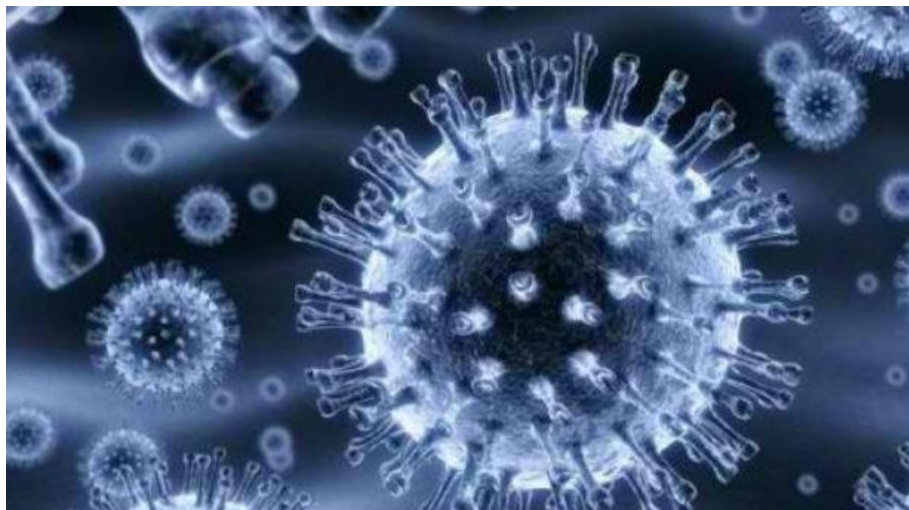




ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: «ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ
ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΙΩΝ
ΓΡΙΠΗΣ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΟΛΗ»**



ΚΑΦΑΣΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ Α.Μ.: 225208

**ΙΔΙΟΤΗΤΑ: ΒΙΟΛΟΓΟΣ
ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ «ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ
ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ Ι.Κ.Υ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ
ΕΛΛΑΔΑ-ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SIEMENS»**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΠΑΝΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΕΚΠΑ**

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2015

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Βιολογίας και Ιατρική Σχολή
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική»

Διπλωματική Εργασία: «Μοριακή ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός αντισωμάτων έναντι ιών γρίπης σε παιδιά με τεχνητή ανοσοκαταστολή».

Καφάση Αθανασία, Βιολόγος
Α.Μ.: 225208

Επιβλέπων: Σπανάκης Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας
Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή, όπως έχει συγκροτηθεί από την *Ειδική Διατμηματική Επιτροπή*:

1. Α. Τσακρής, Καθηγητής
2. Ουρ. Τσιτσιλώνη, Αναπλ. Καθηγήτρια
3. Ν. Σπανάκης, Επικ. Καθηγητής (επιβλ.)

Τόπος διεξαγωγής της Διπλωματικής Εργασίας: Μονάδα Ιολογίας, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία αποτελεί μέρος του ΠΜΣ «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, ΕΚΠΑ, κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2014 – Οκτώβριος 2015. Η παρακολούθηση του μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά και η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με απονομή υποτροφίας του Προγράμματος «ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ ΑΡΙΣΤΕΙΑΣ Ι.Κ.Υ. ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ-ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ SIEMENS». Η υποτροφία αυτή παρείχε σημαντική οικονομική βοήθεια ώστε να αφοσιωθώ στις μεταπτυχιακές σπουδές μου, καθώς επίσης και οικονομικές παροχές για παρακολούθηση συνεδρίων ώστε να διευρύνω τους πνευματικούς μου ορίζοντες.

Ο τομέας της Ιολογίας μου είχε προκαλέσει το ενδιαφέρον από τις προπτυχιακές σπουδές μου, στα πλαίσια του μαθήματος της Μικροβιολογίας, αλλά ο καθοριστικότερος παράγοντας επιλογής της Διπλωματικής Εργασίας ήταν το ίδιο το θέμα της. Οι μελέτη των ιογενών λοιμώξεων των παιδιατρικών ογκολογικών ασθενών είναι πολύ σημαντική στην κλινική πράξη και τη ζωή των παιδιών κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής τους αντιμετώπισης.

Πέρα από το ίδιο το θέμα της εργασίας, μου ενέπνευσε εμπιστοσύνη και θέληση να συνεργαστώ μαζί του, ο επιβλέπων καθηγητής μου, Κος Νικόλαος Σπανάκης, Επίκουρος Καθηγητής. Επίσης, θετικοί παράγοντες στην επιλογή μου ήταν η αρτιότητα του εργαστηρίου σε ανθρώπινο δυναμικό, εξοπλισμό και αναλώσιμα. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Σπανάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την άμεση και αποδοτική συνεργασία μας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μικροβιολογίας κύριο Αθανάσιο Τσακρή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο και για την αξιολόγηση της εργασίας μου ως μέλος της τριμελούς επιστημονικής επιτροπής, καθώς και την κυρία Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών, για την αξιολόγηση της εργασίας μου ως μέλος της τριμελούς επιστημονικής επιτροπής.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρω ότι η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε από το Ογκολογικό τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων Π&Α Κυριακού (ΟΤΑΚ) και τη Β' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική (ΒΠΠΚ) του Νοσοκομείου. Εγκρίθηκε από το

επιστημονικό συμβούλιο του Νοσοκομείου, με ερευνητές τη Διευθύντρια του τμήματος κα Κοσμίδη, την Καθηγήτρια κα Τσολιά και τον Επιμελητή του Ογκολογικού Τμήματος του Νοσοκομείου κο Δογάνη. Σε όλα τα στάδια της μελέτης η συμβολή της κας Δανά ήταν σημαντική και η κα Βαρβουτσή, υπεύθυνη Διευθύντρια του ΟΤΑΚ, έδωσε έγκριση χρήσης στοιχείων για το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό.

Οι γονείς των παιδιών έδωσαν έντυπη συγκατάθεση για τους συγκεκριμένους σκοπούς της μελέτης και της χρήσης των βιολογικών υλικών. Οι εμβολιασμοί διενεργήθηκαν στο ΟΤΑΚ από το σύνολο του ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού για διάστημα 6 μηνών πέραν της προεργασίας και του σχεδιασμού αυτών. Το συντονισμό και την ευθύνη του όλου προγράμματος είχαν από κοινού το ΟΤΑΚ και η ΒΠΠΚ. Η συλλογή των δειγμάτων και η διατήρηση αυτών έγινε με ευθύνη του ΟΤΑΚ και της ΒΠΠΚ, και συγκεκριμένα της κας Βίντιλα και της κας Σδόγγου.

