

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΤΣΑΚΡΗΣ

« ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΩΝ ΓΡΙΠΗΣ ΣΕ  
ΛΟΙΜΩΞΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ-ΣΤΑΥΡΟΥ ΚΟΥΡΤΗ  
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

Στην οικογένειά μου.....



## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν καὶ Ἀσκληπιὸν καὶ Ὑγίαν καὶ Πανάκειαν καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσεσθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσεσθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσεσθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λουπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσεσθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι συμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσοδὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέονται, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιποκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## ΝΕΟΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΠΟΔΟΣΗ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους θεούς και τις θεές, και μάρτυρες τους βάζω ότι θα εκτελέσω τον όρκο μου αυτόν και αυτό μου το συμβόλαιο όσο οι δυνάμεις μου και η κρίση μου το επιτρέπουν.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και θα τον κάνω κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδελφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω.

Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου.

Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους.

Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

## Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

*Επιβλέπων Μέλος:* **Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας  
Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

*Μέλη:* **Γεωργία Βρυώνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας  
Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Νικόλαος Σπανάκης**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας  
Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ημερομηνία Αίτησης:	27 Ιανουαρίου 2010
Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Επιτροπής:	30 Ιουνίου 2010
Ημερομηνία Κατάθεσης Πρωτοκόλλου:	14 Ιουλίου 2010
Ημερομηνία Κατάθεσης 1 <sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου:	1 Ιουλίου 2011
Ημερομηνία Κατάθεσης 2 <sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου:	25 Ιουλίου 2012
Ημερομηνία Κατάθεσης 3 <sup>ης</sup> Έκθεσης Προόδου:	26 Σεπτεμβρίου 2014
Ημερομηνία Ορισμού 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:	21 Ιουνίου 2016

## Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Αθανάσιος Τσακρής**, Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Βασιλική Γεννηματά**, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Γεωργία Βρυώνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Βιολέτα Καψιμάλη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Νικόλαος Σπανάκης**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Ιωάννης Ρούτσιας**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Βασιλική Πιτυρίγκα**, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Κούρτη Αφροδίτη  
Ημερομηνία γέννησης: 04-04-1985  
Τόπος γέννησης: Μαρούσι Αττικής  
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη  
Διεύθυνση κατοικίας: Αναστάσεως 29, Χολαργός, Αττική  
Τηλέφωνο: 6974290477  
E-mail: [afroditi\\_kourti@yahoo.gr](mailto:afroditi_kourti@yahoo.gr)

### ΣΠΟΥΔΕΣ

- 01-07-2003: Αποφοίτηση από το 41<sup>ο</sup> Ενιαίο Λύκειο Αθηνών με βαθμό απολυτηρίου «Άριστα» Δεκαεννέα και Επτά Δέκατα (19,7).
- 25-08-2003: Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Πανελλήνιες Εξετάσεις) με σειρά επιτυχίας 21<sup>η</sup>.
- 28-07-2007: Αποφοίτηση από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό 8,82 «Άριστα».
- 20-08-2009: Χορήγηση Άδειας Άσκησης του Ιατρικού Επαγγέλματος.
- 30-06-2010: Υποψήφια Διδάκτορας της Ιατρικής Σχολής του Ε.Κ.Π.Α., Εργαστήριο Μικροβιολογίας, με θέμα «Ανίχνευση και τυποποίηση ιών γρίπης σε λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος».

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Αγγλικά : Certificate of Proficiency in English,  
University of Cambridge.
- Γαλλικά : Delf 2 Degré.
- Σουηδικά : Certifikat nivå B1.



## ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 15/03/2011 – 31/12/2011 : Εργάστηκε ως Ελεγκτής Ιατρός του Ενιαίου Ταμείου Ανεξάρτητα Απασχολούμενων (ΕΤΑΑ).
- 10/02/2012 – 09/03/2012 : Υπηρέτησε τον πρώτο μήνα της 12μηνιαίας υποχρεωτικής Υπηρεσίας Υπαίθρου στα τακτικά εξωτερικά ιατρεία και αντίστοιχα ιατρεία επειγόντων περιστατικών του Παθολογικού και Χειρουργικού Τομέα του Γενικού Νοσοκομείου Καλαμάτας.
- 10/03/2012 – 14/10/2012 : Υπηρέτησε μέρος της υποχρεωτικής Υπηρεσίας Υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Μαυροματίου Ιθώμης του Κέντρου Υγείας Μελιγαλά (Γενικό Νοσοκομείο Καλαμάτας).
- 17/10/2012 – 16/09/2014 : Τοποθετήθηκε ως έμμισθη Ειδικευόμενη Βοηθός της Παιδιατρικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Καλαμάτας, για απόκτηση ειδικότητας Παιδιατρικής.
- 17/09/2014 – 24/06/2015 : Έλαβε παράταση της παραμονής της ως έμμισθη Ειδικευόμενη Βοηθός της Παιδιατρικής Κλινικής του Γενικού Νοσοκομείου Καλαμάτας.
- 10/07/2015 – 31/08/2015 : Συνέχισε την υποχρεωτική Υπηρεσία Υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Αριστομένη του Κέντρου Υγείας Μελιγαλά (Γενικό Νοσοκομείο Καλαμάτας).
- 01/09/2015 – έως σήμερα : Υπηρετεί ως έμμισθη Ειδικευόμενη Βοηθός Παιδιατρικής στο Νοσοκομείο Παιδών Αθηνών «ΠΑΝ. & ΑΓΛΑΪΑΣ ΚΥΡΙΑΚΟΥ», για απόκτηση της ειδικότητας της Παιδιατρικής.

## ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- Σεμινάριο στην υποστήριξη της ζωής του Νεογνού (NLS), Ελληνική Εταιρεία Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης, Νοέμβριος 2013.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Κούρτη Α, Σπανάκης Ν. (2010). Το χρονικό της πρώτης πανδημίας γρίπης του 21<sup>ου</sup> αιώνα! Μια ανασκόπηση της πανδημίας που προκλήθηκε από τον ιό Α(H1N1) 2009. Δελτίο Ελλ. Μικροβιολ. Εταιρείας ; 55,5 :385-397.
- Κούρτη Α, Πιπεράκη ΕΘ, Σπανάκης Ν. (2010). Ανθρώπινος Βοσα-ιός: ένας νέος ιός του αναπνευστικού συστήματος. Δελτίο Ελλ. Μικροβιολ. Εταιρείας ; 55,6 : 469-476.
- Kourti A., Spanakos G., Politi L., Stayropoulou A., Spanakis N., Tsakris A. (2012). Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus in Greece during the post-pandemic 2010-2011 season. IntJAntimicrob.Agents;40(1);72-4.

## ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ

### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (Posters)

#### **31<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 28 May - 1 June 2013, Milan, Italy**

- VACCINATION COVERAGE OF ADOLESCENTS  
T.Syriopoulou, E.Karachanidi, A.Kourti, I.Argiri, A.Koukouletsos, S.Zisimopoulos, E.Grammatikos, A.Togias, P.Giannakopoulou, V.Katsaros
- FEBRILE URINARY TRACT INFECTIONS IN CHILDREN: EPIDEMIOLOGICAL STUDY  
T.Syriopoulou, E.Karachanidi, I.Argyri, A.Kourti, D.Konstantelos, E.Fourlani, A.Koukouletsos, E.Micha, M.Martinou, V.Katsaros

#### **9<sup>th</sup> World Congress of Cosmetic Dermatology, 27-30 June 2013, Athens, Greece**

- INCONTINENTIA PIGMENTI  
A.Kourti, I.Binakas, T.Syriopoulou, K.Kontargyris, P.Mintzias

**4<sup>th</sup> International Congress of UENPS, 11-14 December 2014, Athens, Greece**

- NEONATE WITH FETOMATERNAL TRANSFUSION SYNDROME  
D.Boudouvas,A.Kourti,D.Panagiotopoulos,A.Kanellopoulou,  
K.Filopoulou, S.Nifakou, M.Martinou, E.Alchazidou, G.Petrakos
- NEONATAL WITH CONGENITAL DIAPHRAGMATIC HERNIA  
D.Boudouvas,D.Panagiotopoulos,A.Kourti, A.Kanellopoulou,  
K.Filopoulou, S.Nifakou, E.Alchazidou, I.Tzanne, G.Petrakos
- NEONATAL WITH OSTEOGENESIS IMPERFECTA  
D.Boudouvas,D.Panagiotopoulos,A.Kourti,A.Kanellopoulou,  
K.Filopoulou, S.Nifakou, T.Syriopoulou, E.Alchazidou, G.Petrakos
- FETAL OMPHALOCELE AT 28 WEEKS OFGESTATION: A CASE  
REPORT  
D.Panagiotopoulos,D.Boudouvas,A.Kourti,A.Kanellopoulou,  
K.Filopoulou, S.Nifakou, E.Alchazidou, P.Giannakopoulou, G.Petrakos

**ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ  
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (Posters)**

**5<sup>ο</sup> Συνέδριο Υγείας Μεσσηνίας, 22-23 Φεβρουαρίου 2013, Καλαμάτα**

- ΝΟΣΟΣ ΑΠΟ ΑΜΥΧΕΣ ΓΑΤΑΣ  
A.Κούρτη, Ι.Μπινάκας, Ε.Βρυώνης, Θ.Συριοπούλου,  
Π.Γιαννακοπούλου,Α.Καπόγλη,Κ.Μανδηλάρης,Β.Κατσάρος.
- ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΑΚΜΗ ΩΣ ΑΡΧΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΕΝΟΥΣ  
ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑΣ ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΩΝ  
Θ.Συριοπούλου, A.Κούρτη, Ι.Αργύρη, Ι.Μπινάκας, Σ.Ζησιμόπουλος,  
Ε.Γραμματικός, Ε.Μίχα, Μ.Μαρτίνου, Κ.Κονταργύρης, Β.Κατσάρος

51<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 21-23 Ιουνίου 2013,  
Αλεξανδρούπολη

- ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΛΑΡΥΓΓΙΤΙΔΑΣ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΗΤΙΚΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Θεοδώρα Συριοπούλου, Αφροδίτη Κούρτη, Ιωάννα Αργύρη, Μαργαρίτα Διαμαντοπούλου, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Ευάγγελος Γραμματικός, Ελένη Μίχα, Μαρία Μαρτίνου, Ιωάννης Μπινάκας, Βάιος Κατσάρος

- ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΤΙΔΑΣ ΑΠΟ ΡΟΤΑΪΟ

Ιωάννα Αργύρη, Αφροδίτη Κούρτη, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Θεοδώρα Συριοπούλου, Ελένη Μίχα, Ευάγγελος Γραμματικός, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Μαρία Μαρτίνου, Βάιος Κατσάρος

- ΕΠΟΧΙΑΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΡΟΤΑΙΟΥ ΣΤΗ ΜΕΣΣΗΝΙΑ

Αφροδίτη Κούρτη, Ιωάννα Αργύρη, Θεοδώρα Συριοπούλου, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Ευάγγελος Γραμματικός, Ελένη Μίχα, Μαρία Μαρτίνου, Βάιος Κατσάρος

- ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΡΟΤΑΪΟΥ ΣΤΗ ΜΕΣΣΗΝΙΑ

Βάιος Κατσάρος, Αφροδίτη Κούρτη, Ιωάννα Αργύρη, Ελένη Μίχα, Ευάγγελος Γραμματικός, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Μαρία Μαρτίνου, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Θεοδώρα Συριοπούλου

- ΦΥΜΑΤΙΩΔΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΥΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ

Καλλιόπη Στράκα, Ελένη Φουρλάνη, Αφροδίτη Κούρτη, Θεοδώρα Συριοπούλου, Ελένη Μίχα, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Ευάγγελος Γραμματικός, Μυρσίνη Παπούλα, Βάιος Κατσάρος, Βασιλική Σπούλου

- ΣΧΕΣΗ ΠΑΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑΣ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ

Θεοδώρα Συριοπούλου, Ευάγγελος Γραμματικός, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Μαρία Μαρτίνου, Αφροδίτη Κούρτη, Ιωάννα Αργύρη, Ελένη Μίχα, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Μιχαήλ Κανέλλος, Βάιος Κατσάρος

**29<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Παιδών με Διεθνή Συμμετοχή, 18-20 Οκτωβρίου 2013, Αθήνα**

- ΑΓΕΝΕΣΙΑ ΑΝΙΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΑΡΣΙΟΥ ΚΟΛΟΥ ΣΕ ΝΕΟΓΝΟ: ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Ελένη Φουρλάνη, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Αφροδίτη Κούρτη, Ελένη Καραχανίδη, Ιωάννα Αργύρη, Α.Κουκουλέτσος, Μαρία Μαρτίνου, Ελένη Μίχα, Μιχαήλ Νικολακέας, Θεοδώρα Συριοπούλου

**17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, 1-3 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα**

- ΜΟΝΟΚΕΡΟΣ ΜΗΤΡΑ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ

Νηφάκου Σ., Κούρτη Α., Πετράκος Γ., Γιαννακοπούλου Π., Μπινάκας Ι., Μπούσιος Ι., Νικολάου Γ., Αλχαζίδου Ε., Ζιώγος Ε., Πλυτά Ε., Νταγκλή Α.

- ΝΕΟΓΝΟ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΑΤΕΛΟΥΣ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗΣ

Κούρτη Α., Νηφάκου Σ., Γιαννακοπούλου Π., Πετράκος Γ., Συριοπούλου Θ., Νικολάου Γ., Μπούσιος Ι., Μπινάκας Ι., Μίχα Ε., Ζησιμόπουλος Σ., Αργύρη Ι., Αλχαζίδου Ε., Πλυτά Ε., Νταγκλή Α.

- ΝΕΟΓΝΟ ΜΕ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΕΜΒΡΥΟ-ΜΗΤΡΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗΣ

Νηφάκου Σ., Κούρτη Α., Πετράκος Γ., Συριοπούλου Θ., Μπούσιος Ι., Νικολάου Γ., Μπινάκας Ι., Μαρτίνου Μ., Γραμματικός Ε., Αλχαζίδου Ε., Νταγκλή Α., Κατσάρος Β.

**52<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 6-8 Ιουνίου 2014, Ρόδος**

- ΤΥΧΑΙΕΣ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΙΣ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ: ΜΕΛΕΤΗ 5ΕΤΙΑΣ

Θεοδώρα Συριοπούλου, Ιωάννα Αργύρη, Ελένη Καραχανίδη, Πεντζέχρω Γιαννακοπούλου, Αφροδίτη Κούρτη, Ελένη Μίχα, Μαρία Μαρτίνου, Σπυρίδων Ζησιμόπουλος, Ιωάννης Μπινάκας, Βάιος Κατσάρος

**9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Εμβρυομητρικής Ιατρικής, 3-5 Ιουνίου 2016, Ναύπλιο**

- ΝΕΟΓΝΟ ΜΕ ΑΤΡΗΣΙΑ ΠΡΩΚΤΟΥ  
Α.Κούρτη, Μ.Λεκαδίτη, Α.Σταμάτη, Ε.Αλχαζίδου, Ι.Τζάννε, Π.Γιαννακοπούλου, Γ.Πετράκος, Θ.Συριοπούλου, Β.Κατσάρος
- ΝΕΟΓΝΟ ΜΕ ΧΕΙΛΕΟΣΧΙΣΤΙΑ ΚΑΙ ΥΠΕΡΩΙΟΣΧΙΣΤΙΑ - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ  
Α.Κούρτη, Μ.Λεκαδίτη, Α.Σταμάτη, Ε.Αλχαζίδου, Ι.Τζάννε, Π.Γιαννακοπούλου, Θ.Συριοπούλου, Γ.Πετράκος, Β.Κατσάρος
- ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΥΝΔΡΟΜΟΥ ALPORT  
Α.Κούρτη, Ε.Αλχαζίδου, Δ.Μπουντουβάς,, Κ.Φιλοπούλου, Γ.Πετράκος

**ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ-ΗΜΕΡΙΔΩΝ**

**2009**

- Θεραπευτικές Εξελίξεις 2009, 11 Απριλίου 2009, Αθήνα
- Επίκαιρα Θέματα και Αντιγνώμεις στην Παιδιατρική, 26 Σεπτεμβρίου 2009, Αθήνα

**2010**

- Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής Αιματολογίας, 12 Μαρτίου 2010, Αθήνα
- 6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 21-24 Απριλίου 2010, Αθήνα

**2011**

- Θεραπευτικές Εξελίξεις 2011, 16 Απριλίου 2011, Αθήνα
- Κόηση και Καρδιά II, 14 Μαΐου 2011, Αθήνα
- 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδοαλλεργιολογίας, 30 Σεπτεμβρίου-1 Οκτωβρίου 2011, Βόλος
- 11<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο, 10-11 Δεκεμβρίου 2011, Αθήνα

**2012**

- 4<sup>ο</sup> Συνέδριο Υγείας Μεσσηνίας, 17-18 Φεβρουαρίου 2012, Καλαμάτα

- 2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο για το Σακχαρώδη Διαβήτη και τα Μεταβολικά Νοσήματα, 27-28 Απριλίου 2012, Αθήνα
- 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδοαλλεργιολογίας, 14-15 Σεπτεμβρίου 2012, Καλαμάτα
- 7<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση της Ελληνικής Ακαδημίας Παιδιατρικής, 21-23 Σεπτεμβρίου 2012, Κυλλήνη
- Επίκαιρα Θέματα και Αντιγνώμιες στην Παιδιατρική 2012, 29 Σεπτεμβρίου 2012, Αθήνα
- 32<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 3-4 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα
- 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδοπνευμονολογικό Συνέδριο, 16-18 Νοεμβρίου 2012, Πάτρα
- Επιστημονική Ημερίδα: Το έμβρυο που κινδυνεύει και το πρόωρο νεογνό. Παρακολούθηση και αντιμετώπιση αιχμής, 24 Νοεμβρίου 2012, Πάτρα

## 2013

- 5<sup>ο</sup> Συνέδριο Υγείας Μεσσηνίας, 22 Φεβρουαρίου 2013, Καλαμάτα
- 23<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 23-24 Φεβρουαρίου 2013, Πάτρα
- 9<sup>ο</sup> Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 30-31 Μαρτίου 2013, Αθήνα
- 6<sup>ο</sup> Συνέδριο Παιδιατρικής, 28-30 Ιουνίου 2013, Καλαμάτα
- 29<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Παιδών με Διεθνή Συμμετοχή, 18-20 Οκτωβρίου 2013, Αθήνα
- 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, 01-03 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα
- 33<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 9-10 Νοεμβρίου 2013, Αθήνα
- Επιστημονική Ημερίδα: Σπάνιες Παθήσεις και Ορφανά Φάρμακα στην Καθημερινή Κλινική Πράξη, 20 Νοεμβρίου 2013, Καλαμάτα

- 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Παιδονευρολογικό Συνέδριο, 13-14 Δεκεμβρίου 2013, Αθήνα
- 10<sup>ο</sup> Σεμινάριο: Πρακτικά Θέματα Παιδοκαρδιολογίας, 14 Δεκεμβρίου 2013, Αθήνα

## 2014

- 15<sup>η</sup> Μετεκπαιδευτική Δημερίδα: Το Αλλεργικό Παιδί στην Κλινική πράξη, 01-02 Φεβρουαρίου 2014
- 6<sup>ο</sup> Συνέδριο Υγείας Μεσοσηνίας, 21-22 Φεβρουαρίου 2014, Καλαμάτα
- 14<sup>η</sup> Εκπαιδευτική Δημερίδα «Πρακτικά Παιδιατρικά Θέματα», 03-04 Μαΐου 2014, Πάτρα
- 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδοαλλεργιολογίας και 5<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Παιδοπνευμονολογίας, 19-21 Σεπτεμβρίου 2014, Αθήνα
- 34<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 8-9 Νοεμβρίου 2014, Αθήνα
- 2<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Φροντιστήριο: «Χοληστερόλη και Παιδί: Όσα πρέπει να γνωρίζει ο Παιδίατρος», 22 Νοεμβρίου 2014, Αθήνα

## 2015

- 25<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 7-8 Μαρτίου 2015, Πάτρα
- 8<sup>ο</sup> Συνέδριο Παιδιατρικής - "Κατευθυντήριες Οδηγίες Ορθής Παιδιατρικής Πράξης II", 13-15 Μαρτίου 2015, Βόλος
- 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου, Βόλος
- 29<sup>ο</sup> Σεμινάριο Επείγουσας και Εντατικής Παιδιατρικής «Πεπτικό Σύστημα», 10 Οκτωβρίου 2015, Αθήνα
- 19<sup>η</sup> Επιστημονική Συνάντηση Παιδιατρικών Λοιμώξεων, 17 Οκτωβρίου 2015, Αθήνα
- 9<sup>η</sup> Επιστημονική Ημερίδα: "Επίκαιρα θέματα και αντιγνώμεις στην Παιδιατρική", 31 Οκτωβρίου 2015, Αθήνα



- 35<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής, 07-08 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα
- 15<sup>ο</sup> Ετήσιο Συμπόσιο ΎΠροσέγγιση των γαστρεντερολογικών, ηπατολογικών και διατροφικών προβλημάτων στα παιδιά, 05 Δεκεμβρίου 2015

## **2016**

- 8<sup>ο</sup> Συνέδριο Υγείας Μεσσηνίας, 19-20 Φεβρουαρίου 2016, Καλαμάτα
- 9<sup>ο</sup> Συνέδριο Υποειδικοτήτων Παιδιατρικής με Διεθνή Συμμετοχή, 26-28 Φεβρουαρίου 2016, Αθήνα
- 1<sup>η</sup> Ημερίδα Ενημέρωσης Ιατρών για τη Διαχείριση Περιστατικών Σωματικά Κακοποιημένων Παιδιών, 3 Ιουνίου 2016, Αθήνα

## **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΗΘΣΗ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ**

### **2011**

- 5<sup>th</sup> Europaediatrics, 23-26 June 2011, Vienna, Austria

### **2012**

- Excellence in Paediatrics 2012, 28 November-01 December 2012, Madrid, Spain

### **2013**

- 31<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID), 28 May-01 June 2013, Milan, Italy
- 9<sup>th</sup> World Congress of Cosmetic Dermatology, 27-30 June 2013, Athens, Greece

### **2014**

- 4<sup>th</sup> International Congress of UENPS, 11-14 December 2014, Athens, Greece

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες:

Στον Καθηγητή κ. Τσακρή για τη συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής, τις χρήσιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Βρυώνη για τη συμπαράστασή της.

Στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σπανάκη για την ουσιαστική του συμμετοχή και βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής.

Σε όλο το προσωπικό του Ιολογικού Τμήματος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας για το φιλικό περιβάλλον και ιδιαίτερες τις βιολόγους κ. Λήδα Πολίτη και Αναστασία Σταυροπούλου, η βοήθεια των οποίων ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	1
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	2
<b>2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ</b>	3
<b>3. ΙΟΛΟΓΙΑ</b>	6
3.1 Δομή του ιού	6
3.2 Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της γρίπης	9
Α. Τμήμα 1 - Βασική Πρωτεΐνη της Πολυμεράσης 2 (PB2)	10
Β. Τμήμα 2 - Βασική Πρωτεΐνη της Πολυμεράσης 1 (PB1)	11
Γ. Τμήμα 3 - Όξινη Πρωτεΐνη της Πολυμεράσης (PA)	11
Δ. Τμήμα 4 - Αιμοσυγκολλητίνη (HA)	11
Ε. Τμήμα 5 - Νουκλεοπρωτεΐνη (NP)	13
ΣΤ. Τμήμα 6 - Νευραμινιδάση (NA)	14
Ζ. Τμήμα 7 - Οι Μembrανικές (matrix) Πρωτεΐνες (M1 και M2)	15
Η. Τμήμα 8 - Μη Δομικές Πρωτεΐνες NS1 και NS2	16
Θ. Η Πρωτεΐνη HEF	17
3.3 Ιικός Κύκλος	19
3.4 Αλληλεπίδραση του ιού με τα κύτταρα	23
<b>4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</b>	24
<b>5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ</b>	33
<b>6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ</b>	35
<b>7. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ</b>	41
Φυσική Ανοσολογική Απόκριση	44
Επίκτητη Ανοσολογική Απόκριση	48
Ανοσογήρανση	53
Επιλοιμώξεις	54
<b>8. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ</b>	55
8.1 Λοίμωξη στους Ενήλικες	55
8.2 Λοίμωξη σε Βρέφη και Παιδιά	56
8.3 Επιπλοκές	58

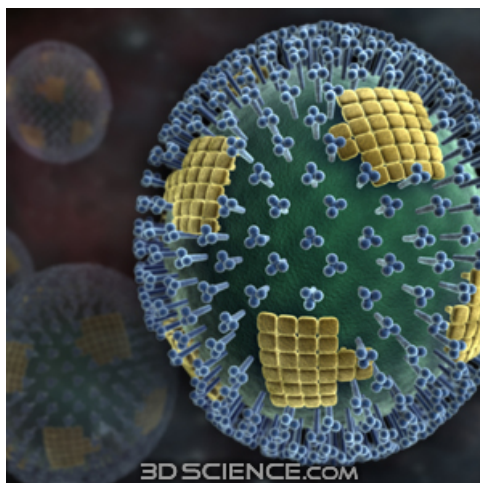
A. Επιπλοκές από το Αναπνευστικό	58
8.3.1 Πρωτοπαθής Ιογενής Πνευμονία	58
8.3.2 Δευτεροπαθής Βακτηριακή Πνευμονία	60
8.3.3 Παροξύνσεις Χρόνιων Νόσων του Αναπνευστικού	61
B. Επιπλοκές εκτός του Αναπνευστικού Συστήματος	61
8.3.4 Μέση Ωτίτιδα και Παραρρινοκολπίτιδα	61
8.3.5 Μυοσίτιδα	62
8.3.6 Επιπλοκές από το Καρδιαγγειακό Σύστημα	62
8.3.7 Σύνδρομο Reye	63
8.3.8 Νευρολογικές Επιπλοκές	64
8.3.9 Άλλες Επιπλοκές	65
<b>9. ΔΙΑΓΝΩΣΗ</b>	66
9.1 Κλινική Διάγνωση	66
9.2 Εργαστηριακή Διάγνωση	67
9.2.1 Απομόνωση του ιού σε καλλιέργειες	67
9.2.2 Ανίχνευση αντιγόνου	68
9.2.3 Ορολογικές δοκιμασίες	69
9.2.4 Μοριακές μέθοδοι	71
<b>10. ΘΕΡΑΠΕΙΑ</b>	73
10.1 Αμανταδίνη και Ριμανταδίνη	75
10.2 Αναστολείς της Νευραμινιδάσης	77
10.3 Ριμπαβιρίνη	81
<b>11. ΠΡΟΛΗΨΗ</b>	83
11.1 Τριδύναμο Αδρανοποιημένο Εμβόλιο	84
11.2 Ζωντανό Εξασθενημένο Εμβόλιο	86
<b><u>B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u></b>	88
<b>1. ΣΚΟΠΟΣ</b>	89
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	90
2.1 Ασθενείς και Δείγματα	91
2.2 Μέθοδοι	92

2.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	92
2.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με Αντίστροφη Μεταγραφάση (RT - PCR)	98
2.2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)	99
2.2.4 Εμφωλεύουσα Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Nested PCR)	100
2.3 Μέθοδοι τη Διατριβής	101
2.3.1 Απομόνωση Γενετικού Υλικού	101
2.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για διερεύνηση παρουσίας ιών γρίπης στα δείγματα	102
2.3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο της H275Y μεταλλαγής	103
2.3.4 Εμφωλεύουσα αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον έλεγχο της D222G μεταλλαγής	104
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	107
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	113
<b><u>Γ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</u></b>	117
1.Περίληψη	117
2.Άρθρο	122
<b><u>Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	125

## Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ιοί της γρίπης αποτελούν μια από τις συχνότερες αιτίες αναπνευστικών λοιμώξεων στον άνθρωπο με παγκόσμια σημασία, αφού έχουν τη μοναδική ικανότητα να προκαλούν εποχικές επιδημίες ποικίλης βαρύτητας και έντασης, αλλά και πανδημίες με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας. Αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας σε όλες τις ηλικιακές ομάδες και κάθε χρόνο η εποχική γρίπη υπολογίζεται ότι προσβάλλει το 5-20% του πληθυσμού. Η νόσος είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη, όμως επιπλοκές από το κατώτερο αναπνευστικό και το καρδιαγγειακό σύστημα μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο συνήθως ηλικιωμένα άτομα με υποκείμενα νοσήματα. Εκτιμάται ότι, κάθε χρόνο, 250.000-500.000 άτομα πεθαίνουν παγκοσμίως από γρίπη, ακόμα και τις χρονιές που δεν παρατηρούνται επιδημίες (40).



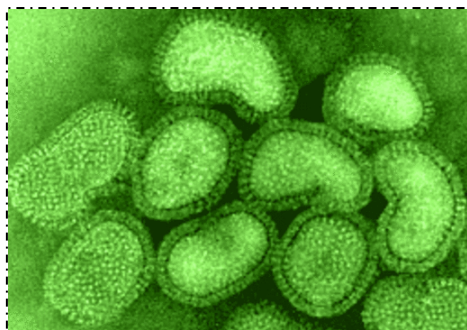
**Εικόνα 1.** Τρισδιάστατο μοντέλο του ιού της γρίπης.

## 2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι ιοί της γρίπης (ινφλουέντζας) ανήκουν στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* (Ορθοβλεννοϊοί), η οποία πήρε το όνομά της από τις ελληνικές λέξεις «ορθός» και «βλέννη», λόγω της ικανότητας των ιών της να προσκολλώνται στη βλέννη. Η ελληνική ονομασία της νόσου που προκαλούν, γρίπη, προέρχεται από τη γοτθική λέξη *gripan* (γερμανικά: *greifen*, αγγλικά: *gripe*, γαλλικά: *gripper*) που σημαίνει «αρπάζω απότομα». Η λατινογενής ονομασία της νόσου, ινφλουέντζα, προέρχεται από τη λέξη «*influentia*» που σημαίνει «επίδραση» και οφείλεται στην τότε κυκλοφορούσα πεποίθηση, ότι η νόσος οφειλόταν στην επίδραση των άστρων στον άνθρωπο (1).

Η οικογένεια *Orthomyxoviridae* περιλαμβάνει πέντε γένη: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, που περιλαμβάνει τους ιούς *Thogoto* και *Dhori*, και *Isavirus*, που περιλαμβάνει τον ιό ISAV (*infectious salmon anemia virus*) (226) .

Οι ιοί της γρίπης των τριών πρώτων γενών υποταξινομούνται περαιτέρω με βάση αντιγονικές διαφορές των νουκλεοπρωτεϊνών (NP) και των μεμβρανικών πρωτεϊνών (M) τους (120). Οι ιοί της γρίπης A προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία ζωικών ειδών εκτός από τον άνθρωπο, όπως χοίρους, άλογα, πτηνά, φώκιες και φάλαινες. Οι B ιοί πιστεύεται ότι έχουν μοναδικό ξενιστή τον άνθρωπο, ενώ οι C χοίρους και ανθρώπους (180).



**Εικόνα 2.** Ο ιός της γρίπης όπως φαίνεται με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



Οι ιοί τύπου Α κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε υποτύπους με βάση τα επιφανειακά τους αντιγόνα, αιμοσυγκολλητίνη (ΗΑ) και νευραμινιδάση (ΝΑ). Η ταξινόμηση σε υποτύπους, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 30% στην αλληλουχία των αμινοξέων **(180)**, έχει πρακτική σημασία, καθώς δεν υπάρχει διασταυρούμενη ανοσία μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων και επομένως οι αντιγονικές διαφορές είναι καθοριστικές για την κατανόηση της επιδημιολογίας της γρίπης και για την παραγωγή εμβολίων.

Έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής 16 διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια αιμοσυγκολλητίνης (ΗΑ) **(67)** (Η1, Η2, Η3, Η4 κτλ) και 9 νευραμινιδάσης (ΝΑ) **(121)** (Ν1, Ν2, Ν3 κτλ) ως προς τις αντιγονικές τους ιδιότητες. Πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί πρωτεϊνών ΗΑ και ΝΑ είναι δυνατοί και κάθε συνδυασμός είναι ένας νέος υπότυπος του ιού **(5)**.

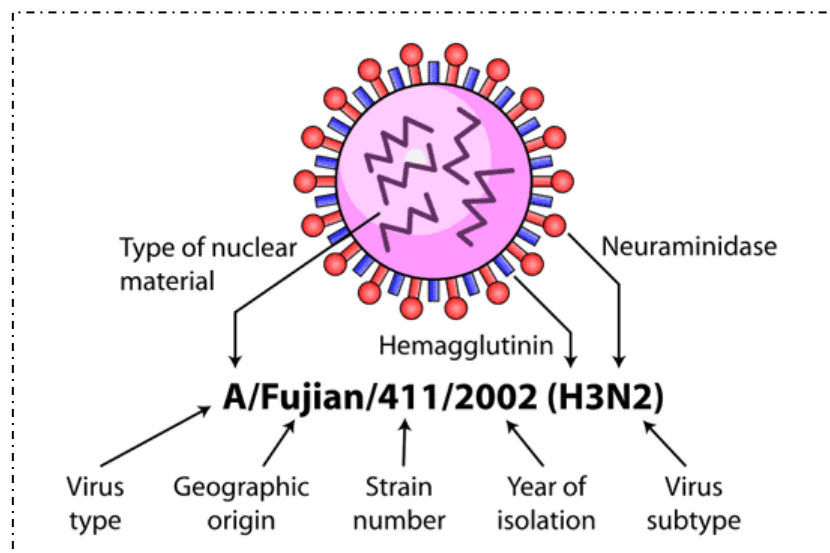
Από αυτούς μόνο οι Η1Ν1, Η2Ν2, Η3Ν2, Η5Ν1, Η7Ν7 και Η9Ν2 υπότυποι έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο **(36, 66, 82, 120, 212, 253)** με τους Η1Ν1, Η2Ν2 και Η3Ν2 να είναι αυτοί που κυριαρχούν. Πιο συγκεκριμένα ο υπότυπος Η1 κυκλοφορούσε μέχρι το 1957, οπότε και τον διαδέχθηκε ο Η2 μέχρι το 1968. Από το 1968 μέχρι σήμερα κυκλοφορεί ο Η3, ενώ ο Η1 επανεμφανίστηκε το 1976 και εξακολουθεί να κυκλοφορεί ακόμη. Από το 1997, άρχισε να προκαλεί νόσο στους ανθρώπους και ο υπότυπος Η5, ο οποίος μέχρι τότε κυκλοφορούσε μόνο ανάμεσα σε πληθυσμούς πουλερικών. Αντίστοιχα στον Ν1 υπότυπο ανήκαν όλοι οι ιοί της γρίπης Α πριν το 1957, στο Ν2 οι ιοί από το 1957 μέχρι σήμερα, ενώ το 1976 επανεμφανίστηκε ο Ν1, ο οποίος έκτοτε εξακολουθεί να εμφανίζεται ως τις μέρες μας. Οι υπόλοιποι υπότυποι νευραμινιδάσης έχουν απομονωθεί μόνο σε πουλιά και άλογα.

Σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (243), η ονοματολογία των ιών της γρίπης περιλαμβάνει κατά σειρά:

- 1) τον τύπο του ιού, δηλαδή A, B ή C
- 2) τον αρχικό ξενιστή (εκτός του ανθρώπου) από τον οποίο απομονώθηκε ο ιός, π.χ. ίππος
- 3) τη γεωγραφική προέλευση, π.χ. Θεσσαλονίκη
- 4) τον αριθμό του ιού, π.χ. 3
- 5) το έτος της απομόνωσης, π.χ. 1998 και
- 6) μέσα σε παρένθεση την αντιγονική περιγραφή της αιμοσυγκολλητίνης και της νευραμινιδάσης του ιού, π.χ. (H3N2).

Στα ανθρώπινα στελέχη η αναφορά του αρχικού ξενιστή παραλείπεται.

Έτσι, για παράδειγμα, η ονοματολογία ενός ιού τύπου A που απομονώθηκε από άνθρωπο στο Hong Kong το 1982 με αριθμό ιού 1 είναι A/Hong Kong/1/1982/(H3N2), ενώ για έναν ιό A που απομονώθηκε από χοίρο στην Iowa με αριθμό ιού 3 το 1970, η ονοματολογία είναι A/swine/Iowa/3/1970/(H1N1).

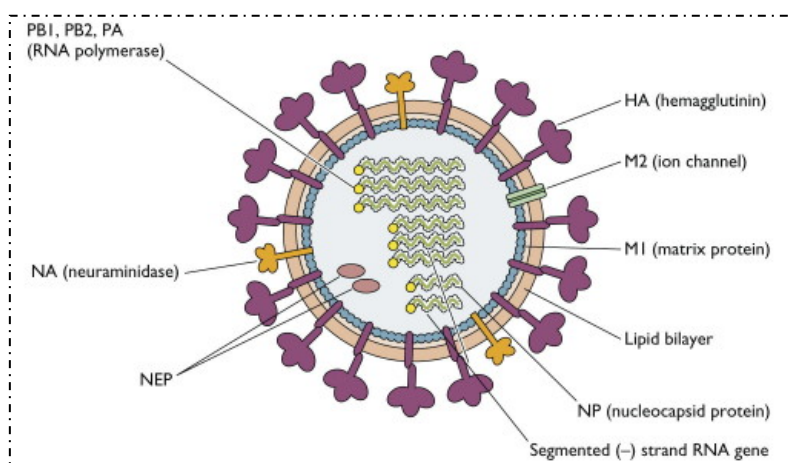


**Εικόνα 3.** Παράδειγμα ονοματολογίας του ιού της γρίπης.

### 3. ΙΟΛΟΓΙΑ

#### 3.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Οι ιοί της γρίπης είναι πλειομορφικοί, με σχήμα που κυμαίνεται από μικρό σφαιρικό έως ελικοειδές και διάμετρο από 80 έως 120 nm (1). Η μορφολογία των ιικών σωματιδίων είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό, το οποίο εξαρτάται από αρκετές ιικές πρωτεΐνες (HA, NA, M1 και M2) (22, 51, 108, 189,190). Υποστηρίζεται ότι η φύση του κυττάρου-ξενιστή μπορεί επίσης να καθορίσει τη μορφολογία του ιού (190). Η χημική σύνθεση του ιού έχει καθοριστεί. Κάθε σωματίδιο αποτελείται από περίπου 1-2% RNA, 70-75% πρωτεΐνες, 20-24% λιπίδια και 5-8% καρβοξύλια (120).



**Εικόνα 4.** Δομή του ιού της Γρίπης τύπου A και τύπου B.

Περιέχουν ένα μονόκλωνο, αρνητικής πολικότητας RNA, με μοριακό βάρος  $4-6 \times 10^6$  νουκλεοτίδια, το οποίο είναι τεμαχισμένο σε 8 τμήματα στους ιούς τύπου A και B και σε 7 τμήματα στους ιούς τύπου C. Το μέγεθος του γονιδιώματος διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ιού. Έτσι οι ιοί τύπου B έχουν το μεγαλύτερο γονιδίωμα (14600 nt), ακολουθούμενοι από τους ιούς τύπου A (13600 nt) και μετά τους ιούς τύπου C (12900 nt) (40).

Χαρακτηριστικά	Ιοί της γρίπης τύπου A	Ιοί της γρίπης τύπου B	Ιοί της γρίπης τύπου C
Αριθμός τμημάτων του γονιδιώματος	8	8	7
Επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες	HA και NA	HA και NA	HEF

Τα τμήματα του ιικού RNA συνδέονται στενά με τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP) και σχηματίζουν τη ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RNP), η οποία ονομάζεται νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη. Το νουκλεοκαψίδιο έχει ελικοειδή συμμετρία και το μοριακό του βάρος είναι περίπου 60kDa. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί αντιγονικοί τύποι NP, που αντιστοιχούν στους τρεις διαφορετικούς τύπους της γρίπης (A, B, C) **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Το νουκλεοκαψίδιο βρίσκεται σε στενή σχέση με ένα σύμπλοκο RNA-εξαρτώμενης RNA-πολυμεράσης. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες: τη βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 1 (PB1), τη βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2 (PB2) και την όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης (PA). Το μοριακό βάρος της κάθε πρωτεΐνης ποικίλλει από 80 έως 90 kDa και υπάρχουν περίπου 50 μόρια από το κάθε είδος σε κάθε ιικό σωματίδιο **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλεται από μια άλλη πρωτεΐνη που ονομάζεται μεμβρανική ή matrix πρωτεΐνη (M1). Είναι η κύρια πρωτεΐνη του ιού και αποτελεί το 35-45% της μάζας του. Το μοριακό της βάρος είναι 23kDa υπάρχουν περίπου 3000 μόρια M1 σε κάθε ιικό σωματίδιο. Υπάρχουν επίσης 14-68 μόρια μιας δευτέρας πρωτεΐνης M, της M2, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο με την M1 **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

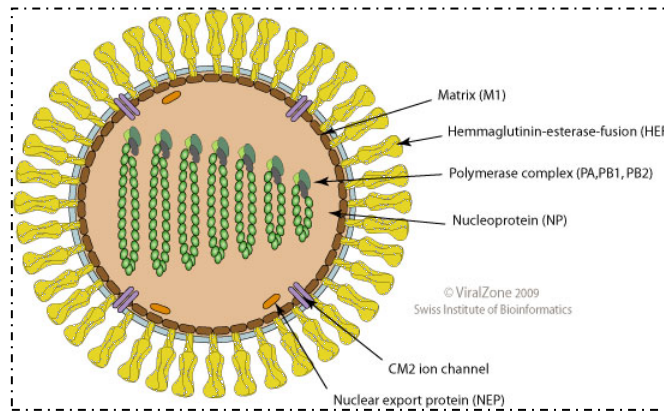
Εξωτερικά της M πρωτεΐνης υπάρχει μια λιπιδική διπλοστιβάδα (φάκελος), που αποτελεί το 20-24% του ιικού σωματιδίου. Από το φάκελο προσεκβάλλουν δύο γλυκοπρωτεΐνες, δίνοντας αγκαθωτή όψη στην επιφάνεια του ιού **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Η πρώτη γλυκοπρωτεΐνη είναι η αιμοσυγκολλητίνη (HA), η οποία αποτελείται από δύο ξεχωριστές υπομονάδες, τις HA1 και HA2, που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Κάθε μόριο αιμοσυγκολλητίνης αποτελείται από τρία τέτοια ζεύγη HA1 και HA2, μοριακού βάρους 75-80kDa έκαστο, και από 20% καρβοξύλιο. Υπάρχουν περίπου 1000 μόρια HA σε κάθε ιικό σωματίδιο. Κάθε προσεκβολή HA έχει μήκος 14-16nm, διάμετρο 4nm και προσκολλάται στο λιπιδικό φάκελο με υδρόφοβο δεσμό. Η HA αποτελεί το 25-30% της πρωτεΐνης του ιού **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Η δεύτερη γλυκοπρωτεΐνη ονομάζεται νευραμινιδάση (NA) και αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες, μοριακού βάρους 60kDa η κάθε μία, και άγνωστο ποσό καρβοξυλίου. Υπάρχουν 100-200 μόρια NA στην επιφάνεια κάθε ιικού σωματιδίου (η αναλογία ακίδων HA προς ακίδες NA σε κάθε σωματίδιο του ιού είναι 5:1). Κάθε μόριο NA έχει μήκος 10nm, διάμετρο 4nm και συνδέεται με το λιπιδικό φάκελο με ένα μίσχο που καταλήγει σε υδρόφοβο δεσμό. Η ολοκληρωμένη δομή έχει σχήμα μανιταριού, μοριακό βάρος 200-250kDa και αποτελεί το 7% της ιικής πρωτεΐνης **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Τέλος το ιικό RNA κωδικοποιεί δύο μη δομικές πρωτεΐνες: τις NS1 και NS2. Η NS1 συντίθεται πρώτα κατά τη μόλυνση, ενώ η NS2, που ονομάζεται και NEP, εμφανίζεται όψιμα **(1, 5, 40, 83, 169, 180)**.

Πρέπει να σημειωθεί πως οι περισσότερες μελέτες για τη δομή του ιού της γρίπης αφορούν κυρίως τον τύπο A. Είναι γνωστό όμως ότι και οι τύποι B και C έχουν παρόμοια δομή και διαφέρουν κυρίως στη νουκλεοπρωτεΐνη. Επιπλέον ο τύπος C χαρακτηρίζεται από την απουσία της HA και της NA και την ύπαρξη μόνο ενός τύπου επιφανειακής γλυκοπρωτεΐνης, της HEF **(40)**.



Εικόνα 5. Δομή του ιού της Γρίπης τύπου C.

