσοαποτύπωσης INNO-LIA HTLV I/II (Fujirebio)	47
6.3 Κριτήρια πλήρους επικύρωσης βιοαναλυτικών μεθόδων	49
6.3.1 Η ειδικότητα και η ευαισθησία	49
6.4 Σχήμα μεικτού τίτλου anti-HTLV I/II (Anti-HTLV Mixed Titer Panel (MTP)-BIOMEX	50
6.5 Έλεγχος ποιότητας (QC)	50
6.5.1 Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας	51
6.5.2 Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας	52
7.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
7.1 Επιλογή δειγμάτων και σχεδιασμός μελέτης	53
7.2 Αποτελέσματα με τη μέθοδο χημειοφωταύγειας	56
7.3 Ειδικότητα (specificity) μεθόδων χημειοφωταύγειας	62
7.4 Ευαισθησία (sensitivity) μεθόδων χημειοφωταύγειας	63
7.5 Μέτρηση της διασποράς των αρνητικών αποτελεσμάτων σε δείγματα ελέγχου για HTLV I/II με τους αναλυτές Alinity s και Prism nEXT	64
7.6 Αποτελέσματα με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης	66
8. Συζήτηση	68
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά για τους ρετροϊούς

Οι ρετροϊοί ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20ου αιώνα σε δύο έρευνες που αφορούσαν νεοπλασματικές ασθένειες σε πουλερικά. Το 1908, η ομάδα Δανών κτηνιάτρων Vilhelm Ellermann και Oluf Bang περιγράφουν μια μορφή λευχαιμίας που προσβάλλει τα κοτόπουλα, γνωστή πλέον ως ιός λευχαιμίας των πουλερικών ή ιός ALV.¹ Το 1911, ο Peyton Rous στο Ινστιτούτο Rockefeller της Νέας Υόρκης ανέφερε τη μετάδοση ενός σαρκώματος σε πουλερικά (Rous sarcoma virus),² ενώ, το 1950 απομονώθηκαν ρετροϊοί από ποντίκια με λευχαιμία.³ Στις δεκαετίες που ακολούθησαν, αποδεικνύεται η αιτιολογική σχέση των ρετροϊών με την πρόκληση λευχαιμίας/λεμφώματος σε είδη θηλαστικών όπως ποντίκια, γάτες, βοοειδή και πίθηκοι.⁴ Η οικογένεια των ρετροϊών (εξωγενής, Group VI [ss RNA-RT]) είχε ταξινομηθεί σε τρεις υποοικογένειες: Oncovirus, Lentivirus και Spumavirus οι οποίες διαχωρίζονται πλέον στις εξής δύο: Orthoretrovirinae που περιλαμβάνει έξι γένη και Spumaretrovirinae που περιλαμβάνει πέντε γένη.⁵ Εικόνα 1

Υποοικογένεια Orthoretrovirinae

Γένος Alpharetrovirus: ιός λευχαιμίας των πτηνών, ιός σαρκώματος Rous

Γένος Betaretrovirus: ιός μαστικού όγκου ποντικού

Γένος Gammaretrovirus: ιός λευχαιμίας ποντικού, ιός λευχαιμίας αιλουροειδών

Γένος Deltaretrovirus: ιός λευχαιμίας των βοοειδών, ανθρώπινος T-λεμφοτρόπος ιός

Γένος Epsilonretrovirus: ιός δερματικού σαρκώματος Walleye

Γένος Lentivirus: ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, Simianvirus, ιός ανοσολογικής ανεπάρκειας γάτας

Υποοικογένεια Spumaretrovirinae

Γένος Bovispumavirus: αφρώδης ιός βοοειδών

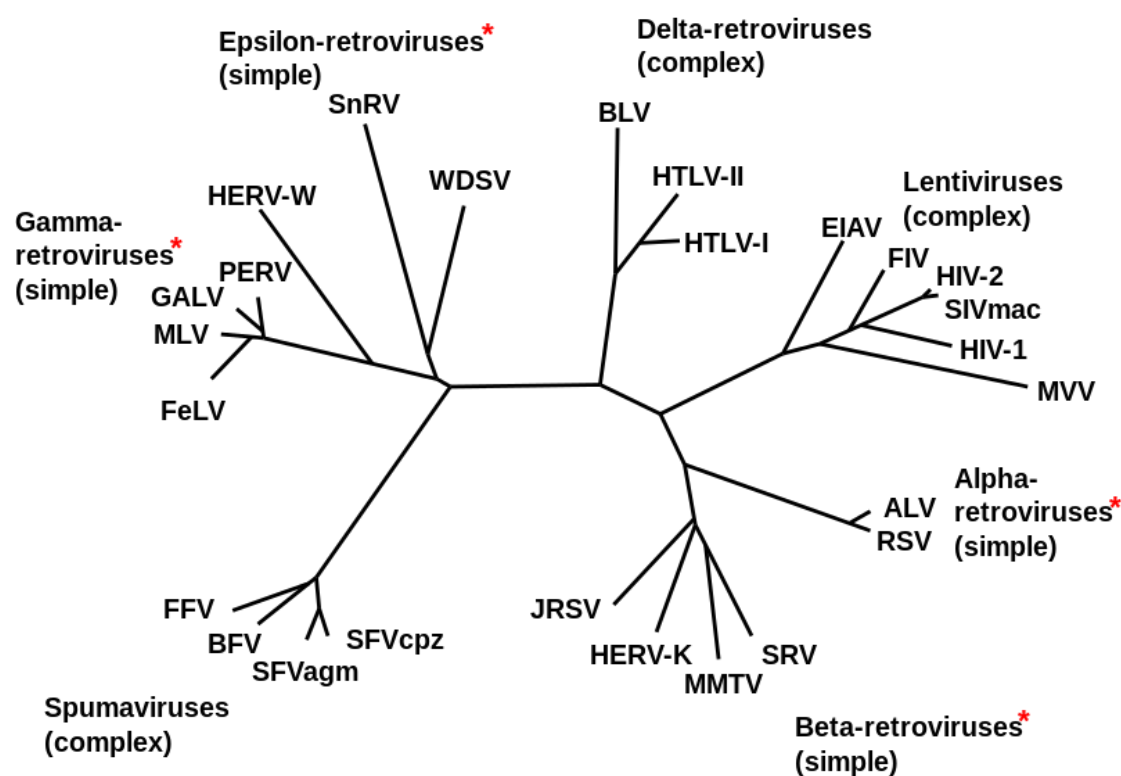
Γένος Equispumavirus: αφρώδης ιός ιπποειδών

Γένος Felispumavirus: αφρώδης ιός αιλουροειδών

Γένος Prosimiispumavirus: αφρώδης ιός λεμούριων

Γένος Simiispumavirus: αφρώδης ιός χιμπατζήδων

Οι ρετροϊοί, με βάση τους μορφολογικούς τους τύπους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διακρίνονται επίσης, ως τύπου Α, τύπου Β, τύπου C και τύπου D. Οι τύπου Α είναι ανώριμες ενδοκυτταρικές μορφές που προέρχονται από ενδογενή όμοια με ρετροϊό στοιχεία. Είναι ενδογενείς ιοί και ορισμένα είδη ζώων έχουν χιλιάδες αντίγραφα αυτών στο χρωμοσωμικό τους DNA. Η λειτουργία τους μας είναι άγνωστη. Οι τύπου Β υπάρχουν ως ενδογενείς και εξωγενείς ιοί σε μερικά ζώα και όταν εκφραστούν μπορούν να προκαλέσουν όγκους μαστού. Χαρακτηρίζονται από προεξέχουσες επιφανειακές πρωτεΐνες και πυκνό ακεντρικό νουκλεοκαψίδιο. Οι τύπου C σχηματίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή στο σημείο της εκβλάστησης. Τύπου C, αποτελούν την πλειοψηφία των ογκοϊών και των ενδογενών ιών. Τέλος, οι τύπου D σχετίζονται με όγκους στους πιθήκους και έχουν ενοχοποιηθεί για το AIDS των πιθήκων. Διαφέρουν από τους τύπου Β στην έλλειψη επιφανειακών πρωτεϊνών.⁶



Φυλογενετικότητα ρετροϊών

Τα γένη που περιλαμβάνουν ενδογενή γονιδιώματα σημειώνονται με έναν αστερίσκο

<https://www.slideshare.net/guestc0268e/retroviruses-compressed>

Εικόνα 1

1.2 Μοριακή οργάνωση ρετροϊών

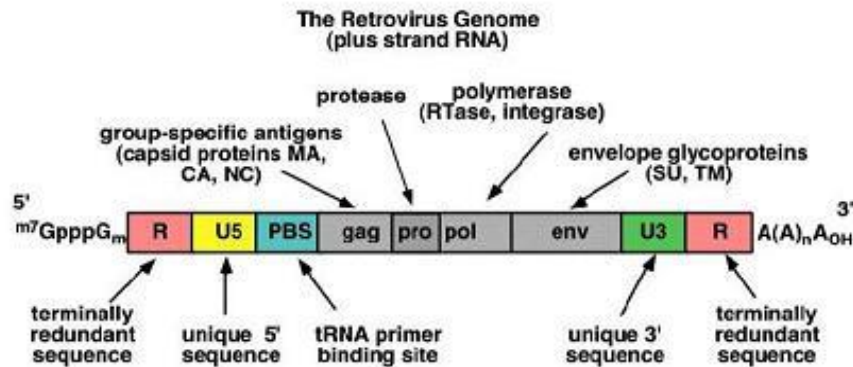
Τα ιοσωμάτια (virion, ολοκληρωμένο μολυσματικό σωματίδιο ενός ιού) των ρετροϊών αποτελούνται από επικαλυμμένα σωματίδια διαμέτρου 80-100nm και περιέχουν δυο πανομοιότυπα αντίγραφα μονής έλικας RNA, θετικής πολικότητας, μεγέθους 7-10 kilobases.⁷ Τα virions των διάφορων ρετροϊών δεν έχουν την ίδια μορφολογία ή βιολογία ωστόσο μοιάζουν αρκετά και μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά αποτελούμενα από:

- Τον ιϊκό φάκελο (**envelope**): αποτελείται από λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή, κατά την διάρκεια της εκβλάστησης καθώς και από γλυκοπρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το env γονίδιο. Ο φάκελος προστατεύει τον ιό από το εξωτερικό περιβάλλον μέσω της λιποπρωτεϊνικής διπλοστιβάδας, επιτρέπει την είσοδο/έξοδο στο κύτταρο ξενιστή λόγω διαπερατότητας της μεμβράνης και δίνει την ικανότητα στον ιό να εισέρχεται απευθείας στα κύτταρα.
- Το **καψίδιο**/κέλυφος: αποτελείται από πρωτεϊνικές ομάδες, καψομερή, σταθεροποιεί το ιοσωμάτιο και προστατεύει το γονιδίωμα από βλάβη.
- Το **RNA** (γονιδίωμα): αποτελείται από διμερές RNA. Τα LTR (long terminal repeats – LTRs, μακρές τελικές επαναλήψεις) υποδιαιρούνται σε τρεις περιοχές τις U3, R, και U5. Το άκρο 5' του LTR φέρει την καλύπτρα και περιλαμβάνει τέσσερις περιοχές, όπως θέση δέσμευσης εκκινητή και θέση/σήμα για τη συσκευασία του γονιδιώματος (PS). Η Packaging Sequence, επιτρέπει στο ιϊκό RNA να διαφοροποιείται από τα RNAs του κυττάρου ξενιστή. Το άκρο 3' φέρει την πολυαδενυλιωμένη ουρά και περιλαμβάνει τρεις περιοχές μεταξύ των οποίων θέση εκκινητή για σύνθεση DNA. Η περιοχή R (terminally redundant sequence) είναι μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία σε κάθε άκρο του γονιδιώματος που χρησιμοποιείται για την αντίστροφη μεταγραφή ώστε να διασφαλιστεί η σωστή μεταφορά από άκρη σε άκρη της αναπτυσσόμενης αλυσίδας, από το άκρο 5' ως το τερματικό άκρο 3'. Το γονιδίωμα RNA φέρει περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες βιρίοντος για έκφραση γονιδίων.

Εικόνα 2

- **Πρωτεΐνες** οι οποίες κωδικοποιούνται σε τομείς (γονίδια-κωδικοποιημένες πρωτεΐνες) που ονομάζονται gag, pol και env. Το γονίδιο **gag** (ομάδα ειδικού αντιγόνου) κωδικοποιεί τις νουκλεοπρωτεΐνες του πυρήνα και τα δομικά στοιχεία του ιϊκού καψιδίου (core). Το γονίδιο **pol** κωδικοποιεί την Reverse Transcriptase, (αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία έχει και δράση

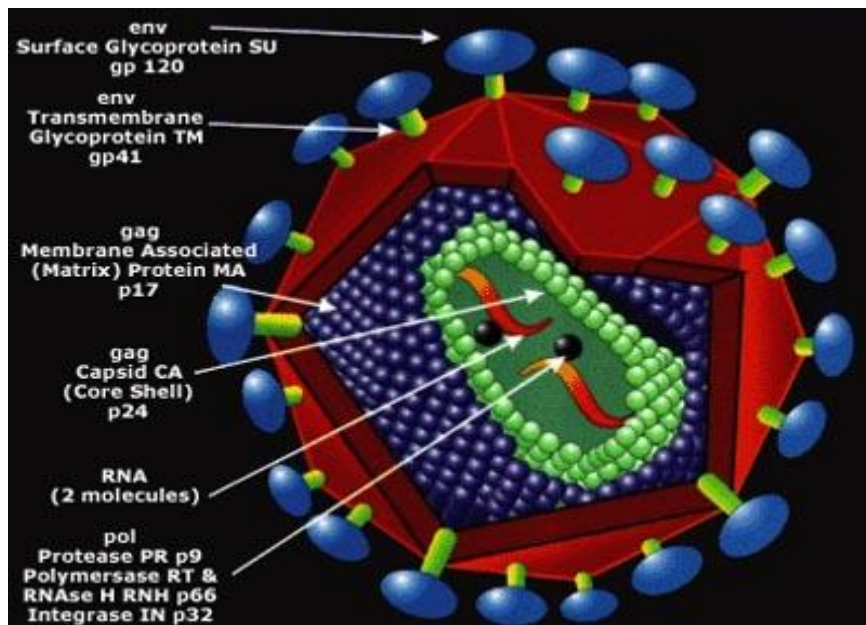
RNA πολυμεράσης) και την ιντεγκράση (ενσωμάτωση του ιϊκού DNA στο DNA του ξενιστή). Το γονίδιο **env** κωδικοποιεί τις γλυκοπρωτεΐνες του ιϊκού φακέλου. Ένα επιπλέον, μικρότερο γονίδιο που υπάρχει σε όλους τους ρετροϊούς είναι το **pro**, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεάση (PR) του ιού η οποία λειτουργεί κατά την διάρκεια της ωρίμασης του βιριόντος για να δημιουργήσει ώριμες πρωτεΐνες gag και pol.⁸⁻⁹ Εικόνα 3



Γονιδίωμα ρετροϊού (Μονή έλικα RNA)

<http://www.genetherapyreview.com/gene-transfer/retroviral-vector>

Εικόνα 2



3D απεικόνιση δομής ρετροϊού

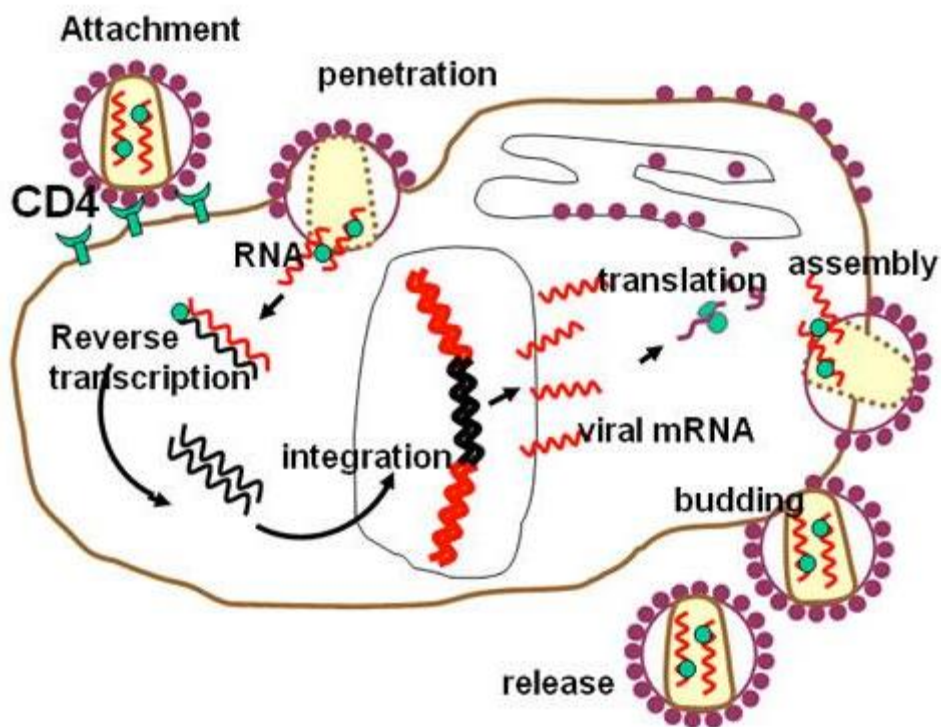
<https://web.stanford.edu>

Εικόνα 3

Το χαρακτηριστικό της οικογένειας των ρετροϊών είναι το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT) όπου δημιουργεί από το RNA του ιού διπλή έλικα DNA (dsDNA) και την επακόλουθη ενσωμάτωση (integration) του στο γονιδίωμα του ξενιστή. Από την **Reverse Transcriptase** προέρχεται και το όνομα των ιών αυτών. Με αυτή τη μορφή, γνωστή ως προ-ιός, τα γονίδια του ιού παραμένουν ενσωματωμένα στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή δια βίου. Διπλασιάζονται μαζί με το DNA του κυττάρου κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και έτσι, εφόσον εγκατασταθεί η λοίμωξη σε έναν οργανισμό διατηρείται εφ' όρου ζωής.¹⁰

1.3 Κύκλος ζωής ρετροϊού

Οι γλυκοπρωτεΐνες της μεμβράνης του ιϊκού φακέλου δεσμεύονται με την πρωτεΐνη υποδοχέα του κύτταρου ξενιστή. Μόλις συνδεθούν, η κυτταρική μεμβράνη αποικοδομείται, ο ιός γίνεται μέρος του κυττάρου ξενιστή και το μονόκλωνο RNA με τα ένζυμα εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα. Μέσα στο κύτταρο, η αντίστροφη μεταγραφάση δημιουργεί ένα συμπληρωματικό μονόκλωνο DNA από το RNA του ρετροϊού και το RNA αποικοδομείται. Αυτός ο κλώνος DNA είναι γνωστός ως cDNA. Το cDNA στη συνέχεια αντιγράφεται και το δίκλωνο DNA εισέρχεται στο πυρήνα. Από αυτή τη στιγμή το DNA ενσωματώνεται στο DNA του κυττάρου ξενιστή με τη βοήθεια της ιντεγκράσης. Αυτό το κύτταρο μπορεί να παραμείνει αδρανές ή το ιϊκό RNA να δημιουργήσει τις πρωτεΐνες για ένα νέο ρετροϊό. Ριβοσώματα χρησιμοποιούνται για τη μετάφραση του mRNA του ιού σε αλληλουχίες αμινοξέων οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε πρωτεΐνες μέσα στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και να κατασκευαστούν ιϊκά ένζυμα και πρωτεΐνες καψιδίου. Ιϊκό RNA θα κατασκευαστεί στον πυρήνα του κυττάρου. Όλα αυτά τα δομικά υλικά συγκροτούνται σε νέους ρετροϊούς οι οποίοι εξέρχονται από την κυτταρική μεμβράνη, ολοκληρώνοντας έτσι τον κύκλο αναδιπλασιασμού.¹¹⁻¹³ Εικόνα 4



Life cycle of a typical retrovirus

Κύκλος ζωής ρετροϊού

<http://www.virology.uct.ac.za/>

Εικόνα 4

1.4 Ενδογενείς και εξωγενείς ρετροϊοί

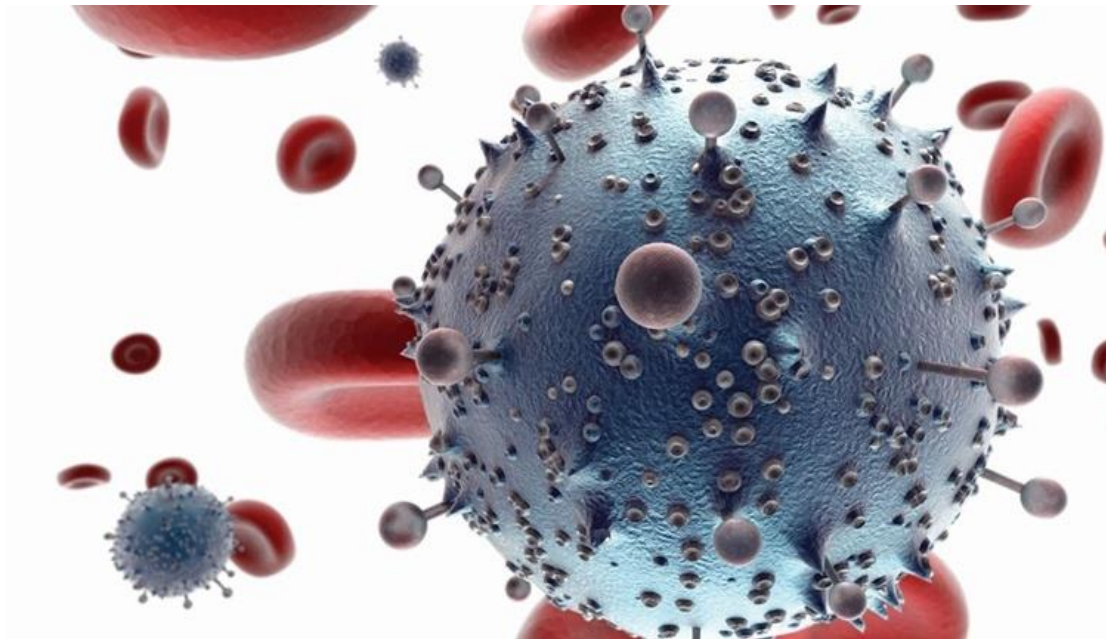
Οι άνθρωποι (όπως και σε άλλα σπονδυλωτά ζώα) έχουν, ανάλογα με τη δράση τους, δυο ειδών ρετροϊούς: **α. Ενδογενείς ρετροϊοί** - ως φυσιολογικά γενετικά στοιχεία του DNA που βρίσκονται σε αδρανή κατάσταση. Είναι δυνατόν όμως να ενεργοποιηθούν από διάφορους εξωτερικούς παράγοντες και να μεταδοθούν με τη μορφή προϊόν (κάθετη μετάδοση) και **β. Εξωγενείς ρετροϊοί**, π.χ. HIV και HTLV - ως οριζόντια μεταδιδόμενοι μολυσματικοί ιοί που περιέχουν RNA και μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο. Έχουν τη δυνατότητα να μετασχηματίζουν ή να καταστρέφουν τα κύτταρα που προσβάλλουν.

Οι ενδογενείς ρετροϊοί πιθανών εξελίχθηκαν από μεταθετά στοιχεία (τρανσποζόνια/transposable elements). Γενικά, στον άνθρωπο δεν είναι παθογόνοι και πολλοί από αυτούς δεν είναι πλήρεις ιοί. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 100-1000 αντίγραφα τέτοιων ιών και πολλά από αυτά έχουν γίνει ψευδογονίδια ή έχουν διάφορα ελαττώματα. Ωστόσο, μερικοί είναι πλήρεις ιοί και η έκφρασή τους έχει βρεθεί σε ορισμένα

αυτοάνοσα νοσήματα όπως στον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο και στο σύνδρομο Sjogren. Η έκφραση γονιδίου ενδογενούς ιού έχει επίσης παρατηρηθεί σε πλακούντα και σε αναπαραγωγικούς ιστούς χωρίς εμφανή παθολογία. Οι εξωγενείς, οριζόντια μεταδιδόμενοι ρετροϊοί είναι συνήθως παθογόνοι. Ασθένειες σε ζώα ή σε ανθρώπους που προκαλούνται ή σχετίζονται με τους εξωγενείς ρετροϊούς περιλαμβάνουν σαρκώματα ή λευχαιμίες ζώων, αρθρίτιδα-εγκεφαλίτιδα αιγοειδών, λευχαιμίες, ανθρώπινη τροπική σπαστική παραπάρεση, λευχαιμία T-κυττάρων ενηλίκων και AIDS. Οι Spumavirus δεν έχουν συνδεθεί οριστικά με ασθένειες στους ανθρώπους.¹⁴⁻¹⁵ Σήμερα, υπάρχουν 6 γνωστοί ανθρώπινοι ρετροϊοί: Ιός ανοσοανεπάρκειας (HIV1, HIV2) και T-λεμφοτρόπος ιός (HTLV I, HTLV II, HTLV III, HTLV IV).