Οι μετρήσεις έγιναν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε από το ΟΤΑΚ και τον κο Δογάνη. Η αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε σε συνεργασία του ΟΤΑΚ, ΒΠΠΚ και του εργαστηρίου Μικροβιολογίας (κα Τσολιά, κος Σπανάκης, κα Καφάση και κος Δογάνης).

Ακόμη, ευχαριστώ από καρδιάς την κα Αναστασία Σταυροπούλου, Βιολόγο, PhD, για την άψογη συνεργασία, για το σχεδιασμό και την υλοποίηση των εργαστηριακών αναλύσεων, για την πολύτιμη βοήθειά της και τις γνώσεις που μου μετέδωσε, καθώς και την κα Ελισάβετ Φρουκαλά, Βιολόγο, για τη βοήθειά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους Ιατρούς, Βιολόγους και Τεχνολόγους του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, που με τον τρόπο του ο καθένας συνέβαλαν στην έρευνα αυτή, καθώς και στην οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν πάντα σε ό,τι κάνω.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Ιοί της Γρίπης.....	10
1.1.1 Ταξινόμηση.....	10
1.1.2 Μορφολογία.....	10
1.1.3 Τύποι.....	11
1.1.4 Γονιδίωμα.....	13
1.1.5 Αναπαραγωγικός Κύκλος.....	13
1.1.6 Επιδημιολογία.....	15
1.2. Γρίπη και Ογκολογία.....	16
1.2.1 Επιπλοκές μετά από λοίμωξη με ιό γρίπης.....	18
1.2.2. Καρκίνος και ανοσοποίηση.....	19
1.2.3 Εμβολιασμός.....	19
1.2.4 Ανοσία έναντι της γρίπης (δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης).....	21
1.2.5 Πρωτοβάθμια χημειοπροφύλαξη.....	22
1.2.6 Δευτεροβάθμια χημειοπροφύλαξη.....	23
1.2.7 Τα αντιικά φάρμακα.....	23
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Αρχή μεθόδου.....	25
2.2 Υλικά.....	25
2.3 Βασικά βήματα.....	27
2.4 Στάδια αναλυτικά.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1. Δείγμα.....	34
3.2 Αποτελέσματα ΗΑΙ.....	34
3.3. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Υπόβαθρο: Τα παιδιά με ανοσοανεπάρκεια που λαμβάνουν χημειοθεραπεία στα πλαίσια θεραπευτικής αγωγής έναντι του καρκίνου (αιματολογικές κακοήθειες ή συμπαγείς όγκους), θεωρούνται ότι έχουν αυξημένο κίνδυνο για σοβαρές επιπλοκές της λοίμωξης από τον ιό της γρίπης, που σχετίζεται με σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα. Ως εκ τούτου, ο εμβολιασμός έναντι του ιού της γρίπης συνιστάται για τα παιδιά αυτά. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί η ανοσοαπόκριση στο εμβόλιο της γρίπης σε αυτούς τους ασθενείς.

Μέθοδοι: Εβδομήντα εννέα παιδιά με διάφορους τύπους καρκίνου (αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους) συμμετείχαν στη μελέτη αυτή. Τα παιδιά βρίσκονταν υπό εντατική ή μη εντατική χημειοθεραπεία με έναν ή περισσότερους κύκλους θεραπείας. Μία ή δύο δόσεις του τριδύναμου εμβολίου της γρίπης χορηγήθηκαν πριν από την έναρξη των κύκλων χημειοθεραπείας. Η Δοκιμασία Αναστολής Αιμοσυγκόλλησης (HAI) διεξήχθη σε διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων ορού που συλλέχθηκαν από αυτά τα παιδιά πριν και μετά τον εμβολιασμό, ώστε να προσδιοριστούν οι τίτλοι αντισωμάτων έναντι κάθε υποτύπου της γρίπης - infA (H1N1), infA (H3N2) και infB - που περιέχονται στο τριδύναμο εμβόλιο. Κανένα από τα παιδιά δεν μολύνθηκε από φυσικό στέλεχος του ιού της γρίπης κατά τη διάρκεια της περιόδου της μελέτης.

Αποτελέσματα: Επαρκής προστατευτικός τίτλος (ποσοστό ασθενών με αύξηση αντισωμάτων τέσσερις ή περισσότερες φορές μετά τον εμβολιασμό), αναπτύχθηκε στο 50.6% (40/79), το 36.7% (29/79) και 34.2% (27/79) των ασθενών έναντι του ιού H1N1, H3N2 και infB, αντίστοιχα. Μια χαμηλότερη από τον τετραπλασιασμό άνοδος (μερική προστασία) παρατηρήθηκε σε ένα επιπλέον 15.2% (12/79), 20.3% (16/79) και 12.7% (10/79) των ασθενών έναντι του ιού H1N1, H3N2 και infB, αντίστοιχα. Στην περαιτέρω ανάλυση που έγινε, επικεντρωθήκαμε σε 37 παιδιά για τα οποία η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μέχρι και 45 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, και τα ποσοστά των παιδιών που σημείωσαν τετραπλασιασμό του τίτλου ήταν: 59.5% για τον H1N1, 43.2% για τον H3N2 και 48.6% για τον ιό της γρίπης Β. Όσον αφορά το είδος του καρκίνου, σημειώθηκε προστατευτικός τίτλος στο 50% (H1N1), 46% (H3N2) και 42% (B) για τα παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες. Αντίθετα, για τα παιδιά με συμπαγείς όγκους οι τιμές ήταν 81.8%, 36.4% και 63.6%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τα παιδιά που βρίσκονταν υπό εντατική θεραπεία ήταν 53.8%, 46.2%

και 46.2% ενώ για τα παιδιά που βρίσκονταν υπό μη εντατική θεραπεία ήταν 62.5%, 41.7% και 50%.

Συμπεράσματα: Ο εμβολιασμός έναντι του ιού της γρίπης παρέχει σημαντική προστασία σε παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες, καθώς και με συμπαγείς όγκους, παρά την ανοσοκαταστολή που προκαλείται από την εναντική χημειοθεραπεία ή τη χημειοθεραπεία συντήρησης. Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, είναι σαφές ότι σχεδόν τα μισά από τα παιδιά που εμβολιάζονται θα αναπτύξουν προστατευτικούς τίτλους αντισωμάτων και ακόμα περισσότερα θα αναπτύξουν αντισώματα σε μερικώς προστατευτικά επίπεδα.

Λέξεις κλειδιά: ιός της γρίπης, καρκίνος, χημειοθεραπεία, παιδιά, εμβολιασμός

SUMMARY

Background: Immunocompromised children receiving chemotherapy against hematological malignancies as well as solid tumors, are considered to have a higher risk for severe influenza infection complications that is related with serious morbidity and mortality. Therefore vaccination against influenza virus is recommended for these children. The purpose of this study is to evaluate the immune response to influenza vaccine in these patients.