### 3.2 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

<b>Πίνακας 2.</b>		<i>Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της γρίπης.</i>
<b>ΤΜΗΜΑ ΠΙΚΟΥ RNA</b>	<b>ΜΗΚΟΣ ΠΙΚΟΥ RNA (bps)</b>	<b>ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ</b>
<i>1</i>	2341	PB2
<i>2</i>	2341	PB1
<i>3</i>	2233	PA
<i>4</i>	1778	HA
<i>5</i>	1565	NP
<i>6</i>	1413	NA
<i>7</i>	1027	M1 και M2
<i>8</i>	890	NS1 και NS2

## A) ΤΜΗΜΑ 1 - ΒΑΣΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ 2 (PB2)

Το πρώτο τμήμα του γονιδιώματος του ιού της γρίπης κωδικοποιεί μία από τις τρεις πρωτεΐνες που απαρτίζουν το σύμπλεγμα της πολυμεράσης, τη βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2 (PB2). Οι PB2, PB1, PA και NP αποτελούν τις ελάχιστα απαιτούμενες πρωτεΐνες για την ιική αντιγραφή και μεταγραφή (96, 171). Η PB2 περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (171) και μεταφέρεται στον πυρήνα των προσβεβλημένων κυττάρων προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ιική αναπαραγωγή (110). Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι η PB2 υπομονάδα του συμπλέγματος της πολυμεράσης είναι απαραίτητη στη δημιουργία της καλυπτικής δομής του ιικού mRNA αφού δρα ως cap-binding πρωτεΐνη (13, 16, 138). Η PB2 έχει επίσης δραστηριότητα ενδονουκλεάσης (201) και χρησιμοποιεί το mRNA του ξενιστή προκειμένου να δημιουργήσει εκκνητικές περιοχές για τη σύνθεση του ιικού mRNA (154). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι PB1, PB2 και PA σχηματίζουν το σύμπλεγμα της πολυμεράσης. Λειτουργικές αναλύσεις της PB2 πρωτεΐνης έδειξαν ότι έχει μία θέση πρόσδεσης για τη PB1 και δύο περιοχές όπου μπορεί να προσδεθεί η NP με δυνατότητα ρυθμιστικού ελέγχου (178). Εκτός από τις ανωτέρω βιολογικές λειτουργίες, η PB2 φαίνεται ότι σχετίζεται με την παθογονικότητα του ιού της γρίπης, αφού μετάλλαξη στη θέση 627 της πρωτεΐνης φαίνεται ότι αλλάζει τη επιθετικότητα του H5N1/97 στα ποντίκια (87).



**Εικόνα 6.** Τρισδιάστατο μοντέλο του συμπλέγματος της πολυμεράσης, βασιζόμενο σε εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

## **Β) ΤΜΗΜΑ 2 - ΒΑΣΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ 1 (PB1)**

Η PB1 πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το δεύτερο τμήμα του γονιδιώματος του ιού της γρίπης και είναι το βασικό συστατικό του συμπλέγματος της πολυμεράσης, αφού αλληλεπιδρά και με τις δύο άλλες πρωτεΐνες PB2 και PA (47, 79). Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την έναρξη της αντιγραφής και την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου ιικού RNA (16). Η σύνδεσή της με την περιοχή που βρίσκεται ο εκκινητής ενεργοποιεί τη δράση ενδονουκλεάσης της πρωτεΐνης.

## **Γ) ΤΜΗΜΑ 3 - ΟΞΙΝΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PA)**

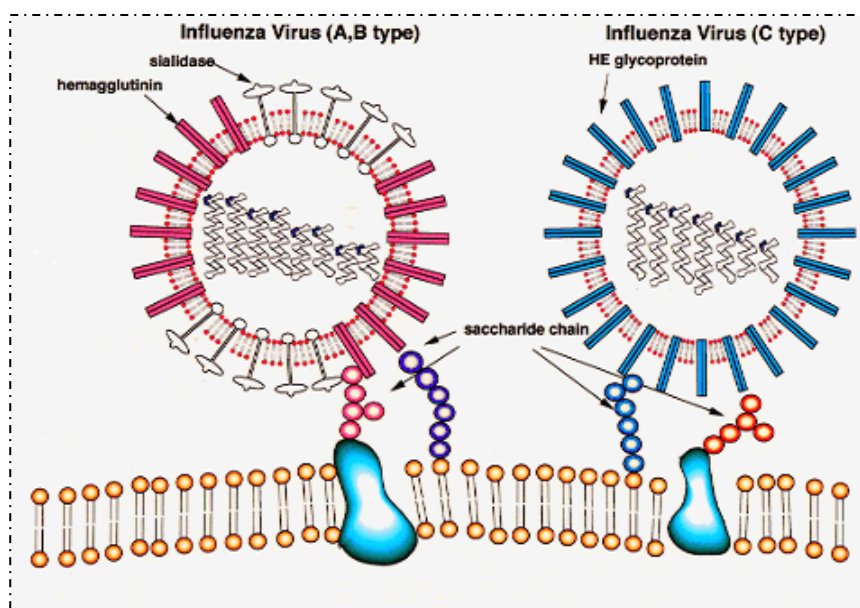
Η PA κωδικοποιείται από το τρίτο τμήμα του γονιδιώματος και είναι η μικρότερη υπομονάδα του συμπλέγματος της πολυμεράσης (45). Όπως και οι άλλες υπομονάδες περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού, απαραίτητα για τη μετακίνηση στον πυρήνα (110). Η PA είναι απαραίτητη για την ική αντιγραφή και μεταγραφή (172) και μεταλλαγές κοντά στο καρβοξυλικό άκρο της αναστέλλουν τη μεταγραφή (257). Ο Fodor και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι μεταλλαγή σε ένα μόνο αμινοξύ της PA είναι ικανή να οδηγήσει στο σχηματισμό ελαττωματικού RNA (61, 62). Επίσης οι Fodor και Smith έδειξαν ότι η PA είναι απαραίτητη για την επαρκή πυρηνική συσσώρευση της PB1 πρωτεΐνης προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλεγμα της πολυμεράσης του ιού της γρίπης (63). Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η PA πρωτεΐνη βρέθηκε ότι μειώνει της πρωτεόλυση των προσβεβλημένων κυττάρων. Μάλιστα όταν η PA εκφράζεται σε κύτταρα σε απουσία των άλλων υπομονάδων της πολυμεράσης επάγει μια γενική πρωτεόλυση τόσο των ικών όσο και των κυτταρικών πρωτεϊνών που συνεκφράζονται (196) αλλά αυτή η ιδιότητα δεν έχει συσχετισθεί με κάποια γνωστή λειτουργία του ιού και η σημασία αυτού του ευρήματος πρέπει να ερευνηθεί περισσότερο.

## **Δ) ΤΜΗΜΑ 4 - ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΗ (HA)**

Η αιμοσυγκολλητίνη (HA) είναι μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης που κωδικοποιείται από το τέταρτο μεγαλύτερο τμήμα RNA. Είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, κατά



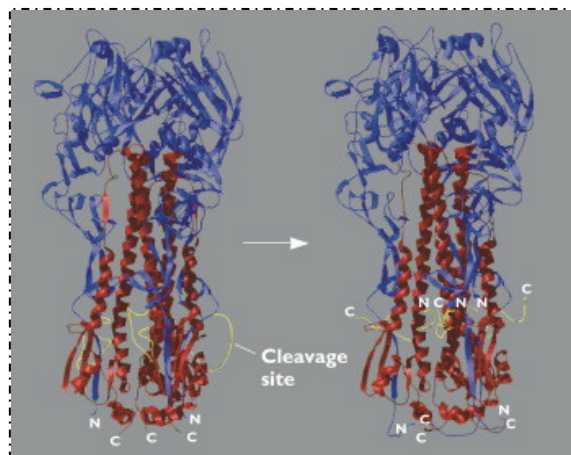
τα αρχικά στάδια της λοίμωξης, μέσω της σύνδεσής της με τους επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων (120).



**Εικόνα 7.** Οι επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες (HA, NA και HEF) είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση του ιού της γρίπης στο κύτταρο.

Η HA αρχικά έχει τη μορφή μονής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία υφίσταται μετα-μεταφραστική διαίρεση από κυτταρικές πρωτεάσες σχηματίζοντας δύο υπομονάδες: την HA1 και την HA2 (122), που ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό. Η δομή της στο χώρο περιλαμβάνει δύο διακριτά μέρη: μία σφαιρική κεφαλή, που συντίθεται από HA1 υπομονάδες και είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς και την ουρά, που αποτελείται και από τα δύο είδη υπομονάδων (HA1 και HA2) και συμμετέχει στη διείσδυση του ιού στο κύτταρο.

Η αιμοσυγκολλητίνη των ιών της γρίπης προσδένεται στο ολιγοσακχαριδικό άκρο του σιαλικού οξέος και έχει ειδικότητα όσον αφορά το είδος των υποδοχέων που συνδέεται αναλόγως με τον τύπο του ιού. Για παράδειγμα οι περισσότεροι ιοί της γρίπης των πτηνών συνδέονται με τον N-ακετυλονευραμινικό οξύ- $\alpha$ 2,3-γαλακτόζη υποδοχέα, ενώ αυτοί των ανθρώπων προτιμούν τον N-ακετυλονευραμινικό οξύ- $\alpha$ 2,6-γαλακτόζη (38).



**Εικόνα 8.** Σχηματικό διάγραμμα της αιμοσυγκολλητίνης.

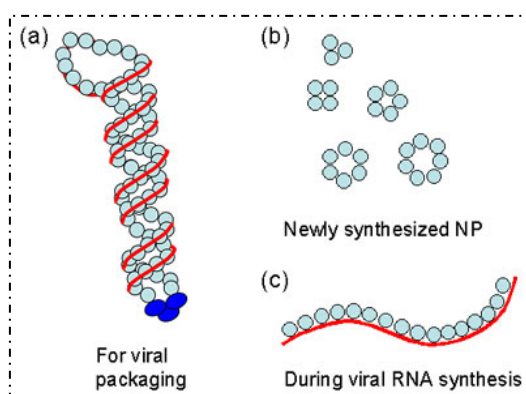
Αυτή η ειδικότητα σύνδεσης με υποδοχέα καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των αμινοξέων στις θέσεις 226 και 228. Για τους ιούς του ανθρώπου H2 και H3 μια αντικατάσταση της Gly-226 με Leu και της Gly-228 με Ser είναι αυτή που άλλαξε την ειδικότητα του υποδοχέα από τη σύνδεση με υποδοχέα των πτηνών σε υποδοχέα ανθρώπου (38, 153). Επίσης μεταλλαγή στη θέση 222 της HA1 υπομονάδας (αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος με γλυκίνη ή ασπαραγίνη) αλλάζει την ειδικότητα από α2-6 σε α2-3 που σημαίνει ότι ο ιός μπορεί να προσδεθεί με υποδοχείς στην επιφάνεια κυττάρων που βρίσκονται βαθύτερα στο ανθρώπινο αναπνευστικό σύστημα, προκαλώντας νόσο βαρύτερης μορφής (55, 132).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η HA συνδέεται και με τους επιφανειακούς υποδοχείς των ερυθροκυττάρων, προκαλώντας αιμοσυγκόλληση, ιδιότητα στην οποία οφείλεται το όνομά της και στην οποία στηρίζονται διάφορες ορολογικές δοκιμασίες για τον ιό της γρίπης (5).

### **Ε) ΤΜΗΜΑ 5 - ΝΟΥΚΛΕΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (NP)**

Η νουκλεοπρωτεΐνη (NP), που κωδικοποιείται από το πέμπτο τμήμα του γονιδιώματος του ιού της γρίπης, είναι το πιο άφθονο συστατικό του RNP. Είναι ένα ειδικό για το είδος του ιού αντιγόνο, που συσχετίζεται με το

ικόν RNA (37) και είναι απαραίτητη για την αντιγραφή και μεταγραφή του (172). Μια θερμοευαίσθητη μεταλλαγή της NP έδειξε αδυναμία σύνθεσης του συμπληρωματικού RNA (cRNA), αλλά όχι και του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) στη μη ανεκτή θερμοκρασία (200). Αυτό το γεγονός δείχνει ότι η NP παίζει ρόλο στον έλεγχο της RNA πολυμεράσης για τη μετάβαση από την αντιγραφή στη μεταγραφή. Η NP είναι επίσης γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο για την μετακίνηση του ιικού RNA στον πυρήνα κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της ιικής λοίμωξης (137, 163, 240). Ενώ, αργότερα στη λοίμωξη η NP, μαζί με τις M1 και NS2, συμμετέχουν στη μετακίνηση των θυγατρικών ιικών RNAs στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να σχηματιστούν τα νέα ιικά σωματίδια (54, 137, 163, 219).

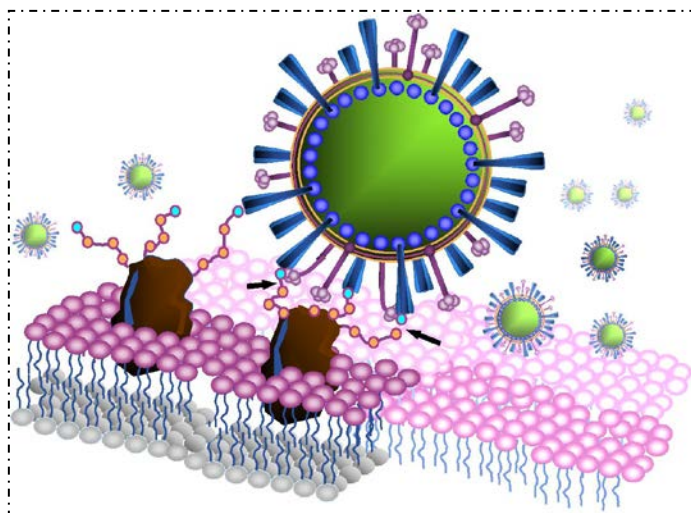


**Εικόνα 9.** Κρυσταλλική δομή της νουκλεοπρωτεΐνης.

### **ΣΤ) ΤΜΗΜΑ 6 - ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗ (NA)**

Η νευραμινιδάση (NA) είναι η δεύτερη σημαντική επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης. Η λειτουργία της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά φαίνεται ότι καταλύοντας τον α-κετοσιδικό δεσμό, απομακρύνει τα υπολείμματα σιαλικού οξέος από την επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, προωθώντας έτσι τόσο τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο, όσο και την απελευθέρωση των νεοσχηματισθέντων ιών απ' αυτό. Τέλος σε πρόσφατες μελέτες φαίνεται ότι η NA μειώνει την απόπτωση, πιθανότατα μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα TGF- $\beta$ . Η σημασία όμως του

ευρήματος αυτού στην παθογένεια του ιού της γρίπης δεν είναι ακόμα γνωστή (40).



**Εικόνα 10.** Η νευραμινιδάση βοηθά στην απελευθέρωση των νεοσχηματισθέντων ιικών σωματιδίων από το κύτταρο.

## Ζ) ΤΜΗΜΑ 7 - ΟΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΕΣ (MATRIX) ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (M1 ΚΑΙ M2)

- **Η M1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ**

Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του ιού και ένα ειδικό για το είδος αντιγόνο των ιών της γρίπης (65). Η πρωτεΐνη M1 βρίσκεται κάτω από τη λιπιδική διλοστιβάδα και μελέτες που έχουν γίνει, με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, υποστηρίζουν ότι μπορεί να την τροποποιήσει, έχοντας ως αποτέλεσμα την πάχυνση του λιπιδικού φακέλου του ιού. Αναφέρονται πολλές λειτουργίες της M1. Πρώτον, συνδέεται με το RNA με μη ειδικό τρόπο (229) και αναστέλλει την ιική μεταγραφή (234). Περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού (251) και φαίνεται ότι ρυθμίζει την πυρηνική μετακίνηση του ιικού RNA (137). Όταν συνδέεται με το RNP προωθεί την πυρηνική έξοδο του RNP και αναστέλλει είσοδο (21, 98). Αναφέρεται μάλιστα ότι όταν η M1

πρωτεΐνη συντίθεται σε υψηλή θερμοκρασία (41°C) είναι ανίκανη να αλληλεπιδράσει με το RNP και αναστέλλεται η μετακίνηση του RNP από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, αποδεικνύοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης της M1 με το RNP για την έξοδο από τον πυρήνα (86,195). Τέλος η M1 παίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση των θυγατρικών ικτών σωματιδίων και την τελική τους μορφολογία (15, 76, 127).

- ***H M2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ***

Η M2 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη (119) που έχει τη μορφή ομοτετραμερούς του οποίου οι υπομονάδες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό (194). Η M2 πρωτεΐνη λειτουργεί ως διαύλος ιόντων για τη ρύθμιση του pH (175). Στο ενδόσωμα των προσβεβλημένων κυττάρων η δραστηριότητα της M2 ως διαύλου ιόντων επιτρέπει την μείωση του pH του εσωτερικού των εισερχομένων ικτών σωματιδίων. Αυτή η μείωση του pH είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή, αφού επιτρέπει την αποσύνδεση του RNP από την M1 πρωτεΐνη και την είσοδό του στον πυρήνα (21, 137). Επίσης, η λειτουργία της M2 ως διαύλου ιόντων διατηρεί υψηλό pH στο σύμπλεγμα Golgi, γεγονός που συμβάλλει στη σταθεροποίηση της δομής των νεοσυντιθέμενων HA, κατά τη διάρκεια της ενδοκυτταρικής τους μετακίνησης προκειμένου να συναρμολογηθούν τα νέα ιικά σωματίδια (85, 213). Τέλος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η M2 πρωτεΐνη, μαζί με την M1, είναι σημαντικοί καθοριστές της ελικοειδούς μορφολογίας των ικτών σωματιδίων (102, 189).

## **H) ΤΜΗΜΑ 8 - ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ NS1 και NS2**

- ***H NS1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ***

Η NS1 είναι μια μη δομική πρωτεΐνη του ιού της γρίπης. Φαίνεται ότι ρυθμίζει την έκφραση κυτταρικών και ικτών πρωτεϊνών συνδεόμενη σε διαφορετικά μόρια RNA. Είναι επίσης γνωστό ότι αναστέλλει την ωρίμανση, την πυρηνική έξοδο (64, 118), καθώς και την πολυαδενυλίωση του κυτταρικού

mRNA (30). Συμβάλλει στην ενεργοποίηση της dsRNA πρωτεϊνικής κινάσης (129) και φαίνεται ότι ενισχύει την έκφραση των ικών πρωτεϊνών, ελέγχοντας τη μετάφραση του ιικού mRNA (44). Σημαντική λειτουργία της είναι επίσης η αναστολή της παραγωγής αντι-ιικής κυτταρικής ιντερφερόνης ως απάντηση στη λοίμωξη από τον ιό (72), εξασφαλίζοντας έτσι αποτελεσματική ιική αναπαραγωγή. Αυτό το επιτυγχάνει εμπλεκόμενη στα μονοπάτια παραγωγής IFN-α και IFN-β, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Μάλιστα η NS1 πρωτεΐνη του H5N1/97 βρέθηκε ότι εκτός από τη μείωση της ευαισθησίας του ιού στη δράση των ιντερφερονών και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), μειώνει τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στα ανθρώπινα μακροφάγα (32), γεγονός που υποδηλώνει ότι η βαρύτητα της νόσου που προκαλεί ο H5N1/97 μπορεί να οφείλεται στη μείωση του «καταρράκτη κυτταροκινών» που προκαλεί η NS1 πρωτεΐνη του ιού. Τέλος φέρεται να μειώνει την απόπτωση στα προσβεβλημένα από τον ιό κύτταρα (198).

- ***Η NS2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ***

Η NS2 είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει ένα κλασσικό πυρηνικό σήμα εξόδου (NES) στο αμινοτελικό άκρο της (164) και αλληλεπιδρώντας με τον κυτταρικό πυρηνικό παράγοντα εξόδου CRM1 (155), ελέγχει την έξοδο του νουκλεοκαψιδίου από τον πυρήνα. Η NS2 λειτουργεί ενώνοντας τον κυτταρικό μηχανισμό εξόδου με το νουκλεοκαψίδιο, μέσω της M1. Εξαιτίας του σημαντικού ρόλου της ως η ιική πρωτεΐνη εξόδου από τον πυρήνα, ονομάζεται πλέον και NEP (nuclear export protein).

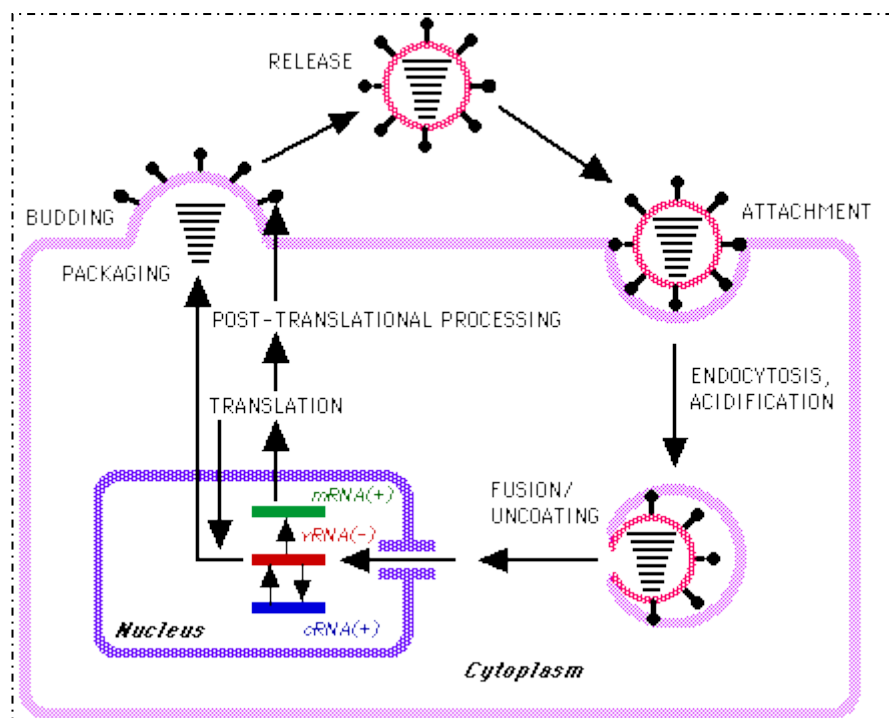
### **©) Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ HEF**

Η HEF (Hemagglutinin - Esterase - Fusion) είναι η επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη των ιών της γρίπης τύπου C. Αρχικά συντίθεται ως μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα και στη συνέχεια διασπάται σε δύο υπομονάδες, τις

HEF1 και HEF2, που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό. Η πρωτεΐνη HEF είναι αυτή που προωθεί τη σύνδεση των ιών της γρίπης τύπου C με επιφανειακούς υποδοχείς των κυττάρων, των οποίων το τελικό τμήμα αποτελείται από 9-Ο-ακετυλο-N-ακετυλονευραμινικό οξύ. Η πρωτεΐνη επίσης συμμετέχει και στη διείσδυση του ιού στο κύτταρο ξενιστή **(40)**.

### 3.3 ΠΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

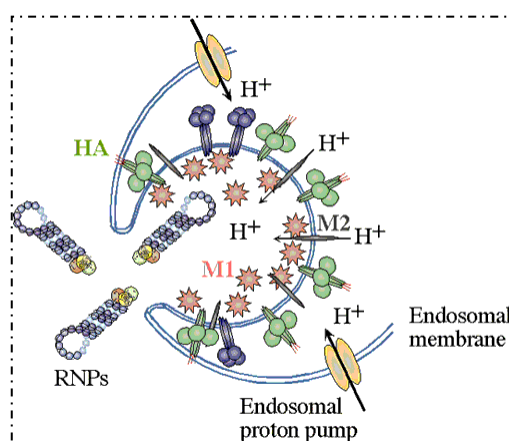
Το πρώτο στάδιο του ιικού κύκλου περιλαμβάνει την προσκόλληση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου. Έτσι ο ιός της γρίπης προσβάλλει τα κύτταρα μέσω της σύνδεσης της αιμοσυγκολλητίνης του (ή της πρωτεΐνης HEF για ιούς τύπου C) με ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς του κυττάρου που περιέχουν σιαλικό οξύ. Έχουν βρεθεί περίπου 28 είδη τέτοιων υποδοχέων, τα χαρακτηριστικά των οποίων είναι καθοριστικά για τον ιό που μολύνει το κάθε κύτταρο, καθώς για παράδειγμα οι ιοί των πτηνών συνδέονται με διαφορετικούς υποδοχείς απ' ό,τι οι ιοί του ανθρώπου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Η ειδικότητα αυτή δεν είναι απόλυτη, καθώς κάποιοι ιοί μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη και σε άλλα είδη μέσω διαφορετικών υποδοχέων. Ο ρόλος της αιμοσυγκολλητίνης στην παραπάνω διαδικασία αποδεικνύεται από μελέτες που έδειξαν ότι το ειδικό αντίσωμα έναντι της HA εμποδίζει την ιική προσρόφηση (40).



Εικόνα 11. Ο ιικός κύκλος.



Μετά την προσκόλληση ακολουθεί η διείσδυση (ενδοκυττάρωση) του ιού. Οι ιοί ενδοκυτταρώνονται σε κοιλότητες καλυμμένες με κλαθρίνη, οι οποίες είναι ορατές με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο περίπου 20 λεπτά μετά τη λοίμωξη. Στη συνέχεια ακολουθεί η σύντηξη του λιπιδικού φακέλου που περιβάλλει τον ιό με τις μεμβράνες των ενδοσωμάτων, διαδικασία η οποία απαιτεί το όξινο περιβάλλον των ενδοσωμάτων (pH 5.0-6.0) και το διαχωρισμό της HA σε HA1 και HA2. Η σύντηξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου του ιού στο κυτταρόπλασμα (230). Πριν από τη σύντηξη οι M2 πρωτεΐνες, δρώντας ως διάλυτοι ιόντων, εισάγουν πρωτόνια στο εσωτερικό του νουκλεοκαψιδίου και εκθέτουν τον πυρήνα του ιού σε όξινο pH (175). Το χαμηλό pH είναι αυτό που προωθεί επίσης την αποσύνδεση της πρωτεΐνης M1 από το RNP, επιτρέποντας στο σύμπλεγμα της RNA πρωτεάσης να μεταναστεύσει στον πυρήνα του κυττάρου μέσω ATP-εξαρτώμενων διαύλων. ( Η έκθεση του ιικού πυρήνα σε χαμηλό pH δεν είναι απαραίτητη για την αποσύνδεση της M1 πρωτεΐνης από το RNP σε ιούς τύπου C ).



**Εικόνα 12.** Η διαδικασία εισόδου του RNP στο κύτταρο.

Μόλις το RNP μεταναστεύσει στον πυρήνα του κυττάρου, το σύμπλεγμα της πολυμεράσης (PA, PB1 και PB2) ξεκινάει την αρχική μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) από όλα τα τμήματα του ιικού RNA. Η σύνθεση του mRNA περιλαμβάνει την αναγνώριση του «μανδύα»

και την πρόσδεση σε αυτόν μέσω της PB2 πρωτεΐνης. Η επιμήκυνση της αλυσίδας πραγματοποιείται με τη βοήθεια της PB1 υπομονάδας (μπορεί να συμμετέχει και η PA) και συνεχίζεται ώσπου να φτάσει στην πολύ(A) περιοχή, που βρίσκεται σε απόσταση 15-22 νουκλεοτιδίων από το 5' άκρο του ιικού RNA **(40, 161)**, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή λειτουργικού mRNA. Στη συνέχεια το mRNA εγκαταλείπει τον κυτταρικό πυρήνα και προσδένεται στα ριβοσώματα, όπου αρχίζει η μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών **(74)**.

Τα προϊόντα της σύνθεσης του ιικού mRNA αλλάζουν όσο προχωρά η λοίμωξη, φανερώνοντας ένα είδος ρύθμισης. Αρχικά κυριαρχεί η σύνθεση mRNAs που κωδικοποιούν τις NP και NS1, αργότερα αυξάνει η παραγωγή mRNAs για τις HA, NA και M1. Η παραγωγή των πρωτεϊνών που αποτελούν το σύμπλεγμα της πολυμεράσης παραμένει σχετικά χαμηλή σε όλη τη διάρκεια της λοίμωξης, αν εξαιρέσουμε το πολύ αρχικό στάδιο **(40, 173)**.

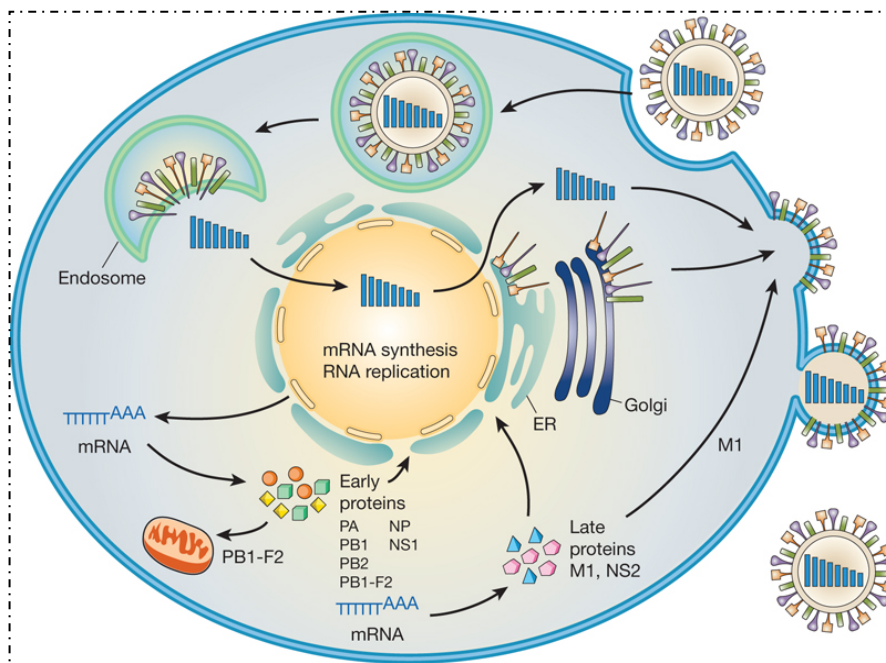
Η παραγωγή του συμπληρωματικού RNA (cRNA) καθώς και των θυγατρικών αλυσίδων ιικού RNA γίνεται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα, μετά την κορύφωση παραγωγής mRNA και την πρωτεϊνοσύνθεση **(40)**.

Η χρονική αλληλουχία της εμφάνισης των ιικών πρωτεϊνών έχει μελετηθεί εκτενώς. Έτσι είναι γνωστό ότι η παρουσία NP μπορεί να ανιχνευθεί περίπου 2 ώρες μετά την προσβολή από τον ιό και η συγκέντρωσή της φτάνει στο μέγιστο στις 5-6 ώρες, ενώ η HA με τη NA εμφανίζονται περίπου 3 ώρες μετά τη λοίμωξη **(180)**.

Είναι φανερό ότι οι παραπάνω διαδικασίες εμπλέκονται στις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή. Συγκεκριμένα υπάρχει μια εκλεκτική σύνθεση των στοιχείων του ιού σε βάρος των στοιχείων του ξενιστή. Πρωταρχικό ρόλο στο γεγονός αυτό παίζει η πρωτεΐνη NS1 **(180)**.

Η συναρμολόγηση των θυγατρικών ιικών σωματιδίων μέσα στα μολυσμένα κύτταρα ξεκινά με την πρόσδεση της νουκλεοπρωτεΐνης με τα νεοσχηματισθέντα ιικά RNA, σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο **(53)**. Τα νουκλεοκαψίδια εξέρχονται από τον πυρήνα συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες M1 και NS2. Η πρωτεΐνη NS2, που αναφέρεται πλέον και ως NEP (nuclear export protein), ρυθμίζει αυτή την έξοδο αλληλεπιδρώντας με τον κυτταρικό

παράγοντα εξόδου CRM1 (155). Μόλις φτάσουν στην κυτταρική μεμβράνη περιβάλλονται από έναν φάκελο που περιέχει τις πρωτεΐνες HA, NA και M2. Υποστηρίζεται ότι στη διαδικασία αυτή κύριο ρόλο παίζει η πρωτεΐνη M1 (76). Τελικά, οι ιοί εξέρχονται από το κύτταρο μέσω λιπιδικών διόδων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτή είναι μία διαδικασία της οποίας ο μηχανισμός δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, πιστεύεται πάντως ότι η νευραμινιδάση παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς απομακρύνει τα υπολείμματα του σιαλικού οξέος, τα οποία θα εμπόδιζαν την απελευθέρωση του ιού, από τον φάκελο και την κυτταρική μεμβράνη. Η απελευθέρωση των νέων ιών από το κύτταρο ανιχνεύεται 5-6 ώρες μετά τη μόλυνση του κυττάρου και μεγιστοποιείται στις 7-8 ώρες.



**Εικόνα 13.** Σχηματικά ο ιικός κύκλος.

### 3.4 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες για τον ικό κύκλο στο κύτταρο αφορούν στελέχη ιού της γρίπης τύπου Α, περιορισμένος αριθμός μελετών με στελέχη τύπου Β δεν έχει δείξει σημαντικές διαφορές στο μηχανισμό. Έτσι, όταν ένας ιός της γρίπης τύπου Α ενοφθαλμίζεται σε μια κυτταροκαλλιέργεια υπάρχουν τρεις εκδοχές (180):

- A. Μπορεί να μην προκαλέσει λοίμωξη, κάτι που συνήθως συμβαίνει όταν τα κύτταρα δεν διαθέτουν τους απαραίτητους υποδοχείς για την είσοδο του ιού.
- B. Μπορεί ο ιός να υποστεί έναν ατελή κύκλο ανάπτυξης, κατάσταση γνωστή ως ανεπιτυχή λοίμωξη. Αυτό συμβαίνει σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών, όπως τα κύτταρα HeLa, τα κύτταρα L και τους ανθρώπινους διπλοειδείς ινοβλάστες, αλλά δεν υπάρχει προς το παρόν ικανοποιητική εξήγηση. Φαίνεται να υπάρχει κάποιο εμπόδιο σε κάποιο στάδιο του φυσιολογικού κύκλου της αναπαραγωγής, ώστε ενώ παράγεται μεγάλος αριθμός ικών σωματιδίων, το περιεχόμενό τους σε γενετικό υλικό είναι ανεπαρκές και τα σωματίδια αυτά δεν είναι ικανά να προκαλέσουν λοίμωξη. Ανεπιτυχής λοίμωξη παρατηρείται επίσης όταν ενοφθαλμίζονται υπερβολικές ποσότητες του ιού σε σειρές που φυσιολογικά επιτρέπουν τη λοίμωξη, όπως είναι τα κύτταρα της αμνιακής μεμβράνης εμβρυοφόρων αυγών όρνιθας. Η περίπτωση αυτή είναι γνωστή ως φαινόμενο Von Magnus.
- C. Ο ιός που ενοφθαλμίζεται σε μια κυτταρική σειρά μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη, παράγοντας νέα λοιμογόνα ικά σωματίδια. Επιτυχής λοίμωξη μπορεί να συμβεί σε κύτταρα ανθρώπου, μπαμπούτνου και νεφρού πιθήκου, καθώς και σε κυτταρικές αμνιακής και αλλαντοϊκής κοιλότητας εμβρυοφόρων αυγών όρνιθας. Επίσης μπορεί να συμβεί και σε άλλα κύτταρα με προσθήκη θρυψίνης, η οποία θα διαχωρίσει την HA σε HA1 και HA2, διαδικασία βασική για την αναπαραγωγή του ιού.

## 4. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

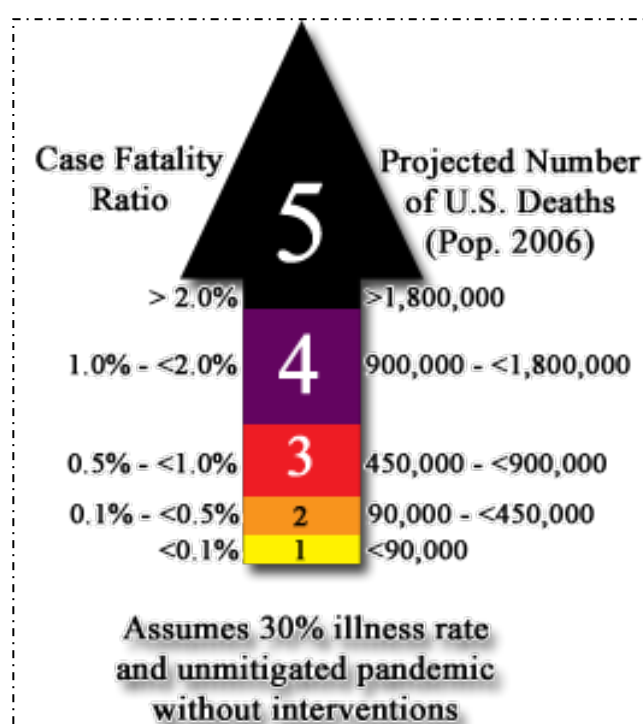
Η υψηλής μεταδοτικότητας οξεία αναπνευστική νόσος, γνωστή ως γρίπη, φαίνεται να υπάρχει για την ανθρωπότητα από τα αρχαία χρόνια. Η κλινική εικόνα της γρίπης, με την αιφνίδια εμφάνιση αναπνευστικής νόσου, που διαρκεί λίγες εβδομάδες και υποχωρεί εξίσου αιφνιδίως, είναι αρκετά χαρακτηριστική ώστε να επιτρέψει την αναγνώριση αρκετών επιδημιών του παρελθόντος. Μια τέτοια επιδημία αναφέρεται από τον Ιπποκράτη το 412 π.Χ. και κάποιες άλλες κατά το 14<sup>ο</sup> και 15<sup>ο</sup> αιώνα. Η πρώτη αξιόπιστη αναφορά στον ιό της γρίπης έγινε το 1694 από τον Molineux, όμως η ποιότητα και η ποσότητα των δεδομένων αυξάνεται από τις αρχές του 18<sup>ου</sup> αιώνα. Η εργαστηριακή απομόνωση του ιού της γρίπης, που έγινε το 1933 από τους Smith, Andrews και Laidlaw, ήταν αυτή που έδωσε το έναυσμα για ενδελεχή μελέτη του ιού. (Ο ιός της γρίπης τύπου Β απομονώθηκε πρώτη φορά από τον Francis το 1936) **(12, 217)**.

Ο ιός της γρίπης έχει παγκόσμια κατανομή και ενώ μπορεί να προκαλέσει και σποραδικές λοιμώξεις, συνήθως προκαλεί περιορισμένες ή εκτεταμένες επιδημίες, οι οποίες συμβαίνουν στις περισσότερες χώρες σχεδόν κάθε χρόνο. Ξεκινούν συνήθως απότομα, φτάνουν στο μέγιστο μέσα σε 2 - 3 εβδομάδες και έχουν συνολική διάρκεια 5 - 8 εβδομάδες. Σε περίοδο επιδημίας, μπορεί να προσβληθεί περίπου το 10% του πληθυσμού, το 50% των προσβεβλημένων ατόμων θα αναπτύξει συμπτώματα και θα σημειωθεί αύξηση του ποσοστού των θανάτων **(14, 33)**. Μεγάλες επιδημίες γρίπης συμβαίνουν συνήθως κάθε 2-5 χρόνια. Υπάρχει επίσης η πιθανότητα μια επιδημία γρίπης να πάρει τις διαστάσεις πανδημίας.

Για να χαρακτηριστεί μια επιδημία γρίπης ως πανδημία πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, το κύμα γρίπης πρέπει ξεκινώντας από μία συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, να εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο, προσβάλλοντας ένα υψηλό ποσοστό του πληθυσμού και να οδηγήσει σε αύξηση του δείκτη θνησιμότητας. Δεύτερον, η νόσος πρέπει να έχει προκληθεί από ένα καινούριο στέλεχος του ιού, η HA του οποίου να μην σχετίζεται με

την ΗΑ των ιών της γρίπης που κυκλοφορούσαν ακριβώς πριν την πανδημία, ούτε να μπορεί να προκύψει απ' αυτούς με απλή μεταλλαγή (97, 235).

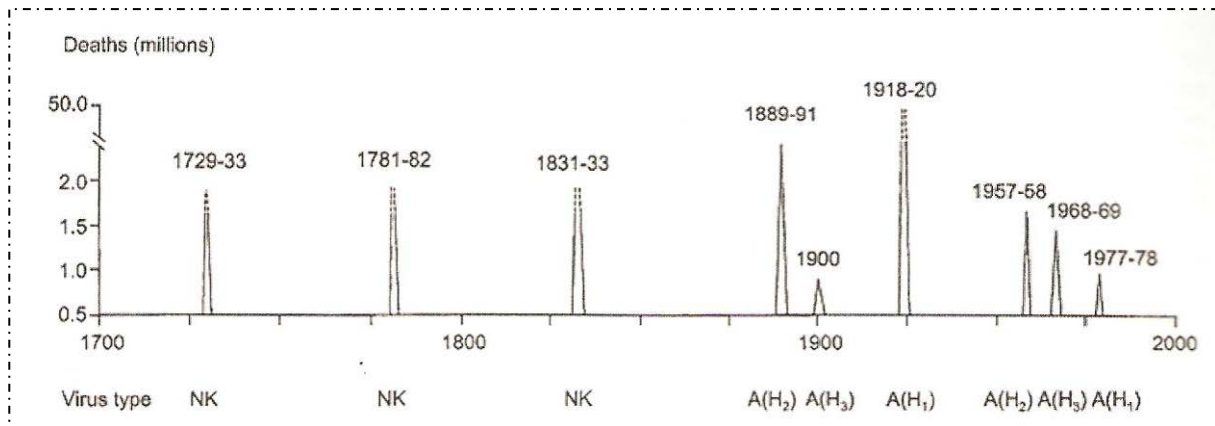
Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των Η.Π.Α. (CDC) έχει καθιερώσει το Δείκτη Σοβαρότητας Πανδημίας (PSI), για τη σχεδίαση των τρόπων συντονισμένης αντιμετώπισης των πανδημιών, από τις πολιτείες, τις κοινότητες, τις επιχειρήσεις και τα σχολεία. Ο Δείκτης καθορίζεται από το ποσοστό θνησιμότητας, που είναι η αναλογία θανάτων/προσβολών %, σε μια κλίμακα από 1 έως 5 (βλέπε εικ. 14).



**Εικόνα 14.** Δείκτης Σοβαρότητας Πανδημίας.

Η πρώτη πανδημία γρίπης, για την οποία συμφωνούν όλοι οι μελετητές, εμφανίστηκε το 1580. Ξεκινώντας από την Ασία το καλοκαίρι του 1580, εξαπλώθηκε σε Αφρική και Ευρώπη μέσα σε 6 μήνες και έφτασε τελικά μέχρι την Αμερική. Οι δείκτες νοσηρότητας ήταν υψηλοί και αναφέρεται ότι στη Ρώμη πέθαναν 8000 άνθρωποι και κάποιες ισπανικές πόλεις αποδεκατίστηκαν (11, 184).

Από το 1700 και μετά έχουν αναφερθεί τουλάχιστον εννέα πανδημίες.



**Εικόνα 15.** Πανδημίες της γρίπης από το 1700 μ.Χ. μέχρι το 2000 μ.Χ.

Η πρώτη επίσημη πανδημία του 18<sup>ου</sup> αιώνα ξεκίνησε την άνοιξη του 1729 στη Ρωσία, εξαπλώθηκε στην Ευρώπη μέσα σε μια περίοδο 6 μηνών και μέσα σε τρία χρόνια είχε εξαπλωθεί παγκοσμίως **(168)**.

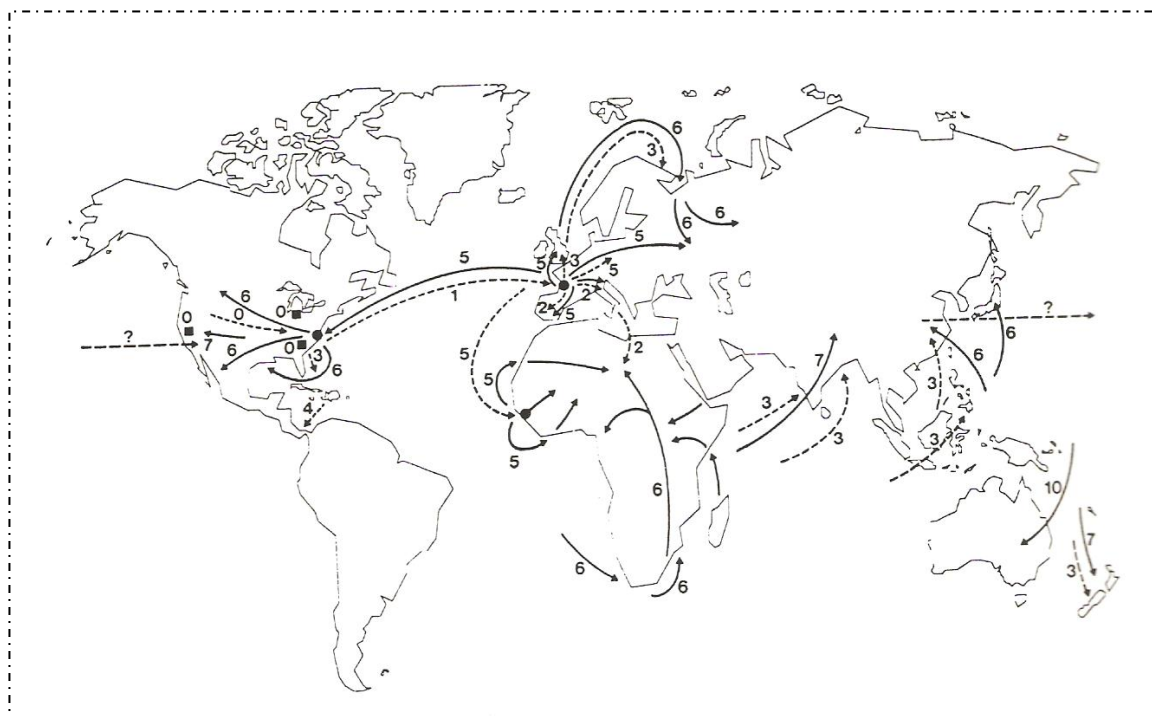
Η επόμενη πανδημία εμφανίστηκε, μετά από ένα κενό 40 χρόνων, το 1781. Ξεκίνησε το φθινόπωρο στην Κίνα, εξαπλώθηκε στη Ρωσία και από εκεί δυτικά, σε ολόκληρη την Ευρώπη μέσα σε 8 μήνες. Ο δείκτης προσβολής ήταν υψηλός, ιδιαίτερα μεταξύ νέων ενηλίκων: στην κορύφωση της πανδημίας 30000 άνθρωποι προσβάλλονταν κάθε μέρα μόνο στην Αγία Πετρούπολη **(168)**.