Οι HTLV I και HTLV II είναι οι πιο καλά μελετημένοι υπότυποι του HTLV, η πλειονότητα των ανθρώπινων λοιμώξεων από HTLV αφορά τον τύπο HTLV I και λιγότερο τον τύπο HTLV II. Οι HTLV III και HTLV IV ταυτοποιήθηκαν το 2005 σε ορισμένους κυνηγούς στην κεντρική Αφρική, συγκεκριμένα σε οικισμούς που βρίσκονται σε δασικές περιοχές του Καμερούν και της Γκαμπόν. Δεν υπάρχει ακόμα συσχέτιση τους με παθολογία και οι γνώσεις μας για αυτούς τους δυο τύπους του HTLV είναι περιορισμένες.¹⁶ Η ανακάλυψη των HTLV III και HTLV IV σε ανθρώπους που κυνηγούν και σφαγιάζουν είδη πιθήκων υποδηλώνει ότι η μετάδοση μεταξύ ειδών εξακολουθεί να βρίσκεται σε εξέλιξη.¹⁷

2. HTLVII



<http://www.saude.al.gov.br/2019/10/25/%EF%BB%BFii-simposio-alagoano-de-htlv-esta-com-inscricoes-abertas/>

2. Τ-λεμφοτρόπος ιός ανθρώπου HTLV I/II

ssRNA-RT ιός με περίβλημα

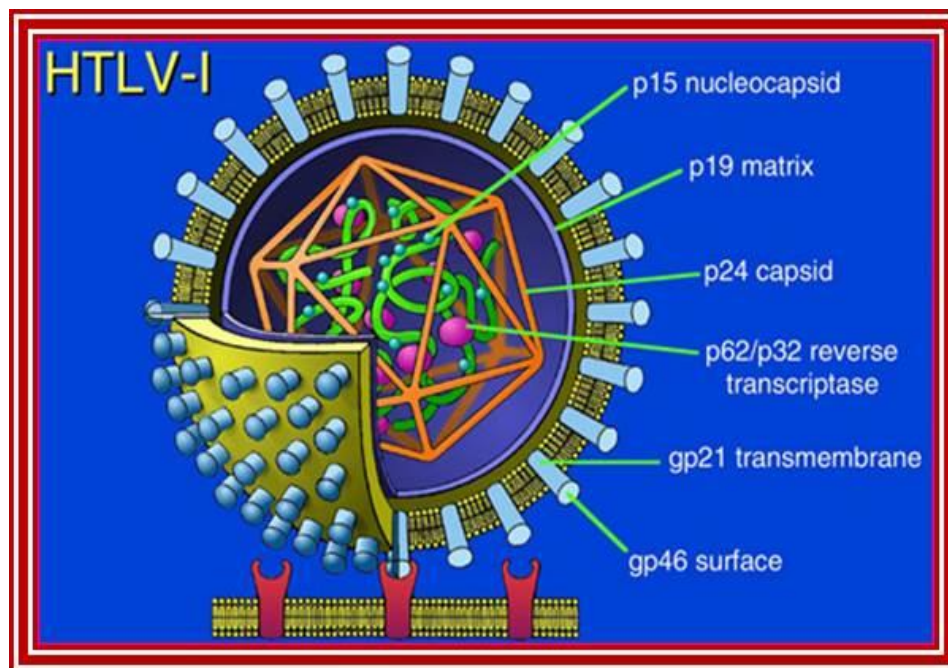
Οικογένεια: Retroviridae

Υποοικογένεια: Orthoretrovirinae

Γένος: Deltaretrovirus

Ο ιός λευχαιμίας Τ-κυττάρων ανθρώπων (HTLV) είναι RNA εξωγενής ρετροϊός, τύπου C, ογκογόνος, λεμφοτρόπος και νευροτρόπος.¹⁸ Προέρχεται από συγγενή ιό πιθήκων Τ-λεμφοκυττάρων STLV ο οποίος ενδημεί σε πολλά είδη πιθήκων και χιμπατζήδων του παλαιού κόσμου και θεωρείται ότι η μετάδοση μεταξύ των ειδών έγινε επί αρχαιοτάτων χρόνων.¹⁹ Τα κύρια και καλύτερα μελετημένα στελέχη του HTLV είναι τύπου I (HTLV I) και τύπου II (HTLV II) τα οποίοι έχουν στενή συγγένεια μεταξύ τους, περίπου 70% νουκλεοτιδική ομολογία και παρόμοια δομή γονιδιώματος. Ωστόσο, αποτελούν ξεχωριστούς ρετροϊούς που μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο στοχεύοντας στα Τ-λεμφοκύτταρα. Η γενετική διαφοροποίηση τους εμφανίζεται κυρίως στο γονίδιο *env*, το οποίο καθορίζει τους υπότυπους του HTLV.²⁰ Ο HTLV I έχει έξι υπότυπους (υπότυποι Α έως F)²¹ ενώ ο HTLV II έχει τέσσερις υπότυπους (υπότυποι Α έως D).²² Ωστόσο, δεν υπάρχει αναφερθείσα σύνδεση συγκεκριμένου υπότυπου HTLV I/II με συγκεκριμένη νόσο.²³

Τα HTLVs φέρουν έναν εξωτερικό, διπλής στιβάδας λιπιδικό/γλυκοπρωτεϊνικό σφαιρικό φάκελο (envelope) προερχόμενος από κύτταρα ξενιστή αλλά και από διαμεμβρανικές και επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες gp46, gp21, διαμέτρου 150-200 nm. Ο φάκελος αυτός περιβάλλει το πρωτεϊνικό εικοσαεδρικό καψίδιο (core) μέσα στο οποίο είναι συσκευασμένο το RNA. Το καψίδιο περιέχει αρκετά αντίγραφα της αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-ένζυμο μεταγραφής RNA σε DNA) δεσμευμένα σε δύο ταυτόσημα μονόκλωνα μόρια RNA. Το RNA είναι γραμμικό, μη κατακερματισμένο, θετικής πολικότητας κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του πυρήνα (*gag*), τις πρωτεΐνες του φακέλου (*env*), την αντίστροφη μεταγραφάση και την ιντεγκράση (*pol*), την πρωτεάση (*pro*) και τις ρυθμιστικές, μεταγραφικές πρωτεΐνες (*Tax*, *Rex*) οι οποίες είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Εικόνα 5



3D απεικόνιση δομής HTLV I

http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Genetic_RNA8A-Retroviruses_Introduction.htm

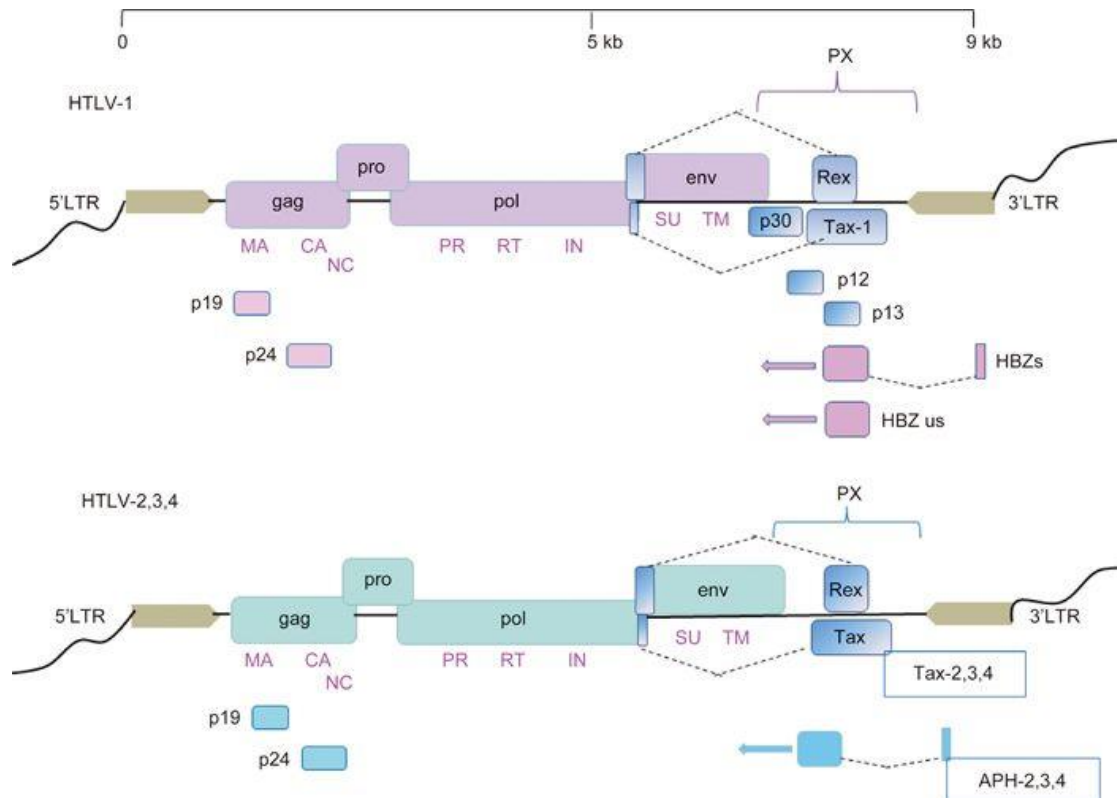
Εικόνα 5

Τα μήκη των πρωτογενών γονιδιωμάτων HTLV I και HTLV II είναι 9,0 και 8,9 kilobases αντίστοιχα, με μακρές τελικές επαναλήψεις (LTR) άκρο 5' καλύπτρα και άκρο 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά.²⁴ Τα LTR υποδιαιρούνται σε τρεις περιοχές (U3, R και U5) που περιέχουν στοιχεία που είναι απαραίτητα για την έκφραση των γονιδίων: θέσεις δέσμευσης αντίστροφης μεταγραφάσης, θέσεις έναρξης και τερματισμού μεταγραφής, θέσεις πολυαδενυλίωσης και mRNA. Η περιοχή pX, η οποία βρίσκεται μεταξύ του env γονιδίου και του άκρου 3'-LTR, περιέχει τουλάχιστον τέσσερα μερικώς επικαλυπτόμενα πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν βοηθητικές πρωτεΐνες (p12, p13, p30), τον μεταγραφικό ρυθμιστή Rex (ORF III) και τον τρανσενεργοποιητή Tax (ORF IV). Στο άρο 3'-LTR κωδικοποιείται και η πρωτεΐνη HBZ (Basic Zipper Factor). Οι πρωτεΐνες Tax και HBZ φαίνεται να έχουν ιδιαίτερα σημαντικούς ρόλους στην ιϊκή ανθεκτικότητα και παθογένεια. Στο άκρο 5'-LTR κωδικοποιούνται τα δομικά και ενζυμικά γονίδια (Gag, Pro, Pol και Env).²⁵ Η πρωτεΐνη Gag (ειδική για την ομάδα αντιγόνου) συντίθεται ως πρόδρομη πρωτεΐνη, με συμμετοχή της πρωτεάσης μέσα στις: πρωτεΐνη μήτρας-MA (Matrix Protein), πρωτεΐνη καψιδίου-CA (Capsid Protein) και πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου-NC (Nucleocapsid Protein). Η MA βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια της ιϊκής λιπιδικής μεμβράνης. Η CA είναι το κύριο δομικό στοιχείο του νουκλεοκαψιδίου, ενώ η NC συνδέεται με το γονιδίωμα του ιού και προάγει την αντίστροφη μεταγραφή. Η Pro είναι

ασπαρτυλική πρωτεάση που επεξεργάζεται τις Gag, Gag-Pro και Gag-Pro-Pol πρόδρομες πρωτεΐνες. Τα ρυθμιστικά και βοηθητικά γονίδια εκφράζονται στην περιοχή pX που βρίσκεται στο άκρο 3'- LTR του δομικού γονιδίου Επν. Η πρωτεΐνη Pol περιλαμβάνει την πολυμεράση, την αντίστροφη μεταγραφάση και την ιντεργκράση. Η γλυκοπρωτεΐνη Επν συντίθεται ως πρόδρομη πρωτεΐνη στο ενδοπλασματικό δίκτυο πάνω στην πρωτεΐνη επιφανείας-SU (Surface Protein) και την διαμεμβρανική πρωτεΐνη-TM (Transmembrane Protein). Οι πρωτεΐνες Επν σχηματίζουν ένα τριμερές στην επιφάνεια του ιϊκού σωματιδίου. Η πρωτεΐνη SU δεσμεύεται στον υποδοχέα του ιού και εν συνεχεία οι διαδοχικές αλλαγές του συμπλέγματος SU-TM οδηγούν στην σύντηξη της μεμβράνης του ιού με την κυτταρική μεμβράνη στόχου. Και οι δυο ιοί HTLV I/II χρησιμοποιούν την ρυθμιστική πρωτεΐνη Tax, για την μεταγραφή του ιϊκού γονιδιώματος (RNA), καθώς και την πρωτεΐνη Rex, που εξασφαλίζει την εξαγωγή του mRNAs ως ιϊκό γονιδίωμα για μελλοντικά βιρίονια και επίσης ως πηγή πρωτεϊνών.²⁶

Όταν το γονιδίωμα του ιού από μονόκλωνο RNA με τη βοήθεια της Reverse Transcriptase γίνεται δίκλωνο DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή (προ-ιός) και πολλαπλασιάζεται από κύτταρο σε κύτταρο. Για να αυξηθεί το ιϊκό φορτίο ο HTLV με τη συνεργασία των ιϊκών πρωτεϊνών Tax και Rex αλλάζει τον ανοσοφαινότυπο των μολυσμένων κυττάρων, επάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση ενώ αποφεύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή.²⁷ Επιπλέον, τα μολυσμένα κύτταρα μπορούν να εισέρχονται στο μητρικό γάλα και στο σπέρμα. Ως αποτέλεσμα, τα μολυσμένα κύτταρα επιβιώνουν, πολλαπλασιάζονται και διεισδύουν στους ιστούς προκαλώντας τη μετάδοση του. Η μόλυνση είτε με HTLV I είτε με HTLV II έχει αποδειχθεί ότι έχει ως αποτέλεσμα κλωνικό πολλαπλασιασμό T-κυττάρων. Ένας μολυσμένος με HTLV I ξενιστής έχει περίπου 28.000 κλώνους που κυκλοφορούν. Ο HTLV I μολύνει κυρίως τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα και ο HTLV II τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα, και οι δυο τύποι προκαλούν λοιμώξεις δια βίου αλλά διαφέρουν στις πιθανές κλινικές εκβάσεις τους.²⁸ Θεωρείται ότι οι δυο ιϊκές HTLV I πρωτεΐνες, Tax και HBZ, εμπλέκονται στην διαδικασία ογκογένεσης μέσω της κλωνικής επέκτασης. Η πρωτεΐνη Tax επάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση ενώ η πρωτεΐνη HBZ εκφράζεται συνεχώς σε όλα τα HTLV I μολυσμένα κύτταρα και πιστεύεται ότι είναι παράγοντας συντήρησης όγκου.²⁹

Εικόνα 6



Γονιδίωμα HTLV I/II/III/IV

<https://www.nature.com/articles/aps201717>

Εικόνα 6

2.1 HTLV I

Ο **HTLV I** είναι ο πρώτος παθογόνος ανθρώπινος ρετροϊός που ανακαλύφθηκε το 1980 από τον Poiesz και Gallo, σε έναν 28χρονο έγχρωμο άνδρα που έπασχε από λέμφωμα T-κυτταρικής σειράς.³⁰ Μολύνει κυρίως τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα και λιγότερο τα CD8⁺ T και B λεμφοκύτταρα.³¹ Προκαλεί T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία ενηλίκων (ATL/Adult T-cell Leukemia) και μυελοπάθεια/τροπική σπαστική παραπάρεση (HAM/TSP: Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis). Το 95% των ατόμων που μολύνονται παραμένουν ασυμπτωματικά. Συνήθως, υπάρχει μια περίοδο 2 με 5 δεκαετιών μετά την μόλυνση πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων.³²

Η **ATL** (T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία ενηλίκων) περιγράφεται πρώτη φορά το 1977 από τον Takatsukitou Πανεπιστημίου του Κιότο αγνώστου όμως αιτιολογίας.³³ Στη διάρκεια των ετών 1978-79 στις ΗΠΑ, οι ερευνητές κατάφεραν να απομονώσουν τον ιό από κακοήγη κύτταρα.³⁴

Η ATL είναι μια σπάνια και επιθετική νεοπλασία Τ-κυττάρων και αντιστοιχεί στο 1% - 5% μεταξύ των HTLV I φορέων (περίπου 2.1% των γυναικών και 6.6% των ανδρών).³⁵ Η νοτιοδυτική Ιαπωνία είναι η περιοχή με την υψηλότερη επικράτηση της λοίμωξης από HTLV I και την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της ATL στον κόσμο. Εκτιμάται ότι περίπου 1,2 εκατομμύρια άτομα έχουν μολυνθεί με HTLV I στην Ιαπωνία και η ετήσια συχνότητα εμφάνισης ATL είναι περίπου 700 άτομα. Σε μια εθνική έρευνα στην Ιαπωνία, η μέση ηλικία των ασθενών με ATL ήταν 57,6 έτη. Οι ασθενείς σε περιοχές εκτός Ιαπωνίας είναι κάπως νεότεροι, με μέση ηλικία τα 45 έτη.³⁶

Η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια σε παιδιά, γεγονός που υποδηλώνει μια μακρά περίοδο λανθάνουσας λοίμωξης.³⁷ Αυτό, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τα περισσότερα κρούσματα ATL, αν όχι όλα, αναπτύσσονται σε άτομα που έχουν μολυνθεί κατά τη γέννηση.³⁸ Οι περισσότεροι φορείς του ιού παραμένουν ασυμπτωματικοί δια βίου. Τα χαρακτηριστικά της ATL είναι η παρουσία λεμφοκυττάρων με πολύλοβο πυρήνα σαν λουλούδια-flower cells,³⁹ σκελετικές αλλοιώσεις, δερματικές διηθήσεις, αλλοιώσεις οργάνων (ήπαρ, σπλήνας, πνεύμονες), προσβολή λεμφαδένων, προσβολή του γαστρεντερικού συστήματος ως διαβρώσεις ή έλκη, προσβολή οφθαλμών⁴⁰ καθώς και προσβολή του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Το δέρμα αποτελεί την πιο κοινή εξωλεμφαδενική θέση συμμετοχής (>50%) ως διάχυτο αποφωλιδωτικό εξάνθημα, βλατίδες ή οζίδια.⁴¹ Επίσης, εμφανίζεται υπερασβεσταιμία, αύξηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και χολεριθρίνης⁴² ενώ η εξέλιξη της νόσου προς το θάνατο είναι ταχεία, εντός 11 μηνών.⁴³ Η ATL σχετίζεται επίσης με σοβαρή ανοσοκαταστολή, όπως αποδεικνύεται από την ευαισθησία αυτών των ασθενών σε διάφορες ευκαιριακές λοιμώξεις κυρίως βακτηριακές (80%), μυκητιασικές *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *Candida* (10%) αλλά και ιογενής HSV, CMV(10%) οι οποίες μπορεί να αποβούν μοιραίες.⁴⁴⁻⁴⁵

Τα διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου οδήγησαν στην ταξινόμησή της (κριτήρια Shimoyama) σε τέσσερις υποκατηγορίες: 1) οξεία 60% των περιπτώσεων 2) χρόνια 15% 3) έρπουσα λευχαιμική μορφή 5% και 4) λεμφωματική μορφή 20%.⁴⁶ Η οξεία και η λεμφωματική μορφή έχουν γρήγορα εξελισσόμενη κλινική πορεία με μέσο χρόνο επιβίωσης 5-6 μήνες με ένα μόλις 5% να επιβιώνει στην τετραετία. Η έρπουσα και η χρόνια μορφή έχουν πιο ήπια πορεία, αλλά μπορεί να μεταπέσουν σε πιο επιθετικές μορφές νόσου με εκτιμώμενη τετραετή επιβίωση 67% και 27% αντίστοιχα.⁴⁷

Η παρουσία μερικών προγνωστικών παραγόντων, όπως, βεβαρημένη κατάσταση του ασθενούς, ηλικία μεγαλύτερη από 40 έτη, υψηλά επίπεδα LDH, προσβολή περισσότερο των 3 θέσεων, υπερασβεσταιμία, θρομβοπενία, ηωσινοφιλία, εμπλοκή μυελού των οστών, υψηλά επίπεδα ιντερλευκίνης - 5 (IL-5), έκφραση υποδοχέα χημειοκίνης 4 (CCR4), μετάλλαξη p53 και διαγραφή p16 επηρεάζουν δυσμενώς την πορεία της νόσου.⁴⁸

Οι στρατηγικές θεραπείας βασίζονται κυρίως στον τύπο της νόσου, μαζί με προγνωστικούς παράγοντες, την ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία καθώς και το αν ο ασθενής συμμετέχει σε κλινική μελέτη.⁴⁹ Γενικά οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν αντιρετροϊκά και αντιϊκα φάρμακα, χημειοθεραπεία, αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και θεραπεία υποκείμενων νόσων. Οι ασθενείς με ATL σπάνια θεραπεύονται έχοντας περιορισμένο αριθμό θεραπευτικών επιλογών, έτσι ενθαρρύνονται να συμμετέχουν σε κλινικές δοκιμές με σκοπό τη βέλτιστη αγωγή τους και παράλληλα βοηθώντας τις μελέτες στις αναδυόμενες θεραπείες.⁵⁰

Η **HAM/TSP** (μυελοπάθεια/τροπική σπαστική παραπάρεση) αντιστοιχεί στο 1% -2% των HTLVΙ φορέων. Με βάση τον αριθμό των μολυσμένων ατόμων, ο αριθμός των κρουσμάτων HAM/TSP στον κόσμο εκτιμάται ότι κυμαίνεται μεταξύ 60.000-100.000 στις ενδημικές περιοχές HTLVΙ. Σποραδικά κρούσματα της νόσου έχουν επίσης αναφερθεί σε μη ενδημικές περιοχές όπως οι ΗΠΑ και η Ευρώπη, μεταξύ μεταναστών από ενδημικές περιοχές.⁵¹ Στην Ιαπωνία, έως το τέλος του 2018, 551 ασθενείς σε περίπου 3.000 περιπτώσεις καταγράφηκαν στο “HAM-net”, ένα σύστημα καταγραφής ασθενών με HAM/TSP.⁵²

Η μυελοπάθεια/τροπική σπαστική παραπάρεση είναι μια χρόνια προοδευτική, χωρίς ύφεση, νευροφλεγμονώδης νόσος του ΚΝΣ με καταστροφή κυρίως της θωρακικής μοίρας του νωτιαίου μυελού και προσβάλλει περισσότερο τις γυναίκες σε αναλογία 2:1.⁵³ Η βλάβη στο νωτιαίο μυελό προκαλεί ποικίλα συμπτώματα όπως οσφυαλγία, αδυναμία και/ή μερική παράλυση των κάτω άκρων, λειτουργική απώλεια της ουροδόχου κύστης και του παχέος εντέρου καθώς και σεξουαλική δυσλειτουργία.⁵⁴ Ο χρόνος εκδήλωσης της νόσου κυμαίνεται από μερικά χρόνια έως μερικές δεκαετίες ενώ ο μέσος χρόνος έναρξης είναι 40 έτη.⁵⁵ Ωστόσο έχουν αναφερθεί ασθενείς παιδικής και εφηβικής ηλικίας όπου έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ IDH (μολυσματική δερματίτιδα) και HAM/TSP.

Η **IDH** είναι μια χρόνια και σοβαρή δερματίτιδα, παιδικής ηλικίας, που χαρακτηρίζεται από εξιδρωματική, μολυσματική δερματίτιδα με

υποτροπιάζον έκζεμα που αφορά κυρίως το τριχωτό της κεφαλής, το λαιμό και τα αυτιά, τις μασχάλες και τη βουβωνική χώρα. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν γενικευμένο εξάνθημα, ρινική καταρροή και κρούστες ρουθουνιών όπως και βλεφαροεπιπεφυκίτιδα. Η πλειοψηφία των ασθενών με IDH που έχουν περιγραφεί είναι από την Τζαμάικα και αυτοί οι ασθενείς ήταν κατακόρυφα μολυσμένοι.⁵⁶

Η μετάγγιση μολυσμένου αίματος με HTLV I μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση της νόσου εντός 6 μηνών.⁵⁷ Έχει βρεθεί ότι το 50% των μεταγγισθέντων με μολυσμένο αίμα εμφάνισε HAM/TSP σε διάστημα 3 ετών από την μετάγγιση. Η νόσος συνδέεται με υψηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι HTLV I τόσο στο αίμα όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, μείωση των B-κυττάρων και αυξημένη αναλογία T/B κύτταρα καθώς και ενεργοποιημένα CD8+ T-κύτταρα. Αυτοί οι παράμετροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν και ως προγνωστικοί βιοδείκτες για HAM/TSP.⁵⁸ Η θεραπεία του HAM/TSP παραμένει απογοητευτική και η συμπτωματική θεραπεία είναι ο βασικός πυρήνας της θεραπείας.⁵⁹

Άλλα νοσήματα που μπορεί να προκληθούν από HTLV I είναι πνευμονική κυψελίτιδα, ουρηθρίτιδα, λεμφαδενίτιδες, πολυμυοσίτιδα, πολυαρθρίτιδα, οστεοαρθρίτιδα, αρθροπάθειες, μυοσίτιδα, θυρεοειδίτιδα Hashimoto, σύνδρομο Sjögren, πολυνευροπάθειες, ραγοειδίτιδα (φλεγμονή οφθαλμών), διάμεση κερατίτιδα, σύνδρομο Sicca (ξηρότητα οφθαλμού και στόματος), κυστίτιδα και προστατίτιδα, σύνδρομο Graves, ήπια νοητικά ελλείμματα καθώς και αύξηση των ευκαιριακών λοιμώξεων όπως λοιμώδη δερματίτιδα, φυματίωση και λοιμώξεις από παράσιτα (*Strongyloides stercoralis*).⁶⁰ Οι σχετιζόμενες ευκαιριακές λοιμώξεις, όπως η φυματίωση, αναπτύσσονται συχνά σε ασθενείς με ATL, λόγω της ανοσοκαταστολής ενώ η στρογγυλοειδίωση πιθανώς οφείλεται σε μειωμένες ανοσοσφαιρίνη IgE, και ιντερλευκίνες IL-4, IL-5 και IL-13, οι οποίες ενισχύουν την αντιελμινθική απόκριση. Η μόλυνση με HTLV I θεωρείται παράγοντας κινδύνου για τη διάδοση του *S. Stercoralis* και σχετίζεται με κλωνική επέκταση του HTLV I σε ασυμπτωματικά άτομα. Με κλωνική επέκταση σχετίζεται και η λοιμώδη δερματίτιδα.⁶¹

Μια πρόσφατη δημοσίευση (2018) από την ομάδα του Taylor αναφέρει ότι οι περισσότερες περιπτώσεις ATL αναπτύσσονται σε άτομα που μολύνθηκαν με HTLV I κατά τη γέννηση, μέσω μόλυνσης από μητέρα σε παιδί, ενώ σπάνια εμφανίζεται σε φορείς HTLV I που έχουν μολυνθεί στην ενηλικίωση. Αντίθετα, η μυελοπάθεια HAM/TSP, η δεύτερη μείζονα νόσο του HTLV I, παρατηρείται με υψηλότερο επιπολασμό και ραγδαία εξέλιξη της νόσου σε άτομα που έχουν μολυνθεί κατά την ενηλικίωση λόγω μεταγγίσεων αίματος ή μεταμόσχευσης οργάνων. Επίσης, γνωρίζοντας ότι η περιγεννητική μόλυνση

αντιπροσωπεύει περίπου το 20% έως 25% όλων των λοιμώξεων από HTLV I εκτιμάται ότι ο πραγματικός κίνδυνος της ATL μεταξύ των περιγεννητικά μολυσμένων φορέων θα μπορούσε να είναι όσο το 25%,⁶² ένας αριθμός που ξεπερνάει ακόμη και τον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα που σχετίζεται με το κάπνισμα (περίπου 16%).⁶³ Αυτή η νέα μελέτη δείχνει ότι ο HTLV I είναι αναμφισβήτητα ένας από τους πιο καρκινογόνους ογκοϊούς που είναι γνωστοί ως σήμερα.⁶⁴

2.2 HTLV II

Ο HTLV II απομονώθηκε το 1982 από τον Gallo σε ασθενή με λευχαιμία των τριχωτών κυττάρων.⁶⁵ Είναι λιγότερο παθογόνος από τον HTLV I, η μόλυνση είναι δια βίου και το 95% των φορέων δεν αναπτύσσει συμπτώματα νόσου, ωστόσο έχει συνδεθεί με νευρολογική ασθένεια παρόμοια με την HAM/TSP και χρόνια φλεγμονώδη αρθροπάθεια.⁶⁶ Επίσης, ενοχοποιείται για αυξημένο κίνδυνο πνευμονίας και βρογχίτιδας, δερματίτιδες, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και σπάνιες νευρολογικές εκδηλώσεις. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος μεταξύ χρηστών ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών στις Η.Π.Α και στην Ευρώπη.⁶⁷