Methods: Seventy nine children with various types of cancer (hematological malignancies and solid tumors) were involved in this study. All of them were under intensive or non-intensive chemotherapy with one or more treatment cycles. One or two doses of the trivalent influenza vaccine were administered before the initiation of chemotherapy cycles. Hemagglutination Inhibition Assay (HAI) was performed in serial dilutions of serum samples collected from these children before and after influenza vaccination in order to determine the antibody titers against each influenza subtype - infA(H1N1), infA(H3N2) and infB - contained in the trivalent vaccine. None of the children was infected from a natural influenza virus infection during the period of the study.

Results: Adequate protective titer (proportion of patients with four-fold or more antibody rise after vaccination), was developed in 50.6% (40/79), 36.7% (29/79) and 34.2% (27/79) of the patients against H1N1, H3N2 and infB, respectively. A lower than a four-fold antibody rise (partial protection) was observed in an additional 15.2% (12/79), 20.3% (16/79) and 12.7% (10/79) of the patients against H1N1, H3N2 and infB viruses, respectively. In our further analysis, we focused on 37 children for whom the sample was obtained up to 45 days after vaccination. The protective titer rates for these children were 59.5% against H1N1, 43.2% against H3N2 and 48.6% against infB. As regards the type of cancer, the protective rates for this group were 50% (H1N1), 46% (H3N2) and 42% (B) for children with hematological malignancies. In contrast, in children with solid tumors the percentages were 81.8%, 36.4% and 63.6%. The corresponding rates for children who were under intensive treatment were 53.8%, 46.2% and 46.2%, while for children who were under non-intensive treatment were 62.5%, 41.7% and 50%, respectively.

Conclusions: Influenza vaccination provides a significant protection in children with hematological malignancies as well as solid tumors despite the immunosuppression

caused by the intense or conservative chemotherapy. In our study it is clear that almost half of the children being vaccinated will develop protective antibody titers and even more will develop some portion of the protective levels.

Key words: influenza virus, cancer, chemotherapy, children, vaccination

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιοί της Γρίπης

1.1.1 Ταξινόμηση

Οι ιοί της γρίπης ή Ορθομυξοϊοί (*Orthomyxoviridae*) είναι μια οικογένεια RNA ιών που περιλαμβάνει πέντε γένη: τον ιό γρίπης Α, τον ιό γρίπης Β, τον ιό γρίπης C, τον *Thogovirus* και τον *Isavirus*. Τα τρία πρώτα γένη περιλαμβάνουν ιούς που μολύνουν τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων πτηνών, ανθρώπων και άλλων θηλαστικών, ενώ ο *Thogovirus* προσβάλλει τόσο σπονδυλωτά όσο και ασπόνδυλα. Ο *Isavirus* είναι ένα πρόσφατο μέλος της οικογένειας, αίτιο της αναιμίας στο σολομό που προσβάλλει ιχθυοκαλλιέργειες σε όλο τον κόσμο.¹

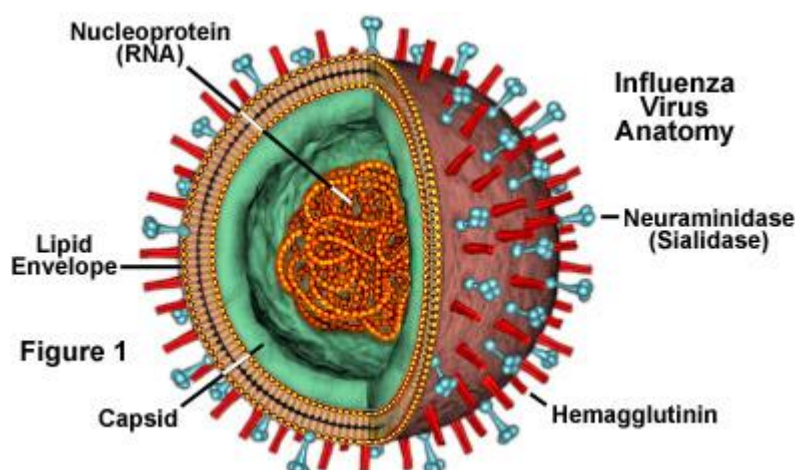
Τα τρία γένη του ιού της γρίπης, μολύνουν τα σπονδυλωτά ως εξής:

- Ο ιός της γρίπης Α μολύνει τους ανθρώπους, άλλα θηλαστικά και πουλιά, και προκαλεί όλες τις πανδημίες γρίπης
- Ο ιός της γρίπης Β μολύνει τους ανθρώπους και τις φώκιες
- Ο ιός της γρίπης C μολύνει τους ανθρώπους, τους χοίρους και τους σκύλους.^{2,3}

1.1.2 Μορφολογία

Το ιικό σωματίδιο είναι πλειομορφικό. Ο φάκελος μπορεί να μεταβάλλει το σχήμα του από σφαιρικό έως και ελαφρώς κυλινδρικό. Σε γενικές γραμμές, η μορφολογία του ιού είναι σφαιρική με σωματίδια διαμέτρου 100 έως 200 nm, ή κυλινδρικά ιικά σωματίδια που μερικές φορές το μήκος τους φτάνει μέχρι τα 1000 nm. Στην επιφάνεια του φακέλου υπάρχουν περίπου 500 διακριτές προεξοχές μήκους 10-14 nm, που απαρτίζονται από πρωτεΐνες.¹ Από αυτές οι καλύτερα χαρακτηρισμένες είναι η αιμοσυγκολλητίνη (HA) και η νευραμινιδάση (NA), δύο μεγάλοι μεγέθους γλυκοπρωτεΐνες. Η νευραμινιδάση είναι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην απελευθέρωση των νέων ιών από τα μολυσμένα κύτταρα, με διάσπαση των σακχάρων που δεσμεύουν τα ώριμα ιικά σωματίδια. Αντίθετα, η αιμοσυγκολλητίνη είναι μία λεκτίνη που μεσολαβεί στην πρόσδεση του ιού σε κύτταρα στόχους και την είσοδο του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο στόχο.⁴ Η αιμοσυγκολλητίνη και νευραμινιδάση είναι στόχοι για τα αντιικά φάρμακα.⁵ Αυτές οι πρωτεΐνες, επίσης,

αναγνωρίζονται από αντισώματα, δηλαδή έχουν αντιγονική δράση. Εσωτερικά της λιποπρωτεϊνικής μεμβράνης βρίσκεται το καψίδιο, που με τη σειρά του περικλείει το γενετικό υλικό του ιού που απαρτίζεται από 8 τμήματα ριβονουκλεϊκού οξέος, τα οποία είναι νηματοειδή μήκους 50 έως 130 nm και διαμέτρου 9 έως 15 nm, με ελικοειδή συμμετρία.¹ (Εικόνα 1)