Η πανδημία του 1830-1833 συγκρίνεται, όσον αφορά τη σοβαρότητα, με εκείνη του 1918. Ξεκίνησε το χειμώνα του 1830, πάλι στην Κίνα και επεκτάθηκε νότια, σε Φιλιππίνες, Ινδία, Ινδονησία και δυτικά, μέσω Ρωσίας, στην Ευρώπη και τέλος στην Αμερική. Ο δείκτης προσβολής από τον ιό ήταν υψηλός (20-25%), αλλά όχι και η θνητότητα **(168)**.

Η τέταρτη πανδημία ξεκίνησε από τη Ρωσία και εξαπλώθηκε σε Ευρώπη και Ηνωμένες Πολιτείες κατά το διάστημα 1889-1892. Η λοίμωξη παρουσιαζόταν ως λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού με απότομη έναρξη και σύντομη διάρκεια. Ο αριθμός των ανθρώπων που προσβλήθηκαν από τον ιό ήταν μεγάλος και οι θάνατοι ήταν συχνοί σε βρέφη και ηλικιωμένους, αλλά

αφορούσαν μόλις το 0,05% από το 25-30% του συνολικού πληθυσμού που μολύνθηκε (223).

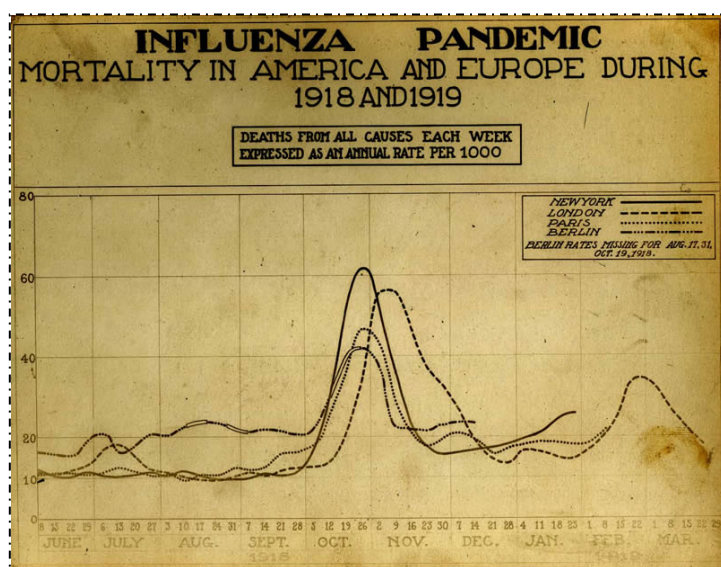
Η πανδημία της γρίπης του 1918-1920, γνωστή και ως «Ισπανική Γρίπη», είναι ένα από τα πιο δραματικά γεγονότα στην ιστορία της ιατρικής. Η προέλευσή της δεν είναι γνωστή. Πιθανολογείται ότι ξεκίνησε από την Κίνα, αν και τα πρώτα κρούσματα εμφανίστηκαν ταυτόχρονα στο Detroit, στη Νότια Καρολίνα και στις φυλακές San Quentin της Βόρειας Αμερικής, το Μάρτιο του 1918 (42). Από την Αμερική, μέσω των στρατιωτών που στάλθηκαν στον πόλεμο, ο ιός πέρασε στην Ευρώπη. Το αρχικό κύμα της γρίπης ήταν μία σχετικά ήπια νόσος που εξαπλώθηκε ταχύτατα σε Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία (στην Ισπανία δημοσιεύτηκαν οι πρώτες περιγραφές της νόσου και γι' αυτό ονομάστηκε Ισπανική Γρίπη), Γερμανία, Μεγάλη Βρετανία και μετά στη Ρωσία. Το Μάιο ο ιός έφτασε στην Αφρική και τον Ιούνιο σε Νέα Ζηλανδία και Φιλιππίνες. Τα γεγονότα από την έναρξη της πανδημίας μέχρι και τον Ιούνιο δεν θεωρούνται κάτι το ιδιαίτερο· τα όσα ακολούθησαν όμως παραμένουν μοναδικά στην ιστορία της γρίπης.



**Εικόνα 16.** Η διαδρομή του ιού της γρίπης κατά την πανδημία του 1918-1919.



Αρχικά, τον Αύγουστο του 1918 ξέσπασε επιδημία στο πλήρωμα ενός καραβιού που ξεκίνησε από την Αγγλία για τη Σιέρα Λεόνε. Οι ασθενείς μεταφέρθηκαν σε ένα τοπικό νοσοκομείο μολύνοντας το γηγενή πληθυσμό. Εκεί, ο ιός υπέστη μια θανατηφόρα μεταλλαγή και εμφανίστηκε ως λοιμώξη ασυνήθιστης επιθετικότητας, που είχε την εικόνα μιας νέας μορφής βαριάς πνευμονίας. Στη συνέχεια, αυτή η πιο σοβαρή μορφή της νόσου εμφανίστηκε στο λιμάνι της Βρέστης, εξαπλώθηκε ταχύτατα σε ολόκληρη την Ευρώπη και τελικά, μέσω ενός πλοίου έφτασε στη Βοστώνη των Η.Π.Α. (75). Η πανδημία εμφανίστηκε στην Ινδία τον Οκτώβριο του 1918 και είχε ως αποτέλεσμα 7 εκατομμύρια θανάτους, στην Αυστραλία τον Ιανουάριο του 1919, προκαλώντας μέσα σε μερικές εβδομάδες 1,5-2 εκατομμύρια θανάτους, και τέλος στην Αλάσκα, όπου πέθανε το 25% του πληθυσμού.



**Εικόνα 17.** Η θνησιμότητα σε Αμερική και Ευρώπη από την πανδημία του 1918-1919 όπως απεικονίζεται σε διάγραμμα της εποχής.

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της πανδημίας είναι ότι οι θάνατοι εμφανίζονταν κυρίως μεταξύ νεαρών ενηλίκων, 20-40 ετών, και όχι μεταξύ παιδιών και ηλικιωμένων όπως συνήθως. Η πανδημία εμφάνισε δύο και σε μερικές χώρες ακόμα και τρία κύματα και αναφέρεται ότι προσβλήθηκε το 50% του πληθυσμού παγκοσμίως, εμφάνισε κλινικά νόσο το 25% και η

συνολική θνησιμότητα ήταν 40-50 εκατομμύρια, ενώ υπολογίζεται ότι ο πραγματικός αριθμός είναι κατά πολύ μεγαλύτερος (41).

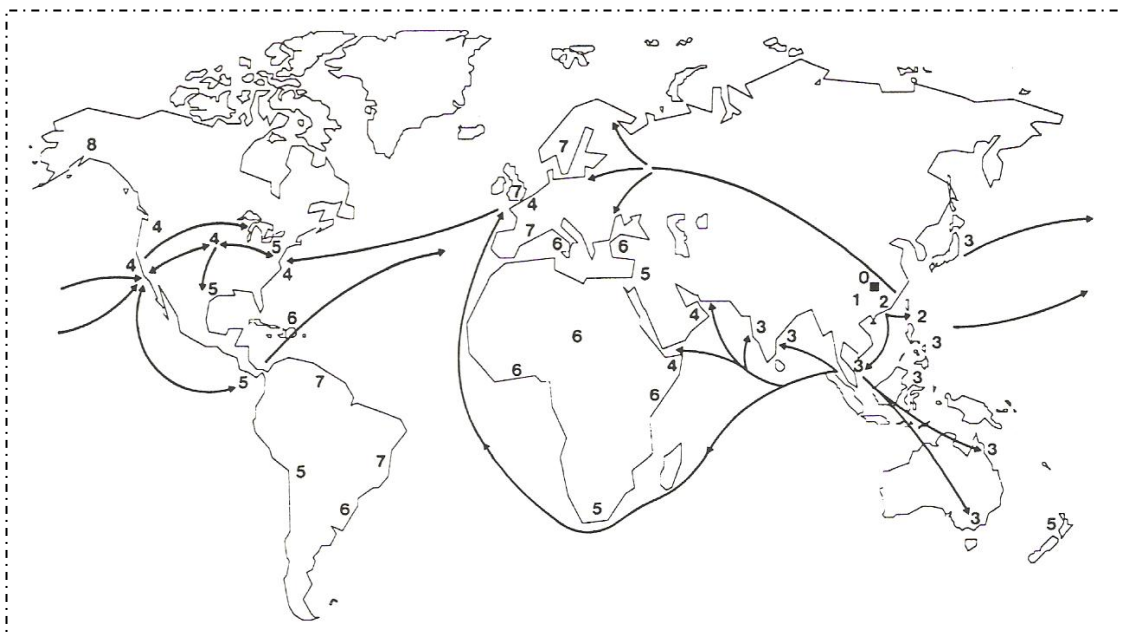
Μελέτες τμημάτων RNA, που πραγματοποιήθηκαν σε διατηρημένο πνευμονικό ιστό θυμάτων της Ισπανικής Γρίπης, καθώς και ορολογικός έλεγχος αντισωμάτων ατόμων που ζούσαν κατά την διάρκεια της πανδημίας, έδειξε ότι η νόσος προκλήθηκε από ιό της γρίπης τύπου A, υποτύπου H1N1. Ο ιός αυτός ήταν ένας ιός των πτηνών με μεταλλαγές δέκα αμινοξέων, οι οποίες οδήγησαν στο σχηματισμό ενός θανάσιμου γονιδίου, που επέτρεψε την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος και τον πολλαπλασιασμό του σε αυτά (187, 188, 206). Χωρίς αυτό το γονίδιο ο ιός έχασε την εξαιρετική λοιμογονικότητά του (5).



**Εικόνα 18.** Πλήθος θυμάτων της γρίπης συνωστίζονται σε νοσοκομεία επειγόντων περιστατικών κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 1918.

Κατά τα έτη 1932-1933 και 1947-1948 εμφανίστηκαν επιδημίες με παγκόσμια εξάπλωση, αλλά τα στελέχη που τις προκάλεσαν είχαν σχέση μεταξύ τους καθώς και με αυτό της πανδημίας του 1918-1920. Άρα, δεν πληρούνται οι δύο απαραίτητες προϋποθέσεις για να χαρακτηριστούν πανδημία (116).

Η επόμενη πανδημία αρχίζει από την Κίνα το Φεβρουάριο του 1957 (136,184), γι' αυτό ονομάζεται και «Ασιατική Γρίπη». Εξαπλώθηκε παντού μέσα σε περίπου 6 μήνες (49), προσβάλλοντας το 40-50% του πληθυσμού και προκαλώντας πάνω από ένα εκατομμύριο θανάτους, κυρίως πολύ νέων και πολύ ηλικιωμένων ατόμων (43). Υπεύθυνος γι' αυτή ήταν ιός της γρίπης τύπου Α, υποτύπου Η2Ν2.



**Εικόνα 19.** Η διαδρομή του ιού κατά τη διάρκεια της πανδημίας του 1957.

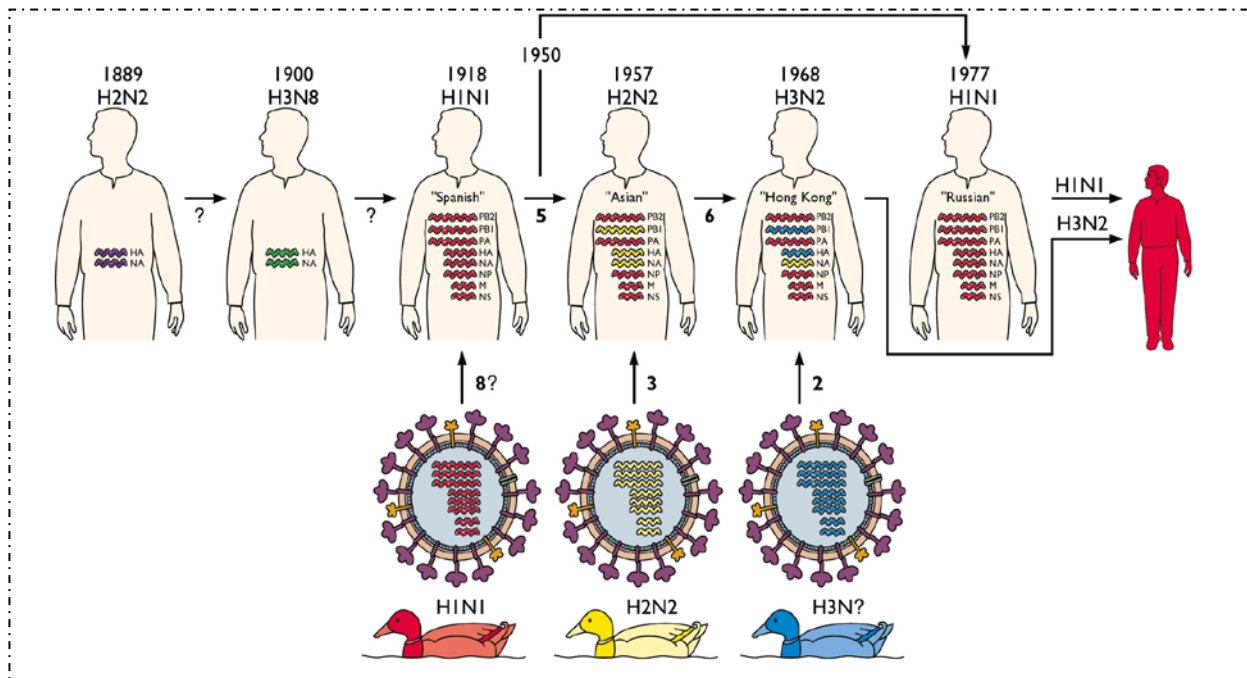
Το 1968 παρουσιάστηκε πανδημία όμοια με αυτή του 1957, που οφειλόταν στον υπότυπο Η3Ν2, και προκάλεσε 34.000 θανάτους στις Η.Π.Α. , ενώ το 1976 η πανδημία που ξέσπασε προκλήθηκε από ένα στέλεχος που είχε εξαφανιστεί το 1947. Έτσι περιορίστηκε στις νεαρές ηλικίες, καθώς πολλά άτομα γεννημένα πριν το 1947 είχαν ανοσία απέναντι στον ιό. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι το 1976 η εμφάνιση ενός ιού που προκαλούσε πανδημία συνοδευόταν από εξαφάνιση του υποτύπου που κυκλοφορούσε πριν και προκαλούσε λοίμωξη στον άνθρωπο, γεγονός που έπαψε να υφίσταται από τότε και μέχρι σήμερα (116,179).

Στον 21<sup>ο</sup> αιώνα, μεγάλη αναστάτωση προκάλεσε η εξάπλωση του στελέχους H5N1, που προκάλεσε την αναφερόμενη «Γρίπη των Πτηνών». Το στέλεχος αυτό μέχρι το 1997 κυκλοφορούσε μόνο ανάμεσα στα πτηνά, όμως πιθανότατα μετά από ανασυνδυασμό των γονιδίων του με γονίδια ανθρώπων της γρίπης, ανιχνεύτηκαν στελέχη A/H5N1 σε ανθρώπους στο Hong Kong το Μάρτιο του 1997, ταυτοχρόνως με μια εκτεταμένη επιδημία γρίπης των πουλερικών από τον ιό A/H5N1 σε πουλερικά της περιοχής **(81, 125, 212)**.

Επιδημίες γρίπης από τον ιό των πτηνών σε πουλερικά επανεμφανίστηκαν την περίοδο 2003-2004 **(170)** σε αρκετές Ασιατικές χώρες (Καμπότζη, Κίνα, Ινδονησία, Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊλάνδη και Βιετνάμ) **(114)**. Δυστυχώς παρόμοια περιστατικά αναφέρθηκαν και σε ανθρώπους. Έτσι, ο ιός προκάλεσε, από το 2003 έως το 2009, 421 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα με 257 θανάτους **(245)**. Ιδιαίτερη έξαρση των κρουσμάτων παρατηρήθηκε το 2006. Υπήρξε έντονη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα από το γεγονός πως η νόσος εμφανίζεται σε νέα άτομα και έχει εξαιρετικώς υψηλή θνητότητα. Στα περισσότερα από τα περιστατικά αυτά είχε προηγηθεί άμεση επαφή με πουλερικά, ορισμένα εκ των οποίων θεωρούνται «σιωπηλοί φορείς» του ιού, δηλαδή μεταδίδουν τον ιό χωρίς να νοσούν ευθέως, ενώ τελευταίως έχει αναφερθεί και μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο **(166, 220)**. Για τον περιορισμό της μετάδοσης στους ανθρώπους πραγματοποιήθηκε σφαγιασμός των πουλερικών σε αυτές τις περιοχές.

Τέλος από τον Απρίλιο του 2009 ένα νέο στέλεχος του υποτύπου H1N1 (A/California/09/2009 (H1N1) like) απείλησε την παγκόσμια υγεία προκαλώντας μια νέα πανδημία **(25)**.

Πίνακας 3.		Οι Σημαντικότερες Πανδημίες του 20 <sup>ου</sup> αιώνα	
Πανδημία	Έτος	Αντιγονικός υπότυπος	Θάνατοι Παγκοσμίως
Ισπανική Γρίπη	1918-1919	A/H1N1	40-50 εκατομμύρια PSI=5
Ασιατική Γρίπη	1957-1958	A/H2N2	~2 εκατομμύρια PSI=2
Γρίπη του Χονγκ Κονγκ	1968-1969	A/H3N2	>1 εκατομμύριο PSI=2
Γρίπη των Χοίρων	2009-2010	Πανδημικός A/H1N1	>18.000



Εικόνα 20. Εξέλιξη των ιών της γρίπης.

## 5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ

Μελέτες της οικολογίας των ιών της γρίπης έδειξαν ότι οι 16 υποτύποι της HA και οι 9 της NA έχουν απομονωθεί από πάπιες και άλλα υδρόβια πτηνά. Αυτή η παρατήρηση, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα υδρόβια πτηνά είναι «δεξαμενές» των ιών της γρίπης **(236)**, από τις οποίες προκύπτουν νέα πανδημικά στελέχη και από τις οποίες μολύνονται και άλλα είδη.

Τα πτηνά δεν εμφανίζουν νόσο, αλλά αποβάλλουν τον ιό σε μεγάλες συγκεντρώσεις από τα κόπρανα, μολύνοντας τα νερά των λιμνών. Με αυτό τον τρόπο διάφορα αποδημητικά πτηνά, όπως οι αγριόπαπιες, μεταφέρουν τον ιό σε άλλες γεωγραφικές περιοχές κατά τη μετανάστευσή τους. Η μη εμφάνιση νόσου στα πτηνά είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής του ιού σ' αυτούς τους ξενιστές κατά τη διάρκεια πολλών αιώνων. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάποια μέλη των υποτύπων H5 και H7 μπορεί να προκαλέσουν θανατηφόρο συστηματική λοίμωξη στα πτηνά, εξαιτίας της ικανότητάς τους να διαιρούν την HA στις υπομονάδες της σε πολλούς ιστούς **(236)**.

Φυλογενετική ανάλυση των αλλαγών στα αμινοξέα δείχνει ότι οι ιοί της γρίπης A των πτηνών, σε αντίθεση με αυτούς των θηλαστικών, έχουν χαμηλούς ρυθμούς εξέλιξης. Στην πραγματικότητα φαίνεται ότι στους ιούς των υδρόβιων πτηνών υπάρχει εξελικτική στασιμότητα τα τελευταία 70 χρόνια. Νουκλεοτιδικές αλλαγές συνεχίζουν να συμβαίνουν, αλλά δεν οδηγούν πλέον σε μεταβολές στα αμινοξέα. Το υψηλό αυτό επίπεδο συντήρησης στους ιούς των πτηνών δείχνει ότι οι ιοί αυτοί, στις φυσικές τους δεξαμενές, φτάνουν ή έχουν φτάσει στο βέλτιστο της προσαρμοστικότητάς τους, όπου περαιτέρω γενετικές μεταβολές δεν οδηγούν πλέον σε επιλεκτικό πλεονέκτημα **(78, 236)**.

Μελέτες της οικολογίας υποστηρίζουν επίσης ότι όλοι οι ιοί της γρίπης των θηλαστικών προήλθαν από τις δεξαμενές της γρίπης των πτηνών **(204)**. Αυτή η θεωρία στηρίζεται σε φυλογενετικές αναλύσεις της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων των ιών της γρίπης A, όλων των υποτύπων, που

απομονώθηκαν από μια ποικιλία ξενιστών σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

Φυλογενετικές αναλύσεις του NP γονιδίου, δείχνουν ότι οι ιοί της γρίπης των πτηνών έχουν εξελιχθεί σε πέντε «καταγωγές», οι οποίες είναι ειδικές του ξενιστή: ο παλιός του ίππου, ο νέος του ίππου, του γλάρου, του χοίρου και του ανθρώπου. Ο ιός του χοίρου και ο ιός του ανθρώπου έχουν γενετική σχέση αδελφικού τύπου, γεγονός που δείχνει ότι εξελίχθηκαν από μια κοινή προέλευση, η οποία φαίνεται να ήταν ένας άθικτος ιός των πτηνών, που ενδημεί στην Ευρώπη, και πήρε όλα τα γονιδιά του από τους ιούς των πτηνών. Είναι σημαντική η παρατήρηση ότι οι χοίροι έρχονται σε επαφή με μεγάλη ποικιλία πτηνών και μπορούν να μολυνθούν από τα κόπρανά τους. Επιπλέον οι χοίροι μολύνονται και με ιούς γρίπης άλλων χοίρων και ανθρώπων. Αυτό το γεγονός, παρέχει άριστες συνθήκες για γενετικό ανασυνδυασμό και δημιουργία νέων στελεχών του ιού.

Τέλος τα πουλερικά, ιδιαίτερος τα κοτόπουλα και οι χήνες, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην οικολογία των ιών της γρίπης. Είναι ευάλωτα στη μόλυνση από μια ποικιλία υποτύπων του ιού, από τα υδρόβια αποδημικά πτηνά. Η κυκλοφορία των ιών στα πτηνά, ιδιαίτερα χωρίς να προκαλεί αξιοσημείωτη νόσο, οδηγεί σε προσαρμογή στα καινούρια είδη. Η διαδικασία της προσαρμογής των ιών της γρίπης, υποτύπων H5 και H7, στα πουλερικά συχνά οδηγεί σε μεταλλαγές στη θέση όπου δρουν οι πρωτεάσες για να διαιρέσουν την HA στις υπομονάδες της και έχει ως αποτέλεσμα, όπως αναφέρθηκε, θανατηφόρο νόσο σε αρκετά είδη πτηνών. Η στενή σχέση των οικόσιτων πουλερικών με τους ανθρώπους, σε φάρμες της Νοτιοανατολικής Ασίας, οδήγησε σε μετάδοση αυτών των υψηλής παθογενετικότητας στελεχών των ιών της γρίπης από τα πτηνά στους ανθρώπους, προκαλώντας θανατηφόρο νόσο σε υγιή παιδιά και ενήλικες. Υπήρξε μάλιστα η ανησυχία ότι οι ιοί της γρίπης των πτηνών θα μεταλλάσσονταν σε στελέχη ικανά να μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο, με αποτέλεσμα μια θανατηφόρο πανδημία γρίπης (βλέπε και κεφ.4 Ιστορική Αναδρομή).

## 6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο ιός της γρίπης μεταδίδεται, κατά κύριο λόγο, από άνθρωπο σε άνθρωπο, με τα σταγονίδια της αναπνευστικής οδού, μέσω του βήχα και του πταρμού, κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης, πρώτες 3-5 ημέρες της νόσου **(2)**. Υψηλό ποσοστό των σταγονιδίων αυτών έχει διάμετρο μικρότερη των 2μm, με αποτέλεσμα να επικάθονται κατά προτίμηση στους κατώτερους αεραγωγούς του αναπνευστικού συστήματος. Είναι επίσης πιθανή η μετάδοση με άμεση επαφή ή έμμεση επαφή με εκκρίσεις του αναπνευστικού.

Δεν υπάρχει ένδειξη χρόνιας ή λανθάνουσας λοίμωξης με τον ανθρώπινο ιό. Οι απομονωμένες κοινωνίες μολύνονται με την εισαγωγή του ιού από ένα μολυσμένο άτομο και συχνά εξελίσσονται σε μια εντοπισμένη επιδημία. Οι επόμενες επιδημίες στις κοινωνίες αυτές ξεκινούν με την επανεισαγωγή του ιού. Στις μεγάλες πόλεις ο ιός της γρίπης ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια όλων των μηνών του έτους, αν και οι μεταγενέστερες επιδημίες προέρχονται πιθανώς από εξωγενή εισαγωγή του ιού **(197)**.

Οι κύριοι υπεύθυνοι για τη μετάδοση του ιού στην κοινότητα είναι τα παιδιά προσχολικής ή σχολικής ηλικίας (παρουσιάζουν τον υψηλότερο δείκτη προσβολής κατά τη διάρκεια της περιόδου της γρίπης, σύμφωνα με το CDC), ενώ οι πιο ευπαθείς ομάδες απέναντι στον ιό είναι οι ηλικιωμένοι άνω των 65 ετών και τα παιδιά κάτω των 5 ετών και κυρίως κάτω του 1 έτους (> από το 90% των θανάτων αφορά άτομα άνω των 65 ετών, σύμφωνα με το CDC) **(2)**.

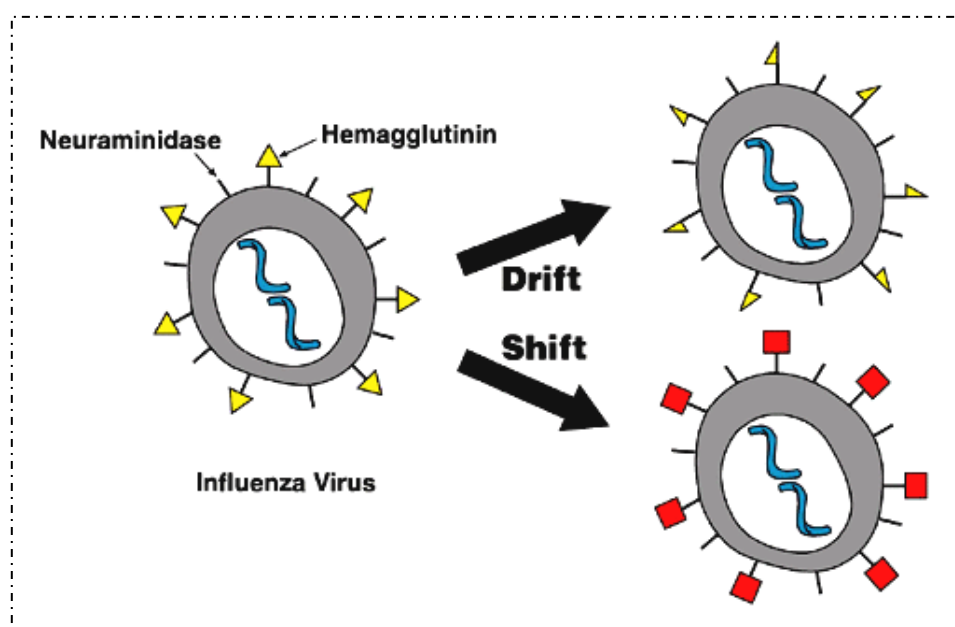
Σε παγκόσμια κλίμακα, οι ιοί της γρίπης απομονώνονται από τους ανθρώπους κατά τη διάρκεια όλων των μηνών του έτους κάπου στον κόσμο **(68)**. Η εποχικότητα, όσον αφορά τη δραστηριότητα της γρίπης, έχει τεκμηριωθεί σε πολλές χώρες με εύκρατο κλίμα (Ευρώπη, Βόρεια Αμερική, Ασία). Στις χώρες αυτές οι επιδημίες της γρίπης συμβαίνουν συνήθως από Ιανουάριο μέχρι Απρίλιο, με σποραδικές επιδημίες το Δεκέμβριο ή το Μάιο. Στην Ελλάδα οι επιδημίες συμβαίνουν μεταξύ Οκτωβρίου και Απριλίου, με μεγαλύτερη έξαρση από Δεκέμβριο μέχρι Φεβρουάριο. Μια βιολογική



ιδιότητα του ιού, που θα μπορούσε να εξηγήσει την εποχιακή κατανομή του ιού, είναι η ικανότητα της γρίπης τύπου Α να επιβιώνει σε σταγονίδια κάτω από συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας, που επικρατούν στους κλειστούς χώρους κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών.

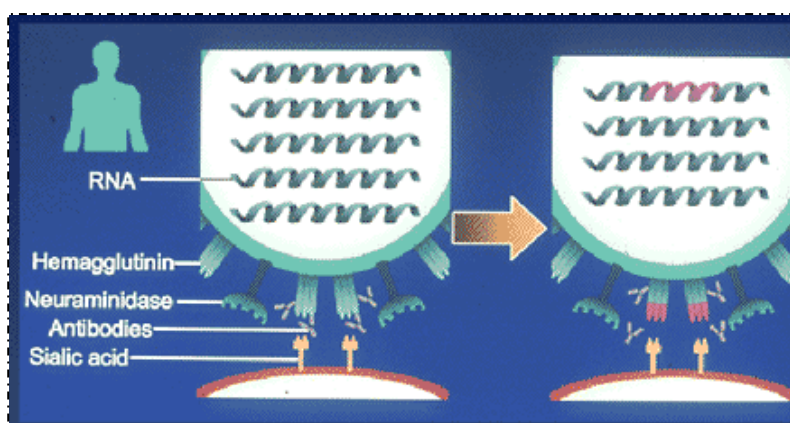
Στα τροπικά και υποτροπικά κλίματα η εποχικότητα της γρίπης είναι λιγότερο μελετημένη, παρόλα αυτά έχει βρεθεί ότι ιοί της γρίπης μπορούν να απομονωθούν κατά τη διάρκεια όλου του έτους και εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητά τους καλοκαιρινούς μήνες. Κάποιες άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η μέγιστη δραστηριότητα των ιών της γρίπης στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές ακολουθεί τις εναλλαγές του καιρού, όπως η έναρξη της περιόδου των βροχών. Οι περιβαλλοντολογικοί και επιδημιολογικοί παράγοντες όμως που είναι υπεύθυνοι γι' αυτές τις παρατηρήσεις χρειάζονται περαιτέρω μελέτη (2).

Η επιδημιολογική επιτυχία των ιών της γρίπης οφείλεται σε δύο τύπους αντιγονικής μεταβολής που μπορούν να συμβούν στην ΗΑ και την ΝΑ, την αντιγονική εκτροπή και την αντιγονική μετατροπή.



**Εικόνα 21.** Σύγκριση αντιγονικής εκτροπής και αντιγονικής μετατροπής.

Το πρώτο είδος αντιγονικής μεταβολής ονομάζεται «αντιγονική εκτροπή» (antigenic drift) , εμφανίζεται τόσο στους ιούς της γρίπης τύπου Α (στους υποτύπους Η1, Η2 και Η3), όσο και στους ιούς τύπου Β και συνίσταται σε προοδευτική αλλαγή της δομής της ΗΑ ή της ΝΑ. Η αλλαγή αυτή προκύπτει εξαιτίας αντικατάστασης αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα (σημειακή μεταλλαγή). Ο ιός εξακολουθεί να χαρακτηρίζεται π.χ. Η1Ν1, αλλά προκύπτουν διαφορετικά στελέχη του, που συχνά παίρνουν το όνομα της περιοχής όπου απομονώθηκαν πρώτη φορά. Αυτές οι μεταλλαγές στην αλληλουχία των αμινοξέων προκύπτουν με ρυθμό μικρότερο από 1% κάθε χρόνο (40).



**Εικόνα 22.** Αντιγονική Εκτροπή: μια μικρή αλλαγή στο γονιδίωμα του ιού.

Το πρακτικό αποτέλεσμα της αντιγονικής εκτροπής είναι ότι η λοίμωξη από ένα στέλεχος μπορεί να επάγει διασταυρούμενως-αντιδρώντα αντισώματα και μερική ανοσία σε λοίμωξη από άλλους ιούς του ίδιου υποτύπου. Ο βαθμός της διασταυρούμενης ανοσίας συνδέεται ευθέως με το βαθμό της διασταυρούμενης αντίδρασης των αντισωμάτων. Με αυτόν τον τρόπο οι ιοί μπορούν να μεταβάλλονται από έτος σε έτος, δίνοντας γένεση σε νέα στελέχη ικανά να προκαλέσουν νέες επιδημίες στα μεσοδιαστήματα των πανδημιών (180).

Μεγάλες επιδημίες συμβαίνουν συνήθως κάθε 2-5 χρόνια, προσβάλλουν το 5-30% του πληθυσμού, προκαλώντας μια σημαντική αύξηση

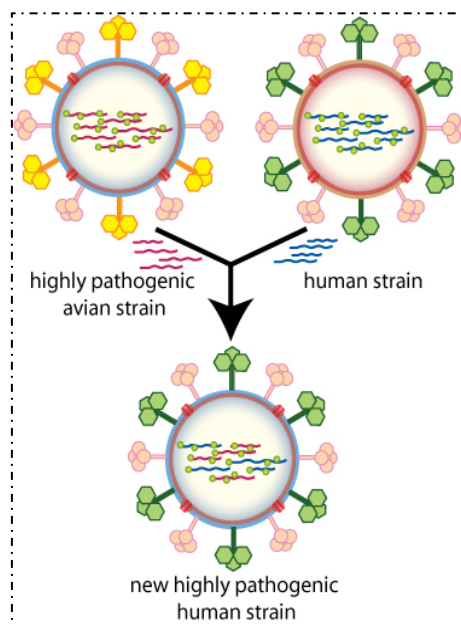
της νοσηρότητας και των θανάτων, κυρίως στις ακραίες ηλικίες. Παράλληλα έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην παραγωγικότητα και την ανάπτυξη της κοινωνίας.

Η πλέον αποδεκτή θεωρία για το μηχανισμό της αντιγονικής εκτροπής δέχεται ότι οι ιικές μεταβολές που συμβαίνουν φυσιολογικά με μεταλλαγές, υπόκεινται σε επιλεκτική διαδικασία υπό την πίεση των αντισωμάτων (κυρίως της τάξης IgA στους βλεννογόνους) που υπάρχουν σε έναν άνοσο ή μερικώς άνοσο πληθυσμό (23, 177). Εφόσον αυτοί οι νέοι ιοί δεν εξουδετερώνονται εντελώς από τα αντισώματα των προϋπαρχόντων στελεχών, είναι ικανοί να προκαλέσουν καινούριες επιδημίες. Οι επιδημίες αυτές όμως, δεν μπορούν να είναι τόσο σοβαρές, αφού τα διασταυρούμενως-αντιδρώντα αντισώματα, από προϋπάρχοντα στελέχη, καθιστούν τον πληθυσμό μερικώς άνοσο στα νέα.

Μόνο οι τύπου A ιοί της γρίπης έχουν την ικανότητα του δεύτερου και πιο δραματικού τύπου αντιγονικής μεταβολής, που ονομάζεται «αντιγονική μετατροπή» (antigenic shift). Αντιγονική μετατροπή είναι η εμφάνιση, στον ανθρώπινο πληθυσμό, ενός νέου υποτύπου των ιών της γρίπης τύπου A, με τελειώς διαφορετική αιμοσυγκολλητίνη ή αιμοσυγκολλητίνη και νευραμινιδάση, ανοσολογικά διακριτές από αυτές που είχαν απομονωθεί και κυκλοφορούσαν προηγουμένως. Όταν συμβαίνει αντιγονική μετατροπή υπολογίζεται ότι η αλληλουχία των αμινοξέων της αιμοσυγκολλητίνης του νέου στελέχους θα διαφέρει 20-50% από την αντίστοιχη πρωτεΐνη των κυκλοφορούντων στελεχών (39, 40).

Καθώς η αιμοσυγκολλητίνη και η νευραμινιδάση συνιστούν τα κύρια αντιγόνα του ιού της γρίπης, οι νέοι υπότυποι που δημιουργούνται με την αντιγονική μετατροπή δεν μπορούν να εξουδετερωθούν από τα αντισώματα που έχουν επαχθεί από τον προϋπάρχοντα υπότυπο, με αποτέλεσμα την αποτυχία προστασίας του πληθυσμού και την εμφάνιση πανδημίας. Κατά την εξέλιξη της πανδημίας όμως, και αφού ο καινούριος υπότυπος εξαπλώνεται γρήγορα σε πολλές χώρες προσβάλλοντας μεγάλο αριθμό ανθρώπων, αρχίζει να εγκαθίσταται ανοσία προς το νέο υπότυπο, με αποτέλεσμα τον περιορισμό

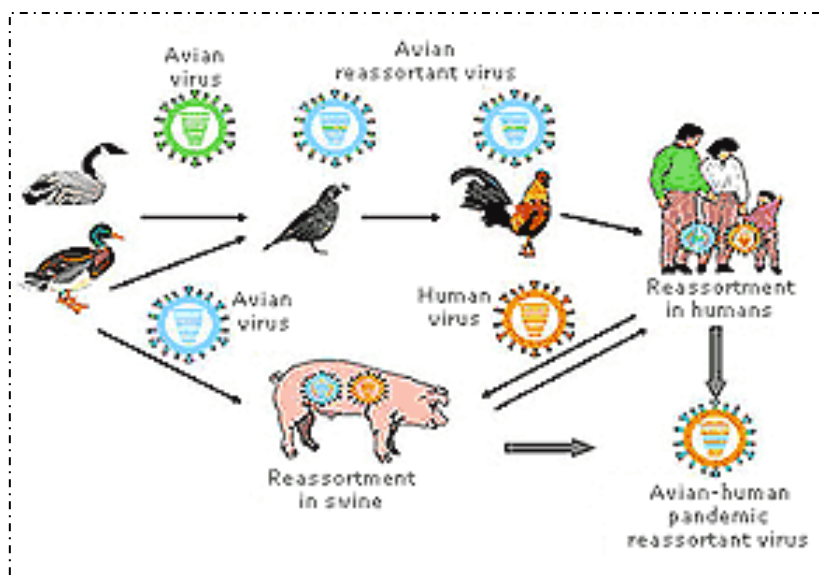
των κρουσμάτων και την υποχώρηση της πανδημίας. Με βάση τα ιστορικά δεδομένα χρειάζονται 10-40 χρόνια για να εμφανιστεί ένας νέος υπότυπος, ο οποίος εξαιτίας μιας νέας αντιγονικής μεταβολής δεν θα εξουδετερώνεται από τα αντισώματα και θα είναι ικανός να ξεκινήσει ένα νέο κύκλο πανδημίας (180).



**Εικόνα 23.** Αντιγονική μετατροπή: ανασυνδυασμός του γονιδιώματος δύο ιών.

Παρά τη μεγάλη σημασία των αντιγονικών μετατροπών στη δημιουργία πανδημικών στελεχών ο μηχανισμός τους δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η πιο αποδεκτή θεωρία υποστηρίζει ότι τα πανδημικά στελέχη οφείλονται σε γενετικό ανασυνδυασμό. Δεδομένου ότι το γενετικό υλικό του ιού έχει τη μορφή 8 τμημάτων RNA, ανασυνδυασμός μπορεί να προκύψει από διπλή μόλυνση στο ίδιο κύτταρο. Καθώς όμως, με εξαίρεση το 1976, η εμφάνιση ενός υποτύπου συνοδεύεται από εξαφάνιση του προηγούμενου, θα φαινόταν απίθανο η διπλή μόλυνση να αφορά δύο ανθρώπινους ιούς. Πιο πιθανό ενδεχόμενο είναι η διπλή μόλυνση να οφείλεται σ' έναν ανθρώπινο και έναν μη-ανθρώπινο ιό, συχνότερα έναν ιό των πτηνών, οι οποίοι συνυπάρχουν σε ένα είδος που μπορεί να υποστηρίξει την αναπαραγωγή και των δύο, όπως είναι οι χοίροι (βλέπε οικολογία). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να παραχθεί ένας ανασυνδυασμένος ιός με επιφανειακό αντιγόνο από τον

μη-ανθρώπινο ιό και μολυσματικότητα από τον ανθρώπινο ιό. Οι ιοί της γρίπης τύπου Β, δεν προσβάλλουν ζώα και γι' αυτό πιθανότατα δεν υφίστανται αντιγονικές μετατροπές (180).



**Εικόνα 24.** Γένεση νέου πανδημικού ιού.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που τα αντιγόνα ΗΑ των διαφόρων υποτύπων της γρίπης Α δεν δίνουν καμία διασταυρούμενη αντίδραση κατά τη δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης, έχουν βρεθεί κάποιες εκφράσεις συγγένειας σε ένα φαινόμενο γνωστό ως «πρωταρχική αντιγονική αμαρτία» (70). Αυτός ο όρος, περιγράφει την παρατήρηση ότι η λοίμωξη με έναν ιό της γρίπης επάγει αντισώματα για το συγκεκριμένο ιό, αλλά, επίσης, ανακαλεί τα αντισώματα και για τους άλλους υποτύπους που έχουν προσβάλλει το άτομο στο παρελθόν, με επακόλουθη αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων αυτών. Το γεγονός αυτό οφείλεται προφανώς στη διέγερση, από το νέο υπότυπο, των Β κυττάρων που διατηρούνται μετά τη λοίμωξη. Έτσι φαίνεται να υπάρχει συγγένεια μεταξύ των ΗΑ αντιγόνων διαφόρων υποτύπων, η οποία όμως δεν μπορεί να ανιχνευθεί από την αναστολή αιμοσυγκόλλησης και τις άλλες ορολογικές δοκιμασίες.

## 7. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Η γρίπη έχει περιγραφεί ως μια αμετάβλητη νόσος που προκαλείται από έναν ιό που συνεχώς μεταβάλλεται. Η ιστορία όμως δείχνει ότι η κλινική της εικόνα ποικίλει σε βαρύτητα κατά περιόδους. Μελέτες των ιών της γρίπης έχουν δείξει ότι η λοιμογόνος δύναμη του ιού σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως την ικανότητα διαχωρισμού της HA σε HA1 και HA2 **(208)**, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της HA και της NA, την αντίσταση στους αναστολείς της NA, την ανεξάρτητη δομή της NA, το ρόλο της PB2 πρωτεΐνης και την παραγόμενη από τον ξενιστή ιντερφερόνη. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να δρουν είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό, όμως η πλήρης εξήγηση για τη διαφορά στη λοιμογόνο δύναμη μεταξύ των στελεχών παραμένει άγνωστη.

Δεν υπάρχει κοινώς αποδεκτή εξήγηση για την παθογένεια της ανθρώπινης γρίπης και οι αιτίες για κάποια χαρακτηριστικά της νόσου παραμένουν άγνωστες. Ιστολογικές και ιολογικές μελέτες, όμως, έχουν σκιαγραφήσει τις επιπτώσεις της λοίμωξης από τον ιό **(254)**.

Η μετάδοση του ιού της γρίπης γίνεται με τη μεταφορά αναπνευστικών εκκρίσεων, συνήθως με τη μορφή μικροσταγονιδίων, που περιέχουν τον ιό από ένα άτομο που έχει μολυνθεί σε ένα άλλο. Πολλά ιικά σωματίδια καταστρέφονται από τους μη ειδικούς ανοσολογικούς φραγμούς, όπως η βλέννη της αναπνευστικής οδού, στην οποία μπορούν να παγιδευτούν ή να εξουδετερωθούν από τους φυσικούς αναστολείς των βλεννωδών εκκρίσεων, οι οποίοι περιέχουν σιαλικό οξύ. Κάποιοι άλλα, όμως, διαφεύγουν των αναστολέων αυτών και απελευθερώνονται από τη βλέννη με τη βοήθεια της νευραμινιδάσης **(180)**.

Μετά την είσοδό του στο αναπνευστικό σύστημα, ο ιός προσκολλάται με τη βοήθεια της αιμοσυγκολλητίνης σε ειδικούς υποδοχείς και διεισδύει στα επιθηλιακά κύτταρα όπου και πολλαπλασιάζεται, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης και απόπτωσης **(20)**. Πριν όμως επέλθει ο

κυτταρικός θάνατος, προηγείται η απελευθέρωση αντιγράφων του ιού από το μολυσμένο κύτταρο και η επακόλουθη μόλυνση γειτονικών κυττάρων. Εκτός από τα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου, ο ιός της γρίπης προσβάλλει ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα και η προσβολή αυτή συνδέεται με την παθογένεια των φαινομένων της φλεγμονής που συνοδεύουν τη λοίμωξη από τη γρίπη **(9,180, 218)**.

Ο ιός ανιχνεύεται στο αναπνευστικό σύστημα περίπου 24 ώρες πριν την εκδήλωση της νόσου, το φορτίο του αυξάνεται γρήγορα και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα για 24 - 48 ώρες και στη συνέχεια υποχωρεί σημαντικά, ώστε να μην είναι ανιχνεύσιμο μετά από 5 - 10 ημέρες. Σε πειραματικά μοντέλα έχει διαπιστωθεί ότι η βαρύτητα της νόσου σχετίζεται με την ποσότητα του ιού που αποβάλλεται. Επομένως, αίτιο των συμπτωμάτων είναι ο κυτταρικός θάνατος, λόγω πολλαπλασιασμού του ιού, ο οποίος περιορίζεται στο αναπνευστικό σύστημα **(218)**.

Ωστόσο, οι κύριες εκδηλώσεις της λοίμωξης από το ιό της γρίπης είναι τα συστηματικά συμπτώματα. Η εμφάνιση πυρετού και συστηματικών συμπτωμάτων οδήγησε στην υπόθεση συστηματικής διάδοσης του ιού μέσω αιματογενούς διασποράς, κάτι που δεν μπόρεσε όμως να αποδειχθεί αφού ιαίμια ανιχνεύεται σπανίως. Επίσης ενώ ο ιός φαίνεται να έχει ισχυρές πυρετογόνες ιδιότητες όταν ενοφθαλμίζεται ενδοφλεβίως σε ζώα, το ικό φορτίο που χρειάζεται για να προκαλέσει άνοδο της θερμοκρασίας είναι αφύσικα υψηλό. Διατυπώθηκε λοιπόν η υπόθεση ότι η διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση πυρετογόνων **(183)**, ενώ τα υπόλοιπα συστηματικά συμπτώματα πιθανώς αποτελούν συνέπεια της απελευθέρωσης κυτταροκινών από τα μολυσμένα κύτταρα **(218)**.