Η συχνότητα του HTLV II είναι μικρότερη στους ομοφυλόφιλους άνδρες συγκριτικά με τους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών, γεγονός που υποδηλώνει ότι μεταδίδεται πιο εύκολα μέσω του αίματος παρά με τη σεξουαλική επαφή.⁶⁸ Μολύνει κυρίως τα CD8+ T-λεμφοκύτταρα και έχει συσχετιστεί με σπάνιους καρκίνους αυτών των κυττάρων.⁶⁹ Η διαφορά αυτή μεταξύ HTLV I και HTLV II στην προτίμηση των CD4+ και CD8+ T-κυττάρων φαίνεται να είναι το ελαφρώς διαφορετικό σύμπλεγμα μορίων υποδοχέα. Το HTLV I χρησιμοποιεί πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (HSPGs) και νευροπυλίνη-1 (NRP1) για την πρόσδεση και υποδοχέα γλυκόζης-1 (GLUT1) για την είσοδο στον ξενιστή. Το HTLV II χρησιμοποιεί NRP1 και GLUT1, όχι όμως HSPG. Τα CD4+ T-κύτταρα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεογλυκάνης θειϊκής ηπαρίνης (HSPG) και ελάχιστη για τον υποδοχέα γλυκόζης-1 (GLUT1), ενώ στα CD8+ T-κύτταρα συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο.⁷⁰

Σε *in vivo* μελέτες φαίνεται ότι ο τροπισμός για τις δυο σειρές T-λεμφοκυττάρων είναι αμφίβολη μια εβδομάδα μετά τον ενοφθαλμισμό κουνελιών με HTLV I και HTLV II. Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες όπου ο τροπισμός εμφανίσθηκε αρκετές εβδομάδες μετά την μόλυνση. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι ο τροπισμός εμφανίζεται μετά την είσοδο του ιού στον ξενιστή και ο

πολλαπλασιασμός των CD4⁺ ή CD8⁺ καθοδηγείται από τον HTLV I ή HTLV II αντίστοιχα.⁷¹ Οι ιϊκοί φάκελοι HTLV συνδέονται φυσικά με τον υποδοχέα γλυκόζης (GLUT1) και αυτή η αλληλεπίδραση ρυθμίζει τον μεταβολισμό της. Τα μολυσμένα κύτταρα δείχνουν μειωμένη παραγωγή και κατανάλωση γαλακτικού οξέος και οι καλλιέργειες στις οποίες αναπτύσσονται γίνονται πιο όξινες ενώ η κατανάλωση γλυκόζης των μολυσμένων κυττάρων μειώνεται έως 95%. Επιπλέον, η υπέρ έκφραση των υποδοχέων γλυκόζης προκαλεί παράλληλη αύξηση της σύνδεσης με HTLV στα κύτταρα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι όταν η μεταφορά γλυκόζης παρεμποδίζεται η σύνδεση HTLV μειώνεται σημαντικά. Απαιτούνται όμως περαιτέρω έρευνες για να προσδιοριστεί αν ο εμπλεκόμενος μεταβολισμός της γλυκόζης με την HTLV μόλυνση σχετίζεται με την παθογένεση του ιού.⁷²

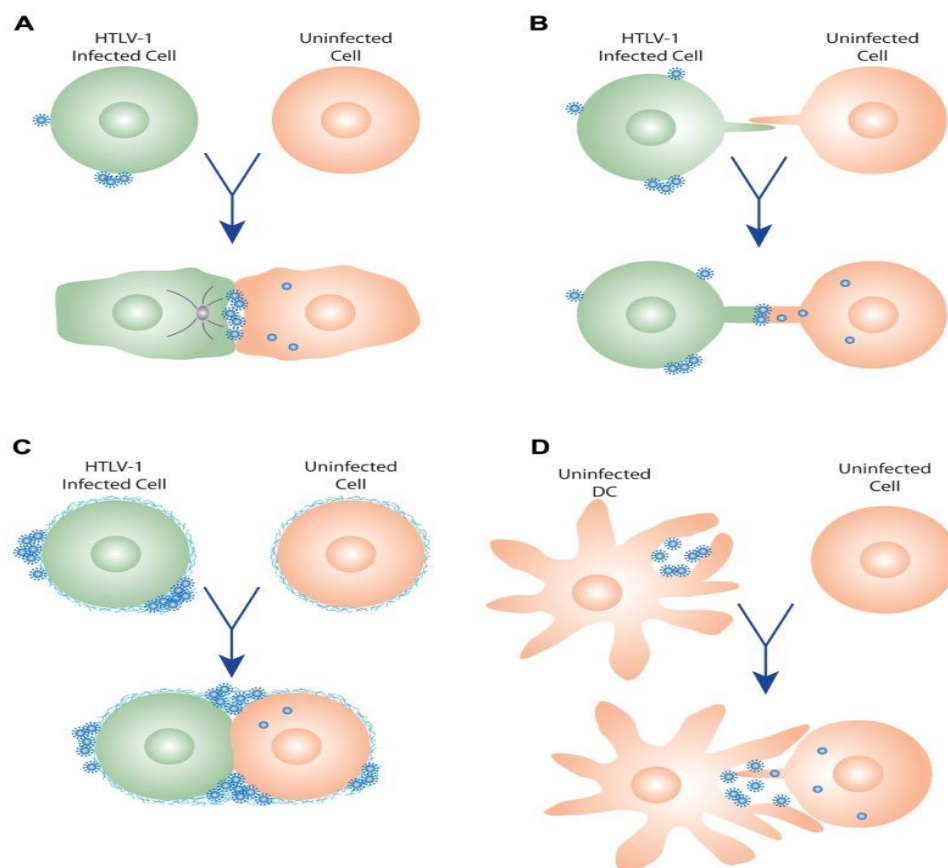
Μακροχρόνια ασυμπτωματική μόλυνση με HTLV II έχει εντοπιστεί σε Αμερικανούς Ινδιάνους, μια πληθυσμιακή ομάδα στην οποία ο ιός θεωρείται ότι υπήρχε για εκατοντάδες ή ίσως χιλιάδες χρόνια με εξελικτική πορεία.⁷³ Οι πρόγνωση για τους περισσότερους ασθενείς είναι καλή και η πλειοψηφία αυτών δεν παρουσιάζουν συμπτώματα πάθησης. Δεν υπάρχει θεραπεία για την HTLV II μόλυνση αλλά επικεντρώνεται στην έγκαιρη ανίχνευση και την αποτροπή της εξάπλωσης σε άλλους.⁷⁴

Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες για το HTLV I και HTLV II έχουν επικεντρωθεί στις διαφορές μεταξύ της ρυθμιστικής πρωτεΐνης Tax και των πρωτεϊνών που προέρχονται από τα αντιγόνα HBZ (HTLV I) και APL-2 (HTLV II). Οι διαφορετικοί κυτταρικοί οδοί και οι καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραμονή του ιού αρχικά και στον πολλαπλασιασμό του στη συνέχεια, στην διαφυγή του από τη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή καθώς και στις αποκλίνουσες παθολογικές εκβάσεις αυτών των ιών.⁷⁵⁻⁷⁶

3.Τρόποι μόλυνσης και μετάδοσης του ιού

Πιστεύεται ότι η μόλυνση ενός ατόμου με HTLV συμβαίνει σε δύο στάδια. Ο ιός αρχικά εξαπλώνεται από T-λεμφοκύτταρο σε T-λεμφοκύτταρο, κυρίως μεταξύ κυττάρων CD4⁺ και CD8⁺ και αργότερα παραμένει στον ξενιστή με κλωνική επέκταση των μολυσμένων κυττάρων. Οι τρόποι μετάδοσης από κύτταρο σε κύτταρο είναι: Α- Ιολογική σύναψη. Όταν τα μολυσμένα με HTLV κύτταρα έρχονται σε επαφή με μη μολυσμένα κύτταρα, η ιολογική σύναψη σχηματίζεται από ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών στα μολυσμένα και μη μολυσμένα

κύτταρα. **Β- Κυψελοειδείς αγωγοί.** Τα μολυσμένα με HTLV κύτταρα μπορούν επίσης να μεταφέρουν τον ιό σε μη μολυσμένα κύτταρα με μεταβατικές επεκτάσεις μεμβράνης (κυτταρικός αγωγός). **Γ- Εξωκυτταρικά ιϊκά συστήματα.** Στο μολυσμένο κύτταρο, ο ιός παραμένει συνδεδεμένος μέσα σε μια μήτρα που περιέχει συστατικά της εξωκυτταρικής μεμβράνης. Κατά την επαφή, αυτά τα συγκολλητικά ιϊκά συστήματα μεταφέρονται σε ένα υγιές κύτταρο, το οποίο στη συνέχεια μολύνουν. **Δ- Μόλυνση μέσω δενδριτικών κυττάρων (DCs).** Μη μολυσμένα DCs «συλλαμβάνουν» HTLV, αποθηκεύουν προσωρινά τον ιό σε επιφάνειες προσιτές στην επιφάνεια και στη συνέχεια, προτού μολυνθούν οι ίδιοι, μεταφέρουν τον ιό σε μη μολυσμένα Τ κύτταρα.⁷⁷ Εικόνα 7



Μοντέλα μετάδοσης από κύτταρο σε κύτταρο

[10.3389/fmicb.2012.00378](https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00378)

Εικόνα 7

Η μετάδοση της μόλυνσης από HTLV γίνεται με τρεις τρόπους, παρεντερική μετάδοση, σεξουαλική μετάδοση και κάθετη μετάδοση. Η

κάθε οδό μόλυνσης, έχει τους αντίστοιχους παράγοντες κινδύνου: μετάγγιση αίματος χωρίς ανίχνευση των δοτών για anti-HTLV αντισώματα καθώς και κοινή χρήση μολυσμένων βελόνων σε χρήστες ναρκωτικών ουσιών, σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα και παρατεταμένος θηλασμός.

Παρεντερική μετάδοση. Μετάγγιση μολυσμένου ολικού αίματος ή κυτταρικών προϊόντων του⁷⁸ (ερυθρά, αιμοπετάλια) αλλά όχι με το πλάσμα, λόγω της σπάνιας παρουσίας βιριόνιων HTLV σε αυτό.⁷⁹ Η μετάγγιση μολυσμένου αίματος ευθύνεται για την μετάδοση του ιού σε ποσοστό ορομετατροπής κατά 50% και μπορεί να οδηγήσει εντός τριμήνου στην ανάπτυξη μυελοπάθειας ή τροπικής σπαστικής παραπάρεσης. Η συντήρηση των μονάδων αίματος (+4⁰ C) για διάστημα πέραν των έξι ημερών, μειώνει την πιθανότητα μετάδοσης του ιού σημαντικά.⁸⁰

Ο ιός μπορεί να μεταδοθεί επίσης μέσω μολυσμένων βελόνων από χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών. Είναι ο συχνότερος τρόπος μόλυνσης για τον HTLV II ίσως επειδή η χρήση ενέσιμων ναρκωτικών είναι λιγότερο συχνή μεταξύ των HTLV I φορέων. Ωστόσο, η αυξανόμενη ανθρώπινη κινητικότητα και η πολιτισμική αλληλεπίδραση δημιουργούν προϋποθέσεις για αυξημένη μετάδοση HTLV I μέσω αυτής της διαδρομής.⁸¹

Η μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων είναι άλλη μια οδός μετάδοσης του HTLV, πιθανών λόγω της ανοσοκαταστολής που υφίστανται οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς. Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις μυελοπάθειας σχετιζόμενης με μεταμόσχευση, στις ΗΠΑ δυο περιπτώσεις μεταμόσχευσης νεφρού είχε ως αποτέλεσμα HAM καθώς και σε μεταμόσχευση καρδιάς στη Γαλλία και σε μεταμόσχευση νεφρού και ήπατος στην Ισπανία. Στην Ιαπωνία, όπου υπάρχει υψηλός επιπολασμός HTLV I, αναφέρθηκαν 3 περιπτώσεις HAM και 8 περιπτώσεις ATL μετά από μεταμόσχευση νεφρού. Κάποια από τα περιστατικά αυτά είχαν ταχεία εμφάνιση και εξέλιξη. Το GVN (Global Virus Network, gvn.org) ζητά συστηματικότερο έλεγχο HTLV I/II πριν από τη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων. για την πρόληψη της μετάδοσης του ιού.⁸²

Σεξουαλική μετάδοση. Με σεξουαλική επαφή (παρόμοια με σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα), με μεγαλύτερη συχνότητα μετάδοσης από άνδρα σε γυναίκα παρά το αντίστροφο. Μια γυναίκα που διατηρεί σεξουαλική επαφή με μολυσμένο άνδρα επί δεκαετία, έχει πιθανότητα 60% να μολυνθεί ενώ αντίστροφα ο άνδρας μόλις 0,4%. Η παρουσία γεννητικών ελκών ενισχύει τον κίνδυνο μετάδοσης καθώς και το υψηλό ιϊκό φορτίο.⁸³⁻⁸⁴ Η μετάδοση μεταξύ γυναικών και ανδρών είναι

υψηλότερη στους άνδρες με σύφιλη ή ιστορικό πληγών ή ελκών του πέους ενισχύοντας την άποψη ότι η ρήξη του επιθηλίου αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης.

Ο HTLV I έχει συσχετιστεί με καρκίνωμα του τραχήλου γεγονός που υποδηλώνει ότι η ιογενής μόλυνση του επιθηλίου ή άλλων κυττάρων στον τράχηλο, μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην εξάπλωση της λοίμωξης μεταξύ ανδρών και γυναικών.⁸⁵

Κάθετη μετάδοση. Από μητέρα σε παιδί, η ενδομήτρια και η περιγεννητική έκθεση εμφανίζεται σε λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων ενώ ο συχνότερος τρόπος είναι μέσω του θηλασμού λόγω μεταφοράς μολυσμένων λεμφοκυττάρων που φέρει το γάλα από τις μητέρες που έχουν μολυνθεί. Οι μηχανισμοί διέλευσης του HTLV μέσω του πεπτικού συστήματος παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι.⁸⁶

Σε ενδημικές περιοχές, η κύρια οδός μετάδοσης του ιού είναι από μολυσμένη μητέρα σε παιδί. Ο ρυθμός της κάθετης μετάδοσης σε αυτούς τους πληθυσμούς εκτιμάται ότι είναι 10% έως 30%.⁸⁷ Ο κίνδυνος μετάδοσης εξαρτάται από την διάρκεια του θηλασμού (πάνω από έξι μήνες), από το υψηλό ιϊκό φορτίο στο μητρικό γάλα και την ταύτιση τύπου HLA μεταξύ μητέρας και παιδιού, σε ποσοστό που φτάνει το 20%.⁸⁸

Σε μελέτες που έχουν γίνει, αναφέρεται ότι ο θηλασμός πέραν των 12 μηνών συνδέεται με ρυθμό μετάδοσης 32%, σε σύγκριση με ρυθμό μετάδοσης 9% για μικρότερης διάρκειας θηλασμό. Επίσης, μια περίοδος θηλασμού έξι μηνών ήταν κρίσιμο σημείο στο ποσοστό της ορομετατροπής, καθώς βρέθηκαν ποσοστά 4,4% και 14,4% για παιδιά που είχαν θηλάσει για περίοδο κάτω των έξι ή επτά μηνών αντίστοιχα.⁸⁹

4.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

4.1 Μοριακή επιδημιολογία

Ο HTLV παρουσιάζει αξιοσημείωτη γενετική σταθερότητα, χαρακτηριστικό ασυνήθιστο για ρετροϊό. Η επέκταση των μολυσμένων κυττάρων μέσω κλωνικού πολλαπλασιασμού κυρίως, είναι πιθανόν ο λόγος για αυτή την εντυπωσιακή σταθερότητα. Οι λίγες υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων που παρατηρούνται μεταξύ στελεχών του HTLV I μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εργαλείο για την παρακολούθηση της μετανάστευσης μολυσμένων πληθυσμών στο πρόσφατο ή το μακρινό παρελθόν και έτσι να αποκτηθούν νέες γνώσεις σχετικά με την προέλευση, την εξέλιξη και τους τρόπους διάδοσης του ρετροϊού. Οι μικρές

παραλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ στελεχών του ιού είναι ειδικές για τη γεωγραφική προέλευση των ασθενών και όχι για την παθολογία.

Έχουν αναφερθεί τέσσερις σημαντικοί γεωγραφικοί υποτύποι (γονότυποι). Περιλαμβάνουν τον υποτύπο Cosmopolitan A (Κοσμοπολίτικο στέλεχος) με παγκόσμια κατανομή, τον υπότυπο B της Κεντρικής Αφρικής, τον υπότυπο D της Κεντρικής Αφρικής/Pygmies και τον υπότυπο C της Αυστραλό-Μελανησίας. Ο τελευταίος αυτός υπότυπος φαίνεται να έχει μια μακρά περίοδο εξέλιξης (τουλάχιστον αρκετές χιλιετίες) σε απομονωμένους πληθυσμούς που ζουν σε περιοχές του Ειρηνικού. Ένας περιορισμένος αριθμός στελεχών που βρίσκονται στην Κεντρική Αφρική ανήκουν σε άλλους σπάνιους γονότυπους (E, F και G). Το Κοσμοπολίτικο στέλεχος A είναι το πιο διαδεδομένο, ενδημεί στην Ιαπωνία, τη Βόρεια και Δυτική Αφρική, την Καραϊβική, την Κεντρική και Νότια Αμερική καθώς και μέρος της Μέσης Ανατολής. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι ένας συγκεκριμένος γονότυπος σχετίζεται με ανάπτυξη ALT ή TSP/HAM.⁹⁰

Ο HTLV II είναι λιγότερο διαδεδομένος και παρατηρούνται 4 υποτύποι. Οι κύριοι υποτύποι, A και B, βρίσκονται στους αυτόχθονες Αμερικανούς καθώς και στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών τόσο στις ΗΠΑ όσο και στην Ευρώπη. Ο υποτύπος C είναι σχεδόν αποκλειστικός σε πληθυσμούς της Βραζιλίας. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν αρχικά στην υπόθεση ότι ο HTLV II περιοριζόταν στον νέο κόσμο, ωστόσο, σποραδικά κρούσματα μόλυνσης με HTLV II έχουν περιγραφεί και σε περιοχές της Κεντρικής Αφρικής. Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε ένα μοναδικό στέλεχος υποτύπου D σε έναν Πυγμαίο που ζούσε στη Λαϊκή Δημοκρατία του Κονγκό καθώς και στελέχη του υποτύπου B απομονώθηκαν σε Πυγμαίους που ζούσαν στο Καμερούν και στην Γκαμπόν.⁹¹

4.2 Γεωγραφική επιδημιολογία

Πριν τριάντα περίπου χρόνια είχε εκτιμηθεί ότι ο αριθμός των φορέων HTLV I ήταν 10-20 εκατομμύρια άνθρωποι στον κόσμο.⁹² Νεότερες εκτιμήσεις (2012) κυμαίνονται σε 5-10 εκατομμύρια μολυσμένα άτομα παγκοσμίως. Τα αποτελέσματα αυτά, αφορά περίπου 1,5 δισ. άτομα, βασίζονται σε μελέτες από γνωστές ενδημικές περιοχές με αξιόπιστα επιδημιολογικά δεδομένα. Ακριβείς εκτιμήσεις σε πυκνοκατοικημένες περιοχές όπως Κίνα, Ινδία, Αν. Αφρική δεν είναι εφικτές. Ο επιπολασμός του είναι πολύπλοκος δεδομένου ότι είναι ενδημικός σε ορισμένα μέρη του κόσμου με πολύ υψηλές επικρατούσες τιμές σε συγκεκριμένες τοποθεσίες και πληθυσμούς ενώ σε γειτονικές περιοχές είναι σχεδόν απών. Η ευρεία γεωγραφική διάδοσή του πιστεύεται

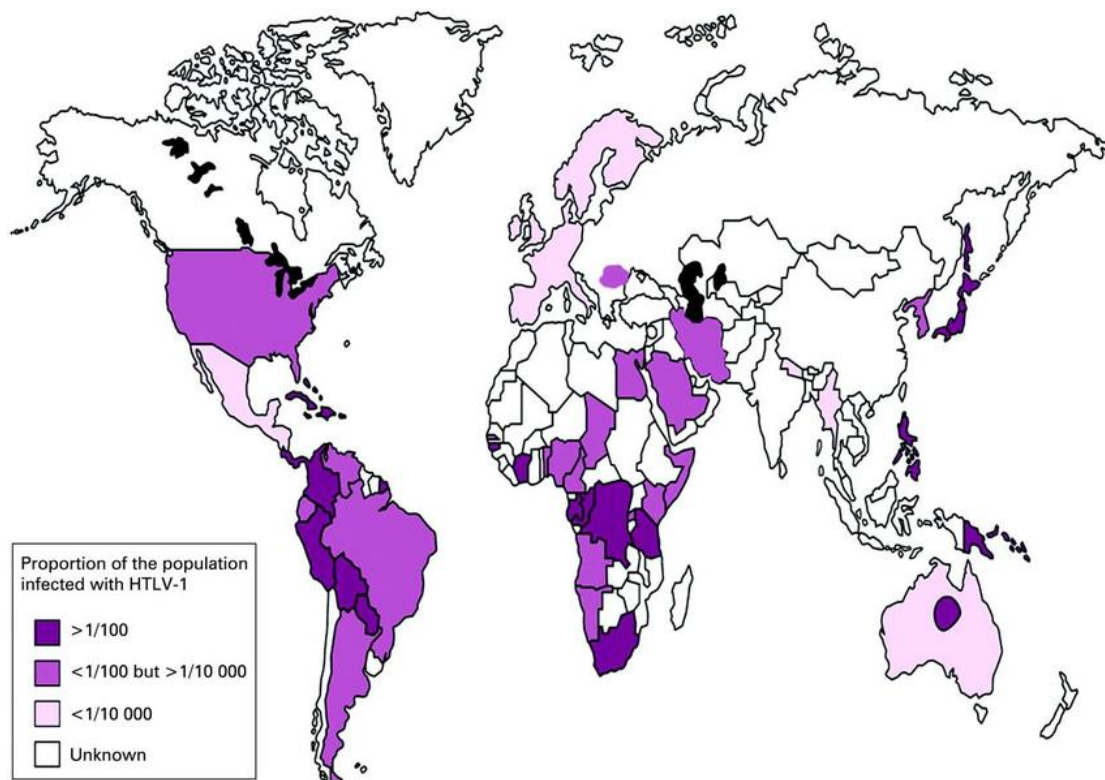
ότι συνέβη κατά τη διάρκεια των τελευταίων εκατονταετιών μέσω των Ευρωπαϊών εξερευνητών, του εμπορίου σκλάβων ή των πληθυσμιακών μεταναστεύσεων. Τα ποσοστά οροθετικότητας διαφέρουν ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την κοινωνικό-δημογραφική σύνθεση του πληθυσμού που μελετήθηκε και τις ατομικές συμπεριφορές κινδύνου. Ωστόσο, οι πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά επικράτησης από αντιπροσωπευτικά δείγματα του γενικού πληθυσμού είναι σπάνιες. Τα περισσότερα δεδομένα σχετικά με τους ρυθμούς επικράτησης του HTLV I προέρχονται από μελέτες γενικά χαμηλού κινδύνου αιμοδοτών ή επιλεγμένων πληθυσμιακών ομάδων όπως έγκυες γυναίκες, νευρολογικοί ή αιματολογικοί ασθενείς, συγγενείς μολυσμένων ατόμων, ειδικές γηγενείς και μερικές φορές απομονωμένες πληθυσμιακές ομάδες και χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών.⁹³

Έχει εντοπιστεί στα περισσότερα μέρη της Αφρικής. Στην Γκαμπόν παρατηρήθηκε επικράτηση 5%-10% σε ενήλικες ενώ σε μερικά χωριά μέχρι και το 25% των ηλικιωμένων γυναικών ήταν HTLV I θετικές ενώ στη Νιγηρία, περίπου 850.000 έως 1,7 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνονται από τον ιό. Στη Νότια Ιαπωνία, περίπου 0,8 εκατομμύρια άνθρωποι είναι HTLV I θετικοί (30%-40% των ενηλίκων >50 ετών φέρουν τον ιό), στην Καραϊβική με μέσο όρο επιπολασμού 6,1% συμπεριλαμβανομένου και την Τζαμάικα με παρόμοια ποσοστά επικράτησης. Στην κεντρική και νότια Αμερική όπου στη Βραζιλία (εκτιμάται 2,5 εκατομμύρια μολυσμένα άτομα) ο επιπολασμός είναι 1,8% στον γενικό πληθυσμό. Στη Μέση Ανατολή, στο Ιράν το HTLV I βρίσκεται σε όλη τη χώρα, στην κεντρική και βόρεια Αυστραλία-Μελανησία, από μελέτη φάνηκε ότι οι αυτόχθονες ήταν HTLV I θετικοί και τέλος στη Ρουμανία με οροθετικότητα 5.3/10.000 σε αιμοδότες πρώτης φοράς και 3%-25% σε ασθενείς μεταμοσχεύσεων. Είναι η μόνη χώρα της Ευρώπης που εμφανίζει επιπολασμό του ιού.⁹⁴ Εικόνα 8

Σε μη ενδημικές περιοχές, εξαιτίας της συνεχιζόμενης μετανάστευσης από την Μέση Ανατολή και την Αφρική καθώς και η αυξανόμενη χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών είναι πιθανό να αλλάξει σημαντικά την επιδημιολογία των HTLV I/II στην Β. Αμερική και στην Ευρώπη. Ο ιός έχει εντοπιστεί στο Ηνωμένο Βασίλειο (20.000-30.000 μολυσμένα άτομα) και στη Γαλλία (10.000-25.000 μολυσμένα άτομα), στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι περίπου 266.000 άτομα έχουν μολυνθεί ενώ 3.600 ασθενείς με HAM/TSP παραμένουν αδιάγνωστοι.⁹⁵

Στην Ευρώπη, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες (κυρίως σε αιμοδότες και σε έγκυες γυναίκες) που αποδεικνύουν ότι πάνω από το 80% των μολυσμένων ατόμων με HTLV I προέρχονται άμεσα ή είναι παιδιά ή απόγονοι μεταναστών από

περιοχές υψηλού επιπολασμού. Έτσι, στη Μεγάλη Βρετανία και τη Γαλλία οι περισσότεροι φορείς προέρχονται από βρετανικές και γαλλικές αποικίες αντίστοιχα, ενώ στην Ισπανία, με χαμηλότερο επιπολασμό, οι φορείς προέρχονται από την Νότιο Αμερική.⁹⁶ Μελέτες που έχουν γίνει σε μαιευτικές κλινικές δείχνουν ότι η συχνότητα HTLV I σε γυναίκες που προέρχονται από ενδημικές περιοχές και μένουν στην Ευρώπη, είναι ίδια με τη συχνότητα που επικρατεί σε αυτές τις περιοχές. Τα ποσοστά λοίμωξης HTLV I στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες είναι πολύ χαμηλά όπως αποδεικνύεται από τους αιμοδότες πρώτης φοράς 0,4/10.000 και από τη σπανιότητα των ATL και TSP/HAM. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η Ρουμανία η οποία φαίνεται να είναι η ενδημική περιοχή HTLV I της Ευρώπης με επιπολασμό στους αιμοδότες πρώτης φοράς 5,3/10,000 ενώ έχουν αναφερθεί σειρά περιστατικών ATL και TSP/HAM. Επίσης, υψηλό είναι και τα ποσοστά μόλυνσης σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς που κυμαίνεται από 3%-25%. Ο αποδεδειγμένος υψηλός επιπολασμός σε αυτήν την χώρα δεν μπορεί να ερμηνευθεί και παραμένει θέμα διαφόρων υποθέσεων.⁹⁷



Παγκόσμια κατανομή της λοίμωξης από HTLV *Pract Neurol.* 2009, 9: 16-26

Εικόνα 8

Ο HTLV II είναι λιγότερο διαδεδομένος και εκτιμάται ότι έχει μολύνει περίπου 800.000 άτομα παγκοσμίως. Τα περισσότερα άτομα βρίσκονται στις ΗΠΑ (400.000-500.000) και αφορά μόλυνση σε πληθυσμούς Αμερικανών ιθαγενών καθώς και χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών. Δεύτερη σε επιπολασμό χώρα είναι η Βραζιλία με 200.000-250.000 φορείς με παρόμοιο πληθυσμιακό προφίλ. Στην Ευρώπη, η λοίμωξη από το HTLV II βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών και εκτιμάται περίπου σε 20.000-40.000 άτομα. Επίσης, ενδημικοί πληθυσμοί που εμφανίζεται ο ιός βρίσκονται στη Λατινική Αμερική και την Κεντρική Αφρική (φυλή Ινδιάνων και Πυγμαίοι) και αφορά 50.000-100.000 μολυσμένα άτομα. Γενικά, η μόλυνση από HTLV II παγκοσμίως είναι περίπου 6 έως 12 φορές χαμηλότερη από του HTLV I. Φαίνεται ότι η λοίμωξη μεταδίδεται σε συγκεκριμένες ομάδες υψηλού κινδύνου και σε μικρότερο βαθμό μέσω σεξουαλικής και κάθετης μετάδοσης σε αντίθεση με τον HTLV I.⁹⁸

Στον γενικό πληθυσμό, η μόλυνση συνήθως ανιχνεύεται σε δότες αίματος πρώτης φοράς ή από την παρουσία κλινικών συμπτωμάτων, με μακρύ χρόνο επώασης και περιορισμένη ανοσολογική περίοδο παραθύρου (41-65 ημέρες) κατά τη διάρκεια της οποίας θα μπορούσε να ανιχνευθεί η οροθετικότητα του HTLV.