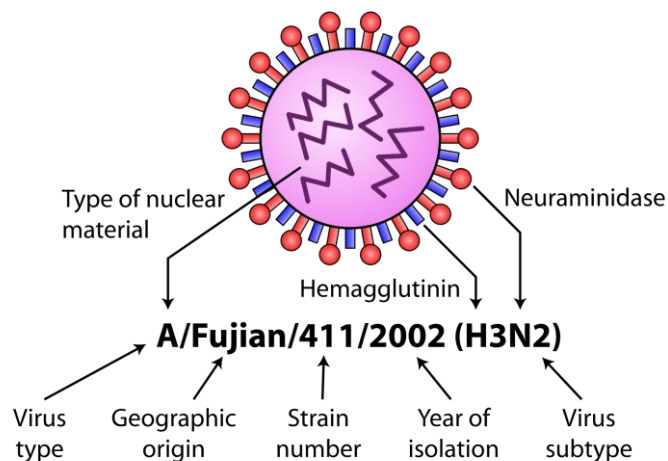


Εικόνα 1. Δομή του ιού της γρίπης.

Πηγή: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>

1.1.3 Τύποι

Οι αποκρίσεις των αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιούνται για τη διάκριση και την ταξινόμηση των διαφορετικών οροτύπων των ιών της γρίπης A, π.χ. H1N1.¹ Υπάρχουν 16 υποκατηγορίες H και 9 υποκατηγορίες N.⁶ Τα απομονωμένα στελέχη γρίπης προσδιορίζονται από μια τυποποιημένη ονοματολογία που περιλαμβάνει τον τύπο του ιού, τη γεωγραφική τοποθεσία όπου απομονώθηκε για πρώτη φορά, τον αύξοντα αριθμό της απομόνωσης, το έτος της απομόνωσης, και τον HA και NA υπότυπο, π.χ. A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/Moscow/10/99 (H3N2).^{7,8} (Εικόνα 2) Οποιοσδήποτε αλλαγές στις αλληλουχίες αμινοξέων της HA ή / και της NA μπορούν να οδηγήσουν σε εποχικές επιδημίες.⁹



Εικόνα 2. Ονοματολογία ιών γρίπης.

Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Influenza_nomenclature.svg

Ο ιός είναι ικανός να μεταβάλλεται γενετικά ως αποτέλεσμα δύο χαρακτηριστικών: (1) αντιγονική μετατόπιση (antigenic shift) - το τμηματικό του γονιδίωμα του επιτρέπει την ανακατάταξη του γενετικού του υλικού, το οποίο εξηγεί γιατί για παράδειγμα ο ιός H1N1 περιέχει γενετικό υλικό από τους χοίρους, τον άνθρωπο και τα πτηνά, (2) αντιγονική μετάθεση (antigenic drift) - η αναποτελεσματική διόρθωση κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιικού RNA προκαλεί σφάλματα μεταγραφής και υποκαταστάσεις αμινοξέων στις HA και NA. Αυτό οδηγεί σε νέες παραλλαγές που επιτρέπουν στον ιό να μπορεί να «αποφεύγει» την προϋπάρχουσα ανοσία και έτσι να προκαλεί επιδημίες.¹⁰

Ο ιός τύπου B διακρίνεται σε δύο γονοτύπους: Yamagata και Victoria.^{6,11} Είναι σχεδόν αποκλειστικά ανθρώπινο παθογόνο και είναι λιγότερο συχνός από τον τύπο A. Αυτός ο τύπος ιού μεταλλάσσεται με ρυθμό 2-3 φορές χαμηλότερο από τον τύπο A και συνεπώς, παρουσιάζει μικρότερη γενετική ποικιλομορφία.^{12,13} Ως αποτέλεσμα αυτής της έλλειψης αντιγονικής ποικιλομορφίας, ένας βαθμός ανοσίας στον ιό της γρίπης B συνήθως αποκτάται σε νεαρή ηλικία. Ωστόσο, όμως, ο ιός μεταλλάσσεται σε ικανοποιητικό βαθμό ώστε να μη μπορεί να επιτευχθεί χρόνια ανοσία.¹⁴ Αυτός ο χαμηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης σε συνδυασμό με το περιορισμένο εύρος ξενιστών του, εξηγούν το γεγονός της απουσίας πανδημιών γρίπης τύπου B.¹⁵

Οι ιοί της γρίπης μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη σε άτομα οποιασδήποτε ηλικιακής ομάδας, αλλά ο κίνδυνος λοίμωξης αυξάνει στα παιδιά.¹⁶⁻¹⁸ Τα ποσοστά πρόκλησης σοβαρής νόσου και θανάτου είναι μεγαλύτερα μεταξύ ατόμων άνω των 65

ετών, παιδιών κάτω των 2 ετών και ατόμων οποιασδήποτε ηλικίας που βρίσκονται σε κατάσταση που τους θέτει σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης επιπλοκών.^{16,19} Οι επιπλοκές αυτές είναι: δευτερογενής λοίμωξη από πνευμονιόκοκκο, ιγμορίτιδα, μέση ωτίτιδα ή χρόνια αναπνευστικά προβλήματα.^{11,20} Σε μικρά παιδιά, η λοίμωξη από γρίπη μπορεί να παρουσιάσει ακόμη και σήψη με υψηλό πυρετό.²¹

1.1.4 Γονιδίωμα

Οι Ορθομυξοϊοί περιέχουν 6 έως 8 τμήματα γραμμικού μονόκλωνου RNA με αρνητική πολικότητα.²² Το συνολικό μήκος του γονιδιώματος είναι 12.000-15.000 νουκλεοτίδια (nt) και έχει τερματικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.

Το γονιδίωμα κωδικοποιεί 11 πρωτεΐνες (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2)²³, εκ των οποίων η αιμοσυγκολλητίνη και η νευραμινιδάση αναφέρθηκαν εκτενέστερα παραπάνω.