Ιστολογικές μελέτες **(95)** έχουν δείξει ότι η κύρια θέση αναπαραγωγής του ιού, τα κροσσωτά, κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα της αναπνευστικής οδού, μετά τη μόλυνση, καθίστανται προσδευτικά αποστρογγυλεμένα και εξοιδημένα, ο πυρήνας τους συρρικνώνεται, γίνεται πυκνοχρωματικός και τελικά εκφυλίζεται, το κυτταρόπλασμά τους γίνεται κενοτοπιώδες και

παρατηρείται απώλεια των κροσσών. Το τελικό στάδιο είναι η νέκρωση και απόπτωση των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου. Σε άλλες περιοχές το φυσιολογικό επιθήλιο αντικαθίσταται από επίπεδο μεταπλαστικό. Η αναγέννηση των αναπνευστικών επιθηλιακών κυττάρων χρειάζεται 3 με 4 εβδομάδες, κατά τη διάρκεια των οποίων μπορεί να επιμείνουν ανωμαλίες της πνευμονικής λειτουργίας.

Παθολογοανατομικές μελέτες (95) πνευμόνων ασθενών που πέθαναν από πρωτογενή ιογενή πνευμονία έδειξαν ότι το τοίχωμα των κυψελίδων καλύπτεται από υαλοειδή μεμβράνη και συνδυάζεται με εκτεταμένο ενδοκυψελιδικό οίδημα και αιμορραγία. Έχουν επίσης παρατηρηθεί αλλοιώσεις ενδεικτικές τραχειίτιδας και βρογχίτιδας.

Η εξέλιξη των μεταβολών στα επιθηλιακά αναπνευστικά κύτταρα δείχνει ότι η έναρξή τους γίνεται από το τραχειοβρογχικό επιθήλιο με κατιούσα πορεία. Έτσι οι πρώιμες βλάβες στο βλεννογόνο της τραχείας και των βρόγχων περιγράφονται ως μη επιλεγμένη γρίπη και εκδηλώνονται κλινικά ως βρογχίτιδα και τραχειίτιδα. Οι ιστοί εμφανίζουν αυξημένη διαπερατότητα στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων, οίδημα, διήθηση πολυμορφοπύρηνων και φαγοκυττάρωση των εκφυλισμένων επιθηλιακών κυττάρων. Η βασική μεμβράνη όμως στην περίπτωση αυτή παραμένει ανέπαφη (19, 241).

Ο βλεννογόνος του αναπνευστικού συστήματος αποτελεί όχι μόνο την πύλη εισόδου του ιού της γρίπης, αλλά ταυτόχρονα και το σημείο στο οποίο η λοίμωξη καταπολεμάται με τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (241).

Μετά την αρχική έκθεση στον ιό, η ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης (κυτταρικής και χυμικής) οδηγεί στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων και κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων τα οποία αδρανοποιούν και εξαλείφουν τον ιό, με αποτέλεσμα την ανάρρωση από τη γρίπη. Η πλήρης δραστηριοποίηση της επίκτητης ανοσίας όμως, απαιτεί 5 - 7 ημέρες, χρονικό διάστημα κατά το οποίο η μη ειδική φυσική ανοσία είναι εκείνη που περιορίζει τον πολλαπλασιασμό του ιού και την εξάπλωση της λοίμωξης (241).



## ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Οι μηχανισμοί της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης τίθενται σε λειτουργία εντός ωρών από την εισβολή του ιού της γρίπης στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος. Οδηγούν στην παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού κυτταροκινών και χημειοκινών με στόχο την περιχαράκωση της λοίμωξης από τον ιό, αλλά η ανεξέλεγκτη δράση τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρή ιστική βλάβη (91, 115). Για περιγραφικούς λόγους η λειτουργία της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης διακρίνεται σε φάσεις οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται χρονικά (238) :

1. Αναστολή του ιού πριν την εισβολή του στα επιθηλιακά κύτταρα από διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο υγρό που επικαλύπτει τις κυψελίδες και στη βλέννα. Ορισμένες από αυτές, όπως οι mucins, gp-340, pentraxins, διαθέτουν δομή παρόμοια με εκείνη των υποδοχέων σιαλικού οξέος, με αποτέλεσμα να δεσμεύουν τον ιό και να παρεμποδίζουν την είσοδό του στα επιθηλιακά κύτταρα. Άλλες, όπως οι collectins, defensins και το συμπλήρωμα, έχουν αντι-ιική δράση ή ενεργοποιούν τη διαδικασία της φλεγμονής. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι προάγουν την απομάκρυνση του ιού από το σύστημα της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης.
2. Αναγνώριση του ιού από διαλυτούς και κυτταρικούς υποδοχείς οι οποίοι αναγνωρίζουν δομικά συστατικά των παθογόνων μικροοργανισμών μη ειδικά αλλά απαραίτητα για την επιβίωση και την εκδήλωση της παθογονικότητάς τους. Με τον τρόπο αυτό αντιλαμβάνονται την παρουσία ενός παθογόνου παράγοντα και σηματοδοτούν την ενεργοποίηση των κυττάρων της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης. Αυτοί οι υποδοχείς εκφράζονται από τη βλαστική σειρά του ξενιστή, σε αντίθεση με τους υποδοχείς της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, που προκύπτουν από αναδιοργάνωση των γονιδίων και είναι ειδικοί για κάθε παθογόνο, οδηγώντας στη δημιουργία ανοσολογικής μνήμης. Οι σπουδαιότεροι από αυτούς του υποδοχείς της βλαστικής σειράς είναι οι Toll-like receptors (TLRs) και το retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1), οι οποίοι είναι

ενδοκυττάριοι και αναγνωρίζουν το RNA του ιού της γρίπης μετά την είσοδό του στα επιθηλιακά κύτταρα (143), για παράδειγμα οι TLR-3 και TLR-7 υποδοχείς εμπλέκονται στην αναγνώριση του ιικού dsRNA και ssRNA, προωθώντας την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και την ενεργοποίηση της παραγωγής ιντερφερόνης (130).

3. Ενεργοποίηση των δραστικών κυττάρων της φυσικής ανοσολογικής απόκρισης. Τα κύτταρα αυτά περιλαμβάνουν:

- **Μακροφάγα:** τόσο τα κυψελιδικά μακροφάγα όσο και αυτά που προέρχονται από τα μονοκύτταρα του αίματος απελευθερώνουν ιντερφερόνες τύπου 1 (IFN-α και IFN-β), χημειοκίνες που επιστρατεύουν στο σημείο της λοίμωξης πολυμορφοπύρρηνα, μονοκύτταρα και NK κύτταρα και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (IL-1, IL-6, IL-12 και TNF-α), που προκαλούν πυρετό και ενεργοποιούν τα NK κύτταρα. Επιπροσθέτως, έχουν την ικανότητα της φαγοκυττάρωσης των μολυσμένων από τον ιό αποπτωτικών κυττάρων.
- **NK κύτταρα:** ανιχνεύονται στους πνεύμονες 48 ώρες μετά τη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης. Επιστρατεύονται και ενεργοποιούνται από τις κυτταροκίνες των μακροφάγων, οδηγώντας σε απόπτωση των μολυσμένων από τον ιό κυττάρων. Η κυτταροτοξική τους δράση αναστέλλεται από την παρουσία του MHC, ενός συμπλέγματος γλυκοπρωτεϊνών που βρίσκεται στην επιφάνεια όλων των κυττάρων του οργανισμού και χαρακτηρίζει το «ίδιον». Η είσοδος του ιού της γρίπης στα επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί μειονεκτική έκφραση του MHC στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα την αναγνώρισή τους ως «μη ίδια» και τη θανάτωσή τους από τα NK κύτταρα. Επιπλέον, τα κύτταρα αυτά παράγουν ιντερφερόνη-γ, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση των κυψελιδικών μακροφάγων.
- **Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα:** επιστρατεύονται στους πνεύμονες υπό την επίδραση των χημειοκινών και παίζουν

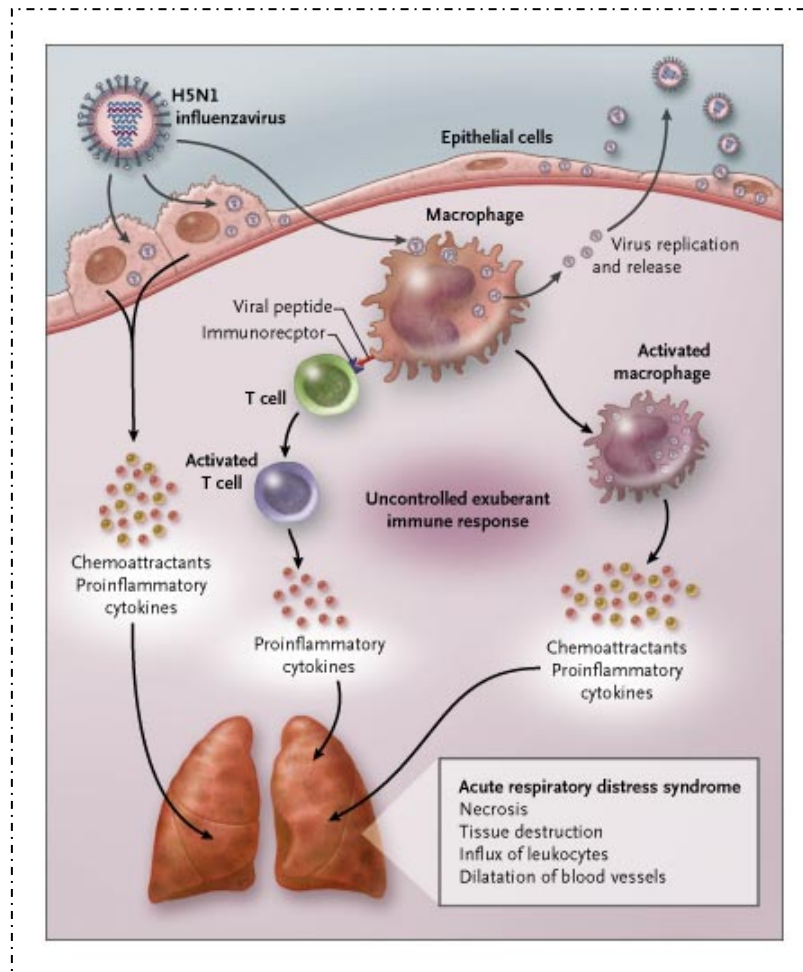
πρωτεύοντα ρόλο στην φλεγμονώδη απάντηση που παρατηρείται τις πρώτες ημέρες μετά τη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης. Ασκούν προστατευτική δράση μέσω της φαγοκυττάρωσης αποπτωτικών κυττάρων μολυσμένων από τον ιό, αλλά παράγουν τοξικές ρίζες οξυγόνου (ROS) που μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή ιστική βλάβη.

- **Δενδριτικά κύτταρα:** ανώριμα δενδριτικά κύτταρα βρίσκονται κατά μήκος των αεραγωγών όπου σχηματίζουν με τις απολήξεις τους ένα εκτεταμένο δίκτυο. Μετά την αναγνώριση ενός παθογόνου μικροοργανισμού από τους TLRs που περιέχουν, υπερπλάσσονται, ωριμάζουν και μεταναστεύουν στους επιχώριους λεμφαδένες, όπου λειτουργούν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs). Τα APCs αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ φυσικής και επίκτητης ανοσίας λόγω της ικανότητάς τους να επεξεργάζονται τα αντιγόνα των παθογόνων μικροοργανισμών και να τα συνδέουν με μόρια του MHC. Τα συμπλέγματα που προκύπτουν εκφράζονται στην επιφάνεια των APCs, όπου αναγνωρίζονται από υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων και οδηγούν στην ενεργοποίησή τους. Τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μόνο όταν αυτά είναι συνδεδεμένα με τα μόρια του MHC. Επιπλέον, τα δενδριτικά κύτταρα απελευθερώνουν ιντερφερόνες τύπου 1, ενεργοποιούν τα NK κύτταρα και λειτουργούν ως φαγοκύτταρα.
- **Επιθηλιακά κύτταρα του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος:** απελευθερώνουν ιντερφερόνες τύπου 1 και χημειοκίνες, όπως η IL-8, που προάγουν τη χημειοταξία των ουδετεροφίλων αλλά και πρωτεΐνες, όπως defensins και surfactant proteins, με αντι-ικη δράση. Επιπλέον, μετά τη νέκρωση ή την απόπτωσή τους, τα μολυσμένα από τον ιό επιθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες που προάγουν τη φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα. Τέλος, έχουν την ικανότητα έκφρασης μορίων MHC στην επιφάνειά τους, λειτουργώντας και ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα.

Οι ιντερφερόνες τύπου 1 που παράγονται από τα κυψελιδικά μακροφάγα, τα επιθηλιακά και τα δενδριτικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα κατά των ιών με διάφορους μηχανισμούς. Συνδέονται σε γειτονικά κύτταρα και προάγουν την παραγωγή ενδοκυττάρων πεπτιδίων που αναστέλλουν την παραγωγή ιικών πρωτεϊνών (231). Επιστρατεύουν κυψελιδικά μακροφάγα, NK κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα, επιταχύνουν την ωρίμανση των APCs και αυξάνουν την έκφραση των μορίων MHC στην επιφάνειά τους, με συνέπεια την αποτελεσματικότερη παρουσίαση του αντιγόνου στα κύτταρα της επίκτητης ανοσίας. Τέλος διεγείρουν απ' ευθείας τα B-λεμφοκύτταρα προς παραγωγή ειδικών αντισωμάτων (73,241).

Η φυσική ανοσολογική απόκριση παίζει σημαντικό ρόλο στην περιχαράκωση της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης, αλλά και στην πρόκληση σοβαρής ιστικής βλάβης μέσω της ανεξέλεγκτης παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και ROS. Αυτό έγινε ιδιαίτερα εμφανές κατά την πανδημική γρίπη, αφού καθώς δεν υπήρχε προηγούμενη έκθεση στον νέο υπότυπο του ιού και η επίκτητη ανοσία αργεί να ενεργοποιηθεί, η άμυνα του οργανισμού εξαρτήθηκε από τη φυσική ανοσία.

Μελέτες σε πειραματόζωα που μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένο στέλεχος του ιού της γρίπης του 1918, αλλά και μελέτες του H5N1 ιού της γρίπης των πτηνών, έδειξαν έντονο πολλαπλασιασμό του ιού και εκτεταμένη διήθηση των πνευμόνων από πολυμορφοπύρρηνα και μακροφάγα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ARDS με θανατηφόρο έκβαση κατά τα πρώτα εικοσιτετράωρα από την έναρξη της νόσου (148, 149). Η αυξημένη παθογονικότητα των ιών αυτών μπορεί να οφείλεται τόσο στην παρουσία ιδιαίτερα δραστικών πρωτεϊνών NS1 και PB1, οι οποίες αναστέλλουν τη φυσική ανοσολογική απόκριση σε διάφορα επίπεδα (αδρανοποίηση των ιντερφερονών τύπου 1, απόπτωση των μακροφάγων), όσο και στην επαγωγή μιας ισχυρής φλεγμονώδους αντίδρασης με παραγωγή πολύ υψηλών επιπέδων κυτταροκινών (cytokine storm) (8, 73).



Εικόνα 25. Ο καταρράκτης των κυτταροκινών.

### ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Οι μηχανισμοί της μη ειδικής, φυσικής ανοσίας γενικότερα αναστέλλουν, αλλά δεν εξαλείφουν τη λοίμωξη από τον ιό. Περιορίζουν την ιική αναπαραγωγή μέχρι να δράσει πλήρως η πιο αποτελεσματική, επίκτητη ανοσολογική απόκριση. Αυτή παράγοντας ειδικά T και B λεμφοκύτταρα (κυτταρική και χυμική ανοσία), καταφέρνει να αντιμετωπίσει τη λοίμωξη εξαλείφοντας πλήρως τον ιό και να δημιουργήσει ανοσολογική μνήμη μακράς διάρκειας (214).

Η επίκτητη ανοσία ενεργοποιείται, όπως προαναφέρθηκε, με τη μεσολάβηση των APCs, τα σημαντικότερα από τα οποία είναι τα δενδριτικά

κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα προσλαμβάνουν με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης εξωγενή ιικά αντιγόνα (ανενεργή ιικά σωματίδια), ζωντανούς ιούς ή και αποπτωτικά κύτταρα μολυσμένα από ιούς και στη συνέχεια επεξεργάζονται ή αποδομούν ιικά πεπτιδία τα οποία εισάγουν σε ειδικές περιοχές σύνδεσης πάνω στα μόρια του MHC. Τα συμπλέγματα που προκύπτουν εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων, όπου αναγνωρίζονται από υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων και οδηγούν στην ενεργοποίησή τους. Υπάρχουν δύο τύποι MHC, I και II, οι οποίοι αναγνωρίζονται από διαφορετικούς υποπληθυσμούς T-λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, τα CD4 (T-βοηθητικά) λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα συμπλέγματα αντιγόνου - MHC II, ενώ τα CD8 αναγνωρίζουν τα συμπλέγματα αντιγόνου - MHC I. Η σύνδεση των T-λεμφοκυττάρων με τα συμπλέγματα αυτά οδηγεί στη διέγερσή τους προς την παραγωγή κυτταροκινών. Υπό την επίδραση αυτών των κυτταροκινών τα CD8 διαφοροποιούνται σε ειδικά για τον ιό κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTLs). Τα ειδικά CTLs προκαλούν τον θάνατο κυττάρων μολυσμένων από τον ιό με μηχανισμούς απόπτωσης. Τα CD4 διαφοροποιούνται σε TH1 και TH2, τα οποία προκαλούν την παραγωγή από τα B-λεμφοκύτταρα αντισωμάτων ειδικών για το στέλεχος του ιού. Τα TH1 λεμφοκύτταρα εκκρίνουν IFN- $\gamma$  και IL-2 που διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων IgG2 και προκαλούν υπερπλασία των CTLs. Τα TH2 εκκρίνουν IL-4 και IL-5 που οδηγούν στην παραγωγή IgA, IgE και IgG1 (214).

Η κυτταρική ανοσία προκαλεί το θάνατο των μολυσμένων κυττάρων, έτσι ώστε να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού και να επιτευχθεί η ανάρρωση από τη λοίμωξη. Τα CTLs ανιχνεύονται στο βρογχικό βλεννογόνο την 5<sup>η</sup> ημέρα από την αρχή της λοίμωξης και η συγκέντρωσή τους κορυφώνεται την 7<sup>η</sup> ημέρα, οπότε παρατηρείται ταχεία πτώση του τίτλου του ιού (214).

Όσοι ιοί επιβιώσουν εξουδετερώνονται στη συνέχεια με τη δράση της χυμικής ανοσίας. Αντισώματα κατά της HA εξουδετερώνουν τον ιό αναστέλλοντας τη σύνδεσή του με υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων και

παρεμποδίζοντας έτσι τη διείσδυσή του στα κύτταρα. Επιπλέον NK κύτταρα συνδέονται με τα συμπλέγματα ιού-αντισωμάτων στην επιφάνεια των μολυσμένων κυττάρων και τα καταστρέφουν μέσω της κυτταροτοξικότητάς που εξαρτάται από το αντίσωμα. Τα αντισώματα που προστατεύουν το βρογχικό βλεννογόνο ανήκουν στις τάξεις των ανοσοσφαιρινών IgA και IgG. Τα αντισώματα κατευθύνονται έναντι των ιικών επιφανειακών γλυκοπρωτεϊνών, HA και NA, καθώς και έναντι των εσωτερικών, δομικών πρωτεϊνών του ιού, NP και M1. Αυτά τα ειδικά για τον ιό της γρίπης λεμφοκύτταρα μπορούν να ανιχνευτούν στο αίμα και στις εκκρίσεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος των ασθενών. Ανιχνεύονται από την 5<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη της λοίμωξης και η συγκέντρωσή τους κορυφώνεται την 11<sup>η</sup> ημέρα (8).

Η IgA παράγεται τοπικά στον βλεννογονικό λεμφικό ιστό (MALT) του αναπνευστικού συστήματος που αποτελείται από το NALT (ρινοφάρυγγας) και το BALT (κατώτερο αναπνευστικό). Τα πλασματοκύτταρα του MALT παράγουν την IgA στην διμερή μορφή της (pIgA). Στη συνέχεια η pIgA συνδέεται με έναν υποδοχέα, που ονομάζεται εκκριτικό συστατικό (SC), σχηματίζοντας την εκκριτική IgA (S-IgA), η οποία μεταφέρεται διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων στον αυλό των ανώτερων και μεγάλων κυρίως αεραγωγών. Εκεί η εκκριτική IgA (S-IgA) εξουδετερώνει τον ιό προστατεύοντας από τις τοπικές εκδηλώσεις της γρίπης. Τα IgG αντισώματα κυκλοφορούν στον ορό και μεταναστεύουν κυρίως στα βρογχιόλια και τις κυψελίδες όπου προστατεύουν από την ανάπτυξη πνευμονίας (214).

Αξιζει να σημειωθεί ότι τα εξουδετερωτικά αντισώματα εναντίον της αιμοσυγκολλητίνης (anti-HA) είναι ο κυριότερος μεσολαβητής της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού ενάντια στον ιό της γρίπης, καθώς η εμφάνιση κλινικής νόσου σχετίζεται με τα επίπεδα των anti-HA αντισωμάτων στον ορό (τίτλοι  $\geq 1:40$  έχουν συσχετισθεί με προστασία από τη λοίμωξη). Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται στον ορό για δεκαετίες και έτσι μέσω αναδρομικών ορολογικών ερευνών είναι γνωστό ότι ένας περιορισμένος αριθμός υποτύπων του ιού έχει προσβάλλει τον άνθρωπο.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν επίσης ότι για την προστασία από τον ιό τα anti-NA αντισώματα μπορεί να αλληλεπιδράσουν και με την εκκριτική IgA ανοσοσφαιρίνη (214).

Τα αντισώματα έναντι της νευραμινιδάσης (anti-NA) είναι αναποτελεσματικά για την εξουδετέρωση των ιών της γρίπης, αλλά μειώνουν το μέγεθος των πλακών στις κυτταροκαλλιέργειες. Σε συμφωνία με αυτά τα ευρήματα έρχεται η πανδημία του 1968, της οποίας ο αιτιολογικός παράγοντας (υπότυπος H3N2) είχε τον ίδιο τύπο νευραμινιδάσης με το στέλεχος που κυκλοφορούσε (υπότυπος H2N2), αλλά τα anti-NA αντισώματα δεν κατάφεραν να προστατέψουν τους ανθρώπους από τη νέα πανδημία. Παρόλα αυτά τα anti-NA αντισώματα περιορίζουν την απελευθέρωση του ιού από τα προσβεβλημένα κύτταρα και το κυριότερο, μειώνουν τη σοβαρότητα της λοίμωξης και συμβάλλουν στην γρήγορη ανάρρωση (214).

Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της επίκτητης ανοσίας είναι η ανοσολογική μνήμη. Μετά τη διέγερση των λεμφοκυττάρων από τα APCs, ένα μέρος τόσο των CTLs, όσο και των Β-λεμφοκυττάρων μετατρέπονται σε κύτταρα μνήμης. Επόμενη επαφή των κυττάρων αυτών με τα συγκεκριμένα ιικά αντιγόνα κινητοποιεί την επίκτητη ανοσία πιο άμεσα (από την 3<sup>η</sup> ημέρα), με παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού ειδικών CTLs και ειδικών αντιγόνων που καταπολεμούν τη λοίμωξη ταχύτερα και αποτελεσματικότερα (214).

Οι πεπτιδικές αλληλουχίες των επιτόπων της HA και της NA, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μεταβάλλονται υπό την εκλεκτική πίεση του ανοσολογικού συστήματος ώστε να διαφύγουν τη σύνδεση με τα ειδικά αντισώματα. Έτσι τα αντισώματα που παρήχθησαν από ένα συγκεκριμένο στέλεχος του ιού της γρίπης ή του εμβολίου μπορεί να μην παρέχουν επαρκή προστασία έναντι του νέου στελέχους.

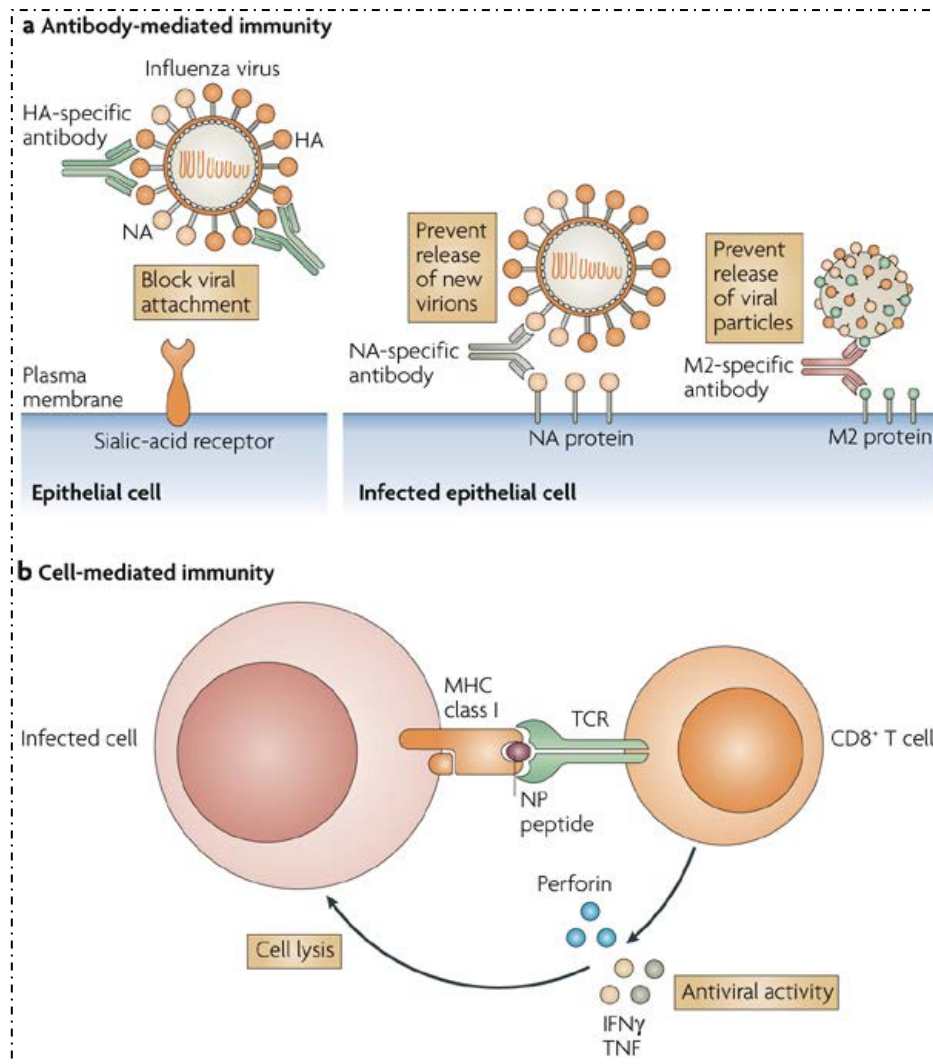
Η κυτταρική ανοσία κατά του ιού της γρίπης παρουσιάζει διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ διαφόρων υποτύπων του ιού γιατί τα ιικά πεπτίδια που διεγείρουν τα T-λεμφοκύτταρα είναι πιο σταθερά από τις θέσεις σύνδεσης των αντισωμάτων. Όμως, ενώ η μνήμη της χυμικής ανοσίας είναι ισόβια, η μνήμη της κυτταρικής ανοσίας διαρκεί πολύ λιγότερο.



Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις από πειράματα σε υγιείς εθελοντές ότι ενώ η κυτταρική ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο στην πρωτολοίμωξη από τον ιό της γρίπης, ο ρόλος της στην προστασία από την επαναλοίμωξη είναι περιορισμένος (214).

Από μελέτες που έγιναν σε παιδιά, τα οποία δεν είχαν εκτεθεί προηγουμένως στους ιούς της γρίπης, ο εμβολιασμός με ζωντανούς εξασθενημένους ιούς της γρίπης, οδήγησε στην εμφάνιση anti-HA IgM, IgG και IgA αντισωμάτων μέσα σε δύο εβδομάδες. Τα IgM και IgA αντισώματα αρχίζουν να ελαττώνονται μετά από αυτό το διάστημα, ενώ τα IgG φτάνουν στο μέγιστο μετά από 6 εβδομάδες, εξασθενούν λίγο τους επόμενους 6 μήνες και τελικά παραμένουν σταθερά για 2-3 χρόνια (152). Αντι-ιικά IgA, IgG και IgM αντισώματα ανιχνεύονται στις ρινικές εκκρίσεις για αρκετό καιρό μετά τη λοίμωξη (151). Σε επόμενη λοίμωξη παρατηρείται αύξηση στον ορό των IgG και IgA αντισωμάτων, καθώς και της βλεννογονικής IgA. Τα anti-NA αντισώματα σπάνια παράγονται στην πρωτογενή λοίμωξη. Συνήθως εμφανίζονται μετά από επανέκθεση στον ίδιο τύπο νευραμινιδάσης. Τα αντισώματα έναντι των ειδικών για τον τύπο του ιού πρωτεϊνών, NP και M1, ενισχύονται μετά από επαναμόλυνση και μπορεί να βοηθήσουν στην διάγνωση μιας πρόσφατης έκθεσης στον ιό.

Έχουν ανιχνευθεί επίσης αντισώματα έναντι της M2 πρωτεΐνης του ιού, τα οποία, μετά από μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια, πιθανολογείται ότι μειώνουν την αναπαραγωγή του ιού και συμβάλλουν στην ανάρρωση.



**Εικόνα 26.** Χυμική και Κυτταρική Ανοσία.

### ΑΝΟΣΟΓΗΡΑΝΣΗ

Με τον όρο «ανοσογήρανση» αναφέρονται οι μεταβολές της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού που συμβαίνουν με την πάροδο της ηλικίας και έχουν ως αποτέλεσμα των αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης της γρίπης, στους ηλικιωμένους. Λόγω των αλληπάλληλων ανοσολογικών απαντήσεων, ο αριθμός των «παρθένων» Τ-λεμφοκυττάρων ελαττώνεται σημαντικά με αποτέλεσμα ανεπαρκή απάντηση της κυτταρικής ανοσίας αλλά και μείωση της ικανότητας για ανοσολογική μνήμη (241). Επιπλέον, με την πάροδο της ηλικίας, τα κύτταρα χάνουν την

ικανότητα έκφρασης CD28, ενός συνδιεγερτικού μορίου απαραίτητου για την πλήρη ενεργοποίηση των CTLs και την αποτελεσματική κυτταροτοξική τους δράση. Παράλληλα, η απώλεια έκφρασης του CD28 συνδυάζεται και με μείωση της ικανότητας παραγωγής αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό (50).

#### *ΕΠΙΛΟΙΜΩΞΕΙΣ*

Τέλος η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης προδιαθέτει στην εμφάνιση επιλοιμώξεων από βακτήρια, μέσω αλλαγών της ανοσιακής απάντησης του αναπνευστικού συστήματος κατά τη διάρκεια και μετά τη λοίμωξη από γρίπη. Στους υπεύθυνους μηχανισμούς συγκαταλέγονται η τροποποίηση της επιστράτευσης των ουδετεροφίλων στον πνεύμονα και η παρεμπόδιση των αντιβακτηριακών τους ιδιοτήτων. Επιπλέον ο ιός της γρίπης προκαλεί αύξηση της απόπτωσης και δυσλειτουργία των ουδετεροφίλων, ελάττωση των TLR και αυξημένη παραγωγή IL-10. Οι αλλαγές αυτές της ανοσιακής απάντησης παραμένουν και μετά την τελική απομάκρυνση του ιού (238).

## **8. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ**

Το φάσμα των συμπτωμάτων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης με τον ιό της γρίπης ποικίλλει, από μια ήπια νόσο του αναπνευστικού συστήματος, με ρινίτιδα και φαρυγγίτιδα, μέχρι πρωτοπαθή ιογενή πνευμονία με θανατηφόρο κατάληξη. Μάλιστα το ποσοστό των ασυμπτωματικών λοιμώξεων κατά τη διάρκεια μιας επιδημίας μπορεί να είναι εξίσου υψηλό με αυτό των συμπτωματικών (3).

### **8.1 ΛΟΙΜΩΞΗ ΣΤΟΥΣ ΕΝΗΛΙΚΕΣ**

Μετά τη μετάδοση του ιού με αερολύματα, ακολουθεί μια περίοδος επώασης 48 ωρών, που μπορεί να ποικίλλει από 24 έως 96 ώρες, πιθανότατα εξαρτώμενη από το ικό φορτίο και την ανοσολογική κατάσταση του ατόμου (3).

Η νόσος χαρακτηρίζεται από αιφνίδια εισβολή με υψηλό πυρετό, ρίγος, κεφαλαλγία, κακουχία, ξηρό βήχα, πονόλαιμο, ρινική απόφραξη και καταρροή, μυαλγίες, φωτοφοβία και ανορεξία. Ο πυρετός είναι συνήθως συνεχής, ανέρχεται στους 38 με 41°C μέσα σε 12 ώρες από την έναρξη της νόσου. Η θερμοκρασία αρχίζει να πέφτει τη δεύτερη ή την τρίτη ημέρα και συνήθως επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα την έκτη ημέρα. Η μέση διάρκεια είναι 3 ημέρες. Σε ένα ποσοστό ασθενών μπορεί να εμφανιστεί και δεύτερο πυρετικό κύμα, το οποίο είναι ηπιότερο από το πρώτο. Λόγω του ξηρού βήχα ο ασθενής μπορεί να παραπονείται για υποστερνικό άλγος. Σπανιότερα συμπτώματα είναι η ναυτία, το κοιλιακό άλγος και η διάρροια (157). Αξίζει να σημειωθεί ότι στους ηλικιωμένους ασθενείς τα συμπτώματα μπορεί να είναι τελείως άτυπα και η νόσος να εμφανιστεί με ατονία, ανορεξία, βήχα, ανεξήγητο πυρετό, γενική κακουχία και σύγχυση.

Κατά την κλινική εξέταση τα φυσικά ευρήματα είναι λίγα στην ανεπίπλεκτη γρίπη. Ο ασθενής μπορεί να παρουσιάζεται με εξέρυθρο προσώπιο, υπεραιμία των επιπεφυκότων και εκσεσημασμένη δακρύρροια, υπεραιμία στην εξέταση του στοματοφάρυγγα και ελαφρά τραχηλική

λεμφαδενοπάθεια, ιδιαιτέρως σε νεαρά άτομα. Η ακρόαση του θώρακα είναι φυσιολογική, ενώ, σπανίως, μπορεί να αναδείξει διάσπαρτους λεπτούς ρόγχους (2).

Καθώς ο πυρετός υποχωρεί, τα συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα μπορεί να γίνονται εντονότερα. Έτσι ο βήχας από ξηρός, μπορεί να γίνει παραγωγικός, με βλεννώδη και σπανιότερα πυώδη πτύελα και να διαρκέσει και μετά την εξαφάνιση των υπολοίπων συμπτωμάτων. Παρόλο που οι ασθενείς με ανεπίπλεκτη γρίπη γενικά έχουν αναρρώσει πλήρως μέσα σε 7 με 10 ημέρες, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρουσιασθεί εμμένουσα αδυναμία ή καχεξία, η οποία μπορεί να διαρκέσει λίγες εβδομάδες, καθώς και ένα αίσθημα κατάθλιψης για το οποίο παραπονείται ο ασθενής (2, 3, 157).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης τύπου Β παρουσιάζει παρόμοια κλινική εικόνα με αυτή που προκαλείται από τους ιούς τύπου Α, όπως επίσης μπορεί να έχει και επιπλοκές. Η νόσος είναι συνήθως ηπιότερη (180, 216), με συχνότερα τα συστηματικά συμπτώματα και τα συμπτώματα από το γαστρεντερικό. Έχει συνήθως διάρκεια 3 ημέρες. Συνήθως έχει επιδημική μορφή και αφορά κυρίως εφήβους και παιδιά σχολικής ηλικίας, αλλά μπορεί να προσβληθούν ενήλικες και ηλικιωμένοι.

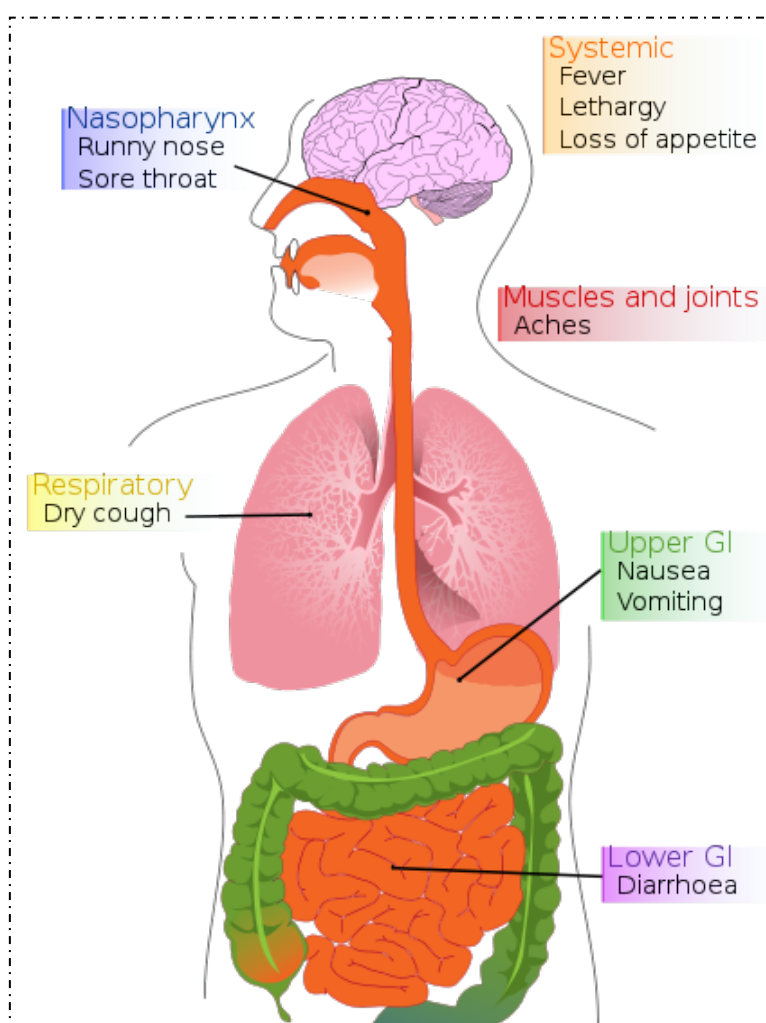
Ο ιός της γρίπης τύπου C προκαλεί σποραδικές λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και πολύ σπάνια συνδέεται με βαριά λοίμωξη από το κατώτερο αναπνευστικό. Συνήθως πρόκειται για τόσο ήπιας μορφής λοίμωξη που παραμένει αδιάγνωστη. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νεαρών ενηλίκων έχει αντισώματα έναντι του ιού της γρίπης τύπου C (111, 180).

## **8.2 ΛΟΙΜΩΞΗ ΣΕ ΒΡΕΦΗ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑ**

Οι ιοί της γρίπης τύπου Α και Β είναι μια σημαντική αιτία νόσου τόσο του ανώτερου όσο και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στα παιδιά. Στα παιδιά οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου μοιάζουν με αυτές των ενηλίκων, όμως υπάρχουν και κάποιες διαφορές. Ο πυρετός είναι συνήθως

υψηλότερος στα παιδιά και μπορεί να συνοδεύεται από πυρετικούς σπασμούς. Εμφανίζονται συχνότερα συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, όπως έμετοι, κοιλιακό άλγος και διάρροια. Συχνή είναι επίσης η εμφάνιση μέσης ωτίτιδας, λαρυγγοτραχειοβρογχίτιδας (croup) και μυοσιτίδας. Επίσης μπορεί να συνδεθεί με εξάρσεις άσθματος (24, 58, 180).

Τα νεογνά μπορεί να εμφανίσουν σοβαρή, απειλητική για τη ζωή νόσο, που εκδηλώνεται μόνο με υψηλό πυρετό, χωρίς συγκεκριμένη εστία λοίμωξης και μοιάζει με σήψη από κοινά βακτήρια (180).



Εικόνα 27. Συμπτώματα της γρίπης.

### **8.3 ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**

Οι επιπλοκές της λοίμωξης περιλαμβάνουν εκδηλώσεις από το ανώτερο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα καθώς και εξωπνευμονικές εκδηλώσεις. Παρατηρούνται συχνότερα σε ηλικιωμένους ασθενείς άνω των 65 ετών, σε πολύ νεαρά άτομα, σε έγκυες γυναίκες στο 2<sup>ο</sup> ή 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης και σε ασθενείς με υποκείμενα χρόνια νοσήματα οι οποίοι θεωρούνται υψηλού κινδύνου, όπως οι ασθενείς με χρόνια νόσο του καρδιαγγειακού ή του αναπνευστικού συστήματος, ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια, αιμοσφαιρινοπάθεια ή ανοσοκαταστολή. Οι κυριότερες επιπλοκές παρουσιάζονται παρακάτω (2).

#### **A. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΑΠΟ ΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Η προσβολή του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στους ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό της γρίπης μπορεί να εμφανιστεί ως πρωτοπαθής ιογενή πνευμονία, ως δευτεροπαθής βακτηριακή πνευμονία, ως συνδυασμός και των δύο, καθώς και με εξάρσεις χρόνιων νόσων του αναπνευστικού (2).

##### **8.3.1. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΙΟΓΕΝΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ**

Η πρωτοπαθής πνευμονία από τον ιό της γρίπης αναγνωρίστηκε πλήρως ως σύνδρομο κατά την πανδημία του 1957 (128, 135). Σήμερα πιστεύεται ότι ένα μεγάλο μέρος των θανάτων κατά την πανδημία του 1918-19 οφειλόταν στην πρωτοπαθή πνευμονία.

Η πρωτοπαθής ιογενής πνευμονία, η οποία αναπτύσσεται απότομα και εξελίσσεται ταχύτατα, είναι σχετικά σπάνια ανάμεσα στους ασθενείς με γρίπη και παρατηρείται συνήθως σε άτομα υψηλού κινδύνου. Είναι δυνατόν να εμφανιστεί με τη μορφή αιμορραγικής πνευμονίας, που είναι και η σοβαρότερη, και αναφέρεται πιο συχνά σε ασθενείς με υποκείμενη καρδιακή

νόσο, ιδιαιτέρως σε ασθενείς με αυξημένες πιέσεις στον αριστερό κόλπο της καρδιάς, όπως σε βαλβιδοπάθεια της μιτροειδούς (2,3,4).

Η πρωτοπαθής πνευμονία προκαλείται από την άμεση προσβολή του πνευμονικού παρεγχύματος από τον ιό. Η βλάβη στο αναπνευστικό επιθήλιο προέρχεται από την άμεση κυτταρολογική δράση του ιού και την έμμεση επίδραση του ξενιστή (77).

Η βλάβη των πνευμονοκυττάρων τύπου I προκαλεί διαρροή υγρού διαμέσου της κυψελιδοτριχοειδικής μεμβράνης, ενώ η προσβολή των πνευμονοκυττάρων τύπου II οδηγεί σε αναστολή της απορρόφησής του από τις κυψελίδες και παράλληλα παραβλάπεται η παραγωγή της επιφανειοδραστικής ουσίας. Το αποτέλεσμα αυτής της συνδυασμένης δράσης είναι η δημιουργία εκτεταμένου πνευμονικού οιδήματος. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι κυψελίδες εμφανίζονται να είναι πλήρεις από υαλοειδές υλικό, ως αποτέλεσμα της πλήρωσής τους από πλούσιο σε πρωτεΐνες υγρό, που αναμιγνύεται με τα υπολείμματα του κυτταροπλάσματος και των λιπιδίων των νεκρωμένων επιθηλιακών κυττάρων. Ο ιός μπορεί επίσης να δράσει στα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα προκαλώντας μείωση της απαντητικότητάς τους στα χημειοτακτικά ερεθίσματα και έκπτωση της συνολικής κυτταρικής τους λειτουργίας. Οι βλάβες αυτές σε συνδυασμό με τη νέκρωση και την απόπτωση του κροσσωτού επιθηλίου καθώς και την παραγωγή παθολογικής βλέννης, ευνοούν την ανάπτυξη δευτεροπαθούς βακτηριακής λοίμωξης (10,135).

Η κύρια κλινική υποψία για την εμφάνιση πνευμονίας τίθεται όταν τα συμπτώματα της γρίπης επιμένουν και αυξάνουν αντί να μειώνονται. Εμφανίζεται με δύσπνοια, ταχύπνοια, ταχυκαρδία, κυάνωση, υψηλό πυρετό και υπόταση. Μέσα σε 1-4 ημέρες μπορεί να προκληθεί υποξαιμία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας και θάνατος. Στην ακτινογραφία θώρακος παρατηρούνται διάχυτες πνευμονικές διηθήσεις στον ένα ή και στους δύο πνεύμονες (2, 3, 4).



Κατά την εργαστηριακή διερεύνηση, η χρώση πτυέλων κατά Gram είναι αρνητική, ενώ η καλλιέργεια αποκαλύπτει μικρή ανάπτυξη φυσιολογικής μικροβιολογικής χλωρίδας (2, 3, 4).