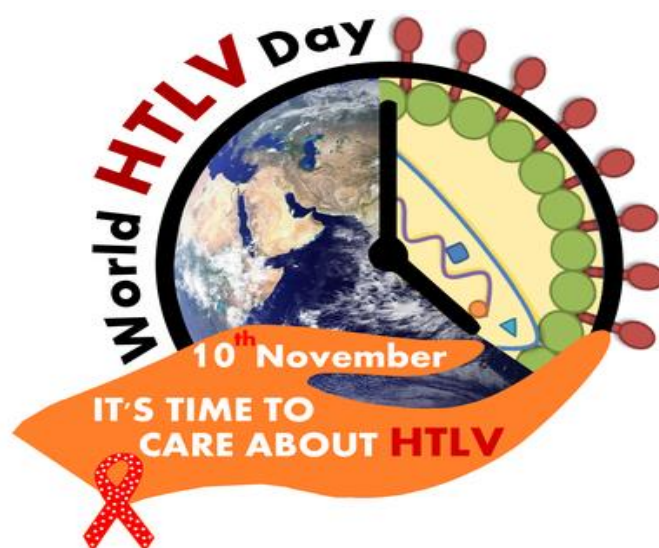
Παγκοσμίως, είναι κυρίως γυναίκες που έχουν μολυνθεί από σεξουαλική επαφή και τα μωρά τους που έχουν μολυνθεί από τον θηλασμό. Έτσι, έχουμε εμφάνιση του HTLV I ιδιαίτερα σε οικογένειες όπου το 1/3 έως 1/4 των μελών της οικογένειας φέρουν τον ιό.⁹⁹

Από το 1986 αναπτύχθηκε διαγνωστικός έλεγχος για τον HTLV I και λίγο αργότερα για τον HTLV II όπου εφαρμόστηκε σταδιακά παγκοσμίως. Το 1993, η εξέταση στους αιμοδότες υπήρχε ήδη στις περισσότερες αναπτυγμένες χώρες και σε πολλές αναπτυσσόμενες ενδημικές.¹⁰⁰ Στις ενδημικές περιοχές του ιού όχι μόνο έχει επιβληθεί ο υποχρεωτικός έλεγχος του αίματος, αλλά είναι συστηματικός και ο έλεγχος των γυναικών στις μαιευτικές κλινικές. Η αποφυγή θηλασμού από τις οροθετικές μητέρες μειώνει τον κίνδυνο μετάδοσης από μητέρα σε παιδί από 20% σε 2,5%.¹⁰¹

Ο έλεγχος των αιμοδοτών για αντισώματα έναντι των HTLV I/II άρχισε να εφαρμόζεται σε πολλές χώρες ως πράξη ρουτίνας με τη σύσταση ότι κάθε χώρα θα πρέπει να αναπτύξει τη δική της πολιτική, ως προς τη λήψη μέτρων για τον περιορισμό της μετάδοσης της λοίμωξης. Ο κίνδυνος μετάδοσης του ιού με μετάγγιση ποικίλλει ανάλογα με τον επιπολασμό στον γενικό πληθυσμό και το προφίλ των αιμοδοτών.¹⁰²⁻¹⁰³

Θέλοντας να τονίσουν τη σημαντικότητα της πρόληψης, τον Μάιο του 2018 η Δρ. Fabiola Martin, που ασχολείται με την αντιμετώπιση ασθενών με HTLV I στο Πανεπιστήμιο του Queensland και έχει ιδρύσει το HTLV Aware, website (Εικόνα 9) για την ενημέρωση των HTLV ασθενών, μαζί με 60 συναδέλφους της συνυπέγραψαν μια ανοιχτή επιστολή προς τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ζητώντας την υποστήριξη του Οργανισμού στην προώθηση αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης εναντίον ενός από τους δυνητικά πιο επιβλαβέστερους καρκινογόνους ιούς, του HTLV I.

Οι ερευνητές επισημαίνουν την καθυστέρηση της παγκόσμιας κοινότητας όσον αφορά την πρόληψη της μετάδοσης του εν λόγω ιού και θεωρούν ότι έχει έρθει η ώρα ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας να ενημερώσει το κοινό γι' αυτό το νόσημα που προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα.¹⁰⁴



<https://www.htlvaware.com/>

Εικόνα 9

4.3 Επιπολασμός HTLV I/II στον Ελληνικό πληθυσμό

Οι πρώτες μελέτες που έγιναν στην Ελλάδα κατά τις περιόδους 1987-1990 και αφορούσαν όλους τους αιμοδότες, δεν ανίχνευσαν αντισώματα έναντι του HTLV I/II. Σε επόμενες μελέτες της περιόδου 1991-1993 αναφέρεται συχνότητα 1,4% σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς (θαλασσαιμικούς 5/357) και 0,02% σε αιμοδότες (2/11.500).¹⁰⁵ Σε μελέτη

του 1995 που έγινε στη ΒΔ Ελλάδα (Ν. Ιωαννίνων) σε αιμοδοτικό πληθυσμό καθώς και σε ομάδες υψηλού κινδύνου διαπιστώθηκε σε σύνολο 5.293 ελέγχων μηδενικός επιπολασμός στους αιμοδότες καθώς και στους χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών. Απροσδιόριστα αποτελέσματα υπήρξαν σε 1 από τα 69 δείγματα πολυμεταγγιζόμενων ασθενών (1.45%) ενώ 2 στα 163 (1.2%) δείγματα ασθενών με αιμοκάθαρση ήταν θετικά.¹⁰⁶ Σε μια άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε στο νομό Δράμας κατά την περίοδο 1999-2001 εξετάσθηκαν συνολικά 12.981 μονάδες αίματος. Οι αιμοδότες ηλικίας 18-65 ετών ήταν στην πλειοψηφία τους άνδρες (73,2%) μόνιμοι κάτοικοι της ευρύτερης περιοχής ενώ ένα μικρό ποσοστό <14% αφορούσε παλιννοστούντες και μετανάστες από τις γειτονικές χώρες. Κατά την μελέτη αυτή δεν διαπιστώθηκε καμία περίπτωση οροθετικού δείγματος.¹⁰⁷ Ίδια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ 1995-1997 (δημοσιεύθηκε το 2003) στην περιοχή της Ηπείρου όπου σε 6.696 αιμοδότες βρέθηκε μηδενικός επιπολασμός του HTLV I/II.¹⁰⁸

Σε πολυκεντρική μελέτη που ξεκίνησε το 1997 έως το 1999 σε εθνικό επίπεδο, ύστερα από οδηγία του Υπουργείου Υγείας προς τα 14 τότε Κέντρα Αιμοδοσίας, είχε σκοπό να εκτιμηθεί η αναγκαιότητα της καθιέρωσης υποχρεωτικού ελέγχου των μονάδων αίματος για αντισώματα έναντι του ιού. Μελετήθηκαν συνολικά 90.381 αιμοδότες ηλικίας 18 έως 65 ετών προερχόμενοι από Αθήνα, Θεσσαλονίκη, Ιωάννινα, Λάρισα, Κόρινθο και Ρόδο. Βρέθηκαν 76 θετικά δείγματα από τα οποία επιβεβαιώθηκαν με μέθοδο Western Blot 9 δείγματα (συχνότητα 0,009%, 8 δείγματα anti-HTLV I και 1 δείγμα anti-HTLV II) και 10 δείγματα κρίθηκαν ακαθόριστα (0,01%) για HTLV I/II. Η πιθανή πηγή μόλυνσης για τους οροθετικούς αιμοδότες μελετήθηκε με βάση το ιστορικό τόσο προ αιμοληπτικά όσο και μετά αιμοληπτικά ενώ αναλύθηκε η αιμοδοτική συχνότητα και το προφίλ των αιμοδοτών.¹⁰⁹ Έτσι, διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η σεξουαλική μετάδοση στη σύζυγο ενός από τους οροθετικούς αιμοδότες. Η γυναίκα ήταν 38 ετών, ασυμπτωματική και ο σύζυγος 42 ετών. Η ορομετατροπή έγινε κατά την διάρκεια παρακολούθησης της γυναίκας, 18 μήνες μετά την διάγνωση της μόλυνσης στο σύζυγό της. Ο χρόνος μεταξύ μόλυνσης και ορομετατροπής στη γυναίκα δεν μπορούσε να προσδιοριστεί αλλά θεωρείται μεγάλος και σχετίζεται τόσο με τον τίτλο της οροαντίδρασης όσο και με το χρόνο της σεξουαλικής σχέσης με τον οροθετικό σύζυγο.¹¹⁰

Σύμφωνα με την μελέτη αυτή η επιλογή των αιμοδοτών με βάση μόνο το ιστορικό ως κριτήριο αποκλεισμού από την αιμοδοσία δεν μπορούσε να αποτελεί ασφαλές μέτρο περιορισμού μετάδοσης της

λοίμωξης με το αίμα. Το 1995 γίνεται υποχρεωτικός ο έλεγχος των αιμοδοτών για anti-HTLV I/II αντισώματα.

Σε μακροχρόνια μελέτη που διενεργήθηκε από το 1997 έως το 2005 στην περιοχή της Πελοποννήσου (σε όλα τα κέντρα ελέγχου της περιοχής) ελέγχθηκαν διάφορες πληθυσμιακές ομάδες μεταξύ των οποίων ήταν 2.016 εγκύων γυναικών, 102 πολυμεταγγιζόμενων αιματολογικών και ογκολογικών ασθενών, 93 θαλασσαιμικών καθώς και 57 χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών. Το ποσοστό επιπολασμού του HTLV I/II και σε αυτή την περιοχή της χώρας ήταν εξίσου μηδενικό.¹¹¹

Σε μια ακόμα πολυετή μελέτη (1999-2004) που πραγματοποιήθηκε στην Αττική, στο Εθνικό Κέντρο παρασκευής παραγώγων αίματος «Ηλίας Πολίτης», εκλέχθηκαν 134.227 μονάδες αίματος εκ των οποίων έδωσαν αρχικά θετικό αποτέλεσμα 83 δείγματα. Οι δότες ήταν άνδρες, πρώτης φοράς κυρίως, 18-25 ετών. Κατά τον επανέλεγχο 57 δείγματα ήταν επαναλαμβανόμενα θετικά ενώ στην επιβεβαιωτική μέθοδο 39 δείγματα ήταν αρνητικά και 18 δείγματα αμφίβολα (0,01%). Ο επιπολασμός του HTLV I/II και σε αυτή την μελέτη ήταν μηδενικός.¹¹²

Το 2000 αναφέρεται ο πρώτος Έλληνας ασθενής με διάγνωση λευχαιμίας ενηλίκων T-λεμφοκυττάρων (ATL) με μόλυνση τόσο των CD4+ όσο και των CD8+ λεμφοκυττάρων παρουσιάζοντας έτσι ένα σπάνιο ανοσοφαινότυπο της νόσου. Πρόκειται για γυναίκα 56 ετών με αρχική διάγνωση non Hodgkin's lymphoma (NHL). Η ανάλυση DNA της ασθενούς αποκάλυψε ότι μολύνθηκε από το κοσμοπολίτικο στέλεχος του HTLV I. Η εξέλιξη της νόσου ήταν ραγδαία και εντός πέντε μηνών απεβίωσε με μη ανταποκρινόμενη υπερασβεσταιμία και συμπτώματα μόλυνσης στο θώρακα.¹¹³ Το 2004, αναφέρονται δυο πλήρως τεκμηριωμένες περιπτώσεις ATL σε ασθενείς με παράλληλο έλεγχο των μελών των οικογενειών τους. Οι ασθενείς, μια γυναίκα 55 χρονών και ένας άντρας 59 χρονών, ασυμπτωματικοί, ανέπτυξαν ταχέως ATL οξείας μορφής. Στον πρώτο ασθενή παρατηρήθηκαν πολλαπλά υποδόρια οζίδια στην επιφάνεια εσωτερικά της παλάμης και στα δυο χέρια, ενώ έπασχε από υποτροπιάζουσες ευκαιριακές λοιμώξεις. Στον δεύτερο ασθενή χορηγήθηκε χημειοθεραπεία με αρχική απόκριση >50%. Και οι δυο οικογένειες των ασθενών βρέθηκαν θετικοί για anti-HTLV I αντισώματα, είχαν ανιχνεύσιμο ιϊκό DNA μετά από PCR ανάλυση και ήταν ασυμπτωματικοί.¹¹⁴

Σε μελέτη του 2004 στη ΒΔ Ελλάδα, από επτά τράπεζες αίματος, εκλέχθηκαν 51.714 αιμοδότες για anti-HTLV I/II. Βρέθηκαν αρχικά 115 οροθετικοί εκ των οποίων μόνο 7 επιβεβαιώθηκαν ως θετικοί με WB (0,013%) ενώ με μέθοδο PCR δεν επιβεβαιώθηκε κανένα δείγμα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι από τους 7 θετικούς κατά WB οι 5 ανιχνεύθηκαν στην τράπεζα αίματος της Κέρκυρας, έξι φορές μεγαλύτερος επιπολασμός, χωρίς όμως να έχει γίνει περαιτέρω έρευνα για να εξετασθεί αν το εύρημα αυτό αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό φαινόμενο.¹¹⁵

Συνοπτικά τα παραπάνω στοιχεία για την οροεπικράτηση του HTLV I/II στην Ελλάδα απεικονίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Οροεπικράτηση HTLV I/II στην Ελλάδα

Έτος	Περιοχή	Πληθυσμός	%	Σχόλια
2004	ΒΔ Ελλάδα	Αιμοδότες	0,013%	7 από τα 5 θετικά δείγματα με WB ήταν από την ίδια τράπεζα αίματος
1999-2004	Αττική	Αιμοδότες	0%	Ένοπλες Δυνάμεις Άνδρες 18-25 ετών
1999-2001	Δράμα	Αιμοδότες	0%	-
1997-2005	Πελοπόννησος	Διάφορος	0%	0% εγκύους, πολυμεταγγιζόμενους & χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών
1997-1999	Πανελλαδικά	Αιμοδότες	0,009%	Από τα 9 θετικά δείγματα τα 8 ήταν HTLV I και 1 ήταν HTLV II
1995-1997	ΒΔ Ελλάδα (Ηπειρος)	Αιμοδότες	0%	-
1995	ΒΔ Ελλάδα	Διάφορος	0-1,2%	0% αιμοδότες & χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών, 1,2% αιμοκαθαρομένοι

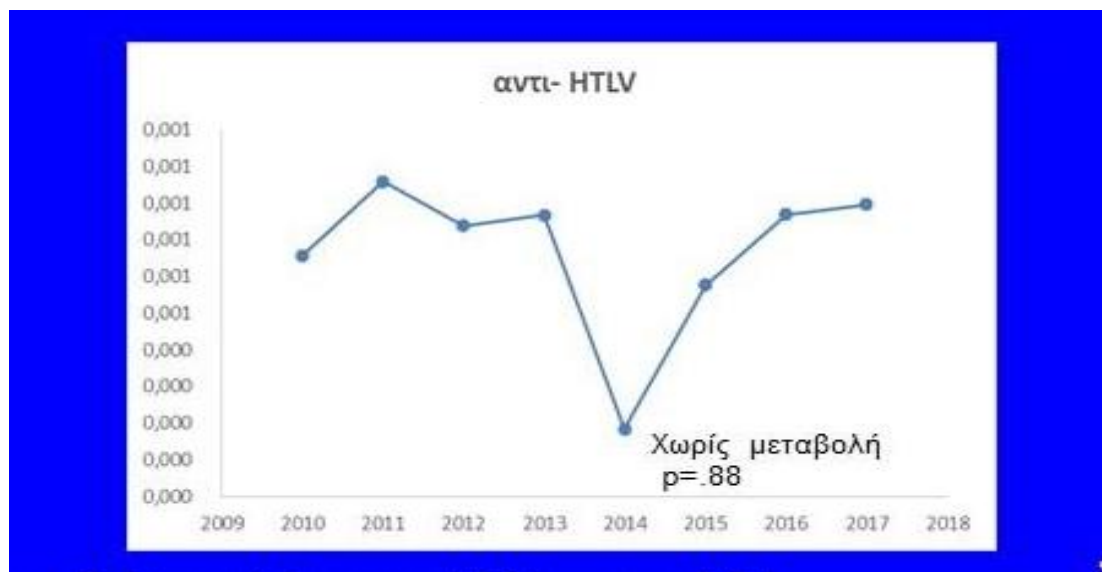
Σύμφωνα με το Δελτίο 2017 του Υπουργείου Υγείας, του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.) και του Συντονιστικού Κέντρου Αιμοεπαγρύπνησης (ΣΚΑΕ) ο επιπολασμός του HTLV στην χώρα το 2011 ήταν 0,001%. (Εικόνα 10) Σε διαχρονική παρακολούθηση τα αποτελέσματα της οροεπικράτησης της λοίμωξης που αφορά 7.591.899 ελεγχθείσες μονάδες αίματος κατά την περίοδο 2003-2016 ο δείκτης anti-HTLV παρουσιάζει σταθερότητα χωρίς σημαντικές μεταβολές. Επισημαίνονται όμως ανεπάρκειες κατά τον επιβεβαιωτικό έλεγχο λόγω ελλείψεων αντιδραστηρίων, καθώς και σε

ορισμένες περιπτώσεις μη συμμόρφωσης με τον ισχύων αλγόριθμο του Συμβουλίου της Ευρώπης για την επιβεβαίωση ανίχνευσης δείκτη λοιμώδους νοσήματος. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν την ανάγκη υποχρεωτικής εφαρμογής και ίσως επανακαθορισμού του εν λόγω αλγόριθμου για την οριστική επιβεβαίωση της λοίμωξης. Σημαντική είναι επίσης και η συνεχή εκπαίδευση του προσωπικού των Υπηρεσιών Αιμοδοσίας στα θέματα συμβουλευτικής διαδικασίας (Counselling) πριν και μετά την αιμοδοσία ως εργαλείο Αιμοεπαγρύπνησης καθώς και γνωστοποίησης των αποτελεσμάτων ελέγχου.

Στο δελτίου του Υπουργείου Υγείας δίνεται το προφίλ του οροθετικού αιμοδότη για το σύνολο των 5 λοιμώξεων, που ελέγχονται υποχρεωτικά και είναι άνδρας, συγγενής και δότης πρώτης φοράς. Σχετικά με τον τόπο προέλευσης του οροθετικού αιμοδότη σημειώνεται ότι 63% των HBV θετικών ατόμων είναι αλλοδαποί, ενώ 78% και 92% των οροθετικών για HCV και HIV αντίστοιχα είναι ελληνικής καταγωγής. Για τον ιό HTLV δεν γίνεται αναφορά.¹¹⁶

Κύριοι κίνδυνοι εξάπλωσης των HTLV I/II στην χώρα μας είναι οι πληθυσμιακές μετακινήσεις, ο τουρισμός και η μαζική προσέλευση πληθυσμών από περιοχές που υπάρχει τεκμηριωμένα αυξημένη συχνότητα της νόσου. Ιδιαίτερα σε απομακρυσμένους νομούς από λιμάνια, αεροδρόμια και μεγάλα αστικά κέντρα η ανίχνευση οροθετικών δειγμάτων είναι εξαιρετικά σπάνια.

**2010- 2017 Οροεπικράτηση σε 4.341.232 μονάδες
Μέση ετήσια μεταβολή**



Ενημερωτικό Δελτίο ΣΚΑΕ 14/12/2018

https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/05/enimerotiko_deltio_skae_2017.pdf

Εικόνα 10

5. Εργαστηριακός έλεγχος

5.1 Ορολογικές και Μοριακές μέθοδοι μελέτης anti-HTLV I/II

Οι διαγνωστικοί μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι HTLV I/II σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα είναι ορολογικές δοκιμασίες ανοσοενζυμικής τεχνικής (ELISA), συγκόλλησης σωματιδίων (PA), ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (ChLIA) και η πιο σύγχρονη μέθοδο μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (CMIA). Οι επιβεβαιωτικές δοκιμασίες του αρχικού θετικού αποτελέσματος αλλά και η διάκριση μεταξύ HTLV I και HTLV II περιλαμβάνουν κυρίως ανοσολογική δοκιμασία αποτυπώματος Western Blot ή ανοσολογική ανίχνευση (INNO-LIA) και σε μικρότερο βαθμό προσδιορισμό ανοσοφθορισμού (IFA). Απροσδιόριστα αποτελέσματα της επιβεβαιωτικής δοκιμής μπορεί να συμβούν και οι πιο συχνοί λόγοι είναι η περίοδος παραθύρου, η παρουσία παραλλαγής του ιού και η μη ειδική αντίδραση των αντισωμάτων του ασθενούς στα ιϊκά αντιγόνα.¹¹⁷ Σε απροσδιόριστα αποτελέσματα διενεργείται μοριακή εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Η μοριακή μελέτη με την τεχνική της

PCR αναδεικνύει την παρουσία του γενετικού υλικού του ιού τόσο στο αίμα όσο και σε άλλους ιστούς, επικυρώνει τα ορολογικά αποτελέσματα, προσδιορίζει τον τύπο του HTLV, παρέχει ενισχυμένο προϊκό DNA για αναλύσεις αλληλουχίας και βοηθάει στη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενειών που σχετίζονται με τον ιό. Μετά την πρωτολοίμωξη από τον ιό, τα αντισώματα έναντι του HTLV I/II αναπτύσσονται εντός δυο μηνών από τη μόλυνση για τα IgM και στους τρεις με τέσσερις μήνες για τα IgG αντισώματα.

Μπορεί επίσης να γίνει άμεση ανίχνευση του ιού από ιϊκή καλλιέργεια, αλλά αυτή η τεχνική απαιτεί εξειδικευμένα και κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια.

Σε περιπτώσεις όπου είναι δύσκολο να ληφθούν δείγματα ορού ή πλάσματος, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί μια αποξηραμένη κηλίδα αίματος που συλλέγεται σε φίλτρο χαρτιού ανίχνευσης, ειδικά για μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες ή για έγκυες γυναίκες κατά την προγεννητική περίοδο. Άλλα βιολογικά υλικά κατάλληλα για ανίχνευση αντισωμάτων HTLV είναι το μητρικό γάλα, το οποίο αποτελεί άμεση πηγή μόλυνσης και μπορεί να λαμβάνεται δείγμα μη επεμβατικά, τα ούρα και το σάλιο.¹¹⁸

5.2 Ερμηνεία αποτελεσμάτων και κριτήρια θετικότητας ενός δείγματος

Ο συνολικός εργαστηριακός έλεγχος για HTLV I/II ακολουθεί έναν συγκεκριμένο αλγόριθμο. (Εικόνα 11) Γίνεται με σταδιακό τρόπο και περιλαμβάνει την αρχική εξέταση για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι HTLV I/II (δοκιμασίες διαλογής) όπου δείγματα με τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες ή ίσες με το όριο θετικότητας που καθορίζεται από τον κατασκευαστή χαρακτηρίζονται ως αρχικά αντιδρώντα. Τα αρχικά αντιδρώντα δείγματα επανεξετάζονται εις διπλούν για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ότι η αντιδραστικότητα οφείλεται σε τεχνικό σφάλμα. Δείγματα που είναι αντιδρώντα σε οποιαδήποτε από τις διπλές εξετάσεις θεωρούνται επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα. Δείγματα που δεν είναι αντιδρώντα σε καμία από τις διπλές επαναλαμβανόμενες δοκιμασίες θεωρούνται μη αντιδρώντα.