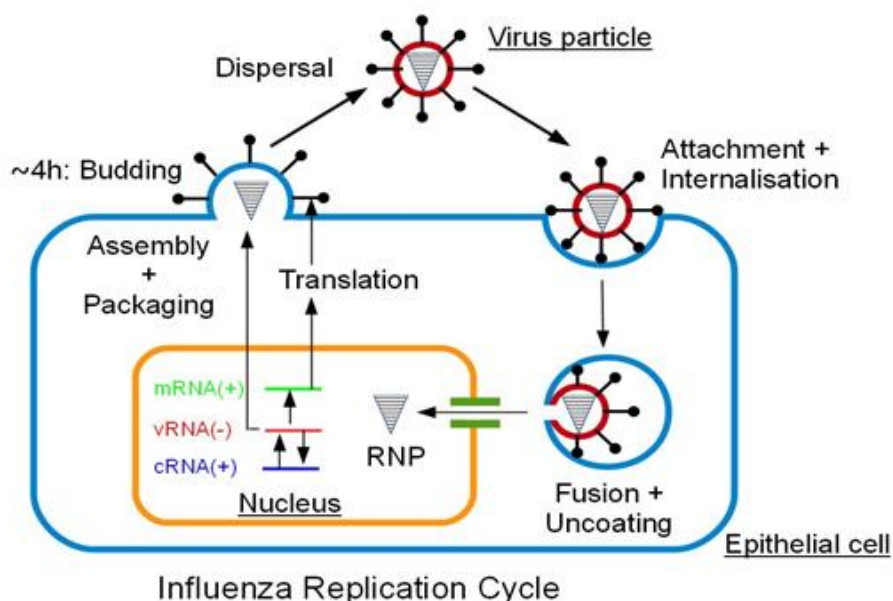
1.1.5 Αναπαραγωγικός Κύκλος

Τυπικά, η γρίπη μεταδίδεται από μολυσμένα θηλαστικά αερογενώς, από το βήχα ή το φτέρνισμα, δημιουργώντας αερολύματα που περιέχουν τον ιό, καθώς και από μολυσμένα πτηνά μέσω των περιττωμάτων τους. Η γρίπη μπορεί επίσης να μεταδοθεί με το σάλιο, ρινικές εκκρίσεις, περιττώματα και αίμα. Οι λοιμώξεις συμβαίνουν μετά από την επαφή με αυτά τα σωματικά υγρά ή με μολυσμένες επιφάνειες. Οι ιοί της γρίπης μπορούν να παραμείνουν μολυσματικοί για περίπου μία εβδομάδα στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, πάνω από 30 ημέρες στους 0°C (32° F), και επ' αόριστον σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Μπορούν να απενεργοποιηθούν εύκολα με απολυμαντικά και απορρυπαντικά.^{24,25,26}

Οι ιοί προσδένονται σε ένα κύτταρο μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της γλυκοπρωτεΐνης αιμοσυγκολλητίνης και του σιαλικού οξέος στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων στον πνεύμονα και το λάρυγγα.²⁷ Το κύτταρο προσλαμβάνει τον ιό με ενδοκυττάρωση. Στο όξινο ενδόσωμα, μέσω της αιμοσυγκολλητίνης, ο ιικός φάκελος συντήκεται με τη μεμβράνη του κυστιδίου, απελευθερώνοντας τα μόρια του RNA του ιού (vRNA), βοηθητικές πρωτεΐνες και την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση στο κυτταρόπλασμα.²⁸ Αυτές οι πρωτεΐνες και τα vRNA σχηματίζουν ένα σύμπλοκο που μεταφέρεται εντός του πυρήνα του κυττάρου, όπου η RNA-

εξαρτώμενη RNA πολυμεράση αρχίζει μεταγραφή στο συμπληρωματικό θετικής πολικότητας-cRNA.²⁹ Το cRNA είτε εξάγεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζεται ή παραμένει στον πυρήνα. Οι πρώιμες ιικές πρωτεΐνες είτε μεταφέρονται μετά από γλυκοζυλίωση μέσω της συσκευής Golgi πάνω στην κυτταρική επιφάνεια (στην περίπτωση της νευραμινιδάσης και της αιμοσυγκολλητίνης) ή μεταφέρονται πίσω στον πυρήνα για να δεσμεύσουν vRNA και να σχηματίσουν το νέο ιικό γονιδίωμα. Άλλες ιικές πρωτεΐνες έχουν πολλαπλές δράσεις στο κύτταρο ξενιστή, συμπεριλαμβανομένης της αποικοδόμησης του κυτταρικού mRNA, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που κυκλοφορούν για την σύνθεση vRNA και επίσης αναστέλλουν μετάφραση των mRNAs του κυττάρου-ξενιστή.³⁰

Τα αρνητικής πολικότητας vRNAs, που αποτελούν το γονιδίωμα των μελλοντικών ιών, η RNA-εξαρτώμενη RNA μεταγραφή και άλλες ιικές πρωτεΐνες, συναρμολογούνται σε ένα ιικό σωματίδιο. Το σύμπλεγμα μορίων αιμοσυγκολλητίνης και νευραμινιδάσης δημιουργούν ένα εξόγκωμα στην κυτταρική μεμβράνη. Το vRNA και οι ιικές πρωτεΐνες του πυρήνα φεύγουν από τον πυρήνα και μεταφέρονται στη προεξοχή της μεμβράνης. Τα ώριμα σωματίδια του ιού μεταφέρονται μακριά από το κύτταρο, σε μια σφαίρα από τη φωσφολιπιδική μεμβράνη του ξενιστή, η οποία στη συνέχεια αποκτά νευραμινιδάση και αιμοσυγκολιτίνη.³¹ Όπως και πριν, οι ιοί προσδένονται στο κύτταρο μέσω αιμοσυγκολιτίνης. Οι ώριμοι ιοί αποκολλώνται όταν η νευραμινιδάση διασπά το σιαλικό οξύ του κυττάρου ξενιστή.²⁷ Μετά από την απελευθέρωση του νέου ιού της γρίπης, το κύτταρο ξενιστής πεθαίνει. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3. Αναπαραγωγικός κύκλος του ιού της γρίπης.
 Πηγή: http://cronodon.com/BioTech/Virus_Tech_3.html

Ο ιός της γρίπης αντιγράφεται στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή. Χρησιμοποιεί κυτταρικά RNAs ως εκκινητές για την έναρξη της σύνθεσης ιικού mRNA σε μια διαδικασία γνωστή ως cap-snatching. Στον πυρήνα, η RNA πολυμεράση Protein PB2 βρίσκει ένα κυτταρικό pre-mRNA και προσδένεται στο 5' καλυμμένο άκρο του. Στη συνέχεια, η RNA πολυμεράση PA διασπά το κυτταρικό mRNA πλησίον του άκρου 5' και χρησιμοποιεί αυτό το καλυμμένο θραύσμα ως εκκινητή για μεταγραφή του υπόλοιπου ιικού γονιδιώματος, παράγοντας ιικό mRNA.³² Αυτό οφείλεται στην ανάγκη του mRNA να έχει ένα 5' κάλυμμα προκειμένου να αναγνωριστεί από τα ριβοσώματα του κυττάρου για μετάφραση.