Στις νεκροτομικές μελέτες καταγράφεται η παρουσία τραχειίτιδας, βρογχίτιδας και διάχυτης αιμορραγικής πνευμονίας με πλήρωση των κυψελίδων και των κυψελιδικών πόρων με υαλοειδές υλικό, θρομβώσεις των πνευμονικών αγγείων και διάφορου βαθμού κυτταρική διήθηση του διάμεσου ιστού (2, 3, 4).

Οι επιζώντες μπορεί να αναπτύξουν διάχυτη διάμεση ίνωση. Η λοίμωξη από ιό της γρίπης τύπου Β μπορεί μεν να προκαλέσει σοβαρή νόσο, αλλά δεν έχει συσχετισθεί με θανατηφόρα πρωτοπαθή ιογενή πνευμονία σε υγιή άτομα (2, 3, 4).

### **8.3.2. ΔΕΥΤΕΡΟΠΑΘΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑ**

Η δευτεροπαθής βακτηριακή πνευμονία είναι τρεις φορές συχνότερη από την πρωτοπαθή και οφείλεται στην ελάττωση της φυσικής ανοσίας του αναπνευστικού συστήματος. Τα βακτήρια που συχνότερα εμπλέκονται είναι ο *Streptococcus pneumoniae*, ο *Staphylococcus aureus* και ο *Hemophilus influenzae* αν και μπορεί να συμμετέχουν και άλλοι μικροοργανισμοί (139, 199, 215).

Η δευτεροπαθής βακτηριακή πνευμονία δε διαφέρει κλινικά από τη συνήθη πνευμονία της κοινότητας. Αναπτύσσεται είτε ταυτόχρονα με την ιογενή λοίμωξη είτε μετέπειτα. Τυπικά, η προσβολή επέρχεται μετά από μια περίοδο βελτίωσης του ασθενούς από τη γρίπη, που μπορεί να έχει διάρκεια 4 -14 ημέρες. Η νόσος εμφανίζεται με υψηλό πυρετό με ρίγη, παραγωγικό βήχα με πυώδη απόχρεμψη, πλευριτικό άλγος και χαρακτηριστική ακτινολογική εικόνα πνευμονικού διηθήματος (218). Η θνητότητα είναι 10 με 12%, αλλά σε περίπτωση συλλοίμωξης του ιού της γρίπης με *S. aureus* το ποσοστό ανεβαίνει. Αξίζει να σημειωθεί ότι τις περιόδους γρίπης 2003-2004 και 2006-2007 αναφέρθηκαν περιπτώσεις σοβαρής πνευμονίας από *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA) με θνητότητα 33% (84, 144).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια δρουν συνεργικά με τον ιό της γρίπης περιλαμβάνουν αύξηση της δέσμευσης, αυξημένη ιική αναπαραγωγή και μεταβολή της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιού της γρίπης και των βακτηρίων έχει τεκμηριωθεί με τον πνευμονιόκοκκο. Έτσι, είναι γνωστό ότι όπως η ιική νευραμινιδάση cleaves το σιαλικό οξύ προκειμένου να απελευθερωθούν από τα κύτταρα τα νεοσχηματισθέντα ιικά σωματίδια, προκαλεί βλάβη στο επιθήλιο των αεραγωγών, εκθέτοντας θέσεις πρόσδεσης απαραίτητες για την προσκόλληση του πνευμονιοκόκκου .

### **8.3.3 ΠΑΡΟΞΥΝΣΕΙΣ ΧΡΟΝΙΩΝ ΝΟΣΩΝ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ**

Οι ιογενείς λοιμώξεις ευθύνονται για ένα σημαντικό ποσοστό των παροξύνσεων του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας. Σε μελέτες παιδιών και ενηλίκων που έπασχαν από άσθμα υπολογίζεται ότι περίπου το 80% των παροξύνσεων της νόσου σχετίζεται με ιογενή λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (158, 109). Παρά το γεγονός ότι οι ρινο-ιοί και οι κορόνα-ιοί ευθύνονται στην πλειοψηφία των παροξύνσεων, οι ιοί της γρίπης ενοχοποιούνται σε ποσοστό έως 25% (174, 191).

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η γρίπη και οι άλλοι ιοί του αναπνευστικού προκαλούν παροξύνσεις των χρόνιων νόσων του αναπνευστικού δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Θεωρείται όμως ότι σχετίζεται με μεσολαβητές της φλεγμονής, όπως οι ιντερλευκίνες και οι κυτοκίνες, και μεταβολή της αναλογίας των T-λεμφοκυττάρων, που οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία απέναντι σε άλλα αλλεργιογόνα (126, 237).

## **B. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ**

### **8.3.4 ΜΕΣΗ ΩΤΙΤΙΔΑ & ΠΑΡΑΡΡΙΝΟΚΟΛΠΙΤΙΔΑ**

Η μέση ωτίτιδα, συνήθως αποτελεί δευτερογενή βακτηριακή επιπλοκή της γρίπης, αν και τελευταία έχει αναγνωρισθεί ότι μπορεί να προκληθεί και μόνο εξαιτίας της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης. Προσβάλλει κυρίως μικρά

παιδιά κάτω των 5 ετών. Μάλιστα υπολογίζεται ότι μέση ωτίτιδα εμφανίζεται στο 12% των παιδιών με γρίπη, ενώ το ποσοστό ανέρχεται σε 24-33% για παιδιά που νοσηλεύονται με ιό της γρίπης Α (2,3).

Δευτερογενής βακτηριακή λοίμωξη μπορεί να αφορά τις παραρρινίες κοιλότητες με εμφάνιση οξείας παραρρινοκολπίτιδας.

### **8.3.5 ΜΥΟΣΙΤΙΔΑ**

Εκτός από τη μυαλγία, που είναι ένα χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας της γρίπης, μπορεί να εμφανιστεί ως επιπλοκή και μυοσίτιδα. Εκδηλώνεται ως έντονη ευαισθησία των προσβεβλημένων μυϊκών ομάδων, κυρίως των κάτω άκρων, ενίοτε συνοδευόμενη από οίδημα της περιοχής και πόνο κατά τη βάδιση. Στον εργαστηριακό έλεγχο διαπιστώνεται άνοδος των τιμών της κρεατινοφωσφοκινάσης. Σε σοβαρές περιπτώσεις παρατηρείται μυοσφαιρινουρία, με πιθανότητα εμφάνισης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, ή σύνδρομο διαμερίσματος που απαιτεί φασιοτομές. Βιοψία των προσβεβλημένων μυών δείχνει νέκρωση, αναγεννητικές ίνες και στοιχεία φλεγμονής. Η νόσος είναι καλοήθης και τα συμπτώματα γενικά υποχωρούν σε 4 με 6 εβδομάδες (69).

### **8.3.6. ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ ΑΠΟ ΤΟ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

Άμεσες καρδιακές επιπλοκές είναι ασυνήθεις, αλλά έχουν αναφερθεί επιπλοκές του τύπου της μυοκαρδίτιδας ή περικαρδίτιδας. Τα συμπτώματα της καρδίτιδας εμφανίζονται 4-7 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της γρίπης (167). Οι ασθενείς παρουσιάζουν δυσκολία στην αναπνοή, οπισθοστερνικό άλγος, ή επιδείνωση μετά από αρχική βελτίωση των συμπτωμάτων.

Η προσβολή του καρδιακού μυός και η ανάπτυξη μυοκαρδίτιδας συνδυάζεται με ανωμαλίες στο ηλεκτροκαρδιογράφημα και εμφάνιση αρρυθμιών (104). Τα περισσότερα ευρήματα υποχωρούν μέσα σε ένα μήνα και δεν παρατηρείται βλάβη του μυός μείωση του κλάσματος εξώθησης. Αυξημένες τιμές κρεατινοφωσφοκινάσης είναι συχνές, αλλά φαίνεται ότι

προέρχονται κυρίως από τους σκελετικούς μύες, αφού σπάνια παρατηρείται αυξημένη τροπονίνη (80).

Η έμμεση επίδραση της γρίπης σε ασθενείς με υποκείμενα καρδιακά νοσήματα, όπως συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή ισχαιμική καρδιοπάθεια, φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη θνητότητα. Στοιχεία υποστηρίζουν τη σύνδεση μεταξύ της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο (233). Ο μηχανισμός δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, αλλά πιστεύεται ότι ο ιός προκαλεί παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η IL-6 και ο TNF-α (112), και η φλεγμονή είναι σημαντικός παράγοντας της αθηρωματικής νόσου (192).

#### **8.3.7. ΣΥΝΔΡΟΜΟ REYE**

Σημαντική εξωπνευμονική επιπλοκή του ιού της γρίπης είναι το σύνδρομο Reye, ένα νευρολογικό και μεταβολικό σύνδρομο, που χαρακτηρίζεται από ταχέως εξελισσόμενη μη φλεγμονώδη εγκεφαλοπάθεια (το ENY περιέχει λιγότερα από 8 λευκοκύτταρα/mm<sup>3</sup>) και λιπώδη διήθηση των σπλάγχων, ειδικά του ήπατος (4).

Η τυπική γριπώδης συνδρομή δεν υφίσταται, αλλά εμφανίζονται ναυτία και έμετοι διάρκειας μίας με δύο ημερών, για να ακολουθήσει μια πλειάδα συμπτωμάτων και σημείων από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Λήθαργος και σύγχυση μπορεί να εξελιχθούν σε παραλήρημα και αληθές κώμα. Σπασμοί εμφανίζονται στο 30% των ασθενών. Υπογλυκαιμία, ηλεκτρολυτικές διαταραχές και οξυαιμία είναι συνηθείς. Η ηπατομεγαλία είναι χαρακτηριστική, με συνοδό θεαματική - τριπήφια αύξηση των τρανσαμινασών, της γαλακτικής δεϋδρογενάσης και μέτρια αύξηση της ολικής χολερυθρίνης ή και των επιπέδων αμμωνίας του αίματος (4).

Το σύνδρομο Reye σχετίζεται κυρίως με τον ιό της γρίπης Β, αλλά και της Α (H1N1 και H3N2), καθώς και με άλλους αναπνευστικούς ιούς. Περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων συνδρόμου Reye εμφανίζονται σε

παιδιά μικρότερα των 14 ετών. Τα περισσότερα των ενηλίκων συνδέονται κυρίως με λοίμωξη από τον ιό της γρίπης Α και καταλήγουν σε θάνατο. Τη δεκαετία του 1970 αναφέρονταν έως και 500 περισσότερα ετησίως, με θνητότητα που έφτανε το 33%. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση θεραπευτικών δόσεων σαλικυλικών ήταν παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του συνδρόμου και έτσι η θνητότητα μειώθηκε σταδιακά μετά τη σύσταση να δίνεται παρακεταμόλη και όχι ασπιρίνη στα παιδιά με ιογενή λοίμωξη.

### **8.3.8 ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**

Ο ιός της γρίπης σχετίζεται με μια πληθώρα νευρολογικών εκδηλώσεων, που περιλαμβάνουν περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας, άσηπτης μηνιγγίτιδας, οξείας εγκάρσιας μυελίτιδας και εστιακές νευρολογικές βλάβες. Επίσης αναφέρονται πυρετικοί σπασμοί στα παιδιά, ευερεθιστότητα, υπνηλία και σύγχυση. Τα αντανάκλαστικά μπορεί να είναι επηρεασμένα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) είναι συχνότερη στα παιδιά **(211)**.

Το σύνδρομο Guillain-Barré, μία υποξεία, ανοσολογικής προέλευσης νόσος που προσβάλλει κυρίως το περιφερικό νευρικό σύστημα, αναφέρεται ότι σχετίζεται σπάνια με λοίμωξη από τον ιό της εποχικής γρίπης **(205)**, βέβαια αξίζει να σημειωθεί ότι σπάνια γίνεται έλεγχος για γρίπη οπότε το αρκετές περιπτώσεις του συνδρόμου που σχετίζονται με τη γρίπη παραμένουν αδιάγνωστες.

Οξεία νεκρωτική εγκεφαλοπάθεια έχει αναφερθεί κυρίως στην Ιαπωνία και έχει σχετιστεί με λοίμωξη από τον ιό της γρίπης Α. Η νόσος είναι συχνά κεραυνοβόλος και θανατηφόρος **(2,3)**.

Η μεταγριπική εγκεφαλίτιδα, η οποία είναι εξαιρετικά σπάνια, συμβαίνει 2-3 εβδομάδες μετά την ανάρρωση και συνήθως είναι ιάσιμη **(71)**. Μετα-ικός παρκινσονισμός έχει επίσης αναφερθεί και οι ασθενείς έχουν φτωχή ανταπόκριση στη φαρμακευτική θεραπεία και άσχημη πρόγνωση **(106)**.

Η διάγνωση της συμμετοχής του ΚΝΣ βασίζεται σε κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η οσφουονωτιαία παρακέντηση δείχνει αυξημένη πρωτεΐνη και λεμφοκυττάρωση. Αξονική και μαγνητική τομογραφία πρέπει να διενεργούνται σε περίπτωση εστιακών ή σοβαρών νευρολογικών συμπτωμάτων και η εμφάνιση ανωμαλιών προβλέπει άσχημη κατάληξη **(211)**.

### **8.3.9 ΑΛΛΕΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ**

Η λοίμωξη με τον ιό της γρίπης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχει συνδυαστεί με αυτόματη αποβολή, πρόωρο τοκετό, γέννηση θνησιγενούς νεογνού, καθώς και γέννηση νεογνού με συγγενείς δυσπλασίες, που αφορούν συνήθως το νευρικό σωλήνα **(103)**. Επίσης έχει αναφερθεί πως συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο θανάτου της μητέρας και περιπτώσεις αιφνιδίου θανάτου των βρεφών. Τέλος μερικές μελέτες αναφέρουν ότι η λοίμωξη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα στο 2<sup>ο</sup> τρίμηνο **(162)**, μπορεί να σχετιστεί με την εμφάνιση σχιζοφρένειας και νόσου Parkinson στους απογόνους. Βέβαια τα στοιχεία είναι ακόμα αμφιλεγόμενα.

Τέλος σημαντική επιπλοκή της γρίπης είναι το σύνδρομο του τοξικού shock, που πιστεύεται ότι προκαλείται από τη βακτηριακή εξωτοξίνη (TSST-1) που εκκρίνεται από στελέχη *S. Aureus* **(181)**.

## 9. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

### 9.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σε περιπτώσεις γνωστής επιδημίας στην κοινότητα, ο κλινικός γιατρός μπορεί με μεγάλη βεβαιότητα να διαγνώσει γρίπη σε περιστατικά με οξεία εμπύρετη νόσο του αναπνευστικού με τη χρήση κλινικών κριτηρίων, όπως φαίνονται στον πίνακα 2. Μάλιστα, σε μεγάλες μελέτες αξιολόγησης των αναστολέων της νευραμινιδάσης ως αντιγριπικών φαρμάκων, συνύπαρξη βήχα και πυρετού εντός του πρώτου 48ώρου της αναπνευστικής νόσου είχε θετική προγνωστική αξία 79% για διάγνωση γρίπης (146).

<b><u>ΣΥΜΠΤΩΜΑ</u></b>	<b><u>ΓΡΙΠΗ</u></b>	<b><u>ΚΟΙΝΟ ΚΡΥΟΛΟΓΗΜΑ</u></b>
<b>Πυρετός</b>	Συνήθως υψηλός, 38,5-40°C, διαρκείας 3-5 ημερών.	Σπανίως υψηλός σε ενήλικες ή εφήβους. Δυνατόν να είναι υψηλός (έως 39°C) στα βρέφη και στα μικρά παιδιά.
<b>Κεφαλαλγία</b>	Δυνατόν να είναι έντονη, με αιφνίδια έναρξη.	Σπανίως αναφέρεται.
<b>Μυαλγίες</b>	Χαρακτηριστικές έντονες.	Εάν παρουσιαστούν είναι μέτριας βαρύτητας.
<b>Δυσανεξία, κόπωση, εξάντληση</b>	Δυνατόν να είναι πολύ έντονη, να έχει αιφνίδια έναρξη, και να επιμείνει για 2 ή περισσότερες εβδομάδες.	Όχι
<b>Καταρροή, πταρμοί</b>	Μερικές φορές	Συχνά
<b>Κονάγχη</b>	Μερικές φορές	Συχνά
<b>Βήχας</b>	Συνήθως έντονος	Μέτριας βαρύτητας, παροξυσμικός.

Σε μερικές περιπτώσεις, όμως, τα διαφορετικά συμπτώματα που μπορεί να παρουσιάζει ο ασθενής μπορεί να δυσκολέψουν τη διάγνωση, αν αυτή στηρίζεται μόνο στην κλινική εικόνα. Επίσης χωρίς την εργαστηριακή

διερεύνηση μπορούν να διαφύγουν μικτές λοιμώξεις. Η εργαστηριακή διάγνωση επιβάλλεται, πάντως, σε ύποπτα περιστατικά για γρίπη όταν δεν υπάρχει επιδημία (255).

## **9.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

Η οριστική διάγνωση της γρίπης απαιτεί εργαστηριακή επιβεβαίωση. Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί τρόποι εργαστηριακής ανίχνευσης του ιού της γρίπης που περιλαμβάνουν: 1) την απομόνωση του ιού, 2) την ανίχνευση ιικών αντιγόνων, 3) την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού, ή 4) τη μοριακή ανίχνευση γενετικού υλικού του ιού (255).

Τα καταλληλότερα διαγνωστικά δείγματα για την απομόνωση του ιού είναι φαρυγγικά ή ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, ρινικά εκπλύματα, πτύελα ή και υγρό από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) (W.H.O. 2002). Η συλλογή των δειγμάτων πρέπει να γίνεται τις πέντε πρώτες ημέρες της νόσου, αφού ο ιός είναι ανιχνεύσιμος 1 με 5 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων, ενώ υψηλότεροι τίτλοι παρατηρούνται κατά τη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> ημέρα. Έχουν γίνει αναφορές για ανίχνευση του ιού στο αίμα, καθώς και σε ιστούς από το αναπνευστικό σύστημα, τον εγκέφαλο και την καρδιά. Σε κάθε περίπτωση η σωστή συντήρηση και η γρήγορη μεταφορά των δειγμάτων είναι σημαντικές για την ανίχνευση του ιού.

### **9.2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

Η κλασική μέθοδος ανίχνευσης των ιών της γρίπης είναι η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια (40). Υπάρχουν δύο ειδών καλλιέργειες, αυτές των γονιμοποιημένων αυγών όρνιθας (ECE) και οι κυτταροκαλλιέργειες σε νεφρικά κύτταρα πιθήκων (MDCK).

Αποτελεί μέθοδο αναφοράς, αφού μετά ο ιός μπορεί να υποστεί γενετική και αντιγονική ανάλυση, αλλά δεν είναι αρκετά γρήγορη ώστε να αποτελέσει τη βάση για την έναρξη θεραπείας ή τη λήψη μέτρων για τον έλεγχο μετάδοσης της λοίμωξης, αφού κατά μέσο όρο οι απαντήσεις δίνονται μεταξύ 2<sup>ης</sup> και 5<sup>ης</sup> ημέρας από τον εμβολιασμό και ολοκληρώνονται σε 14



ημέρες. Έτσι, η καλλιέργεια του ιού χρησιμοποιείται περισσότερο στην παρασκευή των εμβολίων παρά στην κλινική διάγνωση (40).

Οι ιοί της γρίπης Α και Β μπορούν να καλλιεργηθούν σε εμβρυϊκά αυγά όρνιθας 10-12 ημερών. Το κλινικό δείγμα ενοφλαμίζεται στην αμνιακή ή αλλαντοϊκή κοιλότητα των εμβρυοφόρων αυγών και μετά από επώαση στους 33-34°C για 2-3 ημέρες, ο ιός βρίσκεται σε υψηλούς τίτλους στο αμνιακό υγρό. Μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη του αμνιακού υγρού σε ερυθροκύτταρα και την παρατήρηση της αιμοσυγκόλλησης. Αμνιακό υγρό αρνητικό για τον ιό μπορεί να επανενοφθαλμιστεί σε έμβρυα όρνιθας και αν πάλι δεν αναπτυχθεί ο ιός τότε το δείγμα λέγεται αρνητικό (40).

Οι ιοί τύπου C αναπτύσσονται μόνο στην αμνιακή κοιλότητα. Πολλαπλασιάζονται καλύτερα σε εμβρυϊκά αυγά όρνιθας 7-8 ημερών και χρειάζονται επώαση 5 ημερών (40).

Τα παθολογικά δείγματα μπορούν επίσης να ενοφθαλμιστούν σε καλλιέργειες κυττάρων νεφρού πιθήκων rhesus (MDCK), μπαμπούνων και μια ποικιλία άλλων ειδών. Η προσθήκη θρυψίνης, που εγγυάται το διαχωρισμό της HA σε HA1 και HA2, έχει αυξήσει το εύρος των κυτταρικών σειρών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Μετά την επώαση η ανίχνευση του ιού γίνεται με πολλούς τρόπους, όπως η αιμοσυγκόλληση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, η αιμοπροσρόφηση που είναι ορατή με μικροσκόπηση και η σήμανση με φθορίζοντα αντισώματα (6).

### **9.2.2 ANIXNEYΣH ANTIGONOU**

Η αντιγόνων του ιού της γρίπης μπορεί να γίνει με εξετάσεις ταχείας διάγνωσης (RIDTs) καθώς και με άμεσο ή έμμεσο ανοσοφθορισμό (DFA και IFA).

Όλες οι εξετάσεις ταχείας διάγνωσης βασίζονται στην ανίχνευση διαφόρων νουκλεοπρωτεϊνικών αντιγόνων του ιού της γρίπης με ειδικά σημασμένα αντισώματα. Η σύνδεση αυτή παράγει ένα οπτικό σήμα. Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα RIDTs δίνουν αποτελέσματα εντός 30

λεπτών. Η γρήγορη απάντηση που παρέχουν οι δοκιμασίες αυτές αποτελούν το σημαντικότερο πλεονέκτημά τους στην κλινική πράξη **(113)**.

Παρόλα αυτά υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στα εμπορικά τεστ τα οποία α) μπορούν να ανιχνεύσουν και να διαχωρίσουν τη γρίπη Α και Β, β) μπορούν να ανιχνεύσουν τη γρίπη Α και Β χωρίς να μπορούν να κάνουν το διαχωρισμό ή γ) ανιχνεύουν μόνο τη γρίπη Α. Κανένα από τα RIDTs που έχουν άδεια από το FDA δεν μπορεί να διαχωρίσει τους υποτύπους της γρίπης Α. Επίσης κανένα από τα RIDTs δεν μπορεί να δώσει πληροφορίες για ευαισθησία σε αντι-ικά φάρμακα **(48)**.

Η ανίχνευση ικών αντιγόνων με άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό πραγματοποιούνται σε εργαστήρια που διαθέτουν φθορίζον μικροσκόπιο και ολοκληρώνονται σε 2-4 ώρες. Στηρίζονται στη χρήση σημασμένων μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι νουκλεοπρωτεϊνικών αντιγόνων. Η ευαισθησία διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από μέθοδο σε μέθοδο (59 - 93%), αλλά η ειδικότητα είναι υψηλή ( 96%) **(48)**.

### **9.2.3 ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ**

Οι ορολογικές δοκιμασίες **(156)** μπορούν να θέσουν τη διάγνωση της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης, όταν αυτός δεν μπορεί να ανιχνευθεί με άλλες μεθόδους. Μπορούν να θέσουν αναδρομικά τη διάγνωση με βάση τη χαρακτηριστική αύξηση ( $\geq 4$  φορές) των ειδικών αντισωμάτων (αναστολείς της αιμοσυγκόλλησης) στον ορό, 2-3 εβδομάδες μετά την έναρξη της νόσου. Απαιτείται συλλογή δύο δειγμάτων αίματος του ασθενούς, το πρώτο όσο το δυνατόν συντομότερα από την έναρξη των συμπτωμάτων και το δεύτερο 10 με 14 ημέρες αργότερα **(186)**.

Οι πλέον χρησιμοποιούμενες ορολογικές μέθοδοι για τη γρίπη είναι οι εξής:

- **Η σύνδεση του συμπληρώματος (CF)**, η οποία ανιχνεύει αντισώματα έναντι του NP αντιγόνου και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση του τύπου του ιού (Α ή Β), αλλά όχι του υποτύπου.

- **Η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης (HAI)**, είναι μια ορολογική δοκιμασία η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. Το ζεύγος ορών του ασθενούς επεξεργάζεται κατάλληλα για να αφαιρεθούν κάποιοι μη-ειδικοί αναστολείς (Υπάρχουν τρία είδη αναστολέων : α-αναστολείς, που βρίσκονται στον ορό του ανθρώπου και είναι θερμοανθεκτικές γλυκοπρωτεΐνες που όμως δεν εξουδετερώνουν τη μολυσματικότητα του ιού, β-αναστολείς, που βρίσκονται επίσης στον ανθρώπινο ορό αλλά είναι θερμοευαίσθητες και έχουν εξουδετερωτική ικανότητα και οι γ-αναστολείς, που βρίσκονται στον ορό του αλόγου, είναι θερμοανθεκτικές και έχουν εξουδετερωτική ικανότητα. Οι α και γ αναστολείς λειτουργούν ως υποδοχείς που ανταγωνίζονται του υποδοχείς των ερυθροκυττάρων στη σύνδεση της ΗΑ.) και στη συνέχεια πραγματοποιείται μια σειρά διαχύσεων: σε κάθε διάχυση προστίθεται ορισμένη ποσότητα άθικτου ιού και μετά τα κύτταρα. Η παρουσία αντισωμάτων πιστοποιείται από την αναστολή της αιμοσυγκόλλησης.
- **Η αναστολή της αιμοπροσρόφησης**, σε αυτή τη δοκιμασία μείγμα ιού με ορό του ασθενούς εμβολιάζεται σε κατάλληλα κύτταρα, τα οποία επωάζονται για 2-3 ημέρες, στη συνέχεια προστίθενται στην καλλιέργεια ερυθροκύτταρα. Η παρουσία συγκόλλησης σημαίνει ιική αναπαραγωγή και ενώ η απουσία της φανερώνει την ύπαρξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων.
- **Η μέτρηση των αντισωμάτων με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA)**. Ο έλεγχος των αντισωμάτων με ELISA μπορεί να ξεχωρίσει τη γρίπη Α από τη γρίπη Β αλλά δεν έχει την ικανότητα να ξεχωρίσει τους υποτύπους της γρίπης Α. Ο ορολογικός έλεγχος πρέπει να επαναληφθεί 2-4 εβδομάδες μετά την πρώτη εξέταση. Ο τετραπλασιασμός του τίτλου των IgG αντισωμάτων όσο και η ύπαρξη IgM αντισωμάτων είναι ενδεικτικά λοίμωξης. Έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει και λοίμωξη με αρνητική καλλιέργεια. Η ευαισθησία της

μεθόδου είναι >90%. Η συγκεκριμένη εξέταση χρησιμοποιείται κυρίως για επιδημιολογικές μελέτες (176).

Μελέτες δείχνουν οι ορολογικές δοκιμασίες έχουν θετική προγνωστική αξία περίπου 80%.

#### **9.2.4 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Οι μοριακές μέθοδοι χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως, τόσο για τη διάγνωση της γρίπης, όσο και για την τυποποίηση του υπεύθυνου ιού. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ταχύτητα, ευαισθησία και ειδικότητα και τείνουν να γίνουν η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της γρίπης. Οι κυριότερες μοριακές μέθοδοι είναι:

- **Ο μοριακός υβριδισμός**, με ανιχνευτές σεσημασμένους με ισότοπα ή βιοτίνη, είναι μια ευέλικτη μέθοδος με ευαισθησία 72% (89), μεγαλύτερη δηλαδή από αυτή της κυτταροκαλλιέργειας, που όμως δεν χρησιμοποιείται ευρέως εξαιτίας της ανάπτυξης πιο ευαίσθητων και γρήγορων τεχνικών (165).
- **Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**, είναι μια τεχνική κατά την οποία το ιικό RNA μετατρέπεται σε cDNA από την αντίστροφη μεταγραφάση και στη συνέχεια η αλληλουχία που έχει επιλεγεί πολλαπλασιάζεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών DNA (**RT-PCR**) (165). Η ενισχυμένη αλληλουχία ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης. Υπάρχουν αρκετοί ειδικοί εκκινητές (primers) οι οποίοι ενισχύουν διαφορετικά γονίδια του ιού (NP για τους ιούς τύπου A, για τους ιούς τύπου B (247, 248), M (256), HA για τους H1 (17, 185) και H3 υποτύπους, NA για τους N1 και N2 υποτύπους (35) ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Η υπεροχή της PCR έναντι της κυτταροκαλλιέργειας έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες και η ευαισθησία της υπολογίζεται πάνω από 90% (131). Παραλλαγές της μεθόδου είναι: **i**) η πολλαπλή PCR (**multiplex PCR**), (56, 210, 242) στην οποία χρησιμοποιούνται περισσότεροι primers και έτσι ενισχύονται ταυτόχρονα περισσότερα από ένα

γονίδια ενός παθογόνου οργανισμού, ή περισσότεροι από ένας παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως για παράδειγμα ιοί της γρίπης τύπου A (H1, H3) και τύπου B. **ii)** η πραγματικού χρόνου PCR (**real-time PCR**), (202,224) στην οποία χρησιμοποιείται ειδικός φθοριοσημασμένος ιχνηλάτης, ο οποίος όταν συνδεθεί με δίκλωνο DNA εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία που μετράται σε ειδικό μηχάνημα και επιτρέπει ποιοτικό και αλλά και ποσοτικό προσδιορισμό του προϊόντος της PCR, χωρίς να απαιτείται ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης (52, 182).

- **Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA, (124, 134, 232)** είναι μια καινούρια προσέγγιση στη διάγνωση της γρίπης, με την οποία χρησιμοποιώντας ειδικά chip που περιέχουν καθηλωμένους ανιχνευτές, μπορούν να ανιχνευτούν ο τύπος και ο υπότυπος των ιών της γρίπης, καθώς και μια ποικιλία άλλων παθογόνων μικροοργανισμών (όπως ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός, οι ιοί της παραινφλουέντζας, μυκόπλασμα και χλαμύδια της πνευμονίας κ.α.). Φαίνεται να είναι μια υποσχόμενη μέθοδος ταχείας ανίχνευσης πολλών παθογόνων.

## **10. ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Η θεραπεία της γρίπης είναι κατά κύριο λόγο συμπτωματική. Οι ασθενείς συνιστάται να μένουν κλινήρεις για 2-3 ημέρες έως ότου υποχωρήσουν τα οξέα συμπτώματα. Η εκτεταμένη χρήση σαλικυλικών πρέπει να αποφεύγεται γιατί έχει συνδεθεί με την παθολογία του συνδρόμου Reye και έτσι ο πυρετός και η κεφαλαλγία συνιστάται να αντιμετωπίζονται με τη χορήγηση παρακεταμόλης, η κωδεΐνη μπορεί να ανακουφίσει τον ασθενή από τον έντονο βήχα, ενώ για την αϋπνία μπορούν να χορηγηθούν βαρβιτουρικά ή προμεθαζίνη (ένα αντιϊσταμινικό που έχει ως παρενέργεια την υπνηλία). Η χρήση αντιβιοτικών ενδείκνυται σε περίπτωση βακτηριακών επιπλοκών (180).

Για τον ιό της γρίπης υπάρχουν επίσης και εγκεκριμένα αντι-ιικά φάρμακα, που ανήκουν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις κυκλικές αμίνες αμανταδίνη (Amantadine) και ριμανταδίνη (Rimantadine) και η δεύτερη τους αναστολείς της νευραμινιδάσης με κυριότερους εκπροσώπους τη ζαναμιβίρη (Zanamivir) και την οσελταμιβίρη (Oseltamivir) (2,3, 59,180).

Σύμφωνα με πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες της Infectious Disease Society of America (IDSA) έναρξη θεραπείας με αντι-ιικά φάρμακα, εντός 48ωρου από την έναρξη των συμπτωμάτων, συνιστάται σε ενήλικες και παιδιά που πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

1. Εργαστηριακά επιβεβαιωμένη λοίμωξη σε ασθενή υψηλού κινδύνου (πίνακας 5) για την ανάπτυξη επιπλοκών. Η απόφαση για έναρξη θεραπείας είναι ανεξάρτητη από το αν ο ασθενής έχει εμβολιασθεί ή όχι, καθώς και από τη βαρύτητα της νόσου.
2. Ασθενείς που χρήζουν εισαγωγής στο νοσοκομείο λόγω εργαστηριακά επιβεβαιωμένης γρίπης ή λόγω λοίμωξης για την οποία υπάρχει ισχυρή υποψία ότι είναι γρίπη, ανεξάρτητα από τα υποκείμενα νοσήματα ή το ιστορικό εμβολιασμού.

**Πίνακας 5.** Άτομα υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη επιπλοκών γρίπης, τα οποία πρέπει να αρχίσουν αντι-ική θεραπεία.

- Μη εμβολιασμένα βρέφη ηλικίας 12-24 μηνών
- Άτομα με άσθμα ή άλλες χρόνιες πνευμονοπάθειες, όπως ΧΑΠ και κυστική ίνωση
- Άτομα με αιμοδυναμικά σημαντική καρδιακή νόσο
- Άτομα με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες
- Άτομα με νοσήματα που προκαλούν ανοσοκαταστολή ή άτομα υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία
- Άτομα με HIV λοίμωξη
- Άτομα που λαμβάνουν μακροχρόνια αγωγή με ασπιρίνη, π.χ. ΡΑ
- Άτομα με χρόνια μεταβολικά νοσήματα, π.χ. ΣΔ
- Άτομα με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια
- Άτομα με καρκίνο
- Άτομα με νευρομυικά νοσήματα, νοσήματα που προδιαθέτουν σε σπασμούς ή νοσήματα που επηρεάζουν την αποβολή εκκρίσεων του αναπνευστικού
- Άτομα >65 ετών
- Τρόφιμοι ιδρυμάτων μακράς φροντίδας, ανεξαρτήτως ηλικίας

Θα μπορούσε επίσης να χορηγηθεί θεραπεία τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά που πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

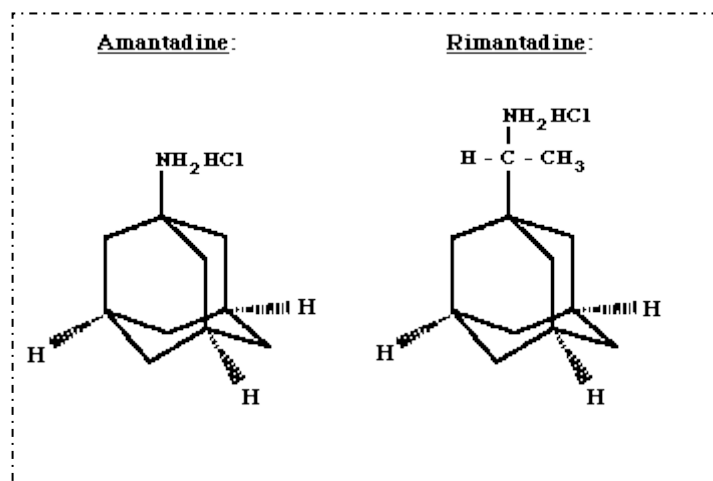
1. Εξωτερικοί ασθενείς υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη επιπλοκών, των οποίων η νόσος δεν βελτιώνεται, οι οποίοι έχουν θετικό εργαστηριακό αποτέλεσμα για γρίπη από ένα δείγμα που ελήφθη >48 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων.
2. Εξωτερικοί ασθενείς με εργαστηριακά επιβεβαιωμένη γρίπη ή λοίμωξη για την οποία υπάρχει ισχυρή υποψία ότι είναι γρίπη, που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου για επιπλοκές, των οποίων τα συμπτώματα έχουν αρχίσει <48 ώρες πριν την προέλευσή τους στο

γιατρό, οι οποίοι επιθυμούν να έχουν βραχύτερη διάρκεια νόσου και μείωση του κινδύνου για επιπλοκές ή που βρίσκονται σε στενή επαφή με άτομα υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη, δευτεροπαθώς, επιπλοκών γρίπης.

## 10.1 ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗ και ΡΙΜΑΝΤΑΔΙΝΗ

Η αμανταδίνη και το συγγενές της ριμανταδίνη ανήκουν στις αδαμαντάνες και είναι συνθετικές, υδατοδιαλυτές, πρωτογενείς αμίνες, με συμμετρική δομή. Εισήχθησαν στη θεραπευτική κατά τη δεκαετία του 60' και απετέλεσαν τα πρώτα φάρμακα με αντι-ϊική δράση. Είναι δραστικές μόνο κατά του ιού της γρίπης τύπου Α (225).

Οι αδαμαντάνες δρουν αναστέλλοντας το κανάλι μεταφοράς ιόντων της M2 πρωτεΐνης (90). Με την ενέργεια αυτή δεν επέρχονται αλλαγές στο pH του πρωτοπλάσματος, οι οποίες είναι απαραίτητες στο στάδιο της απέκδυσης, στο διαχωρισμό της μεμβρανικής πρωτεΐνης από το RNP κατά το αρχικό στάδιο της αναπαραγωγής του ιού και στο στάδιο της συναρμολόγησης των νέων ιών.



**Εικόνα 28.** Η δομή των αντι-ϊικών φαρμάκων αμανταδίνη και ριμανταδίνη.



Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα δύο φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν τόσο για θεραπεία, όσο και για προφύλαξη. Η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη είναι 70-90% αποτελεσματικές στην πρόληψη της νόσου που προκαλείται από τα κυκλοφορούντα στελέχη του ιού όταν χορηγείται προφυλακτικά σε υγιείς ενήλικες και παιδιά. Επίσης μειώνουν τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της νόσου όταν χορηγούνται μέσα σε 48 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων (7, 180).

Και τα δύο φάρμακα έχουν καλή βιοδιαθεσιμότητα, κατανέμονται ευρέως στον οργανισμό και απεκκρίνονται από τα νεφρά. Η τοξικότητά τους είναι δόσοεξαρτώμενη και αφορά κυρίως, το ΚΝΣ και την καρδιά. Γενικώς, η ριμανταδίνη είναι καλύτερα ανεκτή. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες από το ΚΝΣ αποδίδονται σε απελευθέρωση ντοπαμίνης από τους κεντρικούς νευρώνες και γι' αυτό η αμανταδίνη βρήκε εφαρμογή και στη θεραπεία της νόσου Parkinson. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες αφορούν διαταραχές του ύπνου, ευερεθιστότητα, τρόμο, πρόκληση σπασμών σε άτομα πάσχοντα από επιληψία, όπως και καρδιοτοξικότητα που συνίσταται σε πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας σε χρόνια χρήση και κακοηθών αρρυθμιών σε οξεία υπέρβαση δόσεως. Γενικώς, τα φάρμακα αυτά είναι καλύτερα ανεκτά όταν χορηγούνται για προφύλαξη παρά για θεραπεία (180).

Η συνιστώμενη δόση για την προφύλαξη είναι, και για τα δύο φάρμακα, 100mg ανά 12ωρο για όσο διάστημα υφίσταται η επιδημία, ενώ για θεραπεία, η μεν αμανταδίνη χορηγείται στην ίδια δόση για 10 ημέρες, η δε ριμανταδίνη σε δόση 150mg ανά 12ωρο επίσης για 10 ημέρες, αν και φαίνεται ότι ίδια αποτελέσματα επιτυγχάνονται με χορήγηση 150mg μόνο κατά την πρώτη ημέρα και στη συνέχεια με 100mg ανά 12ωρο (180).

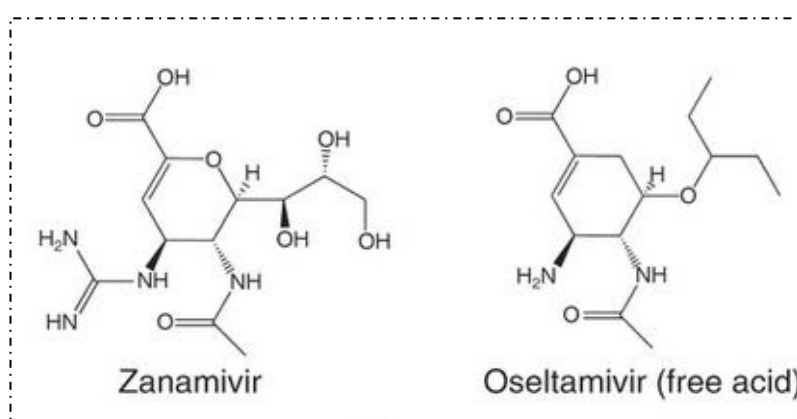
Η δυνατότητα ανάπτυξης αντοχής των ιών της γρίπης έχει ήδη διαπιστωθεί και θεωρείται διασταυρούμενη και για τα δύο φάρμακα (18). Ασθενείς υπό θεραπεία με αδαμαντάνες απεκκρίνουν ανθεκτικό ιό σε έως και 30% των περιπτώσεων μετά 2-5 ημέρες θεραπείας. Τα ανθεκτικά στελέχη είναι παθογόνα και προκαλούν κλινική εικόνα γρίπης, χωρίς όμως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεταδοτικότητα ή τοξικότητα (193). Την τελευταία

πενταετία παρατηρήθηκε υψηλή αντοχή, η οποία αφορούσε σε έως και 90% των κυκλοφορούντων στελεχών H3N2 την περίοδο 2005-2006. Έτσι, λόγω της προοδευτικά αυξανόμενης αντοχής, η χρήση τους έχει εγκαταλειφθεί και προτιμώνται οι αναστολείς της νευραμινιδάσης. Επειδή, τελευταία, όμως, παρατηρείται αντοχή των στελεχών της εποχικής γρίπης και σε αναστολείς της νευραμινιδάσης (ιδιαίτερα ο τύπος H1N1) η χρήση τους επανέρχεται (99).

## 10.2 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ

Η δεύτερη σημαντική κατηγορία φαρμάκων ενάντια στον ιό της γρίπης είναι οι αναστολείς της νευραμινιδάσης. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται η ζαναμιβίρη, η οσελταμιβίρη, η περαμιβίρη και η λανιναμιβίρη (2, 40, 180).

Τα φάρμακα αυτά δρουν αναστέλλοντας τη νευραμινιδάση, την επιφανειακή πρωτεΐνη του ιού που είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση των νεοπαραγόμενων ιικών σωματιδίων από το προσβεβλημένο κύτταρο και έτσι εμποδίζουν την αποκόλληση των νέων ιών από την επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Είναι δραστικά κατά των ιών της γρίπης τόσο τύπου Α, όσο και τύπου Β (92).



**Εικόνα 29.** Η δομή των αναστολέων της νευραμινιδάσης.

Η ζαναμιβίρη είναι ο πρώτος αναστολέας της νευραμινιδάσης που κυκλοφόρησε με την εμπορική ονομασία Relenza. Έχει πτωχή

βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα (2%) και γι' αυτό χορηγείται τοπικώς με εισπνοές **(145)**. Το 10-20% της χορηγούμενης δόσεως απορροφάται από τον αναπνευστικό βλεννογόνο.

Η οσελταμιβίρη (εμπορική ονομασία: Tamiflu) χορηγείται από το στόμα **(160)**, είτε ως χάπι είτε ως εναιώρημα. Έχει βιοδιαθεσιμότητα 80%, η οποία δεν επηρεάζεται από τη λήψη τροφής, ενεργοποιείται στο ήπαρ και κατανέμεται ικανοποιητικώς στους ιστούς και ιδιαιτέρως στο αναπνευστικό. Η οσελταμιβίρη δεν έχει δράση στο κυτόχρωμα P450 και δεν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα **(107)**.

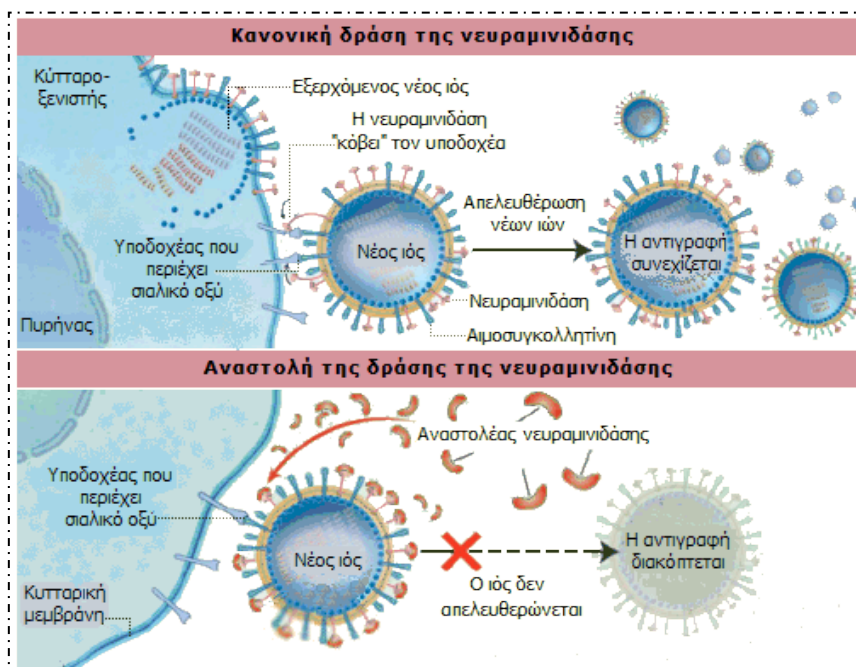
Και τα δύο φάρμακα έχουν νεφρική απέκκριση. Σε τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας, για μεν τη ζαναμιβίρη δεν απαιτείται αναπροσαρμογή της δόσης, ενώ για την οσελταμιβίρη απαιτείται αναπροσαρμογή σε άτομα με κάθαρση κρεατινίνης <30ml/min.