Επιπρόσθετες ορολογικές δοκιμές είναι απαραίτητες για να επιβεβαιωθεί ότι τα δείγματα ορού που είναι επαναλαμβανόμενα αντιδραστικά στις δοκιμασίες διαλογής είναι θετικά για το αντίσωμα HTLV. Οι δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της οροθετικότητας του HTLV πρέπει να είναι ικανές να αναγνωρίσουν

αντίσωμα στις πρωτεΐνες πυρήνα (gag) και φακέλου (env) του HTLV. Ειδικές δοκιμές περιλαμβάνουν δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης Western (WB) και δοκιμή ραδιοανοσοκατακρήμνισης (RIPA). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί δοκιμασία έμμεσου φθορισμού αντισώματος (IFA) για το HTLV σε μερικά εργαστήρια, αλλά η IFA δεν ανιχνεύει αντισώματα σε συγκεκριμένα προϊόντα γονιδίων HTLV I. Το WB φαίνεται να είναι η πλέον ευαίσθητη δοκιμή για τα αντισώματα έναντι των προϊόντων πρωτεΐνης gag p19, p24 και p28, ενώ η RIPA φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη για αντίσωμα έναντι των env γλυκοπρωτεϊνών gp46 και gp61/68. Τα επιβεβαιωτικά κριτήρια για την οροθετικότητα του HTLV είναι όταν ένα δείγμα επιδεικνύει ανοσοαντιδραστικότητα στο προϊόν γονιδίου gag p24 και σε ένα προϊόν γονιδίου env (gp46 και ή gp61/68). Δείγματα ορού που δεν ικανοποιούν αυτά τα κριτήρια αλλά έχουν ανοσοαντιδραστικότητα σε τουλάχιστον ένα προϊόν γονιδίου HTLV (όπως μόνο p19, p19 και p28, ή p19 και env) ορίζονται ως "απροσδιόριστα". Δείγματα που δεν έχουν ανοσοαντιδραστικότητα σε οποιαδήποτε προϊόντα γονιδίου του HTLV στις δοκιμές αυτές χαρακτηρίζονται ως "αρνητικά". Τόσο η WB όσο και η RIPA μπορεί να απαιτηθούν για να καθοριστεί εάν ένα δείγμα ορού είναι θετικό, απροσδιόριστο ή αρνητικό.

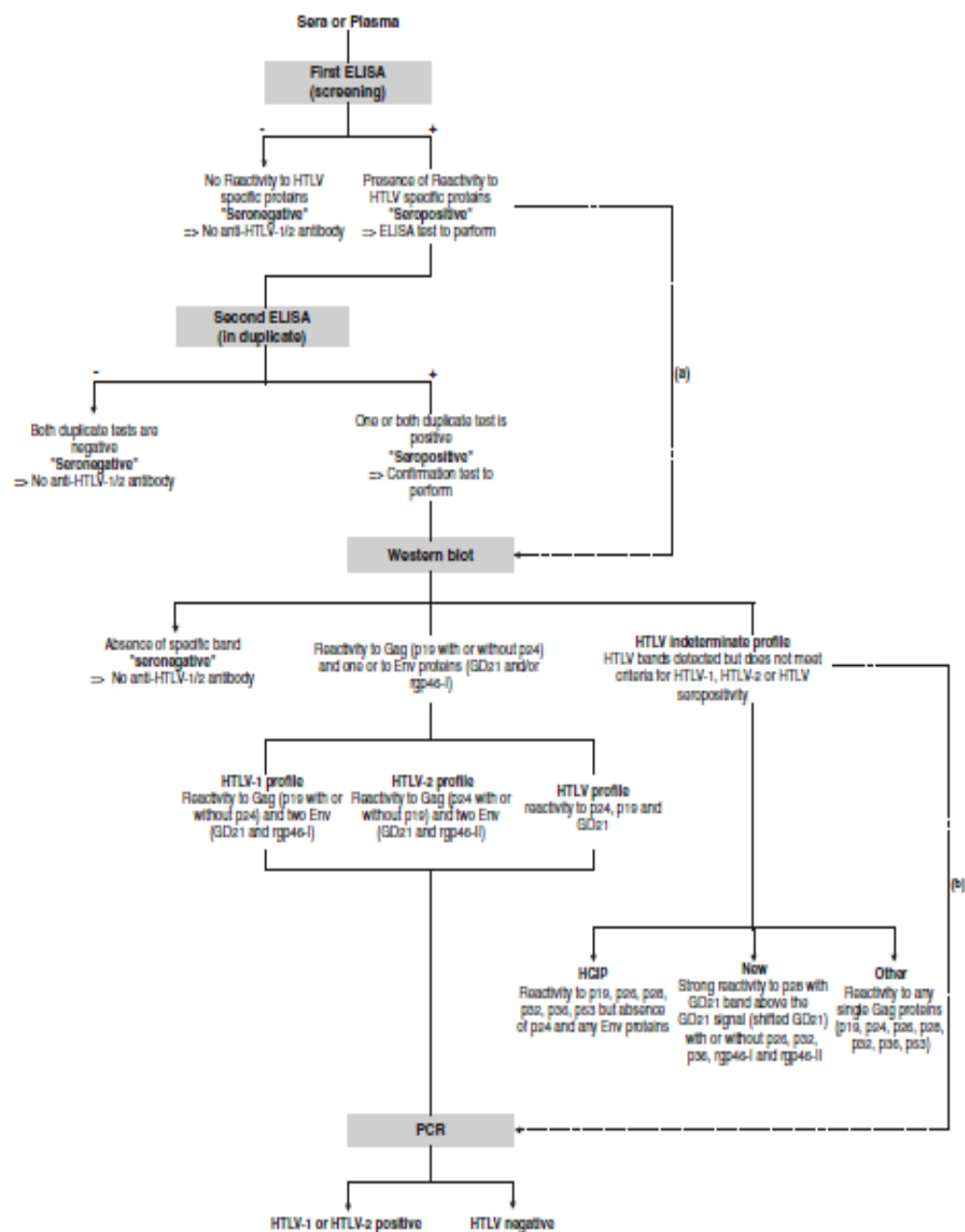
Απροσδιόριστο αποτέλεσμα είναι πιθανό να υπάρχει σε μη ειδική αντίδραση με κάποιο αντίσωμα που μπορεί να οφείλεται σε εμβολιασμό, σε πρόσφατη λοίμωξη, σε αλλεργίες ή σε αυτοαντισώματα και αντισώματα διασταυρούμενης αντίδρασης IgM και IgG. Τα κύτταρα προέλευσης για αντιγόνα HTLV που χρησιμοποιούνται είτε στην WB είτε στην RIPA, καθώς και η μέθοδος παρασκευής αντιγόνου, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ευαισθησία και την ερμηνεία της ανοσοαντιδραστικότητας έναντι των μεμονωμένων πρωτεϊνών HTLV. Πιο αναλυτικές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού και η ενίσχυση του γονιδίου (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR) μπορεί να απαιτηθούν για τη διαφοροποίηση του HTLV I από τον HTLV II.¹¹⁹⁻¹²¹

Άτομα που έχουν βρεθεί θετικά στον ιό αποκλείονται από την αιμοδοσία δια βίου. Ο αποκλεισμός των οροθετικών ατόμων από την ομάδα των αιμοδοτών οδηγεί σε μείωση του αριθμού των παραληπτών μολυσμένων μεταγγίσεων καθώς και στην μείωση νέων λοιμώξεων στο συνολικό πληθυσμό. Ωστόσο, σε μελέτη που έγινε στις ΗΠΑ από το 1995 έως το 2008 αναφέρεται ότι αποκλείστηκαν πάνω από 130.000 αιμοδότες λόγω ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων οι οποίοι πιθανόν να ήταν ασφαλείς δότες. Έτσι, προτείνουν την αναθεώρηση του εργαστηριακού αλγόριθμου διάγνωσης, ώστε σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα να γίνεται επανέλεγχος των αιμοδοτών για πιθανή νέα είσοδό τους ως αιμοδότες.¹²²

Ανάλογες μελέτες έχουν γίνει και σε άλλες χώρες, όπως στη Σαουδική Αραβία (2018) όπου σε 107.419 δείγματα που εξετάστηκαν εντός δεκαετίας (2006-2015) βρέθηκαν 95 δείγματα θετικά ενώ κανένα εξ αυτών δεν επιβεβαιώθηκε με Western Blot μέθοδο ανοσοαποτύπωσης. Τονίζοντας, ότι το μέσο κόστος των ελέγχων ήταν 171.870 δολάρια ετησίως προτείνουν αλλαγές στην πολιτική ελέγχου που εφαρμόζεται στην χώρα.¹²³ Μέχρι στιγμής κανένα προτεινόμενο πρωτόκολλο δεν έχει εγκριθεί από τον FDA ή από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο HTLV για επανείσοδο αποκλεισμένου αιμοδότη λόγω HTLV.

Το Σεπτέμβριο του 2018 ο FDA εξέδωσε συστάσεις για επανεξέταση αποκλεισμένων ψευδώς θετικών HTLV I/II αιμοδοτών. Δίνει κατευθυντήριες οδηγίες για την οριστική αναβολή ενός αιμοδότη καθώς και για μια πιθανή και αποδεκτή διαδικασία σε αυτούς που μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλοι για επανέλεγχο καθώς και τις προτεινόμενες ενέργειες για επανείσοδο τους. Τέλος, στο έγγραφο ζητείται η υποβολή εκθέσεων για την δημιουργία τελικής έκδοσης της οδηγίας.¹²⁴

ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ HTLV-1/2 ΛΟΙΜΩΞΗΣ



Serological and Molecular Methods to Study

Εικόνα 11

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Οργάνωση του Εργαστηρίου Ορολογικού Ελέγχου του Κέντρου Αίματος του Ε.ΚΕ.Α.

Τον Ιούνιο του 2017, στα πλαίσια της υλοποίησης του σχεδίου συγκεντροποίησης του Ορολογικού Ελέγχου των μεταδιδόμενων με τη μετάγγιση νοσημάτων σε 4 Κέντρα Αίματος, ξεκίνησε η λειτουργία του Εργαστηρίου Ορολογικού Ελέγχου του Κέντρου Αίματος του Ε.ΚΕ.Α. Στο Εργαστήριο ελέγχονται οι μονάδες αίματος που συλλέγονται από τις Νοσοκομειακές Υπηρεσίες Αιμοδοσίας των Νοσοκομείων της Αττικής, Βοιωτίας, Φθιώτιδας, Φωκίδας, Ευρυτανίας, Κορινθίας, Ιονίων νήσων, νησιών Κεντρικού και Βορειοανατολικού Αιγαίου, Δωδεκανήσων καθώς και οι αιμοληψίες των Ενόπλων Δυνάμεων.

Ο έλεγχος περιλαμβάνει περίπου 300.000 μονάδες αίματος ετησίως και αφορά τους θεσμοθετημένους υποχρεωτικούς ελέγχους :

- Έναντι του HIV-1 (αντί-HIV-1) και του HIV-2 (αντί-HIV-2), συμπεριλαμβανομένων ορισμένων σπανίων παραλλαγών του ιού (HIV-1 τύπος O) καθώς και το αντιγόνο P24
- του επιφανειακού αντιγόνου του ιού της ηπατίτιδας B (HBsAg)
- των αντισωμάτων εναντίον του ιού της ηπατίτιδας C (αντί-HCV)
- της σύφιλης
- των αντισωμάτων εναντίον του ανθρωπίνου T-λεμφοτρόπου ιού τύπου I (αντί-HTLV I) και II (αντί-HTLV II)

Τα κωδικοποιημένα δείγματα από τις παραπάνω αιμοληψίες παραλαμβάνονται καθημερινά στο Ε.ΚΕ.Α και εισάγονται στο προ-αναλυτικό στάδιο επεξεργασίας το οποίο περιλαμβάνει:

- αξιολόγηση ποιότητας δειγμάτων και ταυτοποίηση αποστολών
- εισαγωγή στο ενδιάμεσο λογισμικό (middleware) του συστήματος διαχείρισης αναλυτών (AMS)
- φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 20 min σε επιτραπέζιες φυγοκέντρους Heraeus Megafuge 16 της εταιρείας THERMO Scientific και
- αποπωματισμός σε αυτοματοποιημένες συσκευές DC1200 της εταιρείας Sarstedt.

Ακολουθεί το αναλυτικό στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται η μέθοδος της χημειοφωταύγειας σε αυτοματοποιημένα συστήματα αναλυτών τελευταίας τεχνολογίας και μεγάλης παραγωγικότητας, με εγκεκριμένες και αξιόπιστες διαδικασίες ανίχνευσης υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας. Για την κύρια μέθοδο καθημερινής εργασίας χρησιμοποιήθηκε αρχικά ο αναλυτής Prism nEXT (Abbott) ο οποίος αντικαταστάθηκε τον Ιούνιο του 2019 από τον αναλυτή Alinity s (Abbott) ενώ για τη δευτερεύουσα μέθοδο (έλεγχος μόνο των αρχικά θετικών δειγμάτων) ο

αναλυτής Architect plus i2000sr (Abbott). Για τον έλεγχο της σύφιλης χρησιμοποιείται ο αναλυτής Liaison (DiaSorin). Στα πλαίσια του ελέγχου ποιότητας των αναλυτών και των μεθόδων, εκτός από τη βαθμονόμηση των αναλυτών, εφαρμόζεται καθημερινά εσωτερικός και εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος. Μετά το τέλος της ανάλυσης τα αποτελέσματα αξιολογούνται και εγκρίνονται από τεχνολόγο και τον υπεύθυνο του Εργαστηρίου και στη συνέχεια αποστέλλονται στις συνεργαζόμενες Υπηρεσίες Αιμοδοσίας μέσω του Εθνικού Μητρώου Αίματος (EMA).

Τέλος, το μετά αναλυτικό στάδιο περιλαμβάνει αρχειοθέτηση των δειγμάτων σε αυτοματοποιημένο σύστημα αρχειοθέτησης Freedom Evo Clinical (TECAN), ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

6.2 Μέθοδοι ορολογικού ελέγχου

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί, αποτελούν εκείνη την κατηγορία των αναλυτικών μεθόδων που συνδυάζουν τεχνολογίες χημείας και ανοσολογίας και χρησιμοποιούνται για τον Ορολογικό έλεγχο του αίματος. Οι σημαντικότερες ανοσοχημικές τεχνικές είναι οι ανοσοενζυμικές τεχνικές, οι ραδιοανοσοενζυμικές τεχνικές και τεχνικές χημειοφωταύγειας. Στην Ελλάδα, στα 4 Κέντρα Αίματος η ορολογική μέθοδο ανίχνευσης που χρησιμοποιείται στα κέντρα ελέγχου αιμοδοτών για τον έλεγχο αντισωμάτων έναντι των ιών HTLV I και HTLV II είναι η ανοσοενζυμική μέθοδος χημειοφωταύγειας.

Η χημειοφωταύγεια είναι το φυσικό φαινόμενο της φωτεινής ακτινοβολίας από μία εξώθερμη χημική αντίδραση ($A+B$). Η οξειδοαναγωγική αυτή αντίδραση παρέχει την ενέργεια σε προϊόν της, ώστε αυτό να διεγερθεί (C^*). Καθώς αμέσως αποδιεγείρεται για να επιστρέψει σε σταθερή ενεργειακή κατάσταση (C), εκπέμπει χαρακτηριστική φωτεινή ακτινοβολία ($h\nu$). Η συνολική αντίδραση περιγράφεται απλοποιημένα από την εξίσωση: $A + B \rightarrow C^* \rightarrow C + h\nu$. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα σήμερα φωταυγή συστήματα είναι η οξείδωση αρωματικών εστέρων ακριδίνης με H_2O_2 , η ενζυμική υδρόλυση φωσφορικών εστέρων και η οξείδωση λουμινόλης με H_2O_2 .

Η χημειοφωταύγεια αποτελεί τη νεότερη ανοσοδιαγνωστική μεθοδολογία και την πλέον αυτοματοποιημένη. Είναι ταχύτατη, παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Οι μέθοδοι της χημειοφωταύγειας, δεδομένου ότι παρέχονται πλήρως αυτοματοποιημένες, αποτελούν μεθόδους μεγάλης δυναμικότητας, μεγάλης ταχύτητας παροχής αποτελεσμάτων, χρήσιμες για τον έλεγχο των αιμοδοτών.

Οι μέθοδοι μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence Microparticles Immunoassay – CMIA ή ChLIA) που

χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του HTLV I και HTLV II σε ορό ή πλάσμα στην παρούσα μελέτη και των οποίων οι βιολογικές αρχές περιγράφονται στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση του ιού και ως δοκιμή τυχαίας διαλογής (screening) για την αποφυγή μετάδοσης του ιού σε λήπτες αίματος, παραγώγων αίματος, ιστών και οργάνων.¹²⁵⁻¹²⁶

6.2.1 Βιολογικές αρχές της διαδικασίας του αναλυτή Alinity s (Abbott)

Κάθε δείγμα προς έλεγχο, συνδυάζεται με παραμαγνητικά μικροσωματίδια επικαλυμμένα με αντιγόνα HTLV I/II και αραιωτικό διάλυμα εξέτασης και επωάζεται. Τα αντισώματα έναντι HTLV I/II που πιθανόν υπάρχουν στο δείγμα δεσμεύονται στα συνθετικά πεπτίδια HTLV I/II και στα μικροσωματίδια που φέρουν επικάλυψη ανασυνδυασμένου αντιγόνου HTLV II και σχηματίζουν ανοσοσύμπλεγμα. Πραγματοποιείται πλύση του μίγματος για την απομάκρυνση μη συζευγμένων υλικών. Στη συνέχεια προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης το συνδετικό διάλυμα (conjugate) συνθετικών πεπτιδίων HTLV I/II και ανασυνδυασμένου αντιγόνου HTLV I με σήμανση ακριδίνης. Το συνδετικό διάλυμα συνδέεται στο ανοσοσύμπλεγμα για να ολοκληρωθεί το μίγμα αντίδρασης το οποίο επωάζεται. Μετά τον κύκλο πλύσης, προστίθενται κατά σειρά τα διαλύματα αρχικής φωτοενεργοποίησης και φωτοενεργοποίησης με σκοπό την οξείδωση της ακριδίνης. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας που προκύπτει μετριέται σε σχετικές μονάδες φωτεινότητας (RLU). Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ της ποσότητας anti-HTLV I/II στο δείγμα και των RLU που ανιχνεύονται από το σύστημα οπτικών του αναλυτή. Η παρουσία ή απουσία των αντισωμάτων έναντι των HTLV I/II στο δείγμα προσδιορίζεται με τη σύγκριση του σήματος χημειοφωταύγειας στην αντίδραση με το σήμα ορίου θετικότητας (cutoff) που έχει προσδιοριστεί με μια ενεργή βαθμονόμηση.¹²⁷

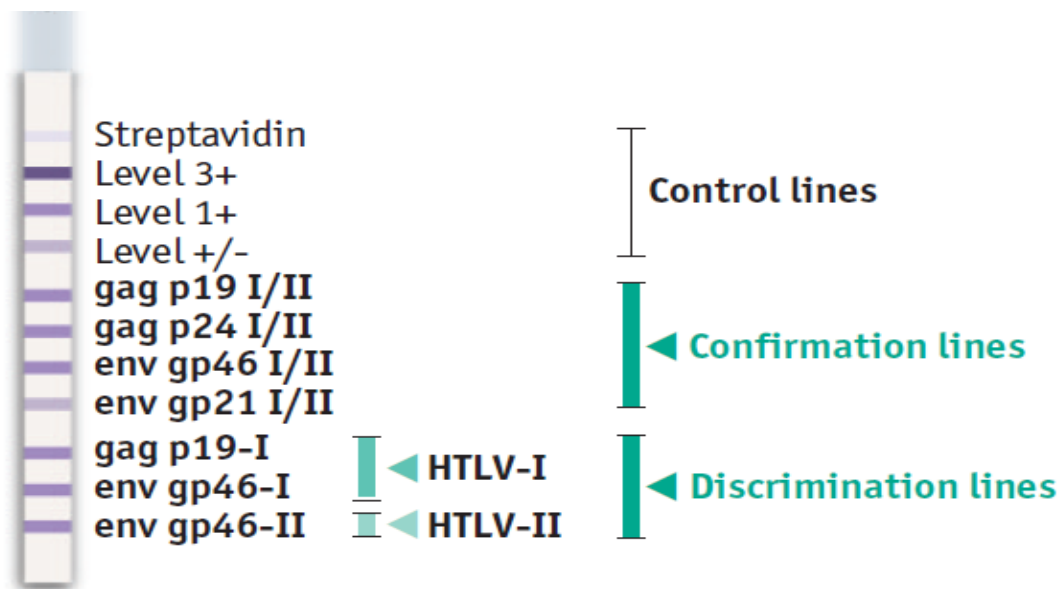
6.2.2 Βιολογικές αρχές της διαδικασίας του αναλυτή PRISM nEXT (Abbott)

Η εξέταση αποτελεί ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (ChLIA) τύπου ‘σάντουιτς’ τριών σταδίων. Αρχικά, μικροσωματίδια επικαλυμμένα με αντιγόνα HTLV I και HTLV II τα οποία έχουν αδρανοποιηθεί με υπέρηχους ή απολυμαντικό, επωάζονται με πλάσμα ή ορό στον υποδοχέα επώασης του δίσκου αντίδρασης. Κατά την επώαση, τα αντισώματα έναντι του HTLV I/II που υπάρχουν στο δείγμα συνδέονται με το αντιγόνο στα μικροσωματίδια. Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης αυτής επώασης, το μίγμα αντίδρασης μεταφέρεται στο πλέγμα υαλογενών ινών του δίσκου αντίδρασης μέσω του πλυστικού μεταφοράς αντιδρώντων όπου τα μικροσωματίδια δεσμεύονται από το πλέγμα υαλογενών ινών. Ένα αντιδραστήριο ανίχνευσης, αποτελούμενο από βιοτινοποιημένες πρωτεΐνες HTLV I/II, προστίθεται

στο ανοσοσύμπλεγμα αντισώματος-μικροσωματιδίων και επωάζεται. Μετά την δεύτερη επώαση, το μη συζευγμένο αντιδραστήριο ανίχνευσης ξεπλένεται με πλυστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, προστίθεται συνδεδετικό διάλυμα αντισωμάτων έναντι της βιοτίνης με σήμανση ακριδίνης ώστε να δεσμεύσει τυχόν υφιστάμενα αντιδραστήρια ανίχνευσης. Μετά την τρίτη επώαση, το μη συζευγμένο διάλυμα ξεπλένεται και ακολουθεί η προσθήκη ενός αλκαλικού διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου ώστε να δημιουργηθεί το σήμα χημειοφωταύγειας όπου μετρώνται τα φωτόνια που παράγονται. Η ποσότητα φωτός που εκπέμπεται είναι ανάλογη της ποσότητας των αντισωμάτων έναντι του HTLV I/II στο δείγμα, η παρουσία ή απουσία των οποίων προσδιορίζεται με τη σύγκριση του σήματος ορίου θετικότητας (cutoff) που έχει προσδιοριστεί με μια ενεργή βαθμονόμηση.¹²⁸

6.2.3 Βιολογικές αρχές της επιβεβαιωτικής Δοκιμασίας Ανοσοαποτύπωσης σε Ζώνες INNO-LIAHTLV I/II (Fujirebio)

Αποτελεί δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης σε ζώνες, για την επιβεβαίωση της παρουσίας αντισωμάτων έναντι του ανθρώπινου Τ-λεμφοτρόπου ιού τύπου I (HTLV I) και τύπου II (HTLV II) στον ορό ή στο πλάσμα και την διαφοροποίηση μεταξύ των λοιμώξεων HTLV I και HTLV II. Χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική επιβεβαιωτική διαδικασία επί θετικού δείγματος μετά την χρήση εξετάσεων διαλογής. Η μέθοδος χρησιμοποιεί σαφώς καθορισμένα αντιγόνα που προέρχονται από HTLV I/II ανοσοεπικρατείς πρωτεΐνες. Τα αντιγόνα αυτά είτε είναι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες είτε συνθετικά πεπτίδια, υψηλής καθαρότητας και είναι μονιμοποιημένα σε πλαστική μεμβράνη ελέγχου. Οι αλληλουχίες έχουν επιλεγεί ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευση αντισωμάτων, με μεγάλη ειδικότητα για όλα τα γνωστά στελέχη του ιού. Η αντιγονικότητα που επιδεικνύουν αυτές οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια είναι είτε κοινή για τα αντισώματα HTLV I και HTLV II, είτε ειδική για έναν από τους δυο ιούς ώστε να επιτρέπει την επιβεβαίωση και την διαφοροδιάγνωση με μία μόνο εξέταση. Εφαρμόζονται δυο ζώνες gag (p19 I/II, p24 I/II) και δυο env (gp46 I/II, gp21 I/II) σαν αντιγόνα μη ειδικού τύπου, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση παρουσίας αντισωμάτων έναντι του HTLV I/II. Τα ειδικά αντιγόνα για τον HTLV I (gag p19-I, env gp46-I) και για τον HTLV II (env gp46-II) χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση μεταξύ των δυο τύπων του ιού. Επιπλέον, υπάρχουν τέσσερις ζώνες ελέγχου (μάρτυρα): μια ζώνη ελέγχου background-υπόβαθρου, και τρεις θετικές ζώνες ελέγχου, 3+ θετικός μάρτυρας (αντί-ανθρώπινη Ig) που χρησιμοποιείται επίσης ως ζώνη ελέγχου προσθήκης δείγματος, 1+ θετικός μάρτυρας (ανθρώπινη IgG) και ζώνη ± αποκοπής (ανθρώπινη IgG). Εικόνα 12



<https://www.fujirebio.com/>

Ταινία Ελέγχου (strip) Εικόνα 12

Ο δείκτης INNO-LIA HTLV I/II βασίζεται στην ανοσοενζυμική τεχνική (EIA). Το προς εξέταση δείγμα επωάζεται μαζί με την ταινία ελέγχου (strip), στην οποία είναι επικαλυμμένα πολλαπλά αντιγόνα. Τα ειδικά αντισώματα HTLV, εάν υπάρχουν στο δείγμα, θα δεσμευθούν στις επιμέρους ζώνες αντιγόνου HTLV στην ταινία ελέγχου. Στη συνέχεια, η αντί-ανθρώπινη IgG αίγας, σημασμένη με αλκαλική φωσφατάση, προστίθεται και δεσμεύεται με όσα σύμπλοκα αντιγόνου/αντισώματος HTLV έχουν σχηματιστεί. Η επώαση με ενζυμικό χρωμογόνο υπόστρωμα, παράγει σκούρο καφέ χρώμα ανάλογο προς την ποσότητα των ειδικών αντισωμάτων που υπάρχουν στο δείγμα και διακόπτεται μεθειϊκό οξύ. Εάν, το δείγμα περιέχει μη-ειδικά αντισώματα HTLV, θα αναπτυχθεί μόνο ασθενές χρώμα στο υπόβαθρο.¹²⁹⁻¹³⁰

Συνοπτικά η Χειροκίνητη διαδικασία εξέτασης

Αραιωτικό Υγρό Δείγματος	1ml
Δείγμα	10μL
Μάρτυρες	10μL
Επώαση ταινιών (strips) LIA	16 ώρες ± 2 ώρες
Πλύση	1ml/ 3× 5 λεπτά
Δ/μα Σύζευξης	1ml/ 30 λεπτά
Δεύτερη Πλύση	1ml/ 3× 5 λεπτά
Χρωμογόνο	1ml/ 30 λεπτά
Διάλυμα Παύσης	1ml/ 10-30 λεπτά

6.3 Κριτήρια πλήρους επικύρωσης βιοαναλυτικών μεθόδων.