Δεδομένου ότι τα ένζυμα επιδιόρθωσης του RNA είναι απόντα, η RNA-εξαρτώμενη RNA μεταγραφάση κάνει ένα σφάλμα εισαγωγής νουκλεοτιδίου περίπου κάθε 10 χιλιάδες νουκλεοτίδια, όσο είναι κατά προσέγγιση το μήκος του RNA του ιού της γρίπης. Ως εκ τούτου, σχεδόν κάθε νέος ιός της γρίπης θα περιέχει μια μεταλλαγή στο γονιδιώμα του.³³ Ο διαχωρισμός του γονιδιώματος σε οκτώ ξεχωριστά τμήματα του νRNA επιτρέπει την ανάμειξη (ανακατάταξη) των γονιδίων, εάν περισσότερα από ένα στελέχη του ιού της γρίπης έχουν μολύνει το ίδιο κύτταρο (επιμόλυνση). Η προκύπτουσα ανακατανομή των τμημάτων του ιικού γονιδιώματος, τους προσδίδει νέα συμπεριφορά, μερικές φορές την ικανότητα να μολύνουν ένα νέο είδος ξενιστή ή να ξεπεράσουν ανοσία του ξενιστή, η οποία βασιζόταν στο παλιό γονιδιώμα του (αυτή η περίπτωση ονομάζεται αντιγονική μετατόπιση).³⁴

1.1.6 Επιδημιολογία

Η γρίπη είναι μια άκρως μολυσματική ιογενής νόσος που εμφανίζεται σε όλο τον κόσμο και μπορεί να έχει τη μορφή πανδημίας, επιδημίας, ή σποραδικών περιπτώσεων. Οι άνθρωποι είναι οι μόνοι γνωστοί φορείς των τύπων γρίπης B και C. Οι ιοί της γρίπης A μπορούν να μολύνουν ανθρώπους και ζώα, ενώ δεν υπάρχει χρόνια κατάσταση φορέα. Η μέγιστη δραστηριότητα της γρίπης σημειώνεται από Δεκέμβριο έως Μάρτιο σε εύκρατα κλίματα, αλλά μπορεί να συμβεί και νωρίτερα ή αργότερα. Σε τροπικά κλίματα εμφανίζεται καθόλη τη διάρκεια του χρόνου. Οι ενήλικες μπορούν να μεταδώσουν τη γρίπη από την ημέρα πριν την έναρξη των συμπτωμάτων και για περίπου 5 ημέρες αφότου αρχίσουν τα συμπτώματα. Τα παιδιά μπορούν να μεταδώσουν τη γρίπη σε άλλους για 10 ή περισσότερες ημέρες.³⁵

Κυριότερες πανδημίες γρίπης^{34, 36, 37}

Πανδημία	Χρονολογία	Θάνατοι	Υπότυπος Γρίπης	Δείκτης Σοβαρότητας
1889-1890 Ασιατική ή Ρωσική Γρίπη ³⁸	1889-1890	1 εκατομμύριο	Πιθανόν H3N8 ή H2N2	NA
1918 Ισπανική Γρίπη ³⁹	1918-1920	20-100 εκ.	H1N1	5
Ασιατική Γρίπη	1957-1958	1-1,5 εκ.	H2N2	2
Γρίπη Χονγκ Κονγκ	1968-1969	0,75-1 εκ.	H3N2	2
Ρωσική Γρίπη	1977-1978	NA	H1H1	NA
2009 πανδημία Γρίπης ^{40,41}	2009-2010	18.000	H1N1	NA

1.2. Γρίπη και Ογκολογία

Πρόσφατες μελέτες στον τομέα της διάγνωσης και της θεραπείας των ιογενών λοιμώξεων έδειξαν ότι οι ιοί που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα αποτελούν υψηλής σημασίας παθογόνα, σχετιζόμενα με σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή άτομα που πάσχουν από κάποια χρόνια νόσο.⁴² Οι ομάδες αυτές ασθενών, μαζί με τα νεογέννητα και τους ηλικιωμένους, ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου. Τα άτομα που πάσχουν από κάποια μορφή καρκίνου, μπορεί συχνά να βιώσουν λοιμώξεις που μπορούν να προληφθούν. Μια από αυτές προκαλείται από τον ιό της γρίπης. Όλοι οι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες ή συμπαγείς όγκους που λαμβάνουν χημειοθεραπεία διατρέχουν υψηλό κίνδυνο επιπλοκών λόγω λοίμωξης από τον ιό της γρίπης.⁴³⁻⁴⁵ Ο αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης σε αυτή την ομάδα ασθενών μπορεί να οφείλεται είτε στην ίδια τη νόσο, είτε στην ανοσοκαταστολή λόγω της λήψης χημειοθεραπείας.⁴⁶

Τα παιδιά με καρκίνο είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης, η οποία μπορεί να μην έχει κάποιο αντίκτυπο στη θεραπεία τους, αλλά σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές, όπως ανάγκη για νοσοκομειακή περίθαλψη, διακοπή της χημειοθεραπείας και χορήγηση αντιβιοτικών. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί περιστατικά όπου η λοίμωξη από τον ιό της γρίπης έχει

οδηγήσει σε σοβαρότερες επιπλοκές, όπως δευτερογενείς λοιμώξεις και αιμοφαγοκυτταρικά σύνδρομα.⁴³⁻⁴⁵

Οι λοιμώξεις από τον ιό της γρίπης έχουν ετήσια περιοδικότητα στα εύκρατα κλίματα. Μια επιδημία γρίπης στη χώρα μας διαρκεί συνήθως πέντε έως έξι εβδομάδες, ενώ συχνά μπορεί να παραταθεί για μεγαλύτερο διάστημα και μπορεί να συσχετιστεί με επίπεδα λοιμογονικότητας έως 20% στο γενικό πληθυσμό και αρκετά υψηλότερα στους ανοσοκατεσταλμένους.^{47,48}

Η κατάλληλη εφαρμογή των βασικών προφυλάξεων για τη μετάδοση του ιού είναι σημαντική για την αποφυγή μετάδοσης της γρίπης από ασθενή σε ασθενή. Στο περιβάλλον του νοσοκομείου, οι προφυλάξεις που αφορούν τη μετάδοση συνιστώνται για κάθε ασθενή με επιβεβαιωμένη ή με υποψία γρίπης. Η ομαδοποίηση ή ο διαχωρισμός μολυσμένων ασθενών προκειμένου να περιοριστεί η επαφή τους με μη μολυσμένους ασθενείς είναι επίσης ένα σημαντικό στοιχείο του ελέγχου της γρίπης και μπορεί να εφαρμοστεί είτε ενδονοσοκομειακά είτε σε ιατρεία εκτός νοσοκομείου.⁴⁹ Ωστόσο, η λήψη μέτρων προφύλαξης είναι περίπλοκη λόγω της δυσκολίας που υπάρχει όσον αφορά στην ταυτοποίηση των μολυσμένων ατόμων και του γεγονότος ότι μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει μέσω ασυμπτωματικών ατόμων.