Η θεραπεία με τους αναστολείς της νευραμινιδάσης, οδηγεί σε μείωση της σοβαρότητας και σε βράχυνση της διάρκειας της νόσου κατά μία περίπου ημέρα. Σε ασθενείς άνω των 50 ετών καθώς και σε εκείνους με βαρύτερη νόσο το όφελος μπορεί να είναι μεγαλύτερο (2-3 ημέρες). Η συνιστώμενη θεραπεία και με τα δύο φάρμακα είναι πενθήμερη και πρέπει να αρχίζει εντός 2 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Η ζαναμιβίρη έχει εγκριθεί για θεραπεία ατόμων 7 ετών και άνω και χορηγείται σε δόση δύο εισπνοών των 5mg (σύνολο 10mg) ανά 12ωρο **(133)**. Η οσελταμιβίρη έχει εγκριθεί για θεραπεία ατόμων άνω του 1 έτους. Σε ενήλικες χορηγείται σε δόση 75mg per os, επίσης ανά 12ωρο, ενώ στα παιδιά με βάση το σωματικό τους βάρος **(29)**.

Τα δύο φάρμακα χρησιμοποιούνται και προληπτικά (η ζαναμιβίρη έχει εγκριθεί για ηλικίες 5 ετών και άνω, ενώ η οσελταμιβίρη για άτομα ηλικίας άνω του 1 έτους). Η ζαναμιβίρη χορηγείται σε δόση 10mg μία φορά την ημέρα, με εισπνοή, ενώ η οσελταμιβίρη, σε ηλικίες άνω των 13 ετών, χορηγείται σε δόση 75mg μία φορά την ημέρα για 10 ημέρες με αποτελεσματικότητα 70-85% **(28, 29, 239)**.

Η οσελταμιβίρη και η ζαναμιβίρη είναι γενικά καλά ανεκτές **(221, 222)**. Οι σημαντικότερες ανεπιθύμητες ενέργειες της οσελταμιβίρης είναι η ναυτία

(10%) και ο έμετος (9%). Συχνά αναφέρονται επίσης διάρροια, κοιλιακό άλγος και κεφαλαλγία. Σπάνια αναφέρονται ηπατίτιδα και αυξημένα ηπατικά ένζυμα, εξάνθημα, αλλεργικές αντιδράσεις και σύνδρομο Stevens – Johnson. Η ζαναμβίρη μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό των βρόγχων και ως εκ τούτου δεν συνιστάται σε ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα στα οποία μπορεί να συμβεί βρογχόσπασμος, όπως είναι το άσθμα και η ΧΑΠ. Σύμφωνα με τις συνταγογραφικές οδηγίες πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο με τη συσκευή Diskhaler που παρέχεται στη συσκευασία και όχι με nebulizers, αναπνευστήρες ή άλλες συσκευές χορήγησης αερολύματος (FDA) (29).



**Εικόνα 30.** Ο τρόπος δράσης των αναστολέων της νευραμινιδάσης.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η οσελταμιβίρη μπορεί να προκαλέσει νευροψυχιατρικά συμβάματα (αυτοκαταστροφικές τάσεις, delirium). Η πλειοψηφία των αναφορών αφορούσε παιδιά και εφήβους από την Ιαπωνία, όπου μέχρι και το 2007 γινόταν η μεγαλύτερη κατανάλωση οσελταμιβίρης (το 60% της παραγωγής) λόγω της γρίπης των πτηνών. Το γεγονός αυτό οδήγησε το Ιαπωνικό Υπουργείο Υγείας και τις αρμόδιες Ευρωπαϊκές Υπηρεσίες να

εκδόσουν σχετικές οδηγίες. Δεδομένου όμως ότι η ίδια η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί με ποικιλία νευρολογικών διαταραχών καθώς και διαταραχών της συμπεριφοράς (σπασμοί, delirium, ψευδαισθήσεις) δεν είναι βέβαιο κατά πόσο οι αναστολές της νευραμινιδάσης ευθύνονται άμεσα για αυτές τις νευροψυχιατρικές διαταραχές. Μέχρι να υπάρξουν περισσότερα δεδομένα το FDA συνιστά οι ασθενείς που λαμβάνουν το φάρμακο πρέπει να παρακολουθούνται για τυχόν ανάπτυξη παθολογικής συμπεριφοράς (FDA).

Η εμφάνιση στελεχών της γρίπης ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη είναι πλέον γεγονός (**140,147, 203**). Την περίοδο 2007-2008 το 24,3% των στελεχών της γρίπης A(H1N1) που απομονώθηκαν συνολικά στην Ευρώπη ήταν ανθεκτικά (**34**). Το ποσοστό αντοχής ποικίλει από 1% στην Ιταλία έως 67% στη Νορβηγία (**142**). Ενώ το 2008, σύμφωνα με το CDC το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών έφτασε στο 99,6%.

Η ανάπτυξη αντοχής φαίνεται ότι οφείλεται σε μια μεταλλαγή στη θέση 275 του γονιδίου της νευραμινιδάσης, που οδηγεί σε αντικατάσταση της ιστιδίνης με τυροσίνη (H275Y ή H274Y) και όχι στη χρήση της οσελταμιβίρης για τη θεραπεία της γρίπης, όπως συμβαίνει με τις αδαμαντάνες (**100, 105, 117, 252**). Σε περιπτώσεις ασθενών με ιό ανθεκτικό στην οσελταμιβίρη τους χορηγείται ζαναμιβίρη ή συνδυαστικό σχήμα με αδαμαντάνες (**150**).

Επίσης, μια μελέτη που έγινε την περίοδο 2006-2008 στην Αυστραλία και τη Νοτιοανατολική Ασία (**101**) έδειξε ότι ένα 2,3% των στελεχών της γρίπης A(H1N1) παρουσίαζε μια μεταλλαγή που προσέδιδε αντοχή στη ζαναμιβίρη, αλλά όχι στην οσελταμιβίρη. Η μεταλλαγή αυτή είναι μια αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 136 από τη λυσίνη (Q136K). Φαίνεται πως αυτή η μεταλλαγή παρατηρούταν σε ένα πολύ μικρό ποσοστό των ιών που κυκλοφορούσαν (<1%) και έγινε πιο σημαντική μετά από κυτταροκαλλιέργεια σε MDCK κύτταρα (**94**).

Εκτός των κλασικών αναστολέων της νευραμινιδάσης υπάρχουν και δύο νεότεροι, η περαμιβίρη και η λανιναμιβίρη. Η περαμιβίρη είναι ένα

παρεντερικώς (IV) χορηγούμενο φάρμακο το οποίο βρίσκεται στη Φάση III των κλινικών ερευνών. Έως τον Οκτώβριο του 2009, 1891 ασθενείς με εποχική γρίπη Α είχαν συμπεριληφθεί στις κλινικές δοκιμές και παρά τα πενιχρά αποτελέσματα το FDA εξέδωσε προσωρινή άδεια επείγουσας χρήσης της περαμιβίρης για τη θεραπεία νοσηλευόμενων ασθενών με δυνητικά θανατηφόρο, επιβεβαιωμένη ή ύποπτη, λοίμωξη από τον ιό της νέας γρίπης Α H1N1 2009, στους οποίους οι υπάρχουσες θεραπευτικές μέθοδοι ήταν αναποτελεσματικές. Αυτή η επείγουσα άδεια έληξε στις 23 Ιουνίου 2010.

Τα δεδομένα ασφάλειας της περαμιβίρης είναι περιορισμένα. Σε νοσηλευόμενους ασθενείς που έλαβαν το φάρμακο για 5 ημέρες, ανεπιθύμητες ενέργειες καταγράφηκαν στο 54% των ασθενών. Συγκριτικά στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν οσελταμιβίρη ανεπιθύμητες ενέργειες παρατηρήθηκαν στο 41% των ασθενών. Σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες παρατηρήθηκαν στο 4% των ασθενών που έλαβαν 200mg περαμιβίρης ημερησίως και στο 17% των ασθενών που έλαβαν 400mg ημερησίως. Διάρροια και ψυχιατρικές διαταραχές καταγράφηκαν πιο συχνά στους ασθενείς που έλαβαν περαμιβίρη σε σχέση με αυτούς που έλαβαν οσελταμιβίρη. Όσον αφορά τις εργαστηριακές παραμέτρους, οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται με γενική αίματος και ούρων, ηλεκτρολύτες, κρεατινίνη και ηπατικά ένζυμα .

Τέλος η λανιναμιβίρη (CS-8958) είναι ένας καινούριος εισπνεόμενος αναστολέας της νευραμινιδάσης, ο οποίος βρίσκεται στη Φάση III των κλινικών δοκιμών (249).

### **10.3 ΡΙΜΠΑΒΙΡΙΝΗ**

Η ριμπαβιρίνη είναι ένα συνθετικό νουκλεοσιδικό ανάλογο που φάνηκε ότι αναστέλλει την αναπαραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας DNA και RNA ιών, συμπεριλαμβάνοντας τους ιούς της γρίπης τύπου Α και τύπου Β (207). Δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος του ιού, μέσω αλλαγών στο μεταβολισμό του κυττάρου. Είναι καλά ανεκτή ακόμα και σε συγκέντρωση 200 φορές μεγαλύτερη απ' αυτή που είναι απαραίτητη για την αναστολή της ιικής αναπαραγωγής. Έχουν γίνει αναφορές για

ανοσοκατασταλτική δράση, που είναι όμως πλήρως αντιστρεπτή μετά τη διακοπή της θεραπείας. Η ριμπαβιρίνη χρησιμοποιείται συνήθως στη θεραπεία ασθενών με ιό ανθεκτικό στην οσελταμιβίρη.

## **11. ΠΡΟΛΗΨΗ**

Δύο μέτρα είναι διαθέσιμα για την πρόληψη της γρίπης: η ανοσοπροφύλαξη με τα αντιγριπικά εμβόλια και η χημειοπροφύλαξη με τα αντι-ιικά φάρμακα (για την χημειοπροφύλαξη βλέπε κεφ. 10 Θεραπεία). Το αποτελεσματικότερο μέσο πρόληψης, βέβαια, είναι ο εμβολιασμός.

Η αιμοσυγκολλητίνη και η νευραμινιδάση είναι οι δύο κύριοι στόχοι των προστατευτικών αντισωμάτων του οργανισμού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα αντισώματα έναντι της ΗΑ εξουδετερώνουν τον ιό και μειώνουν έτσι τη μολυσματικότητα, ενώ τα αντισώματα έναντι της ΝΑ μειώνουν τη σοβαρότητα της νόσου. Τα αντιγριπικά εμβόλια επομένως πρέπει να προκαλούν, και το κάνουν, μια ειδική για το στέλεχος του ιού αντι-ΗΑ ανοσολογική απόκριση. Ο τίτλος των αντισωμάτων του ορού που προκαλούν αναστολή της αιμοσυγκόλλησης είναι ο δείκτης που χρησιμοποιείται για να εξακριβωθεί η ανοσολογική κατάσταση του ατόμου: τίτλοι 1/40 στον ορό αντιπροσωπεύουν το επίπεδο των αντισωμάτων στο οποίο το 50% του πληθυσμού είναι προστατευμένο απέναντι στη λοίμωξη που προκαλείται από ομόλογους Α και Β ιούς. Η ανοσοποίηση με ένα αντιγριπικό εμβόλιο δεν παρέχει προστασία απέναντι στη λοίμωξη με ιούς διαφορετικού υποτύπου, αφού δεν υπάρχει διασταυρούμενη αντίδραση ανάμεσα στην ΗΑ των δύο ιών.

Έτσι, κάθε Φεβρουάριο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, βασιζόμενος σε δεδομένα από συνεργαζόμενα κέντρα και εργαστήρια, κάνει συστάσεις που αφορούν τις αντιγονικές ιδιότητες της ΗΑ και της ΝΑ των στελεχών της γρίπης, που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή των αντιγριπικών εμβολίων της επόμενης χρονιάς, ώστε να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερες με αυτές των στελεχών που αναμένεται να κυκλοφορήσουν το χειμώνα.

Τα εμβόλια κατά της γρίπης που κυκλοφορούν περιλαμβάνουν είτε ολόκληρους εξασθενημένους ιούς της γρίπης (whole ή live attenuated virus vaccines), είτε αδρανοποιημένα τμήματα και υπομονάδες του ιού (split ή



inactivated subunit virus vaccines). Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες τα εμβόλια που κυκλοφορούν είναι τριδύναμα και περιλαμβάνουν δύο υπότυπους για τη γρίπη Α (H1N1, H3N2) και ένα στέλεχος για τη γρίπη Β.

## **11.1 ΤΡΙΔΥΝΑΜΟ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΜΒΟΛΙΟ**

Σήμερα, χρησιμοποιούνται συχνότερα τα εμβόλια που αποτελούνται από αδρανοποιημένο ιό (ολοκυτταρικά) ή τμήματα και υπομονάδες του ιού (ακυτταρικά) (27). Τα στελέχη του ιού που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των εμβολίων καλλιεργούνται σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας. Τα αυγά επωάζονται για 2-3 ημέρες και στη συνέχεια τα αλλαντοϊκά υγρά φυγοκεντρώνται για να συγκεντρωθούν και να καθαριστούν τα σωματίδια του ιού και στη συνέχεια αδρανοποιούνται με φορμαλίνη ή β-προπιολακτόνη. Τα τρία στελέχη του ιού αναμιγνύονται ώστε η κάθε δόση του εμβολίου να περιλαμβάνει 15mg HA από κάθε ιό.

Αρχικά χρησιμοποιούνταν ολόκληρος ο ιός, όμως φάνηκε ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες του εμβολίου μειώνονται με την επεξεργασία του ιού με απορροπαντικά που τον διασπούν, δίνοντας τα εμβόλια από τμήματα του ιού. Ακόμη λιγότερες παρενέργειες παρατηρούνται με εμβόλια που χρησιμοποιούν μόνο υπομονάδες του ιού. Αυτά περιέχουν μόνο τα επιφανειακά αντιγόνα HA και NA του ιού.

Τα εμβόλια αυτά είναι αποτελεσματικά και προστατεύουν απ' τη νόσο, που προκαλεί στέλεχος παρόμοιο με αυτό του εμβολίου, έως και το 90% των υγιών εμβολιαζόμενων που είναι μικρότεροι από 65 ετών, όμως είναι μόνο 30-40% αποτελεσματικό στην πρόληψη νόσου όσον αφορά άτομα άνω των 65 ετών. Σε αυτά τα άτομα το εμβόλιο μειώνει κατά 50-60% την πιθανότητα εισαγωγής στο νοσοκομείο και κατά 80% προλαμβάνει το θάνατο εξαιτίας της γρίπης (228).

Το εμβόλιο πρέπει να χορηγείται κάθε χρόνο το φθινόπωρο (στο Βόρειο Ημισφαίριο), αλλά μπορεί να δοθεί και το χειμώνα ή σε περιόδους

εξάρσεως ή επιδημίας. Ενίεται μία δόση 0,5ml ενδομυϊκά στο δελτοειδή μυ (για παιδιά 6-35 μηνών η δόση είναι 0,25ml). Τα αντισώματα αυξάνονται σε περίπου δύο εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό και η ανοσία διαρκεί περίπου ένα έτος. Δεν χρειάζεται δεύτερη δόση μέσα στον ίδιο χρόνο.

Το εμβόλιο συνιστάται **(27, 57, 159)** :

- 1) Σε άτομα μεγαλύτερα των 50 ετών.
- 2) Σε άτομα υψηλού κινδύνου με χρόνια υποκείμενα νοσήματα όπως: πνευμονικό εμφύσημα, χρόνια βρογχίτιδα, βρογχικό άσθμα, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, αλκοολισμό και αλκοολική κίρρωση, σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια, σπληνεκτομή και λειτουργική ασπληνία π.χ. αιμοσφαιρινοπάθεια (για την αποφυγή των δευτερογενών βακτηριακών λοιμώξεων) και ανοσοκαταστολή από οποιαδήποτε αιτία π.χ. κακοήθεια, μεταμόσχευση, ανοσοκατασταλτική θεραπεία, αντι-TNF παράγοντες, HIV λοίμωξη. Χορηγείται 6 μήνες μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών.
- 3) Σε άτομα με νευρομυϊκές διαταραχές π.χ. άνοια, σπασμούς, βλάβες νωτιαίου μυελού, που είναι επιρρεπή να παρουσιάσουν διαταραχές της αναπνευστικής λειτουργίας και πνευμονία εξ εισροφίσεως.
- 4) Σε εγκύους κατά τη διάρκεια εξάρσεως ή επιδημίας, καθώς και σε γυναίκες που προβλέπεται να μείνουν έγκυες κατά την περίοδο της γρίπης.
- 5) Σε όλους τους υγειονομικούς.
- 6) Στους τροφίμους και στους υπαλλήλους γηροκομείων και κέντρων αποκατάστασης, καθώς και σε άτομα που παρέχουν φροντίδα σε ηλικιωμένους κατ' οίκον, σε άτομα υψηλού κινδύνου με χρόνια υποκείμενα νοσήματα και σε παιδιά προσχολικής ηλικίας.
- 7) Σε ανεμβολιαστούς διεθνείς ταξιδιώτες (η περίοδος έξαρσης της γρίπης στο Ν. Ημισφαίριο είναι από τον Απρίλιο έως το Σεπτέμβριο, ενώ στην τροπική ζώνη διαρκεί όλο το χρόνο).
- 8) Στα παιδιά και στους εφήβους που λαμβάνουν χρονίως ασπιρίνη, προς αποφυγήν του συνδρόμου Reye.

9) Στους επαγγελματίες που ασχολούνται με πουλερικά π.χ. κτηνιάτρους.

Αντενδείξεις εμβολιασμού αποτελούν: i) το ιστορικό σοβαρής αλλεργικής αντίδρασης ή εμφάνισης συνδρόμου Guillain-Barré μετά από προηγούμενο εμβολιασμό, ii) η αλλεργία στα αυγά, iii) κατά τη διάρκεια οξείας εμπόρετης νόσου.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες του εμβολίου είναι κυρίως τοπικές και περιλαμβάνουν ευαισθησία, ερύθημα και σκλήρυνση στην περιοχή της ένεσης. Αυτές οι αντιδράσεις είναι παροδικές, γενικά διαρκούν 1-2 ημέρες και παρατηρούνται σε ένα 15-20% των εμβολιασθέντων. Μη ειδικά συστηματικά συμπτώματα, όπως πυρετός, ρίγη, κακουχία και μυαλγία αναφέρονται σε λιγότερο από 1%. Εμφανίζονται μέσα σε 6-12 ώρες από τον εμβολιασμό και επίσης διαρκούν 1-2 ημέρες. Άμεσες αντιδράσεις υπερευαισθησίας, όπως κνίδωση, αγγειοοίδημα, αλλεργικό άσθμα ή συστηματική αναφυλαξία, παρουσιάζονται σπανιότατα, συνήθως σε άτομα με υπερευαισθησία σε κάποιο από τα συστατικά του εμβολίου (η πλειοψηφία των περιπτώσεων οφείλεται στην πρωτεΐνη του αυγού). Τέλος το εμβόλιο του 1976 έχει συσχετισθεί με μία αύξηση της συχνότητας του συνδρόμου Guillain-Barré, όμως είναι δύσκολο να τεκμηριωθεί η αυτή συσχέτιση αφού η επίπτωση του συνδρόμου είναι πολύ μικρή στο γενικό πληθυσμό. Τα άτομα όμως με προηγούμενο ιστορικό του συνδρόμου εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο επανεμφάνισης μετά από τον εμβολιασμό.

## **11.2 ΖΩΝΤΑΝΟ ΕΞΑΣΘΕΝΗΜΕΝΟ ΕΜΒΟΛΙΟ**

Το εμβόλιο με ζωντανό εξασθενημένο ιό πήρε έγκριση για χρήση στις Η.Π.Α. το 2003. Περιλαμβάνει τα ίδια στελέχη του ιού με το αδρανοποιημένο εμβόλιο (τύπου A, H1N1 και H3N2, και τύπου B) (27). Οι ιοί είναι προσαρμοσμένοι στο ψύχος και αναπαράγονται αποτελεσματικά στο ρινοφαρυγγικό βλεννογόνο. Οι ιοί που χρησιμοποιούνται για το εμβόλιο

επίσης καλλιεργούνται σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, επομένως το τελικό προϊόν περιέχει πρωτεΐνη αυγού.

Μελέτες έδειξαν ότι το εμβόλιο όσον αφορά τα παιδιά είναι αποτελεσματικό κατά 87% έναντι στη γρίπη και μειώνει κατά 27% τα περιστατικά οξείας μέσης ωτίτιδας. Στους ενήλικες μειώνει κατά 20-24% τη σοβαρότητα της νόσου και κατά 41-45% της ημέρες λήψης αντιβιοτικών.

Χορηγείται ενδορρινικά άπαξ ετησίως σε υγιή άτομα 2-49 ετών, που δεν έρχονται σε επαφή με βαρέως ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Αντενδείκνυται σε παιδιά μικρότερα των 2 ετών, σε άτομα μεγαλύτερα των 50 ετών, σε όσους πάσχουν από χρόνια νοσήματα, όπως νόσους του αναπνευστικού ή καρδιαγγειακού συστήματος, σακχαρώδη διαβήτη, νεφρική ανεπάρκεια, αιμοσφαιρινοπάθεια, στα παιδιά και στους εφήβους που λαμβάνουν χρονίως ασπιρίνη, προς αποφυγήν του συνδρόμου Reye, σε άτομα με ανοσοκαταστολή από οποιαδήποτε αιτία, καθώς και σε εγκύους. Αυτά τα άτομα πρέπει να εμβολιάζονται με το αδρανοποιημένο εμβόλιο. Επίσης αντενδείκνυται σε άτομα με ιστορικό σοβαρής αλλεργικής αντίδρασης στο αυγό ή σε άλλα συστατικά του εμβολίου καθώς και σε άτομα που εμφάνισαν σύνδρομο Guillain-Barré μετά από προηγούμενο εμβολιασμό.

Ανεπιθύμητες ενέργειες του εμβολίου στα παιδιά είναι η ρινόρροια και ο πονοκέφαλος, όμως η συχνότητά τους δεν είναι σημαντικά διαφορετική από αυτή που παρατηρείται σε όσους εμβολιάστηκαν με placebo. Σε παιδιά 6-23 μηνών, όμως, παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης συριγμού. Στους ενήλικες, ένα ποσοστό 10-40% των εμβολιασθέντων (ποσοστό 3-10% υψηλότερο από όσους έλαβαν placebo) εμφάνισε βήχα, ρινόρροια, ρινική συμφόρηση, κυνάγχη και ρίγη. Δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμφάνισης συνδρόμου Guillain-Barré.

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν:

- α) η εργαστηριακή διάγνωση και τυποποίηση των ιών της γρίπης, σε ασθενείς με λοίμωξη του αναπνευστικού,
- β) ο έλεγχος των ιών, που απομονώθηκαν από επιλεγμένα δείγματα, για την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγής που προσδίδει αντοχή σε αντιικό φάρμακο και για την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγής που σχετίζεται με πρόσδεση του ιού της γρίπης σε διαφορετικό είδος υποδοχέων,
- γ) η επιδημιολογική παρατήρηση των στελεχών της γρίπης που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, σε ειδικές ομάδες ασθενών (παιδιά, ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ασθενείς με ανοσοκαταστολή).
- δ) συσχέτιση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τα αποτελέσματα της ιικής αναζήτησης , ώστε να διευκολύνεται ο κλινικός γιατρός στην εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς, πριν την παραλαβή των εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΑ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ειδικό Εργαστήριο Ιολογίας του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου γρίπης (από Οκτώβριο 2010 έως και Μάρτιο 2011) εξετάστηκαν 1215 δείγματα από ασθενείς με πιθανή λοίμωξη από τον ιό της γρίπης. Τα δείγματα ήταν ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα και εκπλύματα, καθώς και υγρό από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), από ασθενείς των οποίων το ιστορικό και η κλινική εικόνα συνηγορούσαν υπέρ πιθανής λοίμωξης από τον ιό της γρίπης, από διάφορα νοσοκομεία των Αθηνών.

Τα δείγματα μεταφέρονταν στο Ειδικό Εργαστήριο Ιολογίας και φυλάσσονταν στους 4°C, μέχρι την επεξεργασία του δείγματος. Σε όλα τα δείγματα η απομόνωση του γενετικού υλικού έγινε εντός 24 ωρών από τη λήψη και στη συνέχεια, μετά τον πρώτο έλεγχο για την απομόνωση ή όχι ιού της γρίπης, το γενετικό υλικό φυλάχθηκε στους -70°C, μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

Για κάθε δείγμα συλλέχθηκαν επιδημιολογικά στοιχεία, με έμφαση την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα του ασθενούς, το ιστορικό εμβολιασμού και λοιμώξεων, τα συμπτώματα της νόσου, τις επιπλοκές καθώς και υποκείμενες καταστάσεις που καθιστούν τον οργανισμό ευάλωτο στον ιό της γρίπης.

## **ΣΥΝΟΔΕΥΤΙΚΟ ΔΕΛΤΙΟ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Αριθμός δείγματος :..... Ημ/νια Λήψης Δείγματος : .....

Είδος Δείγματος : Φαρυγγικό Επίχρισμα , BAL , Άλλο .....

**ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΣΘΕΝΟΥΣ :** Αρχικά ονόματος ασθενούς : .....

Ηλικία : ..... Φύλο :  Άρρεν  Θήλυ

Κατοικία : Νομός : ..... Πόλη/Χωριό : .....

Έχει αλλοδαπή εθνικότητα ;  Όχι  Ναι → Χώρα: .....

### **ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥ & ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ**

Εμβολιασμός για εποχική γρίπη τη φετινή περίοδο;  Όχι  Ναι

Εμβολιασμός για πνευμονιόκοκκο κατά τα τελευταία 5 έτη;  Όχι  Ναι

Εμβολιασμός για τη νέα γρίπη H1N1;  Όχι  Ναι-1 δόση  Ναι-2 δόσεις

Λοίμωξη από τον ιό της νέας γρίπης;  Όχι  Ναι

Πρόσφατες λοιμώξεις :  Όχι  Ναι

Ασθενής στο κοντινό περιβάλλον:  Όχι  Ναι

Λήψη αντιβιοτικών το τελευταίο δίμηνο;  Όχι  Ναι → ποιο; .....

### **ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Ημερομηνία έναρξης συμπτωμάτων: .....

Συμπτώματα : Πυρετός  → Μέγιστος πυρετός : .....

Αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων  Βήχας  Καταρροή  Κεφαλαλγία

Φαρυγγαλγία  Μυαλγίες  Αρθραλγίες  Καταβολή  Έμετος

Άλγος ιγμορείων  Διάρροια  Αναπνευστική Δυσχέρεια

Επιπλοκές :  Όχι  Ναι → Ποια; .....

**Υποκείμενες καταστάσεις :**

Χρόνιο νόσημα αναπνευστικού  Μεταβολικό νόσημα

Χρόνιο καρδιαγγειακό νόσημα  Νευρολογικό ή νευρομυϊκό νόσημα

Χρόνια νεφρική ή ηπατική διαταραχή  Εγκυμοσύνη

Ανοσοκαταστολή  Παχυσαρκία



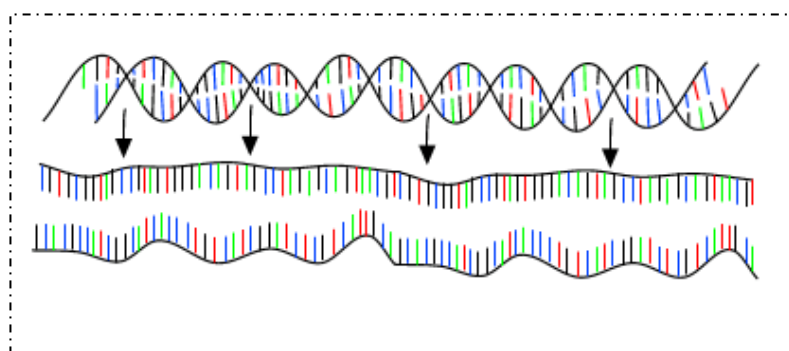
## 2. 2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2. 2. 1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια *in vitro* μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την αναλυτική μελέτη της δομής και της λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων. Ανακαλύφθηκε το 1985 από τον Kary Mullis, ο οποίος βραβεύτηκε το 1993 με το Νόμπελ Χημείας. Πρόκειται ουσιαστικά για μια μέθοδο που επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση τμημάτων νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) σε σύντομο χρόνο.

Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler) και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων αλυσίδων, πιστών αντιγράφων του αρχικού μορίου.

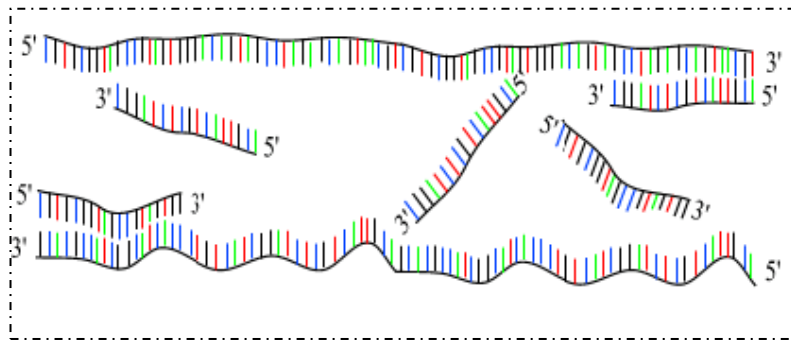
Το πρώτο στάδιο αφορά την αποδιάταξη του DNA-στόχου (denaturation), δηλαδή τον αποχωρισμό των δύο αλυσίδων του δίκλωνου μορίου DNA. Για να αποχωριστούν οι δύο αλυσίδες μεταξύ τους, απαιτείται η κατάργηση των δεσμών υδρογόνου που συνδέουν τις βάσεις τους, κάτι που επιτυγχάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες (90-97°C).



**Εικόνα 31.** Στάδιο 1, αποδιάταξη του DNA.

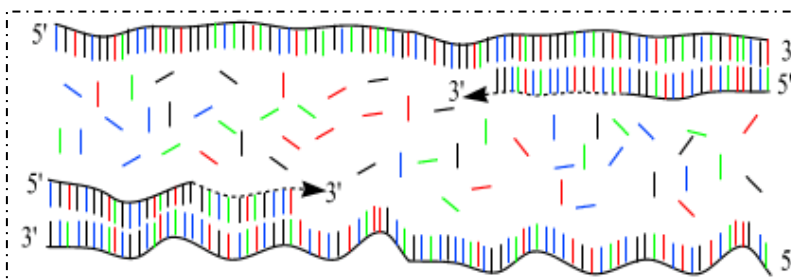
Το δεύτερο στάδιο αφορά στην πρόσδεση (υβριδισμό) των εκκινητών πάνω στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA (annealing). Οι εκκινητές

(primers) είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια σχεδιασμένα για να συνδέονται με τις συμπληρωματικές τους βάσεις στα τμήματα του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Από αυτούς θα ξεκινήσει η παραγωγή της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η αντίδραση της πρόσδεσης των εκκινητών απαιτεί θερμοκρασίες 40-60°C.



**Εικόνα 32.** Στάδιο 2, πρόσδεση (υβριδισμός) των εκκινητών στο DNA.

Το τρίτο στάδιο αφορά στη σύνθεση των δύο συμπληρωματικών αλυσίδων (επιμήκυνση - extension). Η σύνθεση των δύο νέων μορίων από τις αρχικές αλυσίδες γίνεται τόσο προς την κατεύθυνση 5'→3', όσο και προς την αντίθετη κατεύθυνση 3'→5' και προϋποθέτει τη δράση μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης, η οποία προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) στον εκκινητή. Η θερμοκρασία στην οποία διεξάγεται το στάδιο αυτό είναι 72°C.

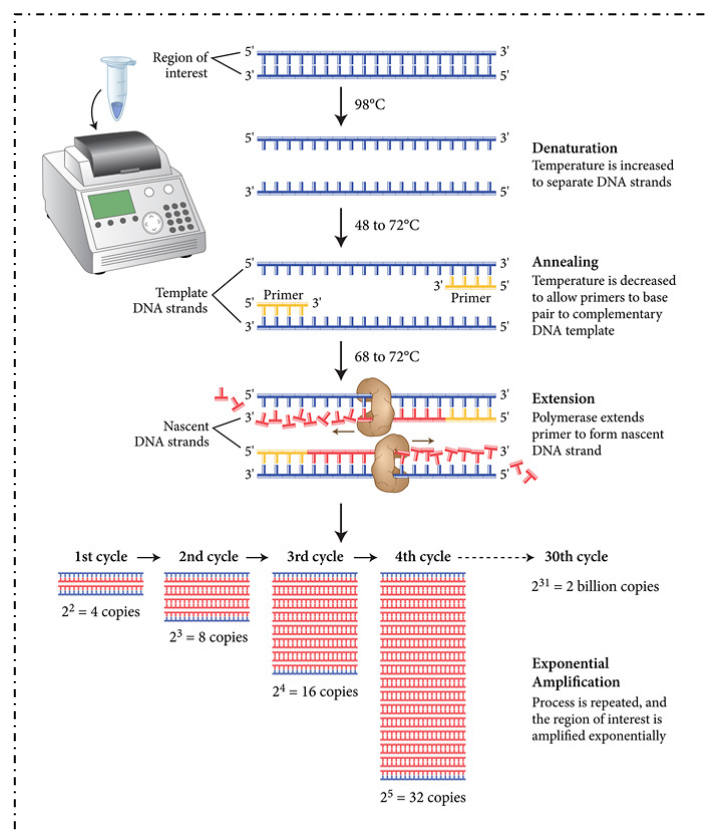


**Εικόνα 33.** Στάδιο 3, αντίδραση επιμήκυνσης.

Οι παραπάνω αντιδράσεις επαναλαμβάνονται συνήθως για 30 με 40 φορές (κύκλοι), αν και ο αριθμός των κύκλων έχει μεγάλο εύρος διακύμανσης.

Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα στον επόμενο, ο αριθμός των τμημάτων DNA διπλασιάζεται με το τέλος κάθε κύκλου. Έτσι μετά το πέρας της συνολικής ενίσχυσης το αρχικό μόριο DNA που χρησιμοποιήθηκε έχει αυξηθεί λογαριθμικά. Η αύξηση αυτή περιγράφεται από τον τύπο  $N=N_0 \times 2^n$ , όπου N: ο αριθμός των μορίων μετά την περάτωση της ενίσχυσης,  $N_0$ : ο αρχικός αριθμός των μορίων και n: ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης. Έτσι, παραδείγματος χάριν, μετά από 20 κύκλους ενίσχυσης η απόδοση είναι γύρω στο 1 εκατομμύριο αντίγραφα της αρχικής αλληλουχίας ( $2^{20}$  αντίγραφα).

Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτρέπει την ενίσχυση και δημιουργία ενός πλήθους αντιγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου.



Εικόνα 34. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Για την *in vitro* DNA σύνθεση, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης απαιτούνται: ένα δίκλωνο μόριο DNA, μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, ένα ζεύγος εκκινητών, ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου και ένα ρυθμιστικό διάλυμα.

- **DNA - στόχος :**

Απαραίτητη προϋπόθεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι η γνώση της αλληλουχίας του γονιδίου που επιθυμούμε να ενισχύσουμε ώστε να μπορούν να σχεδιαστούν οι εκκινητές.

- **Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση :**

Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (*Thermus Aquaticus* DNA Polymerase, Taq DNA Polymerase) είναι ένα ένζυμο που συνδυάζει την ικανότητα αντιγραφής του DNA με την αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι ιδιότητές της αυτές επιτρέπουν τη χρήση της στη διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, καθώς παραμένει ενεργή κατά το στάδιο της αποδιάταξης του DNA, κατά το οποίο οι θερμοκρασίες προσεγγίζουν τη θερμοκρασία βρασμού του νερού. Αντίθετα, σε τέτοιες υψηλές θερμοκρασίες, οι υπόλοιπες πολυμεράσες απενεργοποιούνται.

Γενικώς οι πολυμεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση δίκλωνου DNA από μερικώς δίκλωνο DNA, προσθέτοντας ελεύθερα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Τα ένζυμα αυτά προσθέτουν νουκλεοτίδια μόνο σε προϋπάρχον 3'-OH άκρο, οπότε δεν μπορούν να ξεκινήσουν *de novo* τη σύνθεση της νέας αλυσίδας DNA. Επομένως, για την έναρξη της σύνθεσης της νέας αλυσίδας DNA χρειάζονται ένα τμήμα (εκκινητή - primer) στο οποίο θα προσθέσουν το πρώτο νουκλεοτίδιο. Επίσης απαιτούνται ιόντα μαγνησίου ως συνένζυμο. Η Taq DNA πολυμεράση απομονώθηκε για πρώτη φορά από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο αναπτύσσεται κοντά σε θερμές πηγές.

Σήμερα υπάρχουν πλέον αρκετές τροποποιήσεις του ενζύμου αυτού, με στόχο την ανώτερη ποιότητα αντιγραφής και παραγωγής του επιθυμητού DNA.

▪ **Εκκινητές (primers) :**

Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, με μέγεθος περίπου 15 έως 30 βάσεις. Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων είναι συμπληρωματική του τμήματος της αλυσίδας, από το οποίο επιθυμούμε να αρχίσει η αντιγραφή. Η αλληλουχία τους πρέπει να είναι μοναδική, ώστε να επιτευχθεί 100% ειδικότητα ως προς το αποτέλεσμα της ενίσχυσης.

Για θερμοδυναμικούς λόγους, συνιστάται το περιεχόμενο των εκκινητών σε γουανίνη και κυτοσίνη να κυμαίνεται από 40 έως 60%. Επίσης είναι πολύ σημαντικό, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ζεύγους των εκκινητών να επιτρέπουν εκλεκτική ενίσχυση με υψηλή ειδικότητα. Έτσι, κατά το σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι εξής παράμετροι:

- Η ελεύθερη ενέργεια του εκκινητή ως προς την αλυσίδα - στόχο, η οποία πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, καθώς η ενέργεια αυτή καθορίζει την σταθερότητα της σύνθεσης μεταξύ εκκινητή και αλυσίδας - στόχου.
- Οι θερμοκρασίες υβριδισμού του ζεύγους των εκκινητών με την αλυσίδα-στόχο, οι οποίες πρέπει να είναι παραπλήσιες για τους δύο εκκινητές.
- Η παρουσία περιοχών με δευτεροταγείς δομές τόσο στα τμήματα των εκκινητών, όσο και στην αλυσίδα-στόχο, η οποία αναστέλλει την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, καθώς εμποδίζει τη σύνθεση της DNA πολυμεράσης.
- Η συγκέντρωση των εκκινητών, οι οποίοι πρέπει να βρίσκονται σε περίσσεια κατά τη διάρκεια όλης της αντίδρασης. Η συγκέντρωσή τους, όμως, πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα, καθώς υψηλή

συγκέντρωση έχει ως αποτέλεσμα φτωχή απόδοση προϊόντος, ενώ χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την ευαισθησία της μεθόδου.

- Η καθαρότητα και η χημική σταθερότητα και ακεραιότητα των εκκινητών. Συνιστάται η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων μέγιστης καθαρότητας και ύψιστης χημικής σταθερότητας και ακεραιότητας.

- **Ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτιδία (dNTPs) :**

Τα ελεύθερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτιδία (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη) είναι τα δομικά μονομερή για τον σχηματισμό των νέων αλυσίδων, κατά τη διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η συγκέντρωση των dNTPs πρέπει να βρίσκεται πάντα σε περίσσεια κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και να είναι ίση για όλα τα dNTPs.

- **Ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) :**

Τα ιόντα μαγνησίου κυρίως προσφέρονται στη μορφή  $MgCl_2$ .

Το μαγνήσιο αντιδρά στην ειδικότητα και ευαισθησία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα - συνένζυμο της DNA πολυμεράσης και επίσης σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA.

Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου καθορίζει τα επίπεδα ενεργότητας της πολυμεράσης και πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα, καθώς χαμηλή συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη απόδοση προϊόντος, ενώ υψηλή συγκέντρωση προκαλεί την παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και επομένως χαμηλή ειδικότητα.

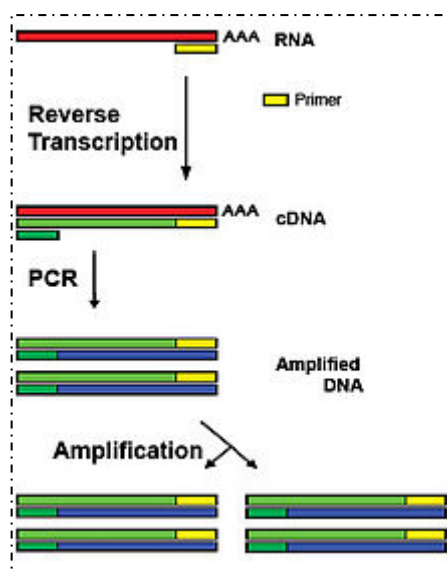
- **Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) :**

Τα ρυθμιστικά διαλύματα, που συνιστώνται για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι υδατικά διαλύματα αλάτων και χημικών ουσιών (συνδιαλυτών), που αυξάνουν την ικανότητα

αποδιάταξης του DNA και διευκολύνουν την υβριδοποίηση των εκκινητών και τη δράση της πολυμεράσης.

## **2. 2. 2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗ (RT-PCR)**

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση, το γενετικό υλικό, που επιθυμούμε να ενισχύσουμε είναι RNA αντί για DNA. Έτσι, πριν τα υπόλοιπα στάδια της PCR, όπως αυτά περιγράφηκαν παραπάνω, διεξάγεται ένα στάδιο μεταγραφής του RNA σε DNA ( αντίστροφη μεταγραφή - Reverse Transcription - RT). Στο στάδιο αυτό, σε θερμοκρασία περίπου 45°C, γίνεται η σύνθεση ενός συμπληρωματικού μορίου DNA (cDNA) με μήτρα το αρχικό RNA. Η σύνθεση αυτή γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία απομονώνεται από ρετροϊούς. Το cDNA που σχηματίζεται χρησιμοποιείται για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος μέσω των υπολοίπων σταδίων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η RT-PCR χρησιμοποιείται είτε για ενίσχυση τμημάτων mRNA για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων, είτε για την ανίχνευση RNA ιών.

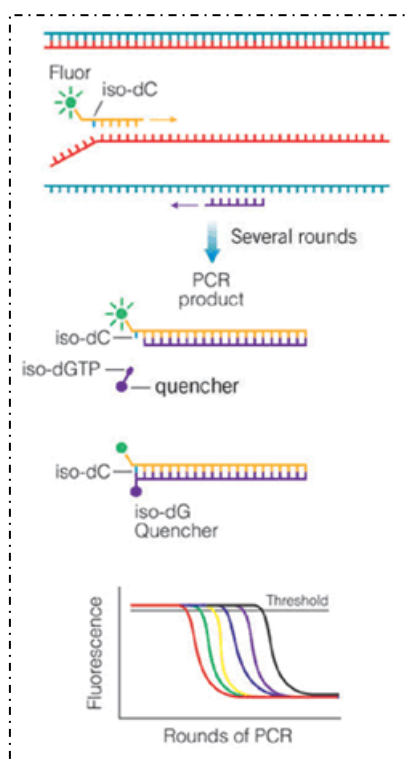


Εικόνα 35. Αρχή RT-PCR.

### 2. 2. 3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME PCR)

Η μέθοδος της Real Time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία - στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτέλεσε η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο.

Η λειτουργία της τεχνολογίας Real Time PCR βασίζεται στην χρήση μηχανισμών ανίχνευσης, με τη βοήθεια ειδικών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως καθώς και ιχνηλατών (probes) αλλά και στις ειδικά διαμορφωμένες συσκευές Real Time PCR που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή της. Οι συσκευές αυτές βασίζονται τόσο στο σύστημα ανίχνευσης που διαθέτουν, για την ανίχνευση του σήματος που εκπέμπει ο εκάστοτε μηχανισμός ανίχνευσης, όσο και στο ειδικό λογισμικό με το οποίο αναλύονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

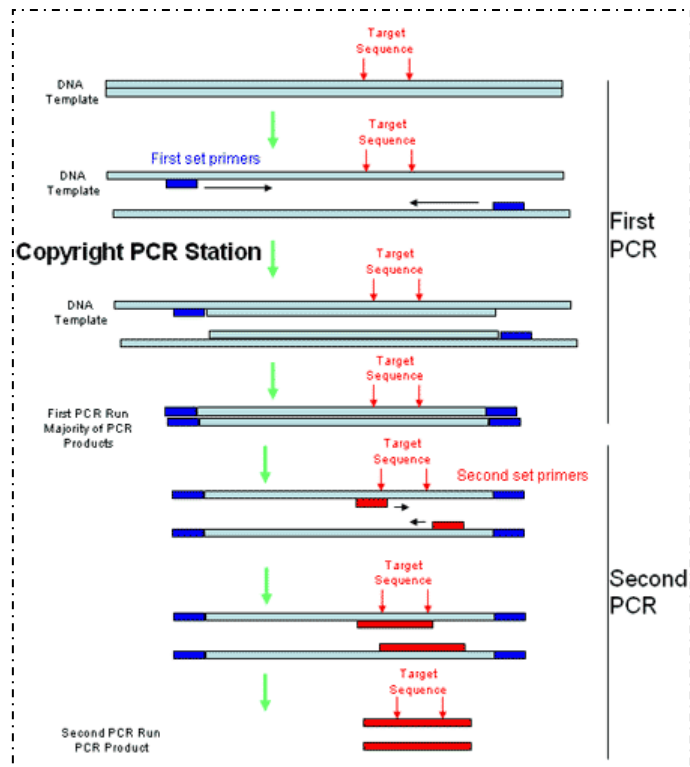


Εικόνα 36. Η αρχή της Real Time PCR.