Τα κριτήρια για την αξιοπιστία μιας ανοσοδιαγνωστικής μεθόδου που αποδεικνύουν την ακαταλληλότητα εφαρμογής της είναι:

1. **Η Ειδικότητα (Specificity):** Η πιθανότητα μιας ανάλυσης να ταυτοποιεί αρνητικά δείγματα δηλαδή η μέθοδος πρέπει να προσδιορίζει αποκλειστικά και μόνο την ουσία που θέλουμε να μετρήσουμε.
2. **Η Ακρίβεια (Accuracy):** αναφέρεται στην απόκλιση του (πειραματικού) αποτελέσματος ενός προσδιορισμού από την πραγματική τιμή της ουσίας που υπάρχει στο δείγμα. Όσο πιο μικρή είναι η απόκλιση, τόσο πιο μεγάλη είναι η ακρίβεια.
3. **Η Ευαισθησία (Sensitivity):** Η πιθανότητα της μεθόδου που εφαρμόζουμε να ταυτοποιεί θετικά δείγματα και αναφέρεται στη μικρότερη συγκέντρωση μιας ουσίας την οποία η μέθοδος που εφαρμόζουμε μπορεί να αντιδιαστείλει από το μηδέν.
4. **Η Πιστότητα (Precision):** Η πιστότητα είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο (και μερικές φορές το αποκλειστικό) χαρακτηριστικό ποιότητας μίας αναλυτικής μεθόδου. Η πιστότητα εκφράζει το βαθμό της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες.
5. **Η Επαναληψιμότητα (Repeatability):** Δίνει το μέτρο της διασποράς των τιμών που παίρνουμε όταν προσδιορίζουμε μια ουσία με συγκεκριμένη μέθοδο. Ο ποσοτικός τρόπος έκφρασης της επαναληψιμότητας είναι η τυπική απόκλιση (T.A).¹³¹⁻¹³³

6.3.1 Η ειδικότητα και η ευαισθησία

Οι ανοσοδιαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις που εφαρμόζονται στον έλεγχο του αίματος, σαν βασική αρχή πρέπει να έχουν την άριστη ευαισθησία ώστε να μπορούν να ανιχνεύουν όλους τους αιμοδότες που είναι πραγματικά θετικοί σε ένα μολυσματικό παράγοντα, καθώς επίσης να έχουν και άριστη ειδικότητα ούτως ώστε να μην αποκλείονται πολλοί αιμοδότες αν έχουμε πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στις ανοσοδιαγνωστικές μεθόδους μπορούμε να διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες ατόμων:

1. **Αληθώς Θετικά (ΑΘ):** άτομα τα οποία πάσχουν από μια λοίμωξη και δίνουν θετικό αποτέλεσμα
2. **Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ):** άτομα τα οποία δεν πάσχουν από μια λοίμωξη και δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα
3. **Ψευδώς Θετικά (ΨΘ):** άτομα τα οποία δεν πάσχουν από μια λοίμωξη αλλά δίνουν θετικό αποτέλεσμα
4. **Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ):** άτομα τα οποία πάσχουν από μια λοίμωξη αλλά δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα

Σύνολο μη πασχόντων: ΑΑ+ΨΘ

Σύνολο πασχόντων: ΑΘ+ΨΑ

Ειδικότητα: είναι το μέτρο της επίπτωσης των αρνητικών αποτελεσμάτων της διαγνωστικής μεθόδου σε άτομα τα οποία είναι γνωστό ότι δεν πάσχουν από μια λοίμωξη, δηλαδή είναι Αληθώς αρνητικά.

Υπολογίζεται από τον τύπο $[AA/(AA+\Psi\Theta)] \times 100$

Επομένως, μια δοκιμασία με ειδικότητα 95%, σημαίνει ότι η δοκιμασία είναι αρνητική στα 95 από τα 100 άτομα που δεν πάσχουν. Άρα τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι 5%.

Ευαισθησία: είναι το μέτρο της επίπτωσης των θετικών αποτελεσμάτων της διαγνωστικής μεθόδου σε άτομα τα οποία είναι γνωστό ότι πάσχουν από μια λοίμωξη, δηλαδή είναι Αληθώς Θετικά.

Υπολογίζεται από τον τύπο $[A\Theta/(A\Theta+\Psi A)] \times 100$

Επομένως, μια δοκιμασία με ευαισθησία 95%, σημαίνει είναι θετική στα 95 από τα 100 άτομα που πάσχουν. Άρα τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι 5%.

6.4 Σχήμα μεικτού τίτλου anti-HTLV I/II [Anti-HTLV Mixed Titer Panel (MTP) – BIOMEX]

Το MTP προορίζεται για πρότυπο έλεγχο IgG Αντισωμάτων για την επικύρωση της διαγνωστικής ακρίβειας και ειδικότητας και τον προσδιορισμό της αναλυτικής ευαισθησίας ή ταυτοποίησης της Cut-Off τιμής (όριο θετικότητας). Το σχήμα αποτελείται από 15 δείγματα, 10 ml ανθρώπινο πλάσμα το καθένα όπου 1 δείγμα είναι από HTLV I, 8 δείγματα από HTLV II, 1 δείγμα από HTLV I ή HTLV II, 2 δείγματα απροσδιόριστα και 3 δείγματα αρνητικά.

6.5 Έλεγχος Ποιότητας (QC)

Ο Έλεγχος Ποιότητας Εργαστηριακών Μετρήσεων (QC) που εφαρμόζεται στον έλεγχο του αίματος έχει σχεδιαστεί για να ανιχνεύει, να μειώνει και να διορθώνει τις ανεπάρκειες της εσωτερικής αναλυτικής διαδικασίας ενός εργαστηρίου πριν από την απελευθέρωση των αποτελεσμάτων ελέγχου των εθελοντών αιμοδοτών. Το QC (Quality Control) είναι ένα μέτρο ακρίβειας ή πόσο καλά το σύστημα μέτρησης αναπαράγει το ίδιο αποτέλεσμα με την πάροδο του χρόνου και υπό διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας. Ο έλεγχος ποιότητας δεν είναι μόνο μια διαδικασία. Ο έλεγχος ποιότητας είναι ένα σύστημα.¹³⁴

Βάσει των Ευρωπαϊκών κατευθυντηρίων οδηγιών (Recommendation No. R (95) 15 του Συμβουλίου της Ευρώπης) η ποιότητα των δοκιμασιών διαλογής,

βασίζεται σε ειδικές αρχές οι οποίες περιλαμβάνουν τις ακόλουθες κατηγορίες μέτρων:

1. Εσωτερικός καθημερινός έλεγχος ποιότητας της κατασκευάστριας εταιρείας
2. Ανεξάρτητος εσωτερικός έλεγχος ποιότητας
3. Εξωτερικοί έλεγχοι ποιότητας, με επιβεβαίωση των θετικών ευρημάτων

6.5.1 Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος

Ο Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος διενεργείται καθημερινά για όλες τις εξετάσεις που εκτελούνται στο Εργαστήριο. Οι συσκευασίες του Quality Control περιέχουν δείγματα γνωστής συγκέντρωσης για κάθε παράμετρο (εξέταση) και τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση, σε διάφορα χρονικά σημεία της διαδικασίας (αρχή, μέση, τέλος) και κάθε φορά που αλλάζουν τα lots των αντιδραστηρίων.

Ο εσωτερικός καθημερινός έλεγχος ποιότητας της κατασκευάστριας εταιρείας Abbott διενεργείται καθημερινά, στην αρχή της διαδικασίας πριν την ανάλυση των εξετάσεων των δειγμάτων αίματος, μετά την βαθμονόμηση του κάθε αναλυτή που χρησιμοποιείται και περιλαμβάνει δύο επίπεδα τιμών, φυσιολογικές και παθολογικές. Ο ανεξάρτητος εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος αφορά ανεξάρτητα δείγματα εσωτερικού ελέγχου ποιότητας των διαγνωστικών δοκιμασιών που περιέχουν αντισώματα ή αντιγόνα για τον καθημερινό έλεγχο ποιότητας στις ορολογικές εξετάσεις της αιμοδοσίας HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV I, HTLV II και σύφιλης. Διενεργείται καθημερινά, στην αρχή και κατά το μέσον της διαδικασίας σε κάθε αναλυτή ξεχωριστά και σε κάθε βάρδια του Εργαστηρίου. Πρόκειται για δείγματα τα οποία προσομοιάζουν με τα ανθρώπινα δείγματα που ελέγχονται και δίνουν οριακά θετική αντίδραση (ένα επίπεδο τιμών).

Με τους παραπάνω ελέγχους επιβεβαιώνεται η αξιοπιστία των επιμέρους μεθόδων αλλά και η ακρίβεια των μετρήσεων του αναλυτή και όταν τα αποτελέσματα της μέτρησης είναι εντός των ορίων μας επιτρέπουν την συνέχιση της ανάλυσης των δειγμάτων των αιμοδοτών, ενώ όταν είναι εκτός ορίων προχωράμε σε καινούργια βαθμονόμηση των εξετάσεων που παρατηρήσαμε μη αποδεκτές αποκλίσεις. Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται ο ανεξάρτητος εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος Q Connect Blue και Q Connect Purple της εταιρείας DiaMex ειδικά για τους αναλυτές Abbott Alinity s και Abbott Prism nEXT αντίστοιχα.

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων επαληθεύεται βάσει στατιστικών αναλύσεων των δεδομένων του ελέγχου ποιότητας τα οποία στηρίζονται κυρίως στη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Τα στατιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται από το Εργαστήριο είναι οι κανόνες του Westgard και τα διαγράμματα Levey-Jennings η χρήση των οποίων δίνει την οπτική ένδειξη ότι ο εργαστηριακός έλεγχος λειτουργεί σωστά.

6.5.2 Εξωτερικός Ποιοτικός Έλεγχος

Ο Ανεξάρτητος Εσωτερικός Ποιοτικός έλεγχος είναι παγκοσμίως ο μοναδικός αποδεκτός τρόπος επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων των κλινικών αναλύσεων. Αποτελείται από ορούς ανθρώπινης προέλευσης που δεν έχουν γνωστή τιμή και δοκιμάζονται από το εργαστήριο στην καθημερινή ρουτίνα. Τα δείγματα αυτά προέρχονται από παγκόσμια αναγνωρισμένο φορέα, ανεξάρτητος πιστοποιημένος με ISO 9001:2008 και διαπιστευμένο ως προς την διενέργεια σχημάτων εξωτερικής αξιολόγησης ποιότητας με τις απαιτήσεις του πρότυπου EN ISO/IEC 17043:2010. Το σχήμα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου περιλαμβάνει ετήσιο πρόγραμμα αποτελούμενο από 3-4 κύκλους, σε ποσότητα που καλύπτει τη χρήση του κύκλου σε όλους τους αναλυτές και για όλες τις ορολογικές εξετάσεις της αιμοδοσίας HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV I/II και σύφιλης.

Ο Εξωτερικός Ποιοτικός Έλεγχος μας δίνει την δυνατότητα ελέγχου ως προς την εξειδίκευση, την ακρίβεια, την ευαισθησία και την επαναληψιμότητα των μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιούμε καθημερινά στο εργαστήριο, με αποτέλεσμα την σημαντική βελτίωση των αποτελεσμάτων μας.

Για το σχήμα εξωτερικού ποιοτικού ελέγχου (EQAS) το Εργαστήριο συνεργάζεται με την εταιρεία NRL με χρήση ετήσιου προγράμματος αποτελούμενου από 3 κύκλους. Τα δείγματα (HEPM, HIVC, HTLV, TREP 435) φθάνουν στο εργαστήριο, αναλύονται και οι τιμές των αποτελεσμάτων τους αποστέλλονται στο κέντρο επεξεργασίας δεδομένων του φορέα από τον οποίο επιβεβαιώνεται ή όχι η ορθή διενέργεια της ανάλυσης ή των αναλύσεων με τις οποίες συμμετέχουμε. Τέλος παραλαμβάνουμε ένα πιστοποιητικό ορθής και ποιοτικής λειτουργίας του εργαστηρίου μας.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Επιλογή δειγμάτων και σχεδιασμός μελέτης

Στο Κέντρο Αίματος Ε.ΚΕ.Α από τον Ιανουάριο έως και το Δεκέμβριο 2019 ελέγχθηκαν συνολικά 277.541 δείγματα για τις πέντε υποχρεωτικά ελεγχόμενες λοιμώξεις των αιμοδοτών (HBsAg, HIVAg/ABCOMBO, anti-HCV, HTLV I/II και σύφιλη) με μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (CMIA) Alinity s (Abbott) και με ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (ChLIA) PRISM nEXT (Abbott). Οι δότες αίματος, κατατάσσονται από την αρχή σε ομάδα χαμηλού κινδύνου λόγω λήψης ιστορικού και τυχόν αποκλεισμού τους σε περίπτωση μη καταλληλότητας. Τα δείγματα προέρχονταν από όλα τα κέντρα αιμοδοσίας της Αττικής, από 16 κέντρα αιμοδοσίας της περιφέρειας (Βοιωτίας, Φθιώτιδας, Φωκίδας, Ευρυτανίας, Κορινθίας, Ιόνια νησιά, νησιά Κεντρικού και ΒΑ Αιγαίου και Δωδεκάνησα) και από αιμοληψίες των Ενόπλων Δυνάμεων Στρατού. Οι αιμοδότες είναι ηλικίας 18-65 ετών, άνδρες και γυναίκες, συγγενικού ή μη περιβάλλοντος, πρώτης φοράς ή και τακτικοί δότες. Τα δείγματα, όρος αίματος χωρίς αντιπηκτικό, χρησιμοποιήθηκαν νωπά ενώ κατά την επιβεβαιωτική μέθοδο χρειάστηκε απόψυξη από τους -40C° η οποία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

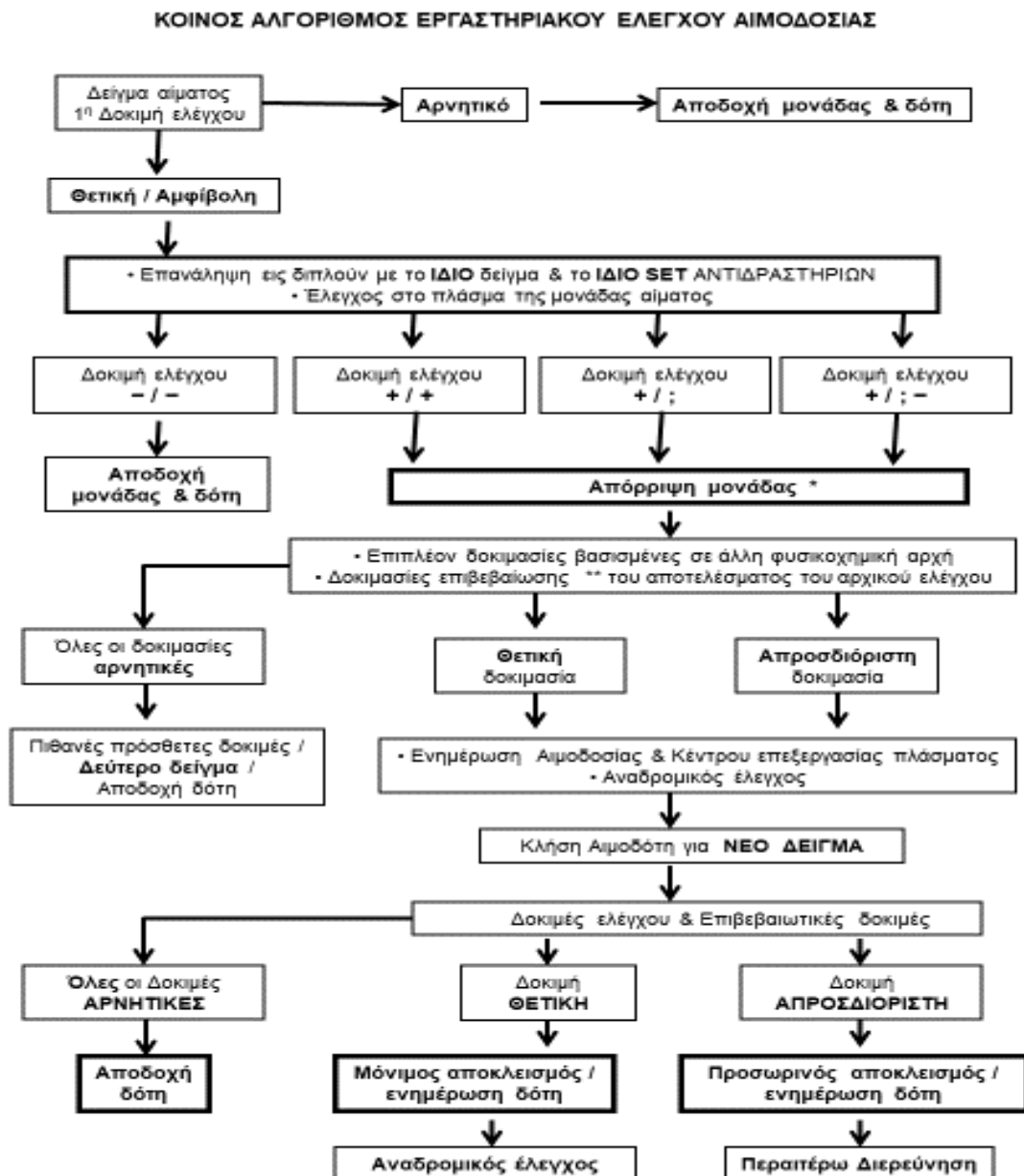
Σύμφωνα με τον ενιαίο αλγόριθμο του Υπουργείου Υγείας (Πίνακας 1 και Πίνακας 2) που ακολουθήθηκε μετά τον έλεγχο διαλογής για ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του HTLV I/II με Alinity s και Prism nEXT (Abbott), τα αρχικά αντιδρώντα δείγματα επανεξετάστηκαν εις διπλούν με την ίδια μέθοδο. Από αυτά κάποια παρέμειναν αρχικά αντιδρώντα (IR) και κάποια επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR). Για όλα αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε έλεγχος από τον ασκό πλάσματος με την κύρια μέθοδο αλλά και με τη δευτερεύουσα (Abbott Architect). Ορισμένα από τα δείγματα που ήταν επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR) επιλέχθηκαν για περαιτέρω έλεγχο με επιβεβαιωτική μέθοδο ανοσολογικής ανίχνευσης αποτύπωσης σε ζώνες INNO-LIA HTLV I/II Score (FUJIREBIO).

Ο υπολογισμός του ορίου θετικότητας (cutoff) γίνεται από τον ακόλουθο τύπο: Όριο θετικότητας = Μέση Απόλυτη Μέτρηση Αρνητικού Βαθμονομητή + (0,15x Μέση Απόλυτη Μέτρηση Θετικού Βαθμονομητή). Ο αναλυτής υπολογίζει την τιμή του λόγου S/CO (σχετική αντίδραση στην τιμή του ορίου θετικότητας) της εξέτασης HTLV I/II χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο: $S/CO = \text{Απόλυτες Μετρήσεις Δείγματος} / \text{Όριο Θετικότητας}$.

Τα δείγματα με απόλυτες μετρήσεις χαμηλότερες της τιμής του ορίου θετικότητας θεωρούνται μη αντιδρώντα ενώ τα δείγματα με απόλυτες μετρήσεις υψηλότερες ή ίσες της τιμής του ορίου θετικότητας θεωρούνται αρχικώς αντιδρώντα. Εάν, μετά την επανάληψη της εξέτασης, οι απόλυτες μετρήσεις και για τις δυο επαναλήψεις είναι χαμηλότερες από την τιμή του ορίου θετικότητας, τότε το δείγμα είναι μη αντιδρών. Εάν

οι απόλυτες μετρήσεις οποιασδήποτε από τις δυο επαναλήψεις είναι υψηλότερες ή ίσες της τιμής του ορίου θετικότητας, τότε το δείγμα είναι κατ' επανάληψη αντιδρών. Τα δείγματα με τιμές S/CO χαμηλότερες του 1,00 θεωρούνται μη αντιδρώντα, ενώ υψηλότερη ή ίση του 1,00 θεωρούνται αντιδρώντα.

Πίνακας 1



Πίνακας 2

* Σε περίπτωση ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών στα δείγματα ορού και πλάσματος επιβάλλεται έλεγχος του πλάσματος της προηγούμενης και επόμενης της αμφισβητούμενης μονάδας αίματος

**** Δοκιμασίες επιβεβαίωσης**

- 1. HBV :**
 - a) πλήρης ορολογικός έλεγχος ηπατίτιδος Β
 - b) Δοκιμασία εξουδετέρωσης (neutralization)
 - c) **HBV-DNA**
- 2. HCV :**
 - a) Immunoblot (RIBA τελευταίας γενιάς)
 - b) HCV-RNA
- 3. HIV- 1 / 2 :**
 - a) Western Blot
 - b) Immunoblot (RIBA)
 - c) P 24 Ag
 - d) HIV-RNA
- 4. Σύφιλης :**
 - a) TPHA
 - b) FTA- Abs
- 5. HTLV- I / II :**
 - a) Western Blot
 - b) Immunoblot
 - c) HTLV-RNA

Απόφαση ολομέλειας Κ.Ε.Σ.Υ (αρ.πρωτ Α4/634/9-08-1999)

7.2 Αποτελέσματα με τη μέθοδο χημειοφωταύγειας

Τα αποτελέσματα των ελέγχων με τις μεθόδους χημειοφωταύγειας που χρησιμοποιήθηκαν συνοψίζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 3 και αναλυτικά μαζί με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης στον πίνακα 4. Κατά τη διάρκεια της μελέτης και στα πλαίσια του υποχρεωτικού ιολογικού ελέγχου, εξετάστηκαν 277.541 δείγματα για HTLV/II εκ των οποίων

-τα 118.005 δείγματα εξετάστηκαν από 01.01.2019 έως και 31.05.2019 στον αναλυτή PRISM nEXT και

-τα 159.536 δείγματα από 01.06.2019 έως και 31.12.2019 εξετάστηκαν στον αναλυτή Alinity s.

Από τα 118.005 δείγματα που εξετάστηκαν στον PRISM nEXT 95 δείγματα ήταν αρχικώς αντιδρώντα – IR (0,080%) και 76 δείγματα ήταν επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα – RR (0,064%). Αντίστοιχα, από τα 159.536 δείγματα που εξετάστηκαν στον Alinity s 92 δείγματα ήταν IR (0,057%) και 87 δείγματα ήταν RR (0,054%).

Όσα δείγματα βρέθηκαν αρχικώς αντιδρώντα, με οποιαδήποτε από τις δυο κύριες μεθόδους, ελέγχθηκαν και με την δευτερεύουσα μέθοδο. Από το σύνολο των δειγμάτων (277.541) που εξετάστηκαν κατά τον έλεγχο διαλογής βρέθηκαν συνολικά αρχικώς αντιδρώντα για HTLV I/II 187 δείγματα (0,066%). Τα δείγματα αυτά επανεξετάστηκαν εις διπλούν με την ίδια μέθοδο, από το ίδιο σωληνάριο, όπου 24 από αυτά έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα και στις δυο τιμές ($<1,00$ S/CO). Επίσης εξετάστηκαν δείγματα από τους αντίστοιχους ασκούς πλάσματος με την κύρια αλλά και τη δευτερεύουσα μεθοδολογία και βρέθηκαν αρνητικά. Αυτά τα 24 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αρχικά αντιδρώντα δείγματα (IR). Τα 163 δείγματα που ήταν επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR), είχαν και τις δυο τιμές $>1,00$ S/CO στην ίδια μέθοδο, ελέγχθηκαν και με τη δεύτερη μέθοδο και θεωρείται ότι χρήζουν περαιτέρω έλεγχο με επιβεβαιωτική μέθοδο ανοσοαποτύπωσης. Από όλα τα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR) δείγματα που ελέγχθηκαν και με τη μέθοδο Alinity s και με τη μέθοδο PRISM nEXT, μόνο 7 από τα 163 (4,3%) βρέθηκαν αντιδρώντα και στις δυο μεθόδους ($>1,00$ S/CO). Τα υπόλοιπα 156 RRδείγματα παρέμειναν αντιδρώντα μόνο σε μια από τις δυο μεθόδους και σε κανένα από αυτά δεν επιβεβαιώθηκε η θετικότητά τους με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης.

Με βάση τον αλγόριθμο όλα τα παραπάνω δείγματα (IR και RR) ελέγχθηκαν και σε δείγματα από τους αντίστοιχους ασκούς πλάσματος με την αρχική κύρια μέθοδο. Στους ελέγχους αυτούς υπήρξε απόλυτη ταύτιση των αποτελεσμάτων με αυτά των ελέγχων στα αρχικά σωληνάρια.