Η συνηθισμένη περίοδος επώασης του ιού της γρίπης κυμαίνεται από μία έως τέσσερις ημέρες. Ο ιός ανιχνεύεται στις αναπνευστικές εκκρίσεις των ασθενών μία ημέρα πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων και τα παιδιά μπορεί να συνεχίσουν τη μετάδοση του ιού για δέκα ή περισσότερες ημέρες μετά την παρέλευση των συμπτωμάτων.⁵⁰ Η διάρκεια της μετάδοσης του ιού στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς μπορεί να είναι μεγαλύτερη του αναμενόμενου, με αποτέλεσμα να παρατείνεται η μετάδοση του ιού.^{51,52}

Η ανοσοποίηση έναντι του ιού της γρίπης έχει αποδειχτεί ότι μειώνει τον κίνδυνο μόλυνσης σε άτομα με φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού τους συστήματος.⁵³ Στους ασθενείς με καρκίνο ο εμβολιασμός προσφέρει προστασία, γεγονός που ερμηνεύεται ως μειωμένη διάρκεια και σοβαρότητα της λοίμωξης και μικρότερους δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας.⁵⁴ Όμως η ανοσοαπόκριση είναι σε γενικές γραμμές μικρότερη από αυτή που αναμένεται στα φυσιολογικά άτομα και εξαρτάται από το χρόνο στον οποίο έγινε η ανοσοποίηση σε σχέση με τη χημειοθεραπεία. Εντούτοις, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για ογκολογικούς παιδιατρικούς ασθενείς, καθώς οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν ετερογένεια σε ότι αφορά στον υποκείμενο τύπο καρκίνου, στο είδος της χημειοθεραπείας, στη δόση,

στο χρόνο και στην οδό χορήγησης του εμβολίου της γρίπης. Σημειώνεται ότι το εμβόλιο που περιέχει απενεργοποιημένο στέλεχος του ιού δεν ενέχει κανένα κίνδυνο εκδήλωσης λοίμωξης και θεωρείται ασφαλές για χορήγηση σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ακόμη κι αν αυτά είναι παιδιά.⁵⁵

1.2.1 Επιπλοκές μετά από λοίμωξη με ιό γρίπης

Τα παιδιά που λαμβάνουν αντινεοπλασματική θεραπεία είναι πιο πιθανό να νοσηλευθούν όταν προσβληθούν από τη γρίπη, σε σχέση με τα υγιή παιδιά. Οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν πυρετό, ο οποίος μπορεί να διαρκέσει 1-2 εβδομάδες.⁵⁶ Πέρα από τη συχνή νοσηλεία, η γρίπη σε παιδιά με καρκίνο προκαλεί σημαντική νοσηρότητα. Σοβαρές αναπνευστικές επιπλοκές, όπως αναπνευστική ανεπάρκεια, πνευμονία και ανάγκη για αναπνευστική υποστήριξη, συμβαίνουν στο 10% - 20% των νοσηλευόμενων παιδιών.^{43,56,57} Περισσότερο συχνές είναι οι λιγότερο σοβαρές αναπνευστικές επιπλοκές, όπως η υποξία και η ανάγκη λήψης βρογχοδιασταλτικών.^{56,57} Μικρός αριθμός των παιδιών που απαιτούν παρατεταμένη υποστήριξη με οξυγόνο μετά την οξεία φάση της ασθένειας μπορεί να καταλήξει.⁵⁷

Συγκεκριμένα, εντατική φροντίδα με ανάγκη για εισαγωγή στο νοσοκομείο εμφανίζεται σε ποσοστό μέχρι 10% σε μολυσμένα από γρίπη παιδιά με καρκίνο, ενώ ποσοστό μέχρι 5% αυτών μπορεί να καταλήξει.⁵⁷ Η βακτηριαιμία ως επιπλοκή της λοίμωξης από γρίπη εμφανίζεται σε περίπου ένα στα έξι παιδιά. Ως υπεύθυνα παθογόνα έχουν αναφερθεί: *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp. και κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι.^{56,58} Δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις μπορεί επίσης να εμφανιστούν, όπως πνευμονία ή μέση ωτίτιδα.⁴³ Λιγότερο συχνές επιπλοκές της λοίμωξης από γρίπη περιλαμβάνουν μυκητιακές πνευμονίες (π.χ. πνευμονία από *Aspergillus*), άλλες διεισδυτικές μυκητιακές λοιμώξεις, και αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστοκύττωση.^{45,59,60} Λοίμωξη λόγω γρίπης σε παιδιά με καρκίνο προκαλεί σημαντική καθυστέρηση στην χημειοθεραπεία ή άλλη ειδική για τον καρκίνο θεραπεία σε 20% - 80% των ασθενών.^{43,34,51,56}

1.2.2. Καρκίνος και ανοσοποίηση

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την ανοσολογική κατάσταση και την απόκριση σε ανοσοποίηση σε ασθενείς με καρκίνο. Πρώτον, η ίδια η νόσος μπορεί να προκαλεί ανοσοκαταστολή, ιδιαίτερα σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Δεύτερον, οι μέθοδοι θεραπείας για τον καρκίνο μπορεί να έχουν ποικίλης σοβαρότητας ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα. Η χημειοθεραπεία έχει κυτταροτοξική δράση ιδιαίτερα στα ταχέως αναπτυσσόμενα κύτταρα ενός όγκου. Παράλληλα, η πλήρης λειτουργική ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος εξαρτάται από τον ταχύ πολλαπλασιασμό των κυττάρων του με αποτέλεσμα να επηρεάζεται επίσης δυσμενώς από τη χημειοθεραπεία. Αυτή η αρνητική επίδραση της χημειοθεραπείας στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος είναι, ωστόσο μεταβλητή, ανάλογα με τον τύπο της χημειοθεραπείας.⁶¹

Σε ασθενείς με καρκίνο, μπορεί να υπάρχει διαταραχή τόσο στη χυμική, όσο και στην κυτταρική ανοσία.^{62,63} Επιπλέον, σε πολλούς ασθενείς με καρκίνο που έλαβαν θεραπεία με κυτταροστατικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, η χημειοθεραπεία έχει συσχετιστεί με διάφορες διαταραχές.⁶³ Για τους λόγους αυτούς, οι ασθενείς με καρκίνο μπορούν να θεωρηθούν ομάδα υψηλού κινδύνου που διατρέχουν κίνδυνο για ιδιαίτερα σοβαρές επιπλοκές λόγω της γρίπης και οι οποίοι πρέπει να εμβολιάζονται έναντι αυτής πριν από κάθε εποχική επιδημία.⁹ Τα επιχειρήματα που υποστηρίζουν ότι το εμβόλιο της γρίπης θα πρέπει να γίνεται σε ασθενείς με καρκίνο, βασίζονται στο γεγονός ότι εμφανίζεται σημαντική θνησιμότητα στην ομάδα αυτή κατά τη διάρκεια επιδημιών γρίπης,^{64,65} και ότι η γρίπη μπορεί να προκαλέσει διακοπή της θεραπείας του καρκίνου για έως και αρκετές εβδομάδες.⁶⁶ Βέβαια, επειδή η ανοσογονικότητα είναι μειωμένη σε ασθενείς με καρκίνο, είναι δύσκολο να γίνει γενίκευση για όλους τους ασθενείς, επειδή οι μελέτες έχουν γίνει σε ετερογενείς ομάδες ασθενών, με διαφορετικούς τύπους όγκων και αγωγές θεραπείας.⁶⁷