## 2. 2. 4. ΕΜΦΩΛΕΑΖΟΥΣΑ ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (NESTED PCR)

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο διαδοχικές αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη αντίδραση χρησιμοποιείται ένα ζευγάρι εκκινητών όπως στην συμβατική PCR, ενώ στην δεύτερη χρησιμοποιούνται εκκινητές (nested primers) που ενώνονται σε τμήμα της αλληλουχίας του προϊόντος της πρώτης PCR, δηλαδή τα προϊόντα της πρώτης αντίδρασης χρησιμοποιούνται ως αλληλουχία - στόχος για τη δεύτερη. Το προϊόν που παράγεται από την δεύτερη αντίδραση είναι μικρότερου μεγέθους.



Εικόνα 37. Η αρχή της Nested PCR.

## **2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

### **2.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ**

Η απομόνωση του γενετικού υλικού των ιών περιλαμβάνει την απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή, μετά από διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και το διαχωρισμό του από άλλα μακρομόρια. Έτσι παραλαμβάνεται καθαρό γενετικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μοριακές τεχνικές.

Για την απομόνωση του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) από τα συλλεχθέντα δείγματα χρησιμοποιήθηκε kit απομόνωσης : Quick Gene, RNA tissue cell kit, (Fujifilm, Japan). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε τρία στάδια, χρησιμοποιώντας στήλες με ηθμό από silica. Το πρώτο στάδιο είναι η προσρόφηση του RNA μετά τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος στον ηθμό της στήλης. Στην συνέχεια ακολουθεί το στάδιο των εκχυλίσεων με σκοπό τον καθαρισμό του RNA από τα υπόλοιπα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Το τελικό στάδιο είναι η έκλυση του RNA από τον ηθμό της στήλης. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

Ο βαμβακοφόρος στυλεός με τον οποίο γίνεται η λήψη του φαρυγγικού επιχρίσματος μπορεί να μεταφερθεί είτε σε στερεό είτε σε υγρό υλικό.

- Εάν ο στυλεός μεταφερθεί σε στερεό υλικό, τότε ο στυλεός εμβαπτίζεται σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 550μl dH<sub>2</sub>O και αναδεύεται.
- Εάν ο στυλεός μεταφερθεί σε υγρό υλικό, αυτό περιστρέφεται (vortex) για σύντομο χρονικό διάστημα, αφαιρείται ο βαμβακοφόρος στυλεός και στη συνέχεια γίνεται περιστροφή σε μέγιστη ταχύτητα στο vortex για 5 λεπτά. Τέλος γίνεται μεταφορά 550μl του ιζήματος σε σωλήνα erpendorf.

Έτσι και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν 550μl κλινικού δείγματος. Από αυτά 250μl μεταφέρονται σε καινούριο σωλήνα erpendorf.





γονιδιώματος στόχου οι ανιχνευτές ανταγωνίζονται για πρόσδεση. Εάν η H275Y μεταλλαγή είναι παρούσα ο VIC σημασμένος ανιχνευτής θα ανταγωνιστεί το FAM σημασμένο ανιχνευτή και θα δώσει ισχυρότερες καμπύλες ενίσχυσης. Το αντίστροφο παρατηρείται όταν το δείγμα περιέχει την αλληλουχία του άγριου τύπου.

## **2. 3. 4. ΕΜΦΩΛΕΑΖΟΥΣΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ D222G ΜΕΤΑΛΛΑΓΗΣ**

Το πρωτόκολλο εμφωλεύουσας PCR (nested PCR) που περιγράφεται από τον Malato και τους συνεργάτες του (2011) χρησιμοποιήθηκε με κάποιες τροποποιήσεις.

Οι εκκινητές της πρώτης PCR

HA1S                    5'-ATGAAGGCAATACTAGTAGTTATGCTATATAC-3'

HA1AS                 5'-TTAAATACATATTTCTACACTGTAGAGACCC-3'

Οι εκκινητές της δεύτερης PCR

HA3S                    5'-CCAAAGCTCAGCAAATCCTAC-3'

HA3AS                 5'-ATCTCGTCAATGGCATTCTGT-3'

Η πρώτη PCR (first step) πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl (περιεκτικότητας 10μl ρυθμιστικό διάλυμα, 2μl μείγμα dNTPs, 1μl από έκαστο εκκινητή, 2μl ενζύμου και 24μl dH<sub>2</sub>O, στο οποίο προστέθηκε 10μl εκλούόμενου RNA.

Για την πραγματοποίηση της PCR χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής με τις εξής συνθήκες:

- προθέρμανση (heat lid) στους 110°C
- αντίστροφη μεταγραφή (RT) στους 95°C για 5 min
- 45 κύκλοι αποδιάταξης (denaturation) στους 94°C για 30 sec, υβριδισμού (annealing) στους 58°C για 30 sec και επέκτασης (extension) στους 68°C για 1min.
- Τελικό στάδιο επέκτασης στους 68°C για 7min

Για τη δεύτερη PCR (second step) που πραγματοποιήθηκε επίσης σε τελικό όγκο 50μl (περιεκτικότητας 10μl ρυθμιστικού διαλύματος, 3μl MgCl<sub>2</sub>, 2μl διαλύματος dNTPs, 2μl HA3S, 2μl HA3AS, 0,2μl Taq πολυμεράσης και 28,8μl dH<sub>2</sub>O) χρησιμοποιήθηκαν 2μl προϊόντος του πρώτου σταδίου.

Για την πραγματοποίηση και του δεύτερου σταδίου χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής στις εξής συνθήκες:

- Προθέρμανση στους 110°C
- Στους 94°C για 12 min
- 40 κύκλοι στους 94°C για 30 sec, στους 55°C για 30 sec και στους 72°C για 2 min
- τέλος στους 72°C για 7 min.

Τα προϊόντα της PCR επώαστηκαν στη συνέχεια με ειδικό περιοριστικό ένζυμο MboI, το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στην αλληλουχία GATC. Αν πρόκειται για στέλεχος χωρίς μεταλλαγή λαμβάνονται 3 προϊόντα 180bp, 121bp και 106bp, ενώ αν πρόκειται για στέλεχος με τη μεταλλαγή D222G λαμβάνονται 2 προϊόντα 301bp και 106bp.

Τα προϊόντα αυτής της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2% , σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,5xTBE ύστερα από χρώση με 0,5g/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η μέθοδος στηρίζεται στη δυνατότητα του βρωμιούχου αιθιδίου να παρεμβάλλεται στην έλικα του DNA, να δεσμεύεται με τις βάσεις του DNA και να φθορίζει όταν βρίσκεται σε υπεριώδες φως. Η ποσότητα

φθορισμού που εκπέμπεται από το δείγμα μπορεί να συγκριθεί με μια σειρά πρότυπων δειγμάτων και είναι ανάλογη της ποσότητας DNA του δείγματος. Η μελέτη και φωτογράφιση του πηκτώματος έγινε κάτω από υπεριώδη φωτισμό (UV).

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από 20-12-2010 έως και 20-03-2011 εξετάστηκαν συνολικά 1215 δείγματα από ασθενείς με κλινική εικόνα γριπώδους συνδρομής (πυρετός, αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων, βήχας, καταρροή, κεφαλαλγία, φαρυγγαλγία, μυαλγίες, αρθραλγίες, καταβολή, έμετοι, διάρροια, αναπνευστική δυσχέρεια). Στα 478 από αυτά ανιχνεύτηκε ο ιός H1N1, ενώ τα υπόλοιπα ήταν αρνητικά (ποσοστό θετικών δειγμάτων = 39,3%).

Σχεδόν στο σύνολο των θετικών δειγμάτων (98,7%) οι ασθενείς ανέφεραν αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων, με υψηλό πυρετό (>38,5°C). Βήχα ανέφερε το 89,2%, ενώ κεφαλαλγία, μυαλγίες και καταβολή το 82,3%. Σπανιότερα αναφέρθηκαν έμετοι και διάρροιες (36,7%).

Από τα 478 θετικά δείγματα, η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν 40,46 έτη, κυμαινόμενη από 44 ημερών έως 88 ετών και ο λόγος άνδρες / γυναίκες ήταν 0,84 (218 (45,6%) άνδρες ασθενείς και 260 (54,4%) γυναίκες), 237 ασθενείς (49,6%) είχαν κάποιο υποκείμενο νόσημα και 110 (23%) παρουσίασαν κάποια επιπλοκή.

Επίσης είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι μόνο 16 ασθενείς (3,3%) είχαν εμβολιαστεί για την εποχική γρίπη και μόλις 5 (1%) είχαν κάνει μία δόση του εμβολίου για την πανδημική γρίπη.

Αξιζει να σημειωθεί ότι από τους 110 ασθενείς που παρουσίασαν επιπλοκές οι 77 (70%) ήταν άντρες και οι 39 (35,5%) είχαν κάποιο υποκείμενο νόσημα. Όσον αφορά τις επιπλοκές, οι συχνότερες αφορούσαν το αναπνευστικό σύστημα (97%). (107 από τους 110 ασθενείς παρουσίασαν πνευμονία ή/και αναπνευστική ανεπάρκεια, ένας εμφάνισε μυοκαρδίτιδα και δύο ,παιδιατρικοί ασθενείς, μυοσίτιδα (αύξηση της CPK).

<b>ΣΥΝΟΛΟ ΕΞΕΤΑΣΘΕΝΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>	1215
<b>ΘΕΤΙΚΑ ΓΙΑ H1N1</b>	478 (39,3%)
<b>ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΓΙΑ H1N1</b>	737 (60,7%)



<b>ΘΕΤΙΚΑ Η1Ν1</b>	<b>ΜΕ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</b>	<b>ΧΩΡΙΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ</b>	<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>
<b>ΜΕ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ</b>	39	71	110
<b>ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ</b>	198	170	368
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	237	241	478

<b>ΕΙΔΟΣ ΕΠΙΠΛΟΚΗΣ</b>	
<b>Πνευμονία ή/και Αναπνευστική Ανεπάρκεια</b>	107 (97,3%)
<b>Μυοκαρδίτιδα</b>	1 (0,9%)
<b>Μυοσίτιδα</b>	2 (1,8%)

Από το σύνολο των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί στον ιό Η1Ν1 έγινε επιλογή 50 ασθενών, οι οποίοι είχαν σοβαρή κλινική εικόνα, χρειάστηκε να νοσηλευτούν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) και είχαν τεθεί σε θεραπεία με οσελταμιβίρη πριν την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Τα στελέχη του ιού που απομονώθηκαν από αυτούς τους ασθενείς ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής H275Y, που προσδίδει στον ιό αντοχή στην οσελταμιβίρη.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ασθενών που εξετάστηκαν παρατίθενται στον πίνακα 1.

Οι ασθενείς αυτοί είχαν μέση ηλικία τα 45,38 έτη, κυμαινόμενοι από 16 έως 81 ετών, και ο λόγος ανδρών / γυναικών ήταν 1,78. Δεκατέσσερις ασθενείς ήταν ανοσοκατεσταλμένοι, έντεκα είχαν χρόνια καρδιαγγειακή ή/και αναπνευστική νόσο και εικοσιτέσσερις δεν είχαν κανένα υποκείμενο νόσημα. Όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν αγωγή με οσελταμιβίρη (75mg × 2) για περίπου 5 ημέρες όταν έγινε η συλλογή του δείγματος.

Α/Α	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΕΠΙΠΛΟΚΕΣ	ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ
1	Θήλυ	64	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
2	Άρρεν	25	Πνευμονία	Κανένα
3	Θήλυ	48	Πνευμονία	Κανένα
4	Άρρεν	17	ARDS	Κανένα
5	Θήλυ	62	ARDS	ΧΑΠ
6	Άρρεν	58	ARDS, Πνευμονία	Κανένα
7	Άρρεν	30	Πολυοργανική Ανεπάρκεια	Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος
8	Θήλυ		Πνευμονία	Επιληψία
9	Άρρεν	32	ARDS	Κανένα
10	Άρρεν	32	Πνευμονία	Ανοσοκαταστολή (Λέμφωμα Burkitt)
11	Θήλυ	33	Καμία	Κανένα
12	Άρρεν	47	Πνευμονία, Καρδιακή ανακοπή	Κανένα
13	Άρρεν	62	Καμία	Ανοσοκαταστολή (HIV)
14	Θήλυ	33	Καμία	Κανένα
15	Άρρεν	53	Πνευμονία	ΧΑΠ, Ανοσοκαταστολή (Ca όρχεως)
16	Άρρεν	38	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Άσθμα
17	Άρρεν	48	ARDS	Ανοσοκαταστολή
18	Άρρεν	49	Αναπνευστική Ανεπάρκεια, Πνευμονία	Χρόνια Βρογχίτιδα
19	Άρρεν	47	ARDS	Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος
20	Θήλυ	33	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
21	Θήλυ	81	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος, μυασθένεια
22	Άρρεν	39	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
23	Άρρεν	30	Αναπνευστική Ανεπάρκεια, Πνευμονία	Κανένα
24	Άρρεν	38	Πνευμονία, ARDS	Αλκοολισμός
25	Θήλυ	72	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	ΧΑΠ
26	Θήλυ	35	Πνευμονία	Κανένα
27	Άρρεν	79	Καμία	ΧΑΠ, Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος, Ανοσοκαταστολή

28	Θήλυ	48	Αναπνευστική Ανεπάρκεια, Πνευμονία	Ανοσοκαταστολή
29	Θήλυ	52	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
30	Άρρεν	62	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
31	Άρρεν	52	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
32	Άρρεν	16	Καμία	Ανοσοκαταστολή (μεταμόσχευση νεφρού)
33	Θήλυ	59	Καμία	Ανοσοκαταστολή (μεταμόσχευση νεφρού)
34	Άρρεν	40	Καμία	Κανένα
35	Άρρεν	37	Καμία	Ανοσοκαταστολή (λέμφωμα Hodgkin)
36	Άρρεν	63	Αναπνευστική Ανεπάρκεια, Πνευμονία	Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος
37	Άρρεν	58	ARDS	ΧΑΠ, Χρόνια καρδιαγγειακή νόσος
38	Θήλυ	40	Καμία	Ανοσοκαταστολή (μεταμόσχευση νεφρού)
39	Άρρεν	76	Πνευμονία	Ανοσοκαταστολή (MDS)
40	Άρρεν	52	Πνευμονία	Κανένα
41	Θήλυ	38	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	Κανένα
42	Άρρεν	42	Πνευμονία	Ανοσοκαταστολή
43	Άρρεν	52	Αναπνευστική Ανεπάρκεια	ΧΑΠ
44	Άρρεν	30	Αναπνευστική Ανεπάρκεια, Πνευμονία	Κανένα
45	Άρρεν	46	Πνευμονία	Κανένα
46	<b>Θήλυ</b>	<b>53</b>	<b>Πνευμονία</b>	<b>Κανένα</b>
47	Άρρεν	30	Πνευμονία	Κανένα
48	Θήλυ	28	Πνευμονία	Ανοσοκαταστολή (λέμφωμα Hodgkin)
49	Θήλυ	31	Καμία	Ανοσοκαταστολή
50	<b>Άρρεν</b>	<b>34</b>	<b>Καμία</b>	<b>Κανένα</b>

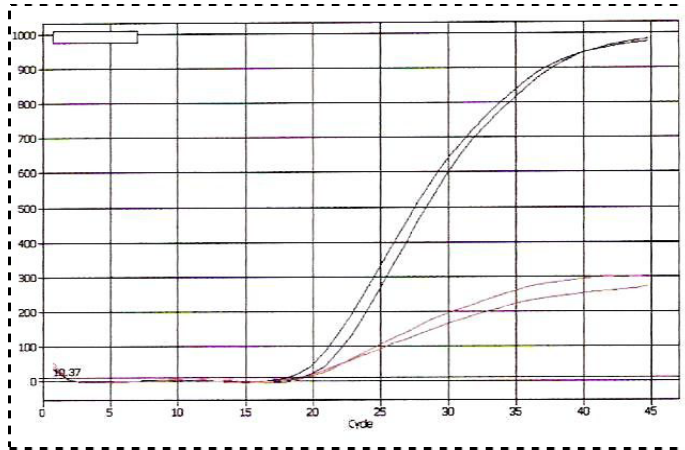
**Πίνακας 1.** Κυριότερα στοιχεία ασθενών που ελέγχθηκαν για τη μεταλλαγή H275Y. Με κόκκινο έχουν σημειωθεί οι δύο ασθενείς από τους οποίους απομονώθηκαν οι ανθεκτικοί ιοί.

Η μεταλλαγή H275Y ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς, οι οποίοι ανέπτυξαν ανοτοχή στην οσελταμιβίρη ενώ βρισκόντουσαν σε θεραπεία.

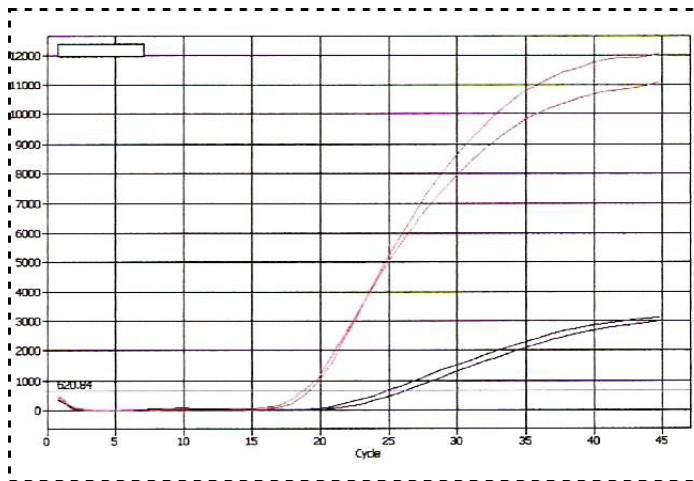
Ο πρώτος ασθενής ήταν μία 53χρονη γυναίκα, χωρίς υποκείμενο νόσημα, η οποία στις 4 Φεβρουαρίου του 2011 παρουσίασε συμπτωματολογία γριπώδους συνδρομής με πυρετό (39°C), ρινόρροια, φαρυγγίτιδα και βήχα. Στις 9 Φεβρουαρίου ξεκίνησε αγωγή με οσελταμιβίρη ( tb Tamiflu 75mg × 2 για 7 ημέρες), όμως τα συμπτώματα δεν παρουσίασαν ύφεση. Μετέβη εκ νέου στο νοσοκομείο με αναπνευστική δυσχέρεια και συμπτωματολογία πνευμονίας και στις 21 Φεβρουαρίου μεταφέρθηκε στη ΜΕΘ. Στις 22 Φεβρουαρίου έγινε η λήψη του φαρυγγικού επιχρίσματος στο οποίο απομονώθηκε το ανθεκτικό στέλεχος. Η ασθενής μετά από μακρά παραμονή στη ΜΕΘ έλαβε εξιτήριο στις 2 Μαρτίου.

Ο δεύτερος ασθενής ήταν ένας 34χρονος άντρας, ο οποίος επίσης δεν είχε κάποιο υποκείμενο νόσημα. Στις 6 Μαρτίου επισκέφθηκε το τμήμα επειγόντων περιστατικών με συμπτώματα γριπώδους συνδρομής από 5ημερου (πυρετός 40°C, βήχας, κεφαλαλγία, μυαλγίες και έμετοι) τα οποία δεν υποχώρησαν παρά την αγωγή με οσελταμιβίρη που του είχε ξεκινήσει ο οικογενειακός γιατρός ( tb Tamiflu 75mg × 2 για 4 ημέρες). Νοσηλεύτηκε στο νοσοκομείο και στις 8 Μαρτίου ελήφθη το φαρυγγικό επίχρισμα στο οποίο έγινε η απομόνωση του ιού με την H275Y μεταλλαγή. Ο ασθενής πήρε εξιτήριο στις 14 Μαρτίου.

Και οι δύο ασθενείς δεν είχαν εμβολιαστεί για τον ιό της γρίπης.



**Εικόνα 38.** Ανίχνευση της χρωστικής FAM, που δείχνει το ισχυρό σήμα του άγριου τύπου του ιού που απομονώθηκε στην πλειοψηφία των εξετασθέντων δειγμάτων.



**Εικόνα 39.** Ανίχνευση της χρωστικής VIC. Φαίνεται με κόκκινο το ισχυρό σήμα του μεταλλαγμένου ιού, που απομονώθηκε από την 53χρονη ασθενή.

Στη συνέχεια από το σύνολο των θετικών δειγμάτων για τον πανδημικό ιό H1N1 έγινε επιλογή 200 δειγμάτων προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής D222G στο γονίδιο της αιμοσυγκολλητίνης. Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα η μεταλλαγή αυτή φαίνεται να προσδίδει στον ιό τη δυνατότητα πρόσδεσης σε υποδοχείς που βρίσκονται κατώτερα στο αναπνευστικό σύστημα και συνδέεται με νόσο βαρύτερης μορφής. Επομένως για τη μεταλλαγή αυτή ελέγχθηκαν όλοι οι ασθενείς οι οποίοι παρουσίασαν κάποια επιπλοκή καθώς και τυχαίο δείγμα των υπολοίπων ασθενών. Σε κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα δεν απομονώθηκε η μεταλλαγή D222G.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στις 25 Απριλίου 2009 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, με αφορμή τα σοβαρά κρούσματα γρίπης από το νέο στέλεχος γρίπης A H1N1 2009 στο Μεξικό και στις Η.Π.Α., ανακοίνωσε πως επρόκειτο για ένα συμβάν δημόσιας υγείας με διεθνή αντίκτυπο. Σταδιακά έως και τις 11 Ιουνίου 2009 ο κόσμος πέρασε από τη φάση 3 (εγρήγορσης για πανδημία) στη φάση 6 του πανδημικού συναγερμού οριοθετώντας την έναρξη της πανδημίας γρίπης του 2009.

Σύμφωνα με διεθνή δεδομένα από την αρχή της πανδημίας υπήρξε συσχέτιση με κλινική εκδήλωση σοβαρής πνευμονίας ιδιαίτερα σε νεαρά άτομα, ενώ η κλινική βαρύτητα ήταν ιδιαίτερη σε ομάδες ασθενών με συνοδά υποκείμενα νοσήματα.

Την περίοδο 2010-2011 αναφέρουμε τις πρώτες 2 περιπτώσεις στην Ελλάδα στελεχών του πανδημικού ιού H1N1 που εμφάνισαν αντοχή στην οσελταμιβίρη. Χαρακτηριστικά των πρώτων στελεχών του ιού της γρίπης A(H1N1) 2009 της πανδημίας, έδειξαν ότι τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στις αδαμαντάνες, μία παλαιότερη κατηγορία αντιγριπικών φαρμάκων (31). Επομένως οι αναστολείς της νευραμινιδάσης (οσελταμιβίρη και ζαναμιβίρη) ήταν η μόνη κατηγορία αντιϊκών φαρμάκων που ήταν διαθέσιμα για τη θεραπεία και την προφύλαξη του καινούριου πανδημικού στελέχους και ήταν ιδιαίτερος σημαντικά πριν τη διαθεσιμότητα του ειδικού εμβολίου. Παρόλο που αυξημένες ποσότητες οσελταμιβίρης, και σε μικρότερο βαθμό ζαναμιβίρης, χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πανδημίας μόνο 370 οσελταμιβίρη ανθεκτικά στελέχη αναφέρθηκαν παγκοσμίως ανάμεσα σε περισσότερα από 20000 δείγματα θετικά για γρίπη (συχνότητα παγκοσμίως <2%). Η μεταλλαγή H275Y είχε παρατηρηθεί μεταξύ ιών της γρίπης A(H1N1) και πριν τον πανδημικό ιό H1N1 2009. Πριν το 2007 μόνο σποραδικές περιπτώσεις στελεχών ανθεκτικών στους αναστολείς των νευραμινιδασών είχαν αναφερθεί (λιγότερο από 0,3% των ιών της γρίπης που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικοί στην οσελταμιβίρη), ακόμα και σε Ιαπωνία και Η.Π.Α. όπου είχαν χρησιμοποιηθεί μεγάλες ποσότητες φαρμάκων. Παρόλα αυτά προς το

τέλος του 2007 παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα στελεχών ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη μεταξύ ιών της εποχικής γρίπης A(H1N1) σε Ευρώπη και Αμερική σε άτομα τα οποία δεν είχαν λάβει προηγουμένως αγωγή. Μεταξύ του Νοεμβρίου του 2007 και του Ιανουαρίου του 2008 η επιτροπή επιτήρησης της ευαισθησίας στα αντιϊικά μεταξύ των κυκλοφορούντων ιών της γρίπης ανέφερε ότι 14% των ιών της γρίπης A(H1N1) ήταν ανθεκτικοί στην οσελταμιβίρη χωρίς καμία συσχέτιση με χρήση φαρμάκων. Έως τον Αύγουστο του 2008 αναλύσεις έδειξαν ότι το 24% των ιών της γρίπης A(H1N1) που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικοί στην οσελταμιβίρη, αλλά διατηρούσαν ευαισθησία στην ζαναμιβίρη. Το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων χωρών: η Νορβηγία ανέφερε το υψηλότερο ποσοστό αντοχής (67,4%) **(88)** ενώ σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες όπως η Σλοβακία, η Λετονία, η Ουγγαρία και η Τσεχία δεν ανέφεραν ανθεκτικά στελέχη. Ανθεκτικά στελέχη του πανδημικού ιού γρίπης A(H1N1) πρώτη φορά ανιχνεύτηκαν σε Ιαπωνία, Δανία και Χονγκ-Κονγκ μεταξύ Μαΐου και Ιουνίου 2009 και έκτοτε ανιχνεύονται σποραδικά ανά τον κόσμο **(123)**. Παρά το ότι αυξημένες ποσότητες οσελταμιβίρης χρησιμοποιήθηκαν τον πρώτο χρόνο της πανδημίας, μόλις 304 ανθεκτικά στελέχη αναφέρθηκαν παγκοσμίως στον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Η πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών (39%) συσχετίστηκε με θεραπεία με οσελταμιβίρη ή χρήση της προφυλακτικά πριν την έκθεση, 28% παρουσιάστηκε σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και μόλις 3 (9%) δεν είχαν καμία γνωστή συσχέτιση με τη χρήση φαρμάκου **(209)**.

Την περίοδο 2010-2011 109 νέες περιπτώσεις στελεχών του ιού της γρίπης A(H1N1)2009 που έφεραν την μεταλλαγή H275Y αναφέρθηκαν στον Π.Ο.Υ. και αύξησαν το συνολικό αριθμό των ανθεκτικών στελεχών στο 370 **(246)**. Η πλειοψηφία των ανθεκτικών στελεχών (42%) εξακολουθεί να συσχετίζεται με τη λήψη του φαρμάκου και 30% ανιχνεύτηκαν σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, αλλά το ποσοστό των στελεχών που δεν συσχετιζονταν με τη λήψη φαρμάκου ανέβηκε από 9% σε 14%.

Κατά την περίοδο 2013-2014 επίσης αναφέρθηκαν λίγες σποραδικές περιπτώσεις ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη στελεχών του ιού της γρίπης Α(H1N1) 2009 που έφεραν τη μεταλλαγή H275Y στη νευραμινιδάση, που εξακολουθούσαν όμως να είναι ευαίσθητα στη ζαναμιβίρη.

Γενικά μπορούμε να πούμε ότι η αντίσταση στην οσελταμιβίρη ανιχνεύτηκε κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ή νοσηλευόμενους ασθενείς σε δείγματα μετά από θεραπεία, παρά το ότι αναφέρθηκαν μεμονωμένες περιπτώσεις μετάδοσης από άτομο σε άτομο σε νοσοκομείο στο Ηνωμένο Βασίλειο και στη Νότια Καρολίνα (46) και σποραδικές περιπτώσεις σε μη θεραπευόμενους ασθενείς σε Κίνα και Βιετνάμ.

Ένας άλλος παράγοντας που πιθανόν επηρεάζει την ανάπτυξη αντοχής είναι η δόση των αντιϊκών που χρησιμοποιείται. Σε προηγούμενες μελέτες ανθεκτικά στην οσελταμιβίρη στελέχη του πανδημικού ιού απομονώθηκαν σε ασθενείς οι οποίοι μολύνθηκαν από τον ιό ενόσω ελάμβαναν χημειοπροφύλαξη. Σε αυτές τις περιπτώσεις, υποθεραπευτικά επίπεδα οσελταμιβίρης μπορεί μόνο μερικώς να αναστέλλουν τον ικό πολλαπλασιασμό ευνοώντας έτσι την εμφάνιση αντοχής.

Πάντως παραμένει ακόμα αμφίβολο αν η H275Y μεταλλαγή σχετίζεται με υψηλότερα ποσοστά θανάτου ή σοβαρής νόσου και παρά το ότι όλες οι αναφορές δείχνουν χαμηλά ποσοστά αντοχής στην οσελταμιβίρη η συνεχής εξέλιξη των ιών της γρίπης τονίζει την αναγκαιότητα συνεχιζόμενης στενής παρακολούθησης της ανθεκτικότητας (60).

Συνοψίζοντας ο ιός της γρίπης προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα τελευταία 100 χρόνια υπήρξαν τέσσερις πανδημίες και η απειλή μιας νέας είναι πάντα παρούσα. Επομένως διαγνωστικές τεχνικές που επιτρέπουν το γρήγορο και ακριβή εντοπισμό των νέων στελεχών είναι ουσιώδους σημασίας. Επίσης η σταθερή ανίχνευση στελεχών του ιού ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη καθιστά απολύτως αναγκαία αφενός την συνεχή επιτήρηση των ανθεκτικών στελεχών, με μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ή και με εφαρμογή νέας μεθόδου που να επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών, ώστε να



εφαρμόζονται οι καταλληλότερες θεραπευτικές επιλογές κατά την περίοδο της εποχικής γρίπης ή τον πανδημιών και αφετέρου τη συνέχιση των ερευνών για αποτελεσματικά αντιικά φάρμακα ώστε η παγκόσμια κοινότητα να είναι προετοιμασμένη σε περίπτωση κυριαρχίας των ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη στελεχών της γρίπης.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ιοί της γρίπης είναι RNA ιοί που ανήκουν στην οικογένεια *Orthomyxoviridae* και αποτελούν μία από τις κυριότερες αιτίες λοιμώξεων, κυρίως του αναπνευστικού, παγκοσμίως, αφού προκαλούν εποχικές επιδημίες αλλά και θανατηφόρες πανδημίες.

Οι ιοί της γρίπης διακρίνονται σε τρία γένη : Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C. Οι ιοί της γρίπης διακρίνονται στα παραπάνω 3 γένη με βάση αντιγονικές διαφορές των νουκλεοπρωτεϊνών (NP) και των μεμβρανικών πρωτεϊνών (M) τους. Οι ιοί τύπου A κατηγοριοποιούνται περαιτέρω με βάση τα επιφανειακά τους αντιγόνα, αιμοσυγκολλητίνη (HA) και νευραμινιδάση (NA). Έχουν αναγνωριστεί 16 HA και 9 NA αντιγόνα.

Η επιδημιολογική επιτυχία των ιών της γρίπης οφείλεται σε δύο τύπους αντιγονικής μεταβολής της HA και NA, την αντιγονική εκτροπή ( με την οποία με μικρές αντικαταστάσεις αμινοξέων οι ιοί μπορούν να μεταβάλλονται από έτος σε έτος δίνοντας γένεση σε νέα στελέχη ικανά να προκαλέσουν νέες επιδημίες στα μεσοδιαστήματα των πανδημιών) και την αντιγονική μετατροπή (εμφάνιση ενός νέου υποτύπου των ιών της γρίπης τύπου A με τελείως διαφορετική HA ή HA και NA, που δεν μπορούν να εξουδετερωθούν από τα αντισώματα που έχουν επαχθεί από τον προϋπάρχοντα υπότυπο, με αποτέλεσμα την αποτυχία προστασίας του πληθυσμού και την εμφάνιση πανδημίας).

Ο ιός της γρίπης μεταδίδεται, κατά κύριο λόγο από άνθρωπο σε άνθρωπο, με τα σταγονίδια της αναπνευστικής οδού κατά τη διάρκεια της οξείας λοίμωξης (πρώτες 3-5 μέρες). Κύριοι υπεύθυνοι για τη μετάδοση είναι τα παιδιά προσχολικής ή σχολικής ηλικίας. Πιο ευάλωτα άτομα >65ετών και <5 και κυρίως <1 έτους. Στις χώρες με εύκρατο κλίμα, όπως η Ελλάδα, επιδημίες από Οκτώβριο έως Απρίλιο, με μεγαλύτερη έξαρση από Δεκέμβριο μέχρι Φεβρουάριο. Το φάσμα των συμπτωμάτων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης με τον ιό της γρίπης ποικίλλει.

Η διάγνωση της γρίπης μπορεί να γίνει με βάση την κλινική εικόνα, αλλά η οριστική διάγνωση απαιτεί εργαστηριακή επιβεβαίωση. Η κλασσική μέθοδος ανίχνευσης των ιών της γρίπης είναι η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια. Αποτελεί μέθοδο αναφοράς, αφού μετά ο ιός μπορεί να υποστεί γενετική και αντιγονική ανάλυση, αλλά δεν είναι αρκετά γρήγορη ώστε να αποτελέσει τη βάση για την έναρξη θεραπείας ή τη λήψη μέτρων για τον έλεγχο μετάδοσης της λοίμωξης. Οι μοριακές μέθοδοι, όπως η PCR, χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως, τόσο για τη διάγνωση της γρίπης, όσο και για την τυποποίηση του υπεύθυνου ιού. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ταχύτητα, ευαισθησία και ειδικότητα και τείνουν να γίνουν η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της γρίπης.

Η θεραπεία της γρίπης περιλαμβάνει γενικά υποστηρικτικά μέτρα καθώς και ειδικά αντι-ικά φάρμακα με κυριότερους εκπροσώπους τους αναστολείς της νευραμινιδάσης και δη την οσελταμιβίρη. Ενώ για την πρόληψη διατίθενται κάθε χρόνο ειδικά αντιγριπικά εμβόλια και σε ορισμένες περιπτώσεις συστήνεται χημειοπροφύλαξη με αντι-ικά.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν: **α)** η εργαστηριακή διάγνωση και τυποποίηση των ιών της γρίπης, σε ασθενείς με λοίμωξη του αναπνευστικού, **β)** ο έλεγχος των ιών, που απομονώθηκαν από επλεγμένα δείγματα, για την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγής που προσδίδει αντοχή σε αντιικό φάρμακο και για την ύπαρξη ή όχι μεταλλαγής που σχετίζεται με πρόσδεση του ιού της γρίπης σε διαφορετικό είδος υποδοχέων, **γ)** η επιδημιολογική παρατήρηση των στελεχών της γρίπης που κυκλοφορούν στην Ελλάδα, σε ειδικές ομάδες ασθενών (παιδιά, ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, ασθενείς με ανοσοκαταστολή). **δ)** συσχέτιση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τα αποτελέσματα της ιικής αναζήτησης, ώστε να διευκολύνεται ο κλινικός γιατρός στην εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς, πριν την παραλαβή των εργαστηριακών αποτελεσμάτων.

Κατά τη διάρκεια μιας περιόδου γρίπης (από Οκτώβριο 2010 έως και Μάρτιο 2011) εξετάστηκαν 1215 δείγματα από ασθενείς με πιθανή λοίμωξη

από τον ιό της γρίπης. Τα δείγματα ήταν ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα και εκπλύματα, καθώς και υγρό από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), από ασθενείς των οποίων το ιστορικό και η κλινική εικόνα συνηγορούσαν υπέρ πιθανής λοίμωξης από τον ιό της γρίπης, από διάφορα νοσοκομεία των Αθηνών. Για κάθε δείγμα συλλέχθηκαν επιδημιολογικά στοιχεία, με έμφαση την ηλικία, το φύλο, την εθνικότητα του ασθενούς, το ιστορικό εμβολιασμού και λοιμώξεων, τα συμπτώματα της νόσου, τις επιπλοκές καθώς και υποκείμενες καταστάσεις που καθιστούν τον οργανισμό ευάλωτο στον ιό της γρίπης.

Τα δείγματα, μετά την απομόνωση του γενετικού υλικού διερευνήθηκαν για την παρουσία ή όχι του πανδημικού A(H1N1)2009 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR), με τη χρήση δημοσιευμένων εκκινητών (RealTime ready InfA(H1N1) detection set (Roche Applied Science, Basel, Switzerland). Στη συνέχεια ο έλεγχος της H275Y μεταλλαγής έγινε χρησιμοποιώντας ειδικό kit (Primer Design Ltd - Detection of Tamiflu resistant Swine H1N1 Influenza Human Pandemic Strain) , ενώ ο έλεγχος της D222G μεταλλαγής έγινε με την εμφωλεάζουσα (nested) PCR.

Από τα συνολικά 1215 δείγματα που εξετάστηκαν στα 478 από αυτά ανιχνεύτηκε ο ιός H1N1, ενώ τα υπόλοιπα ήταν αρνητικά (ποσοστό θετικών δειγμάτων = 39,3%).

Σχεδόν στο σύνολο των θετικών δειγμάτων (98,7%) οι ασθενείς ανέφεραν αιφνίδια έναρξη συμπτωμάτων, με υψηλό πυρετό (>38,5°C). Βήχα ανέφερε το 89,2%, ενώ κεφαλαλγία, μυαλγίες και καταβολή το 82,3%. Σπανιότερα αναφέρθηκαν έμετοι και διάρροιες (36,7%).

Από τα 478 θετικά δείγματα, η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν 40,46 έτη, κυμαινόμενη από 44 ημερών έως 88 ετών και ο λόγος άνδρες / γυναίκες ήταν 0,84 (218 (45,6%) άνδρες ασθενείς και 260 (54,4%) γυναίκες), 237 ασθενείς (49,6%) είχαν κάποιο υποκείμενο νόσημα και 110 (23%) παρουσίασαν κάποια επιπλοκή.

Επίσης είναι εντοπιστικό το γεγονός ότι μόνο 16 ασθενείς (3,3%) είχαν εμβολιαστεί για την εποχική γρίπη και μόλις 5 (1%) είχαν κάνει μία δόση του εμβολίου για την πανδημική γρίπη.

Αξιζει να σημειωθεί ότι από τους 110 ασθενείς που παρουσίασαν επιπλοκές οι 77 (70%) ήταν άντρες και οι 39 (35,5%) είχαν κάποιο υποκείμενο νόσημα. Όσον αφορά τις επιπλοκές, οι συχνότερες αφορούσαν το αναπνευστικό σύστημα (97%). (107 από τους 110 ασθενείς παρουσίασαν πνευμονία ή/και αναπνευστική ανεπάρκεια, ένας εμφάνισε μυοκαρδίτιδα και δύο ,παιδιατρικοί ασθενείς, μυοσίτιδα (αύξηση της CPK).

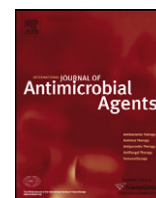
Από το σύνολο των ασθενών που βρέθηκαν θετικοί στον ιό H1N1 έγινε επιλογή 50 ασθενών, οι οποίοι είχαν σοβαρή κλινική εικόνα, χρειάστηκε να νοσηλευτούν σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) και είχαν τεθεί σε θεραπεία με οσελταμιβίρη πριν την εισαγωγή τους στη ΜΕΘ. Τα στελέχη του ιού που απομονώθηκαν από αυτούς τους ασθενείς ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής H275Y.

Οι ασθενείς αυτοί είχαν μέση ηλικία τα 45,38 έτη, κυμαινόμενοι από 16 έως 81 ετών, και ο λόγος ανδρών / γυναικών ήταν 1,78. Δεκατέσσερις ασθενείς ήταν ανοσοκατεσταλμένοι, έντεκα είχαν χρόνια καρδιαγγειακή ή/και αναπνευστική νόσο και εικοσιτέσσερις δεν είχαν κανένα υποκείμενο νόσημα. Όλοι οι ασθενείς ελάμβαναν αγωγή με οσελταμιβίρη (75mg × 2) για περίπου 5 ημέρες όταν έγινε η συλλογή του δείγματος. Η μεταλλαγή H275Y ανιχνεύτηκε σε δύο ασθενείς, οι οποίοι ανέπτυξαν αντοχή στην οσελταμιβίρη ενώ βρισκόντουσαν σε θεραπεία. Και οι δύο δεν είχαν εμβολιαστεί για τον ιό της γρίπης.

Στη συνέχεια από το σύνολο των θετικών δειγμάτων για τον πανδημικό ιό H1N1 έγινε επιλογή 200 δειγμάτων , από ασθενείς με νόσο βαρύτερης μορφής και επιλογή από το κατώτερο αναπνευστικό προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη ή όχι της μεταλλαγής D222G στο γονίδιο της αιμοσυγκολλητίνης. Σε κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα δεν απομονώθηκε η μεταλλαγή D222G.

Την περίοδο 2010-2011 αναφέρουμε τις πρώτες 2 περιπτώσεις στην Ελλάδα στελεχών του πανδημικού ιού H1N1 που εμφάνισαν αντοχή στην οσελταμιβίρη. Όπως αναφέρεται και παγκοσμίως τα ανθεκτικά στελέχη συσχετίστηκαν με προηγηθείσα θεραπεία με οσελταμιβίρη. Ενώ στην Ελλάδα δεν υπήρξε συσχέτιση με τη δόση των αντι-ικών ή με τη χρήση της οσελταμιβίρης ως χημειοπροφύλαξη.

Συνοψίζοντας ο ιός της γρίπης προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα τελευταία 100 χρόνια υπήρξαν τέσσερις πανδημίες και η απειλή μιας νέας είναι πάντα παρούσα. Επομένως διαγνωστικές τεχνικές που επιτρέπουν το γρήγορο και ακριβή εντοπισμό των νέων στελεχών είναι ουσιώδους σημασίας. Επίσης η σταθερή ανίχνευση στελεχών του ιού ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη καθιστά απολύτως αναγκαία αφενός την συνεχή επιτήρηση των ανθεκτικών στελεχών, με μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ή και με εφαρμογή νέας μεθόδου που να επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση των ανθεκτικών στελεχών, ώστε να εφαρμόζονται οι καταλληλότερες θεραπευτικές επιλογές κατά την περίοδο της εποχικής γρίπης ή τον πανδημιών και αφετέρου τη συνέχιση των ερευνών για αποτελεσματικά αντιικά φάρμακα ώστε η παγκόσμια κοινότητα να είναι προετοιμασμένη σε περίπτωση κυριαρχίας των ανθεκτικών στην οσελταμιβίρη στελεχών της γρίπης.



Short communication

## Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus in Greece during the post-pandemic 2010–2011 season

Afroditi Kourti<sup>a</sup>, Gregory Spanakos<sup>a,b</sup>, Leda Politi<sup>a</sup>, Anastasia Stavropoulou<sup>a</sup>, Nicholas Spanakis<sup>a</sup>, Athanassios Tsakris<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Virology Unit, Department of Microbiology, Medical School, University of Athens, 11527 Athens, Greece

<sup>b</sup> Hellenic Center for Diseases Control and Prevention, 15123 Athens, Greece

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 March 2012

Accepted 30 March 2012

#### Keywords:

Influenza H1N1

Oseltamivir

Resistance

Post-pandemic influenza season

### ABSTRACT

Information on the drug susceptibility of influenza epidemic strains is important for antiviral resistance monitoring. In Greece, the 2009–2010 pandemic waves were very mild and seroprevalence rates remained low after this influenza season, resulting in exclusive detection of the pandemic strain during the 2010–2011 influenza season. In the present study during the post-pandemic 2010–2011 season, 50 consecutive influenza A(H1N1) 2009 virus-positive samples from patients hospitalised in Greek hospitals were analysed for resistance to the neuraminidase inhibitor oseltamivir. All patients were hospitalised with severe influenza complications and had previously received oseltamivir. Influenza A(H1N1) 2009 virus detection and testing for oseltamivir resistance were performed with real-time PCR amplification assays. The H275Y substitution associated with resistance to oseltamivir was identified in two immunocompetent patients who received oseltamivir treatment for 3 days and 5 days, respectively. In both cases, patients were discharged in good condition despite development of resistance to antiviral treatment.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

### 1. Introduction

The 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus has spread globally since it first appeared in Mexico in April 2009 and caused the first influenza pandemic of the 21st century. Neuraminidase inhibitors (NAIs) (oseltamivir, zanamivir and peramivir) are designed to specifically bind to the conserved neuraminidase enzymatic site of all influenza A and B viruses, inhibiting the normal function of the enzyme and thus preventing virus release from the host cell following replication [1]. Resistance to NAIs is determined by mutations in the viral neuraminidase (NA) gene. These mutations are both influenza subtype- and drug-specific, with a histidine → tyrosine mutation at position 275 (H275Y) (N1 numbering) of the viral NA being the most common in influenza A(H1N1) viruses [2].

Initial testing of the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus found it to be susceptible to the action of NAIs and resistant to amantadine [1]. Therefore, NAIs were widely used both for chemoprophylaxis and treatment during the first and second waves of the 2009–2010 pandemic. The first sporadic cases of oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A virus infection were reported at the end of July 2009, and currently more than 370 cases infected with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus have been recognised globally [2].

Continuous surveillance of the drug susceptibility of influenza epidemic strains contributes to antiviral resistance monitoring. In Greece, the 2009–2010 pandemic waves were very mild and seroprevalence rates remained low after this influenza season [3]. Thus, different from other northern hemisphere regions, influenza A(H1N1) 2009 virus was exclusively detected in Greece among influenza-positive samples during the post-pandemic influenza 2010–2011 season [4]. Here we report the emergence of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 viral strains during the winter 2010–2011 influenza season in Greece.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Study patients

This study included 50 consecutive patients with confirmed influenza A(H1N1) 2009 viral infection hospitalised in five tertiary care hospitals in Athens, Greece. Patient selection was based on severe complications of viral influenza (primary influenza pneumonia, secondary bacterial pneumonia, exacerbations of chronic pulmonary diseases, exacerbations of underlying heart problems) and treatment with oseltamivir prior to sampling for influenza virus detection.