Πίνακας 3

**Συγκεντρωτική απεικόνιση αποτελεσμάτων των μεθόδων
χημειοφωταύγειας Alinity s και PRISM nEX**

Μέθοδος	Σύνολο δειγμάτων	IR(IRR)	RR(RRR)
PRISM HTLV I/II	118.005	95(0,080%)	76(0,064%)
Alinity s HTLV I/II	159.536	92(0,057%)	87(0,054%)
Συγκεντρωτικά με τις 2 μεθόδους	277.541	187 (0,066%)	163 (0,058%)

IR = αριθμός αρχικά θετικών

(IRR = αναλογία αρχικά θετικών)

RR = αριθμός επαναλαμβανόμενων θετικών

(RRR = ποσοστό επαναλαμβανόμενων θετικών)

Πίνακας 4

Αναλυτικά αποτελέσματα ελέγχου

HTLV I/II Θετικά Δείγματα 2019				
ΑΑ	Alinity s S/CO	PRISMS/CO	INNO-LIA	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
1	0,13	2,47/2,44		
2	0,1	1,13/1,16		
3	0,1	1,16/1,19		
4	0,11	1,23/1,21		
5	0,11	1,07/1,02		
6	0,11	4,37/4,50	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	
7	0,14	1,26/1,22		
8	-	1,13/0,44/0,41		IR
9	-	1,05/0,38/0,35		IR
10	-	1,08/0,33/0,36		IR
11	-	1,11/0,34/0,22		IR
12	-	1,02/0,33/0,36		IR
13	0,09	2,67/2,54		
14	0,1	1,59/1,58		
15	0,1	2,54/2,56	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	
16	1,07	1,25/1,22	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	*
17	0,1	1,79/1,79		
18	0,12	1,49/1,55		

19	0,11	6,66/6,20	APNHTIKO	
20	0,09	3,08/3,01	APNHTIKO	
21	0,19	1,20/1,23		
22	0,12	1,18/1,13		
23	0,12	1,17/1,04		
24	0,09	1,37/1,42		
25	-	1,04/0,87/0,87		IR
26	0,13	1,77/1,72		
27	0,1	1,39/1,41		
28	0,11	5,53/5,54	APNHTIKO	
29	0,12	1,08/1,07		
30	0,11	1,40/1,38	APNHTIKO	
31	0,12	1,36/1,29		
32	-	1,29/0,26/0,25		IR
33	0,11	1,40/1,35	APNHTIKO	
34	0,14	1,18/1,02		
35	0,13	1,04/1,16		
36	0,1	2,68/2,56	APNHTIKO	
37	0,1	1,07/1,11		
38	0,12	1,49/1,40	APNHTIKO	
39	0,11	1,28/1,15		
40	6,98	1,40/1,48	APNHTIKO	*
41	0,11	2,73/2,79	APNHTIKO	
42	0,1	1,44/1,37		
43	-	1,02/0,27/0,28		IR
44	0,15	1,14/1,00		
45	0,1	1,43/1,32		
46	0,11	1,05/1,01		
47	0,1	1,58/1,62	APNHTIKO	
48	0,11	1,24/1,16		
49	0,11	1,06/1,03		
50	0,14	1,35/1,42		
51	0,12	18,79/0,26/0,27	APNHTIKO	IR
52	0,1	2,07/2,00	APNHTIKO	
53	0,09	1,13/1,04		
54	0,11	2,07/1,93	APNHTIKO	
55	-	1,11/0,300,29		IR
56	0,12	1,03/1,14		
57	0,09	3,64/3,94	APNHTIKO	
58	-	1,30/0,35/0,33		IR
59	-	1,67 0,31/0,30		IR

60	0,11	1,01/1,04		
61	0,31	1,26/1,27		
62	-	1,03/0,24/0,24		IR
63	-	1,35/0,25/0,25		IR
64	0,1	1,22/1,27		
65	0,21	1,13/1,17		
66	0,12	1,08/1,01		
67	0,13	3,71/3,88	APNHTIKO	
68	0,11	1,38/1,38		
69	0,11	3,79/0,29/0,31	APNHTIKO	IR
70	0,11	1,61/1,71		
71	-	1,09/0,88/0,94		IR
72	0,1	1,14/1,24		
73	0,1	1,08/1,03		
74	0,08	2,06/2,15	APNHTIKO	
75	0,1	1,02/1,05		
76	0,1	1,68/1,69		
77	0,09	2,2/2,16		
78	0,12	2,97/2,99	APNHTIKO	
79	0,11	1,07/1,00		
80	0,1	1,66/1,45		
81	0,12	1,15/1,15		
82	-	1,45/0,28/0,25		IR
83	0,17	1,05/1,03		
84	0,12	1,11/1,12		
85	0,1	1,18/1,11		
86	0,12	1,01/0,25/0,28		IR
87	0,11	1,26/1,28		
88	0,09	1,05/1,10		
89	0,09	1,18/1,28		
90	-	1,03/0,93/0,91		IR
91	0,14	1,71/1,65		
92	0,1	1,55/1,56		
93	0,12	1,30/1,32		
94	0,11	1,33/1,40		
95	0,11	1,55/1,53		
96	1,73/1,78	0,28		
97	1,46/1,43	0,31	APNHTIKO	
98	1,67/0,14/0,11	-		IR
99	2,97/2,85	0,69	APNHTIKO	
100	1,54/1,55	0,35	ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ	env gp21 I/II(+2)

101	3,88/3,77	0,45	APNHTIKO	
102	1,43/1,43	0,35	APNHTIKO	
103	1,26/1,24	0,37	APNHTIKO	
104	4,01/4,11	0,5	APNHTIKO	
105	194,32/192,80	44,2/45,66	ΘΕΤΙΚΟ	HTLV I*
106	47,56/47,79	2,82	APNHTIKO	*
107	1,40/1,36	0,33	APNHTIKO	
108	1,59/1,48	0,23	APNHTIKO	
109	1,06/1,07	0,35	APNHTIKO	
110	11,67/11,33	0,35	APNHTIKO	
111	1,89/1,92	0,35	APNHTIKO	
112	9,20/9,04	1,1	APNHTIKO	*
113	4,21/4,12	0,4	APNHTIKO	
114	1,19/1,20	0,28		
115	1,60/1,61	0,3	APNHTIKO	
116	1,11/1,08	0,3	APNHTIKO	
117	1,10/1,02	0,31		
118	1,39/1,44	0,32	APNHTIKO	
119	128,19/130,50	27,61/25,92	ΘΕΤΙΚΟ	HTLV I*
120	1,01/1,02	0,35		
121	1,00/0,88/0,88	0,27		IR
122	1,02/1,02	0,37	APNHTIKO	
123	1,82/1,88	0,35	APNHTIKO	
124	1,16/1,08	0,4	APNHTIKO	
125	13,83/14,51	1,45	APNHTIKO	*
126	1,02/1,05	0,32	APNHTIKO	
127	1,09/1,12	0,26		
128	3,50/3,50	0,46	APNHTIKO	
129	1,96/2,08	0,33		
130	2,40/2,51	0,34	APNHTIKO	
131	1,29/1,29	0,29		
132	2,13/2,04	0,37	APNHTIKO	
133	17,21/18,79	0,82	APNHTIKO	
134	1,72/0,10/0,09	0,29		IR
135	1,05/1,04	0,32		
136	3,94/4,05	0,51		
137	1,07/1,16	0,26		
138	7,19/7,07	0,28	APNHTIKO	
139	2,76/2,69	0,59	APNHTIKO	
140	1,06/1,04	0,3		
141	5,59/5,47	0,27	APNHTIKO	

142	1,08/1,11	0,33/0,38		
143	1,67/1,87	0,28/0,28		
144	1,13/1,10	0,40/0,34		
145	1,52/1,55	0,35/0,34		
146	1,52/1,54	0,27/0,27		
147	1,02/1,02	0,37/0,36		
148	4,58/4,64	0,36/0,33	APNHTIKO	
149	2,38/2,35	0,41/0,42	APNHTIKO	
150	8,16/8,34	0,50/0,50	APNHTIKO	
151	1,56/1,66	0,27/0,29		
152	1,47/1,45	0,40/0,37		
153	1,29/1,28	0,30/0,30		
154	1,64/1,63	0,25/0,30		
155	1,22/1,21	0,37/0,35	APNHTIKO	
156	1,44/0,13/0,12	0,42		IR
157	1,36/1,36	0,34		
158	1,72/1,82	0,4		
159	1,18/1,13	0,3		
160	1,24/1,15	0,26		
161	7,44/7,16	0,95	APNHTIKO	
162	1,23/1,17	0,42		
163	1,08/1,14	0,31		
164	2,02/2,02	0,31		
165	5,84/5,88	0,46	APNHTIKO	
166	1,81/1,66	0,3	APNHTIKO	
167	1,25/1,32	0,39		
168	3,71/3,93	0,27		
169	1,63/1,55	0,35		
170	6,28/6,68	0,28	APNHTIKO	
171	1,64/1,69	0,34		
172	1,10/1,02	0,4		
173	1,19/1,21	0,32		
174	1,37/1,29	0,33		
175	5,04/5,53	0,72	APNHTIKO	
176	2,23/2,40	0,26	APNHTIKO	
177	1,01/1,04	0,26		
178	2,51/2,43	0,28		
179	8,28/9,02	0,43	APNHTIKO	
180	1,24/1,04	0,27		
181	3,23/3,02	0,43		
182	15,25/15,54	0,28	APNHTIKO	

183	1,31/1,42	0,3		
184	1,06/1,03	0,41		
185	4,03/4,08	0,36	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	
186	1,07/0,98/0,94	0,36		IR
187	1,0/1,03	0,37		

IR = αρχικά θετικό

*** = θετικό και στις 2 μεθόδους**

7.3 Ειδικότητα (specificity) μεθόδων χημειοφωταύγειας

Όλα τα δείγματα ελέγχθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τόσο για τη μέθοδο της μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (CMIA) Alinity s όσο και με τη μέθοδο ανοσοεξέταση χημειοφωταύγειας (ChLIA) PRISM nEXT. Όπως φαίνεται στον πίνακα 5 και οι δύο μέθοδοι εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα που υπολογίζεται σε 99,93-99,94 %. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται πλήρως με αντίστοιχα που πραγματοποιήθηκαν τον Μάιο 2019 στο Εργαστήριο (ειδικότητα 99,6%), με μικρότερο αριθμό δειγμάτων, κατά την αξιολόγηση και πιστοποίηση των πλέον σύγχρονων αναλυτών Alinity s που αντικατέστησαν τους αναλυτές PRISM nEXT και των αντίστοιχων αντιδραστηρίων.

Πίνακας 5

Υπολογισμός της ειδικότητας (specificity) των διαγνωστικών μεθόδων χημειοφωταύγειας Alinity s και PRISM nEXT

Μέθοδος	Σύνολο	IR (IRR)	RR (RRR)	Επιβεβαιωμένα Θετικά	Ειδικότητα
PRISM HTLV I/II	118.005	95 (0,080%)	76 (0,064%)	0	99,93% (117.929/118.005)
Alinity s HTLV I/II	159.536	92 (0,057%)	87 (0,054%)	2	99,94% (159.449/159.534)

IR = αριθμός αρχικά θετικών

(IRR= αναλογία αρχικά θετικών)

RR = αριθμός επαναλαμβανόμενων θετικών

(RRR = ποσοστό επαναλαμβανόμενων θετικών)

7.4 Ευαισθησία (sensitivity) μεθόδων χημειοφωταύγειας

Για τις δύο μεθόδους Alinity s και PRISM nEXT, σύμφωνα με τον κατασκευαστή η συνολική ευαισθησία ανέρχεται σε ποσοστό 100% με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης από 99,08% έως 100%. Στα πλαίσια της αξιολόγησης και πιστοποίησης των πλέον σύγχρονων αναλυτών Alinity s που αντικατέστησαν τους αναλυτές PRISM nEXT και των αντίστοιχων αντιδραστηρίων, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της ευαισθησίας των μεθόδων και ανάλυση αποτελεσμάτων. Για την αξιολόγηση της ευαισθησίας ελέγχθηκαν, αρχειακά ισχυρά αντιδρώντα δείγματα, δείγματα εσωτερικού και εξωτερικού ελέγχου, σχήμα μεικτού τίτλου 10 οροθετικών δειγμάτων και 2 δειγμάτων απροσδιόριστων για HTLV I και HTLV II.

Όλα τα εξετασθέντα δείγματα βρέθηκαν θετικά για HTLV I/II και με τις δύο μεθόδους Alinity s και PRISM nEXT και αποδεικνύουν της υψηλή ευαισθησία των μεθόδων που αγγίζει το 100%. Στον πίνακα 6 απεικονίζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου για τα δείγματα του σχήματος μεικτού τίτλου αντισωμάτων για HTLV I και HTLV II με τις δύο μεθόδους Alinity s και PRISM nEXT και η σύγκριση με διαφορετικές μεθοδολογίες στις οποίες έχει δοκιμαστεί το συγκεκριμένο σχήμα. Διαπιστώνεται ότι οι δύο μέθοδοι Alinity s και PRISM nEXT εμφανίζουν 100% ευαισθησία για τα θετικά δείγματα του σχήματος, αντίστοιχη ευαισθησία με τη μέθοδο Abbott Architect και πολύ υψηλότερη από τη μέθοδο DiaSorin Murex.

Πίνακας 6

Σχήμα μεικτού τίτλου αντισωμάτων για HTLV I και HTLV II Anti-HTLV Mixed Titer Panel - MTP

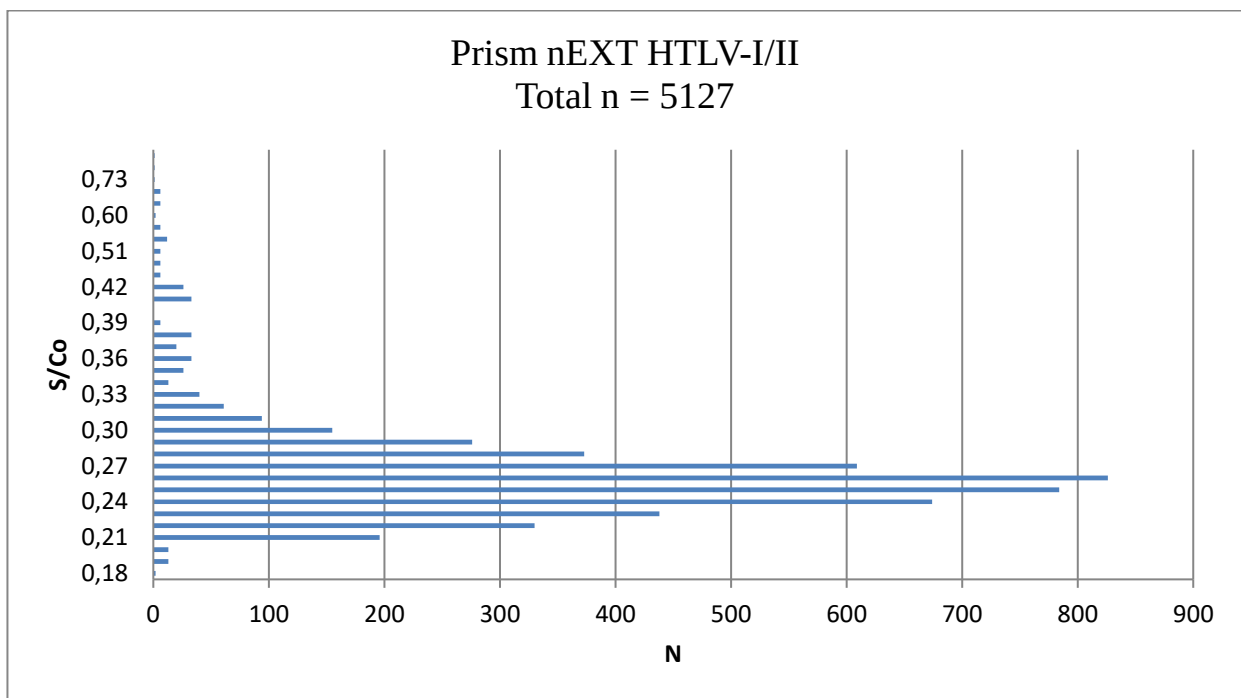
Αριθμός Δείγματος	Ειδικότητα	Abbott Architect	DiaSorin Murex	Abbott Alinity s	Abbott PRISM
		s/co	s/co	s/co	s/co
1	HTLV I	72.3	>13.3	147.61	35.28
2	HTLV II	69.5	Μη ανιχνεύσιμο	116.15	24.75
3	HTLV II	134.1	Μη ανιχνεύσιμο	244.44	70.89
4	HTLV II	118.2	Μη ανιχνεύσιμο	198.37	60.92
5	HTLV II	81.6	Μη ανιχνεύσιμο	121.27	
6	HTLV II	133.7	>13.3	260.15	
7	HTLV II	98.8	>13.3	148.35	38.16
8	HTLV II	73.7	>13.3	125.96	66.79
9	HTLV II	74.1	>13.3	156.08	44.22
10	HTLV I ή II	45.2	>13.3	96.64	6.02
11	**	0.1	0	0.20	1.17
12	**	0.1	0	0.25	0.72

7.5 Μέτρηση της διασποράς των αρνητικών αποτελεσμάτων σε δείγματα ελέγχου για HTLV I/II στους αναλυτές Alinity s και Prism nEXT

Στα πλαίσια συμπληρωματικής αξιολόγησης της πιστότητας-επαναληπτικότητας αλλά και της ειδικότητας των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν, ελέγχθηκε ενδεικτικά το εύρος διασποράς των αρνητικών τιμών των αποτελεσμάτων από 5.127 διαφορετικά δείγματα. Όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα, το εύρος της διασποράς των αρνητικών τιμών βρίσκεται σε πολύ στενά όρια και χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά μεταξύ τους βρίσκονται τα αποτελέσματα και ταυτόχρονα αντικατοπτρίζει την αξιοπιστία και την ειδικότητα των μεθόδων αλλά και των αναλυτών. Η ειδικότητα είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη

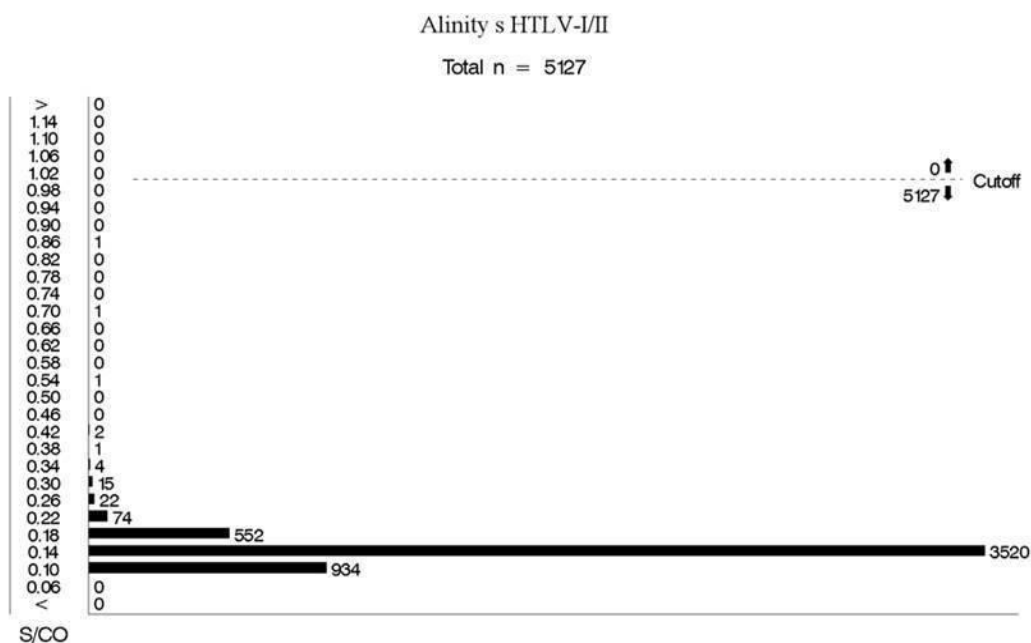
είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων. Ως μέτρα πιστότητας μιας σειράς μετρήσεων χρησιμοποιούνται κυρίως η σχετική απόκλιση, η τυπική απόκλιση και το εύρος.

Στα παρακάτω διαγράμματα 1 και 2 απεικονίζεται ενδεικτικά η διασπορά αρνητικών τιμών σε 5.127 δείγματα που ελέγχθηκαν για HTLV I/II με τους αναλυτές Alinity s και Prism nEXT αντίστοιχα.



Διάγραμμα 1

Εύρος Διασποράς Αρνητικών Τιμών στον αναλυτή Alinity s



Διάγραμμα 2

Εύρος Διασποράς Αρνητικών Τιμών στον αναλυτή Rrism nEXT

7.6 Αποτελέσματα της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης

Τα αποτελέσματα των ελέγχων με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης συνοψίζονται στον πίνακα 7. Από τα 163 επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR) δείγματα επιλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με επιβεβαιωτική μέθοδο ανοσολογικής ανίχνευσης αποτύπωσης 66 δείγματα. Η επιλογή αυτών των δειγμάτων έγινε με βάση την τιμή της επαναλαμβανόμενης θετικότητά τους. Έτσι ελέγχθηκαν αυτά με τις υψηλότερες τιμές καθώς και τα επτά δείγματα που βρέθηκαν αντιδρώντα και στις δυο μεθόδους.

Μετά τον έλεγχο με επιβεβαιωτική μέθοδο ανοσολογικής ανίχνευσης αποτύπωσης INNO-LIA σε ζώνες των 66 επαναλαμβανόμενων αντιδρώντων δειγμάτων βρέθηκαν:

-63 αρνητικά δείγματα

-1 δείγμα απροσδιόριστο, με θετικότητα στη ζώνη envgr21 I/II (2+) και

-2 δείγματα επιβεβαιώθηκαν θετικά για HTLV I, με ισχυρή θετικότητα στις τέσσερις ζώνες επιβεβαίωσης και στις env gr46-I, gagr19-I ζώνες διαφοροποίησης. Οι τιμές για τα 2 επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα ήταν για το πρώτο δείγμα 172,84 S/CO στον Alinity s και 44,2 S/CO στον PRISM nEXT και για το δεύτερο δείγμα 125,28 S/CO στον Alinity s και 27,61 S/CO στον PRISM nEXT με όριο θετικότητας CO 1,00 και στους δυο αναλυτές. Το δείγμα με το απροσδιόριστο αποτέλεσμα ανοσοαποτύπωσης

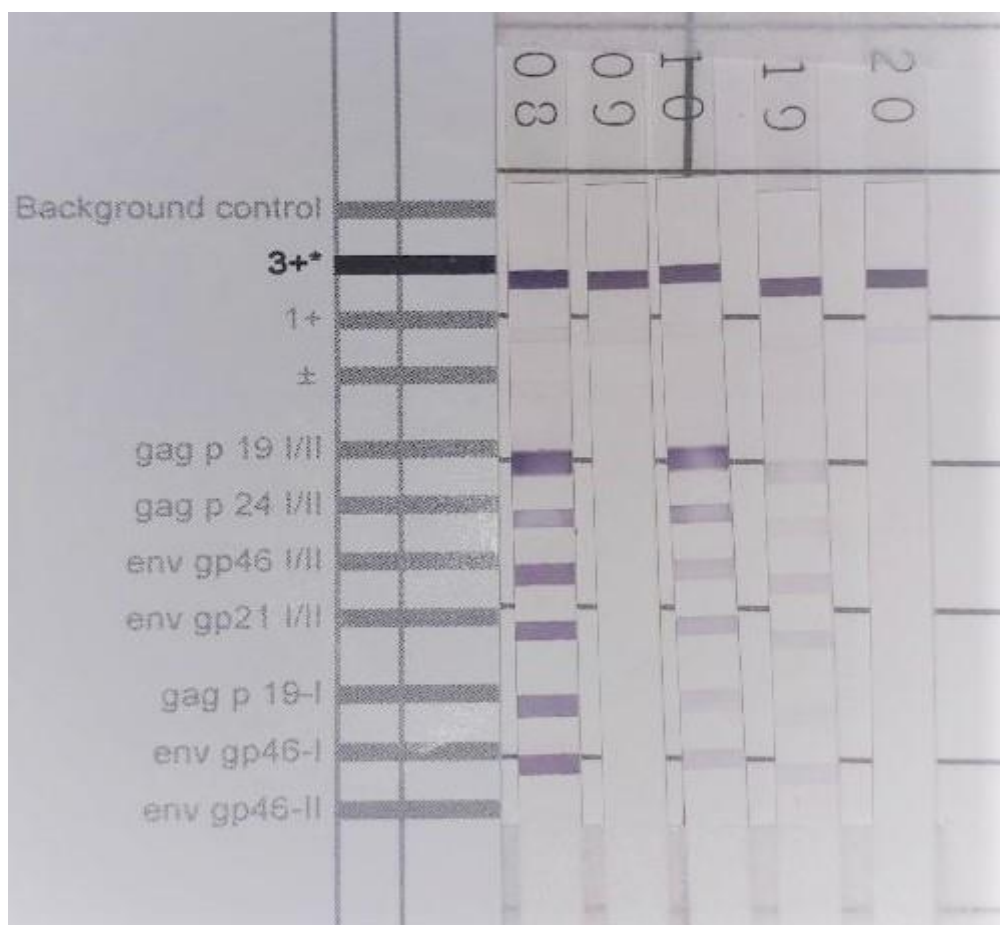
δεν ελέγχθηκε περαιτέρω με μοριακή εξέταση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) ώστε να προσδιοριστεί το αποτέλεσμα και πιθανών ο τύπος του ιού. Οι ταινίες εξέτασης (strips) 08 και 10 που φαίνονται στην Εικόνα 13 αφορούν τα δείγματα με τις υψηλότερες θετικές τιμές όπου ελέγχθηκαν με INNO-LIA και επιβεβαιώνεται η θετικότητα τους. Η αξιολόγηση αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια κάρτας ανάγνωσης αποτελεσμάτων που δίνεται από τον κατασκευαστή .

Πίνακας 7

Συνοπτική απεικόνιση αποτελεσμάτων της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης

Σύνολο Δειγμάτων	RR	Έλεγχος INNO-LIA	Αποτελέσματα
277.541	163	66	2 ΘΕΤΙΚΑ HTLVI (0,0007%) και 1 ΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΟ

RR = αριθμός επαναλαμβανόμενων θετικών



Κάρτα ανάγνωσης αποτελεσμάτων και strips εξέτασης INNO-LIA

Τα δείγματα στα strips 08 και 10 αξιολογούνται ως θετικά

Εικόνα 13

8. Συζήτηση

Η αυστηρή επιλογή των αιμοδοτών βάση κριτηρίων αξιολόγησης και ο υψηλών προδιαγραφών εργαστηριακός έλεγχος οδηγούν σε εξαιρετικά ασφαλή επίπεδα τη μετάγγιση αίματος στην Ελλάδα. Η χρήση ποιοτικών προσδιορισμών διαλογής (screening) με εγκεκριμένες διαδικασίες, τόσο από τον FDA όσο και από τους αντίστοιχους Ευρωπαϊκούς Οργανισμούς, που προσεγγίζουν ευαισθησία και ειδικότητα 100%, βελτιστοποιούν τις πιθανότητες ανίχνευσης του ιού και έχουν καταστήσει τη μετάδοση μέσω της μετάγγισης εξαιρετικά σπάνια.