#### 2.2. Influenza A(H1N1) 2009 virus detection

Detection of influenza A(H1N1) 2009 viral RNA was carried out in oropharyngeal and nasopharyngeal swabs, and bronchoalveolar

\* Corresponding author. Tel.: +30 210 746 2011; fax: +30 210 746 2210.  
E-mail address: [atsakris@med.uoa.gr](mailto:atsakris@med.uoa.gr) (A. Tsakris).

**Table 1**  
Characteristics of patients enrolled in the study (N = 50).

Characteristic	n <sup>a</sup>
Age (years) [mean (range)]	48.02 (16–81)
Days of oseltamivir treatment (mean) <sup>b</sup>	4.6
Hospital of admission	
Sotiria General Hospital	39
Laiko University Hospital	7
Attikon University Hospital	2
Alexandra University Hospital	1
Sismanoglio General Hospital	1
Patient complications <sup>c</sup>	
Primary or secondary pneumonia	20
ARDS	19
Respiratory failure	16
Exacerbation of congestive heart failure	3
Multiorgan failure	1
Underlying medical condition <sup>c</sup>	
Immunosuppression	14
Chronic cardiovascular disease	8
COPD	6
Diabetes mellitus	5
Asthma	2
Epilepsy	1
Alcoholism	1
None	18
Type of clinical specimen	
Oropharyngeal swab	45
BAL fluid	3
Nasopharyngeal swab	2
Oseltamivir resistance	
Absent	48
Present	2

ARDS, acute respiratory distress syndrome; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; BAL, bronchoalveolar lavage.

<sup>a</sup> Data are n unless otherwise stated.

<sup>b</sup> 75 mg twice daily.

<sup>c</sup> Patients may have more than one complication and/or underlying medical condition.

lavage fluids. Viral RNA was isolated from specimens using the QuickGene RNA Tissue Cell Kit (Fujifilm, Tokyo, Japan). Pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus infection was diagnosed using the RealTime ready Inf A/H1N1 detection set (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

### 2.3. Testing for oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 viral strains

The presence of an H275Y mutation was investigated by means of a real-time PCR amplification assay based on the TaqMan principle (Tamiflu resistance genotyping kit–Mexican Swine Flu pandemic strain; Primer Design Ltd., Southampton, UK). The primer and probe set of the assay was designed to identify genetic sequences that contain the mutation leading to a tyrosine substitution for the histidine at position 275 (H275Y) which confers resistance to oseltamivir.

## 3. Results

The characteristics of the patients enrolled in the study are summarised in Table 1. The patients had a mean age of 48.02 years (range 16–81 years) and the female/male sex ratio was 0.56. In total, 36 of the patients were hospitalised in Intensive Care Units (ICUs), whilst the remaining 14 were in hospital wards. All patients were receiving oseltamivir (75 mg twice daily) at the time of collection of the clinical specimen. The mean duration of treatment was 4.6 days. All patients had influenza-associated complications (respiratory failure, primary or secondary pneumonia, multiorgan failure, acute respiratory distress syndrome, exacerbation of congestive heart failure). In total, 14 patients were immunocompromised and

13 had chronic cardiovascular and/or pulmonary diseases (some patients had both cardiovascular and pulmonary disease), whilst 18 had no co-morbidity.

The influenza A(H1N1) 2009 virus was detected in all cases. Moreover, the H275Y mutation was identified in two patients. Both patients had not been vaccinated previously for influenza. The first patient was a 53-year-old female with no underlying medical conditions. On February 2011 she developed influenza-like illness presenting with fever (39 °C), rhinorrhoea, pharyngitis and cough. Five days later the patient started treatment with oseltamivir tablets (75 mg twice daily for 7 days) but her symptoms persisted. She was admitted to the hospital with respiratory distress and signs of pneumonia and 12 days after hospital admission she was transferred to the ICU. On the first day of her hospital admission an oropharyngeal swab was collected. The patient had already been receiving oseltamivir treatment for 5 days. The specimen was positive for H1N1 2009 virus and subsequently the H275Y mutation was detected. After long-term care in hospital the patient was discharged in good condition.

The second patient was a 34-year-old male also with no underlying medical conditions. He developed symptoms of influenza-like illness and 5 days later he was admitted to the hospital emergency department with persistent high fever (40 °C), cough, headache, muscle aches and vomiting. Two days before his hospital admission the patient had previously visited his family doctor who prescribed oseltamivir (75 mg twice daily). During his first day of hospitalisation a nasopharyngeal swab was received that was positive for H1N1 2009 virus, validating the clinical diagnosis of primary pneumonia due to influenza virus, and subsequently the H275Y mutation. The patient was discharged from the hospital 4 days later.

## 4. Discussion

In the present study, the first cases of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 strains circulating in Greece during the post-pandemic 2010–2011 period are described. Characterisation of the first influenza A(H1N1) 2009 viral isolations during the 2009–2010 pandemic season revealed that the strains were resistant to the action of adamantanes, an older class of influenza antivirals that inhibit the M2 ion channel [1]. Therefore, NAIs were the only class of influenza antiviral drugs available for the treatment and prophylaxis of the novel pandemic strain. This was of particular importance, especially before the availability of a specific vaccine. Of note, from 3526 pandemic influenza A(H1N1) 2009 cases with oseltamivir administration that were tested in the WHO European region during the 2010–2011 influenza season, only 109 viral isolations (3.1%) exhibited resistance to oseltamivir [5]. This was despite the fact that increased amounts of oseltamivir and, to a lesser extent, zanamivir were used to reduce complications and spreading of the pandemic strain. Thus, it is evident that the proportion of oseltamivir-resistant isolations in Greece, a country where influenza A(H1N1) 2009 was uniquely detected during the post-pandemic influenza season, is consistent with European findings, as 4% of the viral isolations carried the H275Y mutation.

The H275Y mutation had already been observed before the 2009 pandemic H1N1 outbreak. Prior to 2007, only sporadic cases of NAI resistance had been detected among seasonal H1N1 strains (<0.3% of influenza isolates exhibited resistance to oseltamivir), even in Japan and the USA where large quantities of these drugs were used [6,7]. However, in late 2007, high frequencies of oseltamivir-resistant seasonal influenza A(H1N1) virus were detected in untreated individuals in Europe and the USA [7,8]. Between November 2007 and January 2008, surveillance of antiviral susceptibility of early circulating influenza viruses in Europe reported that 14% of seasonal influenza A(H1N1) viruses



were resistant to oseltamivir, without any correlation to NAI usage [9]. Since August 2008, global analysis showed that 24% of seasonal influenza A(H1N1) viruses isolated were oseltamivir-resistant but retained sensitivity to zanamivir [9]. It is of note that the proportion of resistant viruses differed significantly between countries. In particular, Norway reported the highest resistance rates (67.4%), whereas no resistant viruses were reported from four European countries, namely Slovakia, Latvia, Hungary and the Czech Republic [10]. In 2010/11, cases infected with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) 2009 virus have emerged sporadically in the community, some of which have had no known exposure to oseltamivir, in addition to such cases occurring among hospitalised patients [2]. Although clustering has not been formally ascertained, it is considered unlikely; therefore, low-level onward transmission of resistant strains is probably the case. Resistance to oseltamivir was mainly detected among severely immunosuppressed individuals or hospitalised patients sampled post treatment [9], which is similar to our observations. However, several clusters involving limited person-to-person transmission in hospitals in the UK and North Carolina (USA) were also reported [11,12]. Furthermore, spontaneous emergence of oseltamivir resistance was recognised among untreated patients in China and Vietnam [13,14].

An additional factor influencing resistance development is the dosage of antivirals administered. In a previous study, oseltamivir-resistant 2009 pandemic viral strains were detected in patients during oseltamivir chemoprophylaxis. In these cases, subtherapeutic levels of oseltamivir may have only partially inhibited viral replication, facilitating the emergence of resistance [15]. It should be mentioned that the patients in the current study with oseltamivir-resistant strains had received the recommended treatment doses of oseltamivir. Whether the H275Y mutation is associated with higher mortality rates and/or severe disease is unclear and, whilst all reports indicated a low prevalence of oseltamivir resistance, the continuous evolution of the influenza virus emphasises the necessity for close surveillance of antiviral resistance.

**Funding:** This work was partially supported by the Hellenic Center for Diseases Control and Prevention (Athens, Greece).

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

## References

- [1] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009;325:197–201.
- [2] World Health Organization. Update on oseltamivir resistance to influenza A(H1N1) 2009 viruses—09 February 2011. [http://www.who.int/influenza/2011\\_02\\_11\\_weekly\\_web\\_update\\_oseltamivir\\_resistance.pdf](http://www.who.int/influenza/2011_02_11_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf) [accessed 16.04.12].
- [3] Maltezou HC, Katerelos P, Mavrouli M, Lourida A, Routsias JG, Spanakis N, et al. Seroepidemiological study of pandemic influenza H1N1 following the 2009–2010 wave in Greece. *Vaccine* 2011;29:6664–9.
- [4] Athanasiou M, Baka A, Andreopoulou A, Spala G, Karageorgou K, Kostopoulos L, et al. Influenza surveillance during the post-pandemic influenza 2010/11 season in Greece, 04 October 2010 to 22 May 2011. *Euro Surveill* 2011, pii: 20004.
- [5] World Health Organization, Regional Office for Europe. Summary of the first post-pandemic influenza season in the WHO European region: 2010–2011. <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/communicable-diseases/influenza/publications/2011/summary-of-the-first-post-pandemic-influenza-season-in-the-who-european-region-2010-2011> [accessed 16.04.12].
- [6] Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network. Monitoring of neuraminidase inhibitor resistance among clinical influenza virus isolates in Japan during the 2003–2006 influenza seasons. *Wkly Epidemiol Rec* 2007;82:141–52.
- [7] Dharan NJ, Gubareva LV, Meyer JJ, Okomo-Adhiambo M, McClinton RC, Marshall SA, et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *JAMA* 2009;301:1034–41.
- [8] Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van der Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1) Europe, 2007–08 season. *Emerg Infect Dis* 2009;15:552–60.
- [9] Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay AJ, et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill* 2008;13, pii: 8026.
- [10] Kramarz P, Monnet D, Nicoll A, Yilmaz C, Ciancio B. Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007—lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. *Euro Surveill* 2009;14, pii: 19112.
- [11] Gulland A. First cases of spread of oseltamivir resistant swine flu between patients are reported in Wales. *BMJ* 2009;339:b4975.
- [12] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Oseltamivir-resistant novel influenza A (H1N1) virus infection in two immunosuppressed patients—Seattle Washington, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:893–6.
- [13] Chen H, Cheung CL, Tai H, Zhao P, Chan JF, Cheng VC, et al. Oseltamivir-resistant influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong China. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1970–2.
- [14] Le QM, Wertheim HF, Tran ND, van Doorn HR, Nguyen TH, Horby P, et al. A community cluster of oseltamivir-resistant cases of 2009 H1N1 influenza. *N Engl J Med* 2010;362:86–7.
- [15] Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin M, Boivin G. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med* 2009;361:2296–7.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Αντωνιάδης Α., Αντωνιάδης Γ., Λεγάκης Ν., Τσελέντης Ι. Ιατρική Μικροβιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα (1999): 360-367.
2. Γιαμαρέλλου Ε., και συν. Λοιμώξεις και Αντιμικροβιακή Χημειοθεραπεία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα (2009): 1223-1233.
3. Γιαμαρέλλου Ε., Μπαλτόπουλος Γ.Ι. Παθολογία. Stein J., Hutton J., Kohler P., O' Rourke R., Reynolds H., Samuels M., Sande M, Trier J, Zvaifler N. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα (1997): τόμος III, 610-612.
4. Τούτουζας Π.Κ., Χατζηγιάννης Σ.Ι., Καρβουτζής Γ.Γ. Παθολογία. Stein J., Hutton J., Kohler P., O' Rourke R., Reynolds H., Samuels M., Sande M, Trier J, Zvaifler N. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα (1997): τόμος I, 870-874.
5. Τσακρής Αθανάσιος. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. Gerard J. Tortura, Berdell R. Funke, Christine L. Case. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα (2009): 494-495, 877-880.
6. Atmar R., Baxter B., Dominguez E., Taber L., (1996). Comparison of Reverse Transcription-PCR with Tissue Culture and Other Rapid Diagnostic Assays for Detection of Type A Influenza Virus. *J. Clin. Microbiol.* 34(10):2604-2606.
7. Arruda E. and Hayden F.G. (1996) Update on therapy of influenza and rhinovirus infections. *Antiviral Chemother*, 4, 175-187.
8. Bassler C, Aguilar P. (2008). Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* 79: 166-178.
9. Baum LG, Paulson JC. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem* (1990); 89: 35-38.
10. Beadling C, Slifka MK. (2004). How do viral infections predispose patients to bacterial infections ? *Curr Opin Infect Dis* 17: 185-191.
11. Beveridge WIB. (1991). The chronicle of influenza epidemics. *Historical and Philosophic Life Sciences* 13, 223-235.

12. Biggart M., Caskie E., Ford C., Goldsmith L., Jennings C., Walk D. History of Influenza. University of Edinburgh, Faculty of Medicine.
13. Blaas D, Patzelt E and Kuechler E. (1982). Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* 10: 4803–4812.
14. Boivin G, Hardy I, Tellier G, Maziade J. Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis* (2000); 31: 1166–1169.
15. Bourmakina SV and Garcia-Sastre A. (2003). Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 84: 517–527.
16. Braam J, Ulmanen I and Krug RM. (1983). Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell*, 34, 609–18.
17. Bressoud A, Whitcomb J, Pourzand C, Haller O, Cerruti P. Rapid detection of influenza virus H1 by the polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* (1990); 167: 425–430.
18. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Wallis TR, Davis XM, Povinelli L, et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet.* (2005); 366 (9492): 1175-1181.
19. Bruden D, Srikiatkachom A, Enelow RI. (2006). Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection. *Viral Immunol* 19: 147-155.
20. Brydon, E.W., Smith, H. and Sweet, C. (2003). Influenza A virus-induced apoptosis in bronchiolar epithelial (NCI-H292) cells limits proinflammatory cytokine release. *J Gen Virol*, 84, 2389–2400.
21. Bui M, Whittaker G and Helenius A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J. Virol.* 70:8391–8401.
22. Burleigh LM, Calder LG, Skehel JJ and Steinhauer DA. (2005). Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J. Virol.* 79: 1262–1270.
23. Bush, R.M., Bender, C.A., et al. (1999). Predicting the evolution of human influenza A. *Science*, 286, 1921–1925.

24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Swine influenza A (H1N1) infection in two children—Southern California, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(15):400-402.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: novel influenza A (H1N1) virus infection—Mexico, March-May, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(21):585-589.
26. Centre of Disease Control, 2009a. CDC Realtime RTPCR Protocol for Detection and Characterization of Swine Influenza (Version 2009), CDC ref: #I-007-05.
27. Centre of Disease Control, Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* (2008); 57: 1-30.
28. Center for Disease Control and Prevention, Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis--North Carolina, (2009). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58 (35): 969-972.
29. Center for Disease Control and Prevention, Neuraminidase inhibitors for treatment of Influenza A and B infections. *MMWR* (1999); 48 (No RR-14): 1-14. Chen, W., Calvo, P.A., et al. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, 7, 1306-1312.
30. Chen Z, Li Y and Krug RM (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 18: 2273-2283.
31. Cheng P.K., Leung T.W., Ho E.C., Leung P.C., Ng A.Y., Lai M.Y., Lim W.W. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis.* (2009) Jun; 15(6): 966-968.
32. Cheung CY, Poon LL, Lau AS et al. (2002). Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet* 360: 1831-1837.
33. Christie AB. (1987). *Infectious Disease.* Edinburgh: Churchill Livingstone.
34. Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical

- characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill.* (2009); 14 (46): pii=19412.
35. Claas E, Sprenger M, Kleter G, van Beek R, Quint W, Masurel N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* (1992); 39: 1-13.
  36. Claas E, Osterhaus AD, van Beek R, et al. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351: 472-477.
  37. Compans, R.W., Content, J. and Duesberg, P.H. (1972). Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol*, 10, 795-800.
  38. Connor, R.J., Kawaoka, Y., et al. (1994). Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205, 17-23.
  39. Cox N.J., Bender C.A. The molecular epidemiology of influenza viruses. *Semin Virol* (1995); 6: 359-370.
  40. Cox N.J., Neumann G., Donis R.O., Kawaoka Y. 'Orthomyxoviruses: Influenza' In *Microbiology and Microbial Infection* 10<sup>th</sup> edn (eds Topley and Wilson) (2005); pp634-680. ASM Press.
  41. Crosby A.W. (1976) *Epidemic and Peace, 1918*. Westford, CT: Greenwood Press.
  42. Crosby A.W. (1989). *America's Forgotten Pandemic. The Influenza of 1918*. Cambridge: Cambridge University Press.
  43. Dauer C.C. and Serfling R.E. (1961). Mortality from influenza 1957-58 and 1959-60. *American Reviews of Respiratory Disease* 83, 15-28.
  44. De la Luna S, Fortes P, Beloso A and Ortin J. (1995). Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J. Virol.* 69: 2427-2433.
  45. Detjen, B.M., St Angelo, C., et al. (1987). The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex. *J Virol*, 61, 16-22.
  46. Dharan N.J., Gubareva L.V., Meyer J.J., Okomo-Adhiambo M., McClinton R.C., Marshall S.A., et al. Infections with oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus in the United States. *Jama.* (2009); 301 (10): 1034-1041.

47. Digard P, Blok VC and Inglis SC. (1989). Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes. *Virology* 171: 162-169.
48. Dwyer ED, Smith WD, Gatton GM and Barr I. (2006). Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *MJA*; 185: S48 - S53.
49. Dunn F.L., (1958) Pandemic influenza in 1957. *Journal of the American Medical Association* 166, 1140-1148.
50. Effros RB. (2003). Genetic alterations in the ageing immune system: impact on infection and cancer. *Merc Ageing Dev* 124: 71-77.
51. Elleman CJ and Barclay WS. (2004). The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology* 321: 144-153.
52. Ellis J.S., Zambon M.C. Molecular diagnosis of influenza. *Rev. Med. Virol.* (2002); 12: 375-389.
53. Elton D., Medcalf E., Bishop K. et al. (1999) Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding. *J Virol*, 73, 7357-7367.
54. Elton D, Simpson-Holley M, Archer K et al. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J. Virol.* 75: 408-419.
55. European Centre for Disease Control, (2009). Pandemic Onfluenza A(H1N1) Virus Mutations Reported to be Associated with Severe Disease, 23 December 2009.
56. Fan J., Kelly J., Savatski L. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex). *Clin Infect Dis* (1998); 26: 1397-1402.
57. Fedson, D.S., Hannoun, C., et al. (1995). Influenza vaccination in 18 developed countries, 1980-1992. *Vaccine*, 13, 623-627.
58. Fleming D.M., Cross K.W.. Respiratory syncytial virus or influenza? *Lancet.* (1993); 342: 1507-1510.
59. Fleming D.M. Managing influenza: amantadine, rimantadine and beyond. *Int J Clin Pract.* (2001); 55: 189-195.

60. Fleming D.M., Elliot A.J., Meijer A., Paget W.J. Influenza virus resistance to oseltamivir: what are the implications? *Eur J Public Health.* (2009); 19 (3): 238-239.
61. Fodor E, Crow M, Mingay LJ et al. (2002). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol*, 76, 8989-9001.
62. Fodor E, Mingay LJ, Crow M et al. (2003). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol*, 77, 5017-5020.
63. Fodor E and Smith M. (2004). The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J. Virol.* 78: 9144-9153.
64. Fortes P, Beloso A and Ortin J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* 13: 704-712.
65. Fouchier RA, Bestebroer T, Herfs S, et al. (2000). Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38: 4096-4101.
66. Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al. (2004). Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1356-1361.
67. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al. (2005). Characterization of a novel hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 79: 2814-2822.
68. Fox JP, Hall CE et al. (1982). Influenzavirus infections in Seattle families, 1975-1979. I. Study design, methods and the occurrence of infections by time and age. *Am J Epidemiol*, 116, 212-27.
69. Foulkes W, Rees J, Sewry C. (1990). Influenza A and rhabdomyolysis. *J Infect* 21: 303-304.
70. Francis T. Jr, Davenport F.M. and Hennessy A.V. (1953). A serological recapitulation of human infection with different strains of influenza virus. *Trans AssocAmPhysic*, 66, 231-239.
71. Fujimoto S., Kobayashi M., Uemura O., et al. PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. *Lancet* (1998); 352: 873-875.

72. Garcia-Sastre A. (2001). Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, 279, 375–384.
73. Garcia-Sastre A. (2006). Antiviral response in pandemic influenza viruses. *Emerg Infect Dis* 12: 44-47.
74. Ge Q., McManus M.T., et al. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 2718–2723.
75. Glezen W.P., (1996). Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiology Year Reviews* 18, 65-76.
76. Gomez-Puertas P, Albo C, Perz-Pastrana E. Et al. (2000). Influenza virus matrix protein is a major driving force in virus budding. *J Virol*, 75, 11538–11547.
77. Gomez-Gomez A, Magaña-Aquino M, Garcia-Sepulveda C, et al. (2010). Severe pneumonia associated with pandemic (H1N1) 2009 outbreak, San Luis Potosí, Mexico. *Emerg Infect Dis* 16:27–34.
78. Gorman O.T., Bean W.J. et al. (1990a). Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol*, 64, 1487–1497.
79. Gorman O.T., Donis R.O., et al. (1990b). Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. *J Virol*, 64, 4893–4902.
80. Greaves K, Oxford JS, Price CP, et al. (2003). The prevalence of myocarditis and skeletal muscle injury during acute viral infection in adults: Measurement of cardiac troponins I and T in 152 patients with acute influenza infection. *Arch Intern Med* 163: 165-168.
81. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, Webster RG. (1999). Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the “internal” genes of H5N1 viruses in Hong Kong? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9363–9367.
82. Guan Y, Peiris JS, Poon LL, et al. (2003). Reassortants of H5N1 influenza viruses recently isolated from aquatic poultry in Hong Kong SAR. *Avian Dis.* 47: 911–913.
83. Haaheim L.R., Pattison J.R., Witley R.J. *A Practical Guide to Clinical Virology*. John Wiley & Sons, Ltd. (2002): 67-72.



84. Hageman JC, Uyeki TM, Francis JS, et al. (2006). Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis* 12: 894-899.
85. Haller O. and Kochs G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 3, 710-717.
86. Hara K., Shiota M. (2003). Inhibition of the protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit by viral matrix protein. *Microbiol Immunol*, 47, 521-526.
87. Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842.
88. Hauge S.H., Dudman S., Borgen K., Lackenby A., Hungnes O. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*. (2009) Feb; 15 (2): 155-162.
89. Havlickova M., Pljusnin A., Tumova B. Influenza virus detection in clinical specimens. *Acta Virol* (1990); 34: 446-456.
90. Hay A.J. (1992). The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin Virol*, 3, 21-30.
91. Hayden F.G., Fritz R., et al. (1998). Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest*, 101, 643-649.
92. Hayden F.G., Atmar R.L., et al. (1999). Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med*, 341, 1336-1343.
93. Hayden F. (2009). Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Inf Diseases* 48 (S1): S3-S13.
94. Herlocher M.L., Truscon R., Elias S., Yen H.L., Roberts N.A., Ohmit S.E., et al. Influenza viruses resistant to the antiviral drug oseltamivir: transmission studies in ferrets. *J Infect Dis*. (2004); 190 (9): 1627-1630.
95. Hers J.F. and Mulder J. (1961). Broad aspects of the pathology and pathogenesis of human influenza. *Am Rev Respir Dis*, 83, 84-97.

96. Honda A, Mizumoto K and Ishihama A. (2002). Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13166-13171.
97. Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP et al. (2006). Influenza Pandemics: Past, Present and Future. *J Formos Assoc* 105 (1): 1-6.
98. Huang X., Liu T. et al. (2001). Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*, 287, 405-416.
99. Hurt A.C., Ho H.T., Barr I. Resistance to anti-influenza drugs: adamantanes and neuraminidase inhibitors. *Expert Rev Anti Infect Ther.* (2006); 4 (5): 795-805.
100. Hurt A.C., Barr I.G. (2008). Influenza viruses with reduced sensitivity to the NA inhibitor drugs in untreated young children. *Common. Dis. Intell.* 32: 57-62.
101. Hurt A.C., Holien J.K., Parker M., Kelso A., Barr I.G. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol.* (2009) Oct; 83 (20): 10366-10373.
102. Ito T., Gorman O.T. et al. (1991). Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol*, 65, 5491-8.
103. Irvine W.L., James D.K., Stephenson T. et al. (2000) Influenza virus infection in the second and third trimester of pregnancy: a clinical and socioepidemiological study. *Br J Obstet Gynaecol*, 107, 1289-1290.
104. Ison MG, Campbell V, Rembold C, et al. (2005). Cardiac findings during uncomplicated acute influenza in ambulatory adults. *Clin Infect Dis* 40: 415-422.
105. Ives J.A., Carr J.A., Mendel D.B., Tai C.Y., Lambkin R., Kelly L., et al. The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both in vitro and in vivo. *Antiviral Res.* (2002); 55 (2): 307-317.
106. Jang H, Boltz DA, Webster RG, Smeyne RF. (2009). Viral parkinsonism. *Biophys Acta* 1792: 714-721.
107. Jefferson T.O., Demicheli V., Di Pietrantonj C., Jones M., Rivetti D. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults. *Cochrane Database Syst Rev.* (2006); 3: CD001265.

108. Jin H, Leser GP, Zhang J and Lamb RA. (1997). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape .EMBOJ. 16: 1236-1247.
109. Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al. (1995). Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. BMJ 310: 1225-1229.
110. Jones IM, Reay PA and Philpott KL. (1986). Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. EMBO J. 5: 2371-2376.
111. Joosting A.C.C., Head B., Bynoe M.L., Tyrrell D.A.L. (1968). Production of common colds in human volunteers by influenza C. British Medical Journal 4, 153-154.
112. Kaiser L, Fritz RS, Straus SE, et al. (2001). Symptom pathogenesis during acute influenza : interleukin-6 and other cytokine responses. J Med Virol 64: 262-268.
113. Kalin M. and Grandien M. (1993). Rapid diagnostic methods in respiratory infections. Curr Opin Infect Dis, 6, 150-157.
114. Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, et al. (2006). Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. N Engl J Med 355:2186-2194.
115. Kaufmann A., Salentin R., et al. (2001). Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. Immunobiology, 204, 603-613.
116. Kilbourne E. (2006). Influenza pandemics of the 20<sup>th</sup> century. Emerg. Infect Dis 12:9-14.
117. Kramarz P., Monnet A., Yilmaz C., Ciancio B. Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007- lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. Euro Surveill. (2009); 14 (5); pii19112.
118. Krug RM, Yuan W, Noah DL and Latham AG. (2003). Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. Virology, 309, 181-189.
119. Lamb RA, Zebedee SL and Richardson CD. (1985). Influenza virusM2protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. Cell 40: 627-633.

120. Lamb RA & Krug RM. 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*. vol. 1. Fourth edition D.M. Knipe & P.M. Howley, Eds.: 1487–1531. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
121. Laver WG, Colman PM, Webster RG, et al. 1984. Influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity. *Virology* 137: 314–323.
122. Lazarowitz SG and Choppin PW. (1975). Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, 68, 440–454.
123. Leung T.W., Tai A.L., Cheng P.K., Kong M.S., Lim W. Detection of an oseltamivir resistant pandemic influenza A/H1N1 virus in Hong Kong. *J Clin Virol.* (2009); 46 (3): 298-299.
124. Li J., Chen S., Evans D.. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* (2001); 39: 696–704.
125. Li KS, Guan Y, Wang J et al. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 430, 209–213.
126. Lin CY, Kuo YC, Liu WT, Lin CC. (1988). Immunomodulation of influenza virus infection in the precipitating asthma attack. *Chest* 93: 1234-1238.
127. Liu T, Muller J and Ye Z. (2002). Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology. *Virology* 304: 89–96.
128. Luria DB, Blumenfeld HL, Ellis JT, et al. (1959). Studies on influenza in the pandemic of 1957-58.II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest* 38 :213-265.
129. Lu Y, Wambach M, Katze MG and Krug RM. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology* 214: 222–228.
130. Lund J.M., Alexopoulou L., et al. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 5598–5603.
131. Magnard C., Valette M., Aymard M., Lina B. Comparison of two nested PCR, cell culture, and antigen detection for the diagnosis of upper

- respiratory tract infections due to influenza viruses. *J Med Virol.* (1999); 59: 215-220.
132. Mak G.C., Au, K.W., Tai, Chuang, Cheng, Shiu, Lim, (2010). Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) with severe disease. *EuroSurveill.*15 (14), pii=19534.
  133. Makela M.J., Pauksens K., et al. (2000). Clinical efficacy and safety of the orally inhaled neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza: a randomized, double-blind, placebo-controlled European study. *J Infect*, 40, 42-48.
  134. Malanoski A.P., Lin B., Wang Z., Schnur J.M., Stenger D.A., (2006). Automated identification of multiple micro-organisms from resequencing DNA microarrays. *Nucleic Acids Research*, 34 (18): 5300-5311.
  135. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.* 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2005.
  136. Martin CM, Kunin CM, Gottlieb LS, et al. (1959). Asian influenza A in Boston, 1957-58.I. Observations in thirty-two influenza-associated fatal cases. *Arch Intern Med*, 103 (4): 515-531.
  137. Martin K and Helenius A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67: 117-130.
  138. Masunaga K, Mizumoto K, Kato H et al. (1999). Molecular mapping of influenza virus RNA polymerase by site-specific antibodies. *Virology* 256: 130-141.
  139. McCullers JA. (2006). Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 19: 571-582.
  140. McKimm-Breschkin J.L. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors--a review. *Antiviral Res.* (2000); 47(1): 1-17.
  141. Meijer A., Meerhoff T., Meuwissen L.E., Van der Velden J., Paget W.J. European Influenza Surveillance Scheme (EISS). Epidemiological and virological assessment of influenza activity in Europe during the winter 2005-2006. *Euro Surveill.* (2007); 12: E11-2.
  142. Meijer A., Lackenby A., Hungnes O., Lina B., Van-der-Werf S., Schweiger B., Opp M., Paget J., Van-de-Kasstele J., Hay A., Zambon M. European Influenza Surveillance Scheme. Oseltamivir-resistant influenza

- virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis.* (2009) Apr; 15(4): 552-60.
143. Mizgerd J. (2008). Acute lower respiratory tract infection. *NEJM* 358: 716-727.
  144. MMWR (2007). Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza - Louisiana and Georgia, December 2006-January 2007. *Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56: 325-329.
  145. Monto A.S., Fleming D.M., Henry D. et al. (1999) Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. *J Infect Dis*, 180, 254-261.
  146. Monto A.S., Gravenstein S., Elliot M. et al. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med* (2000); 160: 3243-3247.
  147. Monto A.S., McKimm-Breschkin J.L., Macken C., Hampson A.W., Hay A., Klimov A., Tashiro M., Webster R.G., Aymard M., Hayden F.G., Zambon M. (2006). Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2395-2402.
  148. Morens DM, Taubenberger JK, Folkers GK and Fauci AS. (2010). Pandemic Influenza' s 500<sup>th</sup> Anniversary. *CID* 51: 1442-1444.
  149. Morens DM, Taubenberger JK, Harvey H et al. (2010). The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit Care Med* 38 (suppl):e 10-20.
  150. Moscona A. Oseltamivir resistance--disabling our influenza defences. *N Engl J Med.* (2005); 353(25): 2633-2636.
  151. Murphy B.R. and Clements M.L. (1989). The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 146, 107-116.
  152. Murphy B.R., Nelson D.L., et al. (1982). Secretary and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines. *Infect Immun*, 36, 1102-1108.
  153. Naeve C.W., Hinshaw V.S. and Webster R.G. (1984). Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. *J Virol*, 51, 567-569.

154. Nakagawa Y., Kimura N. Et al. (1995). The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis. *J Virol*, 69, 728-733.
155. Neumann G, Hughes MT and Kawaoka Y. (2000). Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J*, 19, 6751-6758.
156. Newton D.W., Treanor J., Menegus M.A. Clinical and Laboratory Diagnosis of Influenza Virus Infections. *Am. J. Manag. Care.* (2000) Mar; 6(5 Suppl): S265-275.
157. Nicholson KG. (1992). Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect*, 7, 26-37.
158. Nicholson KG, Kent J, Ireland N, et al. (1993). Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 307: 982-986.
159. Nicholson K.G., Snacken R. and Palache A.M. (1995). Influenza immunization policies in Europe and the United States. *Vaccine*, 13, 365-369.
160. Nicholson K.G., Aoki F.Y. and Osterhaus ADME (2000). Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *Lancet*, 355, 1845-1850.
161. Nieto A, De la Luna S, Barcena J et al. (1994). Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J. Gen. Virol.* 75: 29-36.
162. O'Callaghan E. (1991). Schizophrenia after post-prenatal exposure to 1957 H2-influenza epidemic. *Lancet*, 337, 1248-1250.
163. O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G et al. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J. Biol. Chem.* 270: 22701-22704.
164. O'Neill R.E., Talon J. and Palese P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*, 17, 288-296.
165. Offringa D., Tyson-Medlock V., Zhiping Y., Levandowski R. A comprehensive systematic approach to identification of influenza A virus genotype using RT-PCR and RFLP. *J Virol Methods* (2000); 88: 15-24.

166. Olsen SJ, Ungchusak K, Sovann L, et al. (2005). Family clustering of avian influenza A (H5N1). *Emerg Infect Dis* 11:1799-1801.
167. Onitsuka H, Imamura T, Miyamoto N, et al. (2001). Clinical manifestations of influenza A myocarditis during the influenza epidemic of winter 1998-1999. *J Cardiol* 37:315-323.
168. Patterson KD. (1987) *Pandemic Influenza 1700-1900; A Study in Historical Epidemiology*. New Jersey: Rowman & Littlefield.
169. Paragas J., Talon J., O'Neill RE et al. (2001) Influenza B and C virus NEP (NS2) proteins possess nuclear export activities. *J Virol*, 75(16), 7375-7383.
170. Peiris J.S., Yu W.C. et al. (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*, 363, 617-619.
171. Perales B and Ortin J. (1997). The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA. *J. Virol.* 71: 1381-1385.
172. Perales B, De La Luna S, Palacios I and Ortin J. (1996). Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit. *J. Virol.* 70: 1678-1686.
173. Perez D.R. and Donis R.O. (1998). The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo. *Virology*, 249, 52-61.
174. Perez-Padilla R, de-la-Rosa-Zamboni D, Ponce-de-Leon S, et al.(2009). Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A (H1N1) in Mexico. *N Engl J Med* 361:680-9.
175. Pinto LH, Holsinger LJ and Lamb RA. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69, 517-528.
176. Plakokefalos E., Markoulatos P., Ktenas E., Spyrou N., Vamvakopoulos C. A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A and B. *J Med Microbiol* (2000); 49: 1037-1041.
177. Plotkin J.B. and Dushoff J. (2003). Codon bias and frequency-dependent selection on the hemagglutinin epitopes of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 7152-7157.



178. Poole E, Elton D, Medcalf L and Digard P. (2004). Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 321: 120-133.
179. Potter CW (2001) A history of influenza. *J Appl Microbiol*, 91, 1-8.
180. Potter C.W. 'Influenza' In *Principle and Practice of Clinical Virology*, 5<sup>th</sup> edn (eds Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Pattison J.R., Griffiths P.D., Schoub B.D.) (2004); pp 271-297. John Wiley & sons Ltd, Sassex.
181. Prechter GC, Gerhard AK. (1989). Postinfluenza toxic shock syndrome. *Chest* 95:1153-1154.
182. Pregliasco F., Mensi C., Camorali L., Anselmi G. Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. *J Med Virol* (1998); 56: 168-173.
183. Price G.E., Fenton R.J., Smith H., Sweet C. (1997). Are known pyrogenic cytokines responsible for fever in influenza? *Journal of Medical Virology* 52, 336-340.
184. Pyle GF. (1986). *The Diffusion of Influenza: Patterns and Paradigms*. New Jersey: Rowan & Littlefield.
185. Rajakumar A., Inkster M., Manger I., Swierkosz E., Schulze I. The use of the polymerase chain reaction in influenza virus detection and characterization. *Clin Microbiol Rev* (1991); 4: 260-271.
186. Rebelo-de-Andrade H., Zambon M.C. Different diagnostic methods for detection of influenza epidemics. *Epidemiol Infect* (2000); 124: 515-522.
187. Reid A., Fanning T., Hultin J., Taubenberger J. Origin and evolution of the 1918 Spanish influenza virus haemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci* (1999); 96: 1651-1656.
188. Reid A., Fanning T., Janczewski T., Taubenberger J. Characterization of the 1918 'Spanish' influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* (2000); 97: 6785-6790.
189. Roberts PC, Lamb RA and Compans RW. (1998). The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology* 240: 127-137.
190. Roberts PC and Compans RW. (1998). Host cell dependence of viral morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5746-5751.

191. Rohde G, Wiethage A, Borg I, et al. (2003). Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax* 58: 37-42.
192. Ross R. (1999). Atherosclerosis-An inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
193. Saito R., Oshitani H., Masuda H., Suzuki H. Detection of amantadine-resistant influenza A virus strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* (2002); 40: 84-88.
194. Sakaguchi T, Tu Q, Pinto LH and Lamb RA. (1997). The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5000-5005.
195. Sakaguchi A, Hirayama E, Hiraki A et al. (2003). Nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein is temperature-dependently inhibited by dissociation of viral matrix protein. *Virology* 306: 244-253.
196. Sanz- Ezquerro JJ, De la Luna S, Ortin J and Nieto A. (1995). Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J. Virol.* 69: 2420-2426.
197. Schaffer F.L., Soergel M.E. and Straube D.C. (1976). Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids. *Arch Virol*, 51, 263-273.
198. Schultz-Cherry S, Dybdahl-Sissoko N, Neumann G, Kawaoka Y and Hinshaw VS. (2001). Influenza virus NS1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol*, 75, 7875-7881.
199. Schwarzmann SW, Adler JL, Sullivan RJ Jr, et al. (1971). Bacterial pneumonia during the hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med* 127:1037-1041.
200. Shapiro GI and Krug RM (1988). Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J. Virol.* 62: 2285-2290.
201. Shi L, Summers DF, Peng Q and Galarz JM. (1995). Influenza A virus RNA polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme. *Virology* 208: 38-47.

202. Schweiger B., Zadow I., Heckler R., Timm H., Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* (2000); 38: 1552-1558.
203. Sheu T.G., Deyde V.M., Okomo-Adhiambo M., Garten R.J., Xu X., Bright R.A., Butler E.N., Wallis T.R., Klimov A.I., Gubareva L.V. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2008) Sep; 52 (9): 3284-92.
204. Shortridge K.F. (1992). Pandemic influenza: a zoonosis? *Semin Respir Infect*, 7, 11-25.
205. Sivadon-Tardy V, Orlikowski D, Porcher R, et al. (2009). Guillain Barre syndrome and influenza virus infection. *Clin Infect Dis* 48(1): 48-56.
206. Smith W., Andrewes C.H. and Laidlaw P.P. (1933). A virus obtained from influenza patients. *Lancet*, 1, 66-68.
207. Stein D.S., Creticos C.M., Jackson G.G. et al. (1987). Oral ribavirin treatment of influenza A and B. *Antimicrob Ag Chemother*, 31, 1285-1287.
208. Steinhauer D.A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1-20.
209. Stephenson I., Democratis J., Lackenby A., McNally T., Smith J., Pareek M., et al. Neuraminidase Inhibitor Resistance after Oseltamivir Treatment of Acute Influenza A and B in Children. *Clin Infect Dis.* (2009); 48 (4): 389-396.
210. Stockton J., Ellis J., Saville M., Clewley J., Zambon M. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* (1998); 36: 2990-2995.
211. Studahl M. (2003). Influenza virus and CNS manifestations. *J Clin Virol* 28: 225-232.
212. Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279: 393-396.
213. Takeuchi K and Lamb RA. (1994). Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. *J. Virol.* 68: 911-919.

214. Tamura S, Kurata T. (2004). Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis* 57: 236-247.
215. Tashiro M., Ciborowski P. Et al (1987) Role of *Staphylococcus aureus* in the development of influenza pneumonia. *Nature (Lond)*, 325, 536-537.
216. Thompson W.W., Shay D.K., et al. (2004). Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 292, 1333-1340.
217. Tognotti E. (2009). Influenza pandemics: a historical retrospect. *J Infect Dev Ctries* 3 (5): 331-334.
218. Treanor JJ. (2010). Influenza viruses, including avian influenza and swine influenza. In: Mandell GL, Bennett JE, Rolin R (eds) *Principles and practice of infectious diseases*, 7<sup>th</sup> ed, Churchill Livingstone Elsevier Inc, Philadelphia, p:2265-2288.
219. Turan K., Mibayashi M., et al. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res*, 32, 643-652.
220. Ungchusak K, Anrewarakul P, Dowell SF et al. (2005). Probable person to person transmission of Avian Influenza A(H5N1). *N. Engl. J. Med.* 325: 333-340.
221. U.S. Food and Drug Administration. (2009). *Tamiflu Pediatric Adverse Events: Questions and Answers*. April 3, 2009.
222. U.S. Food and Drug Administration. (2009). *Safe and Appropriate Use of Influenza Drugs*. Public Health Advisories. April 30,2009.
223. Valleron AJ, Cori A, Valtat S et al. (2010). Transmissibility and geographic spread of the 1889 influenza pandemic. *PNAS* 107, 19: 8778-8781.
224. Van Elden L., Nijhuis M., Schipper P., Schuurman R.,van Loon A. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J Clin Microbiol* (2001); 39: 196-200.
225. Van Voris L.P. and Newell P.M. (1992). Antivirals for the chemoprophylaxis and treatment of influenza. *Semin Respir Infect*, 7, 61-70.
226. van Regenmortel, M.H.V. 2000. *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses*. In: *Virus taxonomy*. San Diego: Academic Press, 1167.

227. Von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* (2007); 6(12): 967-74.
228. Vu T., Farish S., Jenkins M. et al. (2002). A meta-analysis of effectiveness of influenza vaccine in persons aged 65 years and over living in the community. *Vaccine*, 20, 1831-1836.
229. Wakefield L and Brownlee GG. (1989). RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. *Nucleic Acids Res.* 17: 8569-8580.
230. Wang P., Palese P. and O'Neill RE (1997) The NP1-1/NP1-3 (karyopherin a) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear location signal. *J Virol*, 83, 337-355.
231. Wang X., Li M., et al. (2000). Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of Alpha/Beta interferon. *J Virol*, 74, 11566-11573.
232. Wang Z., Daum L.T., Vora G.J, Metzgar D., Walter E.A., Canas L.C., Malanoski A.P., Lin B., Stenger D.A. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. *Emerg Infect Dis.* (2006) Apr; 12 (4): 638-46.
233. Warren-Gash C, Smeeth L, Hayward AC. (2009). Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: A systematic review. *Lancet Infect Dis* 9: 601-610.
234. Watanabe K, Handa H, Mizumoto K and Nagata K. (1996). Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. *J. Virol.* 70: 241-247.
235. Webster RG and Laver WG. (1972). The origin of pandemic influenza. *Bulletin of the World Health Organisation* 47, 449-452.
236. Webster R.G., Bean W.J., et al. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, 56: 152-179.
237. Wedzicha JA. (2004). Role of viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 1: 115-120.
238. White MR, Doss M, Boland P, Teclé T, Hartshorn KL. (2008). Innate immunity to influenza virus: implications for future therapy. *Expert Der Clin Immunol*, 4: 497-514.
239. Whitley R.J., Hayden F.G., Reisinger K.S., Young N., Dutkowski R., Ipe D., et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *The Pediatric infectious disease journal.* (2001); 20 (2): 127-133.

240. Whittaker G, Bui M and Helenius A. (1996). Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J. Virol.* 70: 2743–2756.
241. Wilschut J, McElhaney J, Palache A. (2006). The immune response to influenza infection. In: *Influenza*, Elsevier, Philadelphia, 2<sup>nd</sup> ed, pp 78-95.
242. Wright K., Wilson G., Novosad D., Dimock C., Tan D., Weber J. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* (1995); 33: 1180–1184.
243. World Health Organization (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ*, 58, 585–91.
244. World Health Organization, (1996). *Influenza in the world*. *Weekly Epidemiol Rec*, 71, 1–7.
245. World Health Organisation, Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1). [www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/en/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/).
246. World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009 - update 104. [http://www.who.int/csr/don/2010\\_06\\_11/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2010_06_11/en/index.html)
247. Yamada A., Imanishi J, Nakajima E., Nakajima K., Nakajima S. Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* (1991); 35: 259–265.
248. Yamada A., Imanishi J. Detection of influenza B virus in throat swabs using the polymerase chain reaction. *Acta Virol* (1992); 36: 320–325.
249. Yamashita M, Tomozawa T, Kakuta M et al (2009) CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents and Chemoth* 53 (1): 186-192.
250. Yasuda J., Bucher D.J. and Ishihama A. (1994). Growth control of influenza A virus by M1 protein: analysis of transfectant viruses carrying the chimeric M gene. *J Virol*, 68, 8141–8146.
251. Ye Z, Robinson D and Wagner RR. (1995). Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. *J. Virol.* 69: 1964–1970.

252. Yen H.L., Herlocher L.M., Hoffmann E., Matrosovich M.N., Monto A.S., Webster R.G., et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother.* (2005); 49 (10): 4075-4084.
253. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, et al. (1998). Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351: 467-471.
254. Zambon M.C. (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol*, 11, 227-241.
255. Zambon M., Hays J., Webster A., Newman R., Keene O. Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. *Arch Intern Med.* (2001) Sep 24; 161 (17): 2116-2122.
256. Zhang W., Evans D.H. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* (1991); 33: 165-189.
257. Zurcher T, De la Luna S, Sanz-Ezquerro JJ et al. (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J. Gen. Virol.* 77: 1745-1749.