Ωστόσο, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα για τον HTLV I/II αποτελούν μια πρόκληση στην διαχείριση τους. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα έχουν σημαντικές επιπτώσεις τόσο για τους δότες όσο και για τα κέντρα αίματος παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα πιθανώς αντιπροσωπεύουν εργαστηριακό ή τυχαίο λάθος, οι αιμοδότες αποκλείονται μόνιμα από τη μελλοντική δωρεά. Έτσι, αποκλείουν αρκετούς αιμοδότες οι οποίοι θα μπορούσαν μελλοντικά να επανενταχτούν. Αυτό συνεπάγεται απώλεια δοτών και κατ' επέκταση μονάδων αίματος. Επιπλέον αυξάνεται ο κίνδυνος λοιμώξεων από την είσοδο νέων αιμοδοτών σε σχέση με τους σταθερούς και ελεγμένους αιμοδότες. Η απόρριψη τακτικών αιμοδοτών προκαλεί άγχος τόσο στους ίδιους όσο και στο συγγενικό τους περιβάλλον και ένα μεγάλο ποσοστό δεν επιστρέφει στην εθελοντική προσφορά. Από την πλευρά των κέντρων αίματος τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα συνεπάγονται οικονομικό βάρος σε σχέση με την επεξεργασία και διαχείριση του αίματος καθώς και απώλεια δοτών και ιδιαίτερα όταν πρόκειται για σπάνιους δότες. Η αναβάθμιση του πληροφοριακού συστήματος χρησιμοποιώντας μητρώο για προσωρινή αναβολή ίσως βοηθούσε αυτούς τους αιμοδότες να αποφύγουν το άγχος και να επανενταχτούν μελλοντικά στον αιμοδοτικό πληθυσμό. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα αποδίδονται σε μη ειδική αντιδραστικότητα αντισωμάτων, η οποία φαίνεται να σχετίζεται με αυξημένες ανοσολογικές αποκρίσεις. Αυτές μπορεί να οφείλονται σε πρόσφατο εμβολιασμό, ιογενή λοίμωξη, αυτοάνοση νόσο ή ηπατική νόσο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι ο επιπολασμός του HTLV I/II μεταξύ των αιμοδοτών της χώρας είναι εξαιρετικά χαμηλός και αγγίζει το 0,0007%. Συνολικά ελέγχθηκαν, σε χρονικό διάστημα ενός έτους, 277.541 μονάδες αίματος με την χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων μικροσωματιδιακής χημειοφωταύγειας (CMIA) και συγκεκριμένα Abbott Alinity s και Abbott Prism nEXT. Παρότι η ανοσοβιολογική αρχή των δύο μεθόδων είναι κοινή (μικροσωματιδιακή χημειοφωταύγεια) ωστόσο υπάρχουν σημαντικές διαφορές από τη μια μέθοδο στην άλλη τόσο στον τεχνολογικό τους σχεδιασμό όσο και στη χημεία των αντιδραστηρίων

τους. Δείγματα τα οποία βρέθηκαν αντιδρώντα επιβεβαιώθηκαν με τη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης INNO-LIA. Βρέθηκαν 163/277.541 (0,06%) δείγματα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα (RR) για HTLV I/II αντισώματα και συγκεκριμένα 76/118.005 με Prism nEXT και 87/159.536 με Alinity s. Τα 163 (RR) συνολικά δείγματα εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους και μόνο 7/163 (4,3%) βρέθηκαν αντιδρώντα και με τις δυο μεθόδους χημειοφωταύγειας. Τα υπόλοιπα 156 δείγματα παρέμειναν αντιδρώντα μόνο στην αρχική μέθοδο (Prism nEXT ή Alinity s) στην οποία είχαν εξεταστεί. Από τα 7 αντιδρώντα δείγματα και στους δυο αναλυτές προέκυψαν τα 2 θετικά επιβεβαιωμένα δείγματα για HTLV I. Από τα 163(RR) δείγματα επιλέχθηκαν 66 δείγματα που εμφάνιζαν την υψηλότερη τιμή από το όριο θετικότητας ($>1,00$ S/CO) και εξετάστηκαν περαιτέρω με τη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης INNO-LIA. Από τα 66 (RR) δείγματα μόνο 2 δείγματα (επιπολασμός 0,0007%) επιβεβαιώθηκαν ως θετικά για HTLV I ενώ 1 δείγμα παρέμεινε αδιευκρίνιστο. Πρέπει να σημειωθεί ότι κανένα από τα επαναλαμβανόμενα αντιδρώντα δείγματα, στη μία μόνο από τις δύο μεθόδους χημειοφωταύγειας, δεν επιβεβαιώθηκε γεγονός που ενισχύει την ανάγκη χρήσης δεύτερης μεθόδου για τον τελικό χαρακτηρισμό του δείγματος και συμπίπτει με τις πρόσφατες μελέτες (Stramer-2018).¹³⁵ Οι δύο μέθοδοι ελέγχου έδειξαν μεγάλη ακρίβεια, ευαισθησία 100% και ειδικότητα που υπολογίστηκε περίπου 99,94%.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποδεικνύουν ότι ο επιπολασμός της HTLV I/II λοίμωξης στον αιμοδοτικό πληθυσμό της χώρας μας είναι εξαιρετικά χαμηλός (0,0007%). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν την ανάγκη επανακαθορισμού του αλγορίθμου για την οριστική επιβεβαίωση της HTLV I/II λοίμωξης με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης και ανοίγουν τη συζήτηση προς την κατεύθυνση

- α) του σχεδιασμού και εφαρμογής ελέγχου μόνο στους αιμοδότες 1^{ης} φοράς
- β) την καθολική τήρηση του εκάστοτε ισχύοντος αλγόριθμου
- γ) τη μη οριστική απόρριψη των δοτών όταν βρίσκονται θετικοί για αντισώματα HTLV I/II για μια φορά εφόσον ο περαιτέρω έλεγχος με δεύτερη μέθοδο ή επιβεβαιωτικό ανοσοαποτύπωσης έλεγχο είναι αρνητικός
- δ) την εφαρμογή επιβεβαιωτικής μεθόδου ανοσοαποτύπωσης στα επαναλαμβανόμενα θετικά με δυο διαφορετικές μεθόδους
- ε) της πιθανής επανένταξης στον αιμοδοτικό πληθυσμό απορριφθέντων εθελοντών αιμοδοτών που βρέθηκαν κατά το παρελθόν θετικοί για αντισώματα έναντι των ιών HTLV I και HTLV II όταν είναι:
 - αρνητικοί στη δοκιμασία ανοσοαποτύπωσης ή ακόμη και αρνητικοί σε 2^η ανοσοδιαγνωστική μέθοδο

- χαρακτηρισμένοι ως αρνητικό τελικό αποτέλεσμα μετά τη χρήση του αλγόριθμου
- αρνητικοί με τη χρήση δυο μεθόδων ελέγχου, εκ των οποίων η μια μέθοδος να είναι αυτή που είχε δώσει το θετικό αποτέλεσμα, εφόσον έχουν παρέλθει έξι μήνες.

Οριστική απόρριψη αιμοδότη θα πρέπει να υπάρχει εάν είναι αντιδρών σε περαιτέρω έλεγχο, αντιδρών σε δεύτερη μέθοδο ή επιβεβαιωτική ανοσοαποτύπωση ή τέλος μετά από το πέρας εξαμήνου είναι αντιδρών τουλάχιστον σε μια από τις μεθόδους ελέγχου.

Μελέτες δείχνουν ότι η ψευδής αντιδραστικότητα είναι συνήθως παροδική και ο χρόνος για νέο έλεγχο μεταβλητός. Επιτρέποντας στους δότες να δώσουν δύο ή τρία αποτελέσματα ψευδώς θετικά πριν από τον οριστικό αποκλεισμό είναι μια στρατηγική που θα μείωνε ουσιαστικά τον αριθμό των δοτών που χρειάζονται απόρριψη.

Οι πιθανές αποφάσεις αλλαγής στρατηγικής στο επίπεδο του ελέγχου του αίματος θα πρέπει να συνεκτιμήσουν την αναγκαιότητα εφαρμογής ενιαίου πληροφοριακού συστήματος σε όλες τις Υπηρεσίες Αιμοδοσίας, την καθολική λευκαφαίρεση των προϊόντων αίματος πριν την αποθήκευση καθώς και την αδρανοποίηση των παθογόνων στο πλάσμα και τα αιμοπετάλια. Αυτό θα οδηγούσε σε εξαιρετικά δύσκολη και σπάνια τη μετάδοση του ιού μέσω μετάγγισης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. A Brief Chronicle of Retrovirology -4
2. Rous P. Transmission of a Malignant New Growth by Means of a Cell-Free Filtrate. JAMA 1983 September 16, 250 (11): 1445-9
3. Robert Gallo, Anthony S. Fauki. Human retroviruses, chapter 134: p 890-893in Harrison Internal Pathology, 12th edition
4. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.1997. A Brief Chronicle of Retrovirology
5. ICTV Taxonomy Browser
6. Cloyd MW. Human Retroviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 62.
7. Coffin, John M. (1992). "Structure and Classification of Retroviruses". In Levy, Jay A. (ed.). The Retroviridae. 1 (1st ed.). New York: Plenum. p. 20
8. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Synthesis of Gag and Gag-Pro-Pol Proteins.
9. Kim FJ, Battini JL, Manel N, Sitbon M (January 2004). "Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture". Virology. 318 (1): 183–91
10. Hughes SH. Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. Microbiol Spectr. 2015;3(2): MDNA3–2014.
11. Molecular Biology and Pathogenesis of Retroviruses By Shailendra K. Saxena and Sai V. Chitti Reviewed: March 7th 2016 Published: March 16th 2016
12. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press;1997. The Place of Retroviruses in Biology.
13. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. Biochemistry of Reverse Transcription.
14. Phylogeny of Human Endogenous and Exogenous Retroviruses Aris Katzourakis and Michael Tristem Retroviruses and Primate Genome Evolution

15. Nelson PN, Hooley P, Roden D, Davari Ejtehad H, Rylance P, Warren P, et al. (October 2004). "Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential?". *Clinical and Experimental Immunology*. 138 (1): 1–9.
16. Larocque É, André-Arpin C, Borowiak M, et al. Human T-cell leukemia virus type 3 (HTLV-3) and HTLV-4 antisense-transcript-encoded proteins interact and transactivate Jun family-dependent transcription via their atypical bZIP motif. *J Virol*. 2014;88(16):8956–8970
17. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7994–7999
18. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7415-7419, 1980
19. Bangham CRM, Matsuoka M. Human T-cell leukaemia virus type 1: parasitism and pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2017;372(1732):20160272.
20. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; 24(39):6058-6068
21. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):577–589
22. N Eiraku, P Novoa, M da Costa Ferreira, et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2 *Journal of Virology* Mar 1996, 70 (3) 1481-1492.
23. Vandamme AM, Salemi M, Van Brussel M, et al. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *J Virol*. 1998;72(5):4327–4340.
24. Martinez, M.P., Al-Saleem, J. & Green, P.L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* 16, 21 (2019)
25. Boxus M, Willems L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *Br J Cancer*. 2009;101(9):1497–1501.
26. Ratner, L. (2019). Molecular biology of human T cell leukemia virus. *Seminars in Diagnostic Pathology*.

27. Laydon DJ, Melamed A, Sim A, et al. Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(6): e1003646. Published 2014 Jun 19.
28. Bangham CRM, Matsuoka M. Human T-cell leukaemia virus type 1: parasitism and pathogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1732):20160272.
29. Satou, Yorifumi et al. "HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103,3 (2006): 720-5
30. Poiesz, B., Ruscetti, F., Reitz, M. et al. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268–271 (1981)
31. Bernand Poiesz, Dipak Dube, Syamalima Dube HTLV-II Associated Cutaneous T-Cell Lymphoma in a Patient with HIV-1 Infection. *N Engl J Med* 2000; 342:930-936
32. E. L. Murphy , B. Hanchard , J. P. Figueroa et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I *Int J Cancer* 1989, 43: 250-253
33. Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, Yodoi J. Adult T cell leukemia in Japan. In: Seno S, Takaku F, Irino S, editor. *Topics in Hematology*. Amsterdam, Excerpta Medica; 1977. pp.73–77.
34. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(10):6476–6480.
35. Yamaguchi K, Futami G, Ishii T, Takatsuki K. Pathogenesis of adult T-cell leukemia from clinical pathologic features. *Hum Retrovirol.* 1990;163–71.
36. Kensei Tobinai, Current Management of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma 2009 Volume:23 Issue:14 cancer network oncology
37. Murphy EL, Hanchard B, et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 1989; 43:250–253.
38. Hino S. ATL development after adult infection of HTLV-1?. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80(10):1016

39. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, et al: Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50:481-492, 1977
40. Kamoi K, Okayama A, Izumo S, Hamaguchi I, Uchimar K, Tojo A and Ohno-Matsui K (2019) Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-Related Ocular Manifestations: Analysis of the First Large-Scale Nationwide Survey. *Front. Microbiol.* 9:3240.
41. Neha Mehta- Shah, Lee Ratner, and Steven M. Horwitz Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma *Journal of Oncology Practice* 2017 13:8,487-492
42. Ghezeldasht S, Shirdel A, Assarehzadegan MA, et al. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Oncogenesis: Molecular Aspects of Virus and Host Interactions in Pathogenesis of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATL). *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(3):179–195
43. Masao Matsuoka, Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL) *Retrovirology* vol 2, Article number: 27 (2005)
44. David C. Rhew, Cyril R. Gaultier, Eric S. Daar, Phillip C. Zakowski, Jonathan Said, Infections in Patients with Chronic Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Case Report and Review, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 21, Issue 4, October 1995, Pages 1014–1016
45. Ratner L, Grant C, Zimmerman B, et al. Effect of treatment of Strongyloides infection on HTLV-1 expression in a patient with adult T-cell leukemia. *Am J Hematol.* 2007;82(10):929–931.
46. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma: A report from the Lymphoma Study Group(1984–87). *Br J Haematol* 1991; 79: 428-437.
47. Κοκόρη Σ. T-Λευχαιμία/Λέμφωμα των ενηλίκων *Heama* 2010; 1(1): 65-71
48. Hermine, O., Ramos, J.C. & Tobinai, K. A Review of New Findings in Adult T-cell Leukemia–Lymphoma: A Focus on Current and Emerging Treatment Strategies. *Adv Ther* 35, 135–152 (2018)
49. Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-

- cellleukemia–lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol.* 2009; 27:453–9.
50. Dearden, C.E., Johnson, R., Pettengell, R., Devereux, S., Cwynarski, K., Whittaker, S., McMillan, A. and (2011), Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *British Journal of Haematology*, 153: 451-485.
 51. Saito M. Association Between HTLV-1 Genotypes and Risk of HAM/TSP. *Front Microbiol.* 2019;10:1101.
 52. Coler-Reilly, A.L.G., Yagishita, N., Suzuki, H. et al. Nation-wide epidemiological study of Japanese patients with rare viral myelopathy using novel registration system (HAM-net). *Orphanet J Rare Dis* 11, 69 (2016)
 53. Lima A. HTLV Type I and Type II NORD rarediseases.org/rare-diseases/htlv-type-i-and-type-ii/ 2012
 54. Nakagawa, M., Izumo, S., Ijichi, S., Kubota, H., Arimura, K., Kawabata, M., et al. (1995). HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J. Neurovirol.* 1, 50–61.
 55. Pedro D Oliveira, Amanda C Kachimarek, Achiléa L Bittencourt, Early Onset of HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) and Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (ATL): Systematic Search and Review, *Journal of Tropical Pediatrics*, Volume 64, Issue 2, April 2018, Pages 151–161
 56. Janeusa Rita L. Primo, Carlos Brites, Maria de Fátima S. P. de Oliveira, Otávio Moreno-Carvalho, Marcos Machado, Achilua L. Bittencourt, Infective Dermatitis and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis in Childhood and Adolescence, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 41, Issue 4, 15 August 2005, Pages 535–541
 57. Kamihira, S., Nakasima, S., et al.(1987), Transmission of Human T Cell Lymphotropic Virus Type I by Blood Transfusion before and after Mass Screening of Sera from Seropositive Donors. *Vox Sanguinis*, 52: 43-44.
 58. Osame, M., Janssen, R., et al. (1990), Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: Association with blood transfusion. *Ann Neurol.*, 28: 50-56.

59. A. Gessain, R. Mahieux, Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects, Vol. 3795, Issue 3, 03/2012, Pages 201-300
60. Verdonck, Kristien et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection *The Lancet Infectious Diseases*, Vol 7, Issue 4, 266-281
61. Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(6):485–496.
62. Malik, B. and Taylor, G.P. (2019), Can we reduce the incidence of adult T-cell leukaemia/lymphoma? Cost-effectiveness of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening in the United Kingdom. *Br J Haematol*, 184: 1040-1043.
63. Villeneuve PJ, Mao Y: Lifetime probability of developing lung cancer, by smoking status, Canada. *Can J Public Health*.1994;85 (6):385–8.
64. Tagaya Y, Matsuoka M, Gallo R. 40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future. *F1000Res*. 2019;8:F1000 Faculty Rev-228. Published 2019 Feb 28.
65. Kalyanaraman V S, Sarngadharan M G, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo R C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982;218:571–573.
66. Araujo, A. and Hall, W.W. (2004), Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol.*, 56: 10-19.
67. Poiesz B, Dube D, Dube S, et al. HTLV-II–Associated Cutaneous T-Cell Lymphoma in a Patient with HIV-1 Infection *N Engl J Med* 2000; 342:930-936
68. Habibi B. HTLV-I-II screening mandatory in France. *Transfus Totay* 1991, 11:8
69. Rosenblatt JD, Giorgi JV, Golde DW, et al. Integrated human T-cell leukemia virus II genome in CD8+ T cells from a patient with “atypical” hairy cell leukemia: evidence for distinct T and B cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 1988; 71:363-369
70. Melamed A, Witkover AD, Laydon DJ, Brown R, Ladell K, Miners K, et al. (2014) Clonality of HTLV-2 in Natural Infection. *PLoS Pathog* 10(3): e1004006.

71. Kannian P, Yin H, Doueiri R, Lairmore MD, Fernandez S, Green PL. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J Virol.* 2012; 86(7):3757–66.
72. Nicolas Manel, Felix J. Kim, Sandrina Kinet, Naomi Taylor, Marc Sitbon, Jean-Luc Battini The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV, *Cell* 2003, Vol. 115, P449-459
73. Gabet AS, Moules V, Sibon D, et al. Endemic versus epidemic viral spreads display distinct patterns of HTLV-2b replication, *Virology* 2006, vol. 345 (pg.13-21)
74. Mark A. Beilke; Hematologic hints of HTLV-2 in US blood donors. *Blood* 2008; 112 (10): 3919–3920.
75. Martinez, M.P., Al-Saleem, J. & Green, P.L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* 16, 21 (2019)
76. Feuer, G., Green, P. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5996–6004 (2005)
77. Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol.* 2012;3:378. Published 2012 Oct 24.
78. Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.* 1984; 46:245–53.
79. Demontis MA, Sadiq MT, Golz S, Taylor GP. HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J Med Virol.* 2015;87(12):2130–4.
80. Murphy EL. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. *Transfus ClinBiol.* 2016;23(1):13–19
81. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Biological Agents. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100B.) HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1
82. Gallo R, Willems L, Hasegawa H, the Global Virus Network’s Task Force on HTLV-1; Screening transplant donors for HTLV-1 and -2. *Blood* 2016; 128 (26): 3029–3031.

83. Paiva Arthur & Casseb Jorge. (2014). Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(3), 265-274
84. Roucoux D., Baoguang W., et al., HTLV Outcomes Study Investigators, A Prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV)–I and HTLV-II, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 191, Issue 9, 1 May 2005, Pages 1490–1497
85. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, et al. Sexual Transmission of Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I). *Ann Intern Med*. 1989; 111:555–560.
86. Rosadas C and Taylor GP (2019) Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. *Front. Microbiol.* 10:999
87. A.B.F. Carneiro-Proietti, M.S. Amaranto-Damasio, et al., Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection, *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Volume 3, Issue suppl_1, September 2014, Pages S24–S29,
88. Percher, Florent et al. “Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission.” *Viruses* vol. 8,2 40. 3 Feb. 2016
89. Takahashi K, Takezaki T, et al.(1991), Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T- lymphotropic virus type I. *Int.J. Cancer*, 49: 673-677
90. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3:388. Published 2012 Nov 15.
91. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev.* 2014;16(1):23–34.
92. de The G and Kazanji M. (1996). *J. Acq. Immun. Def. Synd. Hum. Retrovirol.*, 13 (Suppl 1), S191–S198.
93. Proietti, F., Carneiro-Proietti, A., Catalan-Soares, B. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058–6068 (2005)

94. European Centre for Disease Prevention and Control. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. Stockholm: ECDC; 2015.
95. Gallo, Willems, Hasegawa, the Global Virus Network's Task Force on HTLV-1; Screening transplant donors for HTLV-1 and - 2. *Blood* 2016; 128 (26): 3029–3031.
96. Ades, A E et al. "Human T cell leukaemia/lymphoma virus infection in pregnant women in the United Kingdom: population study." *BMJ (Clinical research ed.)* vol. 320,7248 (2000): 1497-501
97. Laperche, S., Worms, B., Pillonel, J. and (2009), Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sanguinis*, 96: 104-110.
98. Murphy EL, Cassar O, Gessain A. Estimating the number of HTLV-2 infected persons in the world. *Retrovirology*. 2015;12 (Suppl 1):O5. Published 2015 Aug 28.
99. Alvarez C, Gotuzzo E, Vandamme AM, Verdonck K. Family Aggregation of Human T-Lymphotropic Virus 1-Associated Diseases: A Systematic Review. *Front Microbiol*. 2016; 7:1674. Published 2016 Oct 28.
100. Inaba, S., Sato, H., Okochi, K., Fukada, K., Takakura, F., Tokunaga, K., Kiyokawa, H. and Maeda, Y. (1989), Prevention of transmission of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) through transfusion, by donor screening with antibody to the virus One-year experience. *Transfusion*, 29: 7-11.
101. Carneiro-Proietti AB, Amaranto-Damasio MS, Leal-Horiguchi CF, et al. Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc*. 2014;3 Suppl 1(Suppl 1): S24–S29.
102. Ihan, Alojz. "Risk assessment of HTLV-I/II transmission by tissue/cell transplantation." ECDC (2012).
103. Council of Europe. Committee of Experts on Blood Transfusion and Immunohematology and Select Committee of Experts on Automation and Quality Assurance in Blood Transfusion Services. SP-HM 1995, (25)15
104. Fabiola Martin, Yutaka Tagaya, Robert Gallo, Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO, *The Lancet*, 18 May 2018

105. Politis C, Economou I, et.al. HTLV-I infection in blood donors, thalassemia patients and renal patients in Greece. Arch Hell Med 1996, 13:388-392
106. Dalekos, GN et al. "Prevalence of Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Types I and II in Volunteer Blood Donors and High-Risk Groups in Northwestern Greece." Transfusion 35.6 (1995): 503–506.
107. ΑΥΓΟΥΣΤΑΤΟΣ και συν. Ανίχνευση anti-HTLV I/II σε αιμοδοτές κατά τη διετία 1999-2001, ΙΑΤΡΙΚΟ ΒΗΜΑ Τεύχος 83-Οκτ.Νοεμ. 2002
108. Zervou, E.K et al. "Low Prevalence of HCV, HIV, and HTLV-I/II Infection Markers in Northwestern Greece: Results of a 3-Year Prospective Donor Study (1995–1997)." European Journal of Internal Medicine 14.1 (2003): 39–44.
109. Πολίτη Κ και συν. Συχνότητα αντι-HTLV-I-II σε αιμοδοτικό πληθυσμό στην Ελλάδα Πολυκεντρική μελέτη, ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 1999,16(5):480-487
110. Πολίτη Κ και συν. Σεξουαλική μετάδοση της λοίμωξης HTLV-I-II σε αιμοδοτικό πληθυσμό και πολυμεταγγιζόμενα άτομα Πρώτη περίπτωση ετεροφυλικής διασποράς Βραχεία Δημοσίευση, ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 16(5), 1999
111. Tseliou P et al. Prevalence of infection by HTLV-I/II among pregnant women and high-risk groups in the Peloponnese peninsula, Greece. (2006). International Journal of STD & AIDS, 17(8), 543–546.
112. Stamoulis K., Kastaniotis G., et al. Low prevalence of HTLV-I/II infection markers: A 6-Years retrospective analysis. ISBT 2005, 9th European, Athens
113. Ciminale, V., Hatziyanni, M., Felber, B. K., Bear, J., Hatzakis, A., & Pavlakis, G. N. (2000). Unusual CD4+CD8+ phenotype in a Greek patient diagnosed with adult T-cell leukemia positive for human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). Leukemia Research, 24(4), 353–358.
114. Kokoris, S., et al. (2004) Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATLL): Report of Two Fully Documented Hellenic Patients, Leukemia & Lymphoma, 45:4, 715-721

115. Zervou, E.K, et al. Human T-lymphotropicvirus type I/II infections in volunteer blood donors from Northern and Western Greece: increased prevalence in one blood bank unit, *European Journal of Internal Medicine*, Vol.15, Issue 7, 422-427
116. Ενημερωτικό Δελτίο Αιμοεπαγρύπνησης. Δεδομένα 2017 (14/12/2018)
117. Namen-Lopes, M.S.S., Martins, M.L., Drummond, P.C., Lobato, R.R., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2009), Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. *Transfusion Medicine*,19:180-188
118. Cassar O., Gessain A. (2017) Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. In: Casoli C. (eds) *Human T-Lymphotropic Viruses. Methods in Molecular Biology*, vol 1582. Humana Press, New York, NY
119. Kiely, P., Thomas, B., & Kebede, M. (2008). Long-term serologic follow-up of blood donors with biologic false reactivity on an anti-human T-cell lymphotropic virus Types I and II chemiluminescent immunoassay and implications for donor management. *Transfusion*, 48(9), 1833–1841.
120. Tayalor, Bodéus, Courtois et al. The Seroepidemiology of Human T-Lymphotropic Viruses: Types I and II in Europe: A Prospective Study of Pregnant Women, *JAIDS*, Vol 38, 1(2005) : 104-109
121. Centers for Disease Control and Prevention, Current Trends Licensure of Screening Tests for Antibody to Human T-Lymphotropic Virus Type I December 09,1988/37(48);736-740, 745-747
122. Stramer SL, Notari EP 4th, Zou S, et al. Human T-lymphotropic virus antibody screening of blood donors: rates of false-positive results and evaluation of a potential donor reentry algorithm. *Transfusion*. 2011 Apr;51(4):692-701
123. Hindawi, S., Badawi, M., et al. (2018), Testing for HTLV 1 and HTLV 2 among blood donors in Western Saudi Arabia: prevalence and cost considerations. *Transfusion Med*, 28: 60-64.
124. U.S. Department of Health and Human Services, FDA-2018-D-3324, Recommendations for Requalification of Blood Donors

- Deferred Because of Reactive Test Results for Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Types I and II (anti-HTLV-I/II)
125. Cinquanta, Luigi et al. “Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?.” *Auto-immunity highlights* vol. 8,1 (2017): 9
 126. Darwish IA. *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*. *Int J Biomed Sci*. 2006;2(3):217–235.
 127. Alinity s HTLV I/II Reagent Kit Assay insert, Abbott, Revised May 2019
 128. ABBOTT PRISM HTLV-I/HTLV-II Assay insert, Revised December 2012
 129. INNO-LIA HTLV I/II Score Assay insert, FUJIREBIO
 130. Sabino, E C et al. “Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations.” *Journal of clinical microbiology* vol. 37,5 (1999): 1324-8.
 131. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ*. 1994;308(6943):1552.
 132. Baratloo A, Hosseini M, Negida A, El Ashal G. Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. *Emerg(Tehran)*.2015;3(2):48–49.
 133. Šimundić AM. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC*. 2009;19(4):203–211. Published 2009 Jan 20.
 134. Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, et al. *Immunoassay Methods*. 2012 May 1 [Updated 2019 Jul 8]. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004
 135. Stramer, S.L., Townsend, R.L., Foster, G.A., Johnson, R., Weixlmann, B. and Dodd, R.Y. (2018), Discordant human T-lymphotropic virus screening with Western blot confirmation: evaluation of the dual-test algorithm for US blood donations. *Transfusion*, 58: 638-640