1.2.3 Εμβολιασμός

Οι κυκλοφορούντες ιοί της γρίπης του ανθρώπου υπόκειται σε αντιγονικές αλλαγές που απαιτούν ετήσια προσαρμογή της σύνθεσης του εμβολίου. Το εμβόλιο

είναι προσαρμοσμένο ώστε να διασφαλίζεται η πλησιέστερη αντιστοιχία μεταξύ των κυκλοφορούντων στελεχών και αυτών που υπάρχουν στο εμβόλιο.⁶⁸ Στο παρελθόν, υπήρξαν μονοδύναμα και διδύναμα εμβόλια. Από το 1977, εντούτοις, τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως τριδύναμα και περιέχουν τους υποτύπους H1N1 και H3N2 του ιού της γρίπης A και έναν τύπο του ιού γρίπης B.⁵⁴

Η ασφάλεια είναι ένα πολύ σημαντικό θέμα για τον εμβολιασμό ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι Sommer και συν. προσθέτουν ότι η χορήγηση εμβολίων με απενεργοποιημένα στελέχη σε ασθενείς με καρκίνο είναι ασφαλής, αλλά η ικανότητα ενός τέτοιου ασθενή για ανοσοαπόκριση είναι σημαντικά εξαρτώμενη από το χρόνο της χορήγησης του εμβολίου σε σχέση με το χρόνο της χορήγησης χημειοθεραπείας.⁹ Έχει προταθεί ότι η ανοσολογική απάντηση είναι ασθενέστερη σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία.⁶⁹ Ένας μικρός αριθμός μελετών, με ετερογενείς πληθυσμούς ασθενών, έχουν τεκμηριώσει τα ποσοστά ορομετατροπής μετά τον εμβολιασμό σε ασθενείς με κακοήγη νόσο οι οποίοι λαμβάνουν χημειοθεραπεία.^{55,70} Υπογραμμίζεται ότι τα εμβόλια θα πρέπει να χορηγούνται τουλάχιστον μια εβδομάδα πριν από ή μετά την χημειοθεραπεία για το βέλτιστο όφελος για τον ασθενή.⁷¹ Βέβαια η βέλτιστη χρονική στιγμή για τη χορήγηση του εμβολίου της γρίπης σε ασθενείς με καρκίνο που λαμβάνουν χημειοθεραπεία, δεν είναι σαφής.⁷²

Ασθενείς με συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες είναι σε θέση να εκδηλώσουν ανοσοαπόκριση προς το εμβόλιο της γρίπης, αλλά παραμένει ασαφές αν οι τίτλοι των αντισωμάτων που επιτυγχάνονται μετά τον εμβολιασμό είναι αποτελεσματικοί στην προστασία αυτών των παιδιών από τη μόλυνση με τον ιό της γρίπης και τις επιπλοκές κατά τη διάρκεια της επόμενης περιόδου της γρίπης ή στην μείωση της σοβαρότητας της εν λόγω μόλυνσης. Πρέπει να τονιστεί ότι το εμβόλιο της γρίπης φαίνεται να είναι ασφαλές σε αυτούς τους ασθενείς.⁵⁴

Αν και τα παιδιά που λαμβάνουν χημειοθεραπεία είναι σε θέση να δημιουργήσουν ανοσοαπόκριση στο εμβόλιο της γρίπης, ωστόσο, έχουν ασθενέστερες ανοσολογικές αποκρίσεις σε σύγκριση με τα υγιή παιδιά, τα παιδιά με άσθμα ή παιδιά τα οποία έχουν ολοκληρώσει χημειοθεραπεία περισσότερο από ένα μήνα πριν από τον εμβολιασμό.⁷³ Οι ανοσοαποκρίσεις των τελευταίων είναι συγκρίσιμες με εκείνες των υγιών παιδιών. Οι διαφορές στην ανοσολογική απόκριση μεταξύ αυτών των ομάδων έχουν παρατηρηθεί, ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να αξιολογηθεί η ανοσοαπόκριση (δηλαδή τετραπλάσια αύξηση

στον τίτλο αντισώματος, οροπροστασία ή προ και μετά τον εμβολιασμό υπολογισμός GMTs) και ανεξάρτητα από το είδος του καρκίνου. Η διαφορά στην απόκριση μεταξύ αυτών των ομάδων πιθανότατα εξηγείται τόσο από την ανοσοκαταστολή, όσο και από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως από τον ίδιο τον καρκίνο.⁷⁴

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί σαφώς ότι δύο δόσεις του εμβολίου μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερη απόκριση σε σχέση με τη μια δόση, και ότι η προηγούμενη έκθεση στο κυκλοφορούν ιικό στέλεχος φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα ανοσοαπόκρισης.⁷⁵⁻⁸¹ Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα δημιουργίας μιας καλής απάντησης στο εμβόλιο της γρίπης αυξάνεται με την ηλικία. Το καλύτερο ποσοστό ανταπόκρισης σε μεγαλύτερα παιδιά είναι πιθανό να σχετίζεται με μια προηγούμενη λοίμωξη από τον ίδιο τον ιό της γρίπης.⁸¹

1.2.4 Ανοσία έναντι της γρίπης (δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης)

Η δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (Haemagglutination Inhibition Assay, HAI) είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης των ειδικών αντισωμάτων έναντι ιών ή βακτηρίων. Είναι μια εύκολη, απλή και γρήγορη μέθοδος, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων για τη σύγκριση ορολογικών αποκρίσεων σε διάφορα εμβόλια.⁸²

Κάποιες οικογένειες ιών και βακτηρίων έχουν περίβλημα ή πρωτεΐνες στην επιφάνειά τους με αποτέλεσμα να συγκολλούν ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) ανθρώπου ή ζώου, κατόπιν σύνδεσής τους με το N-ακετυλονευραμινικό οξύ της επιφανείας τους. Τα είδη των ζώων των οποίων τα ερυθροκύτταρα μπορούν να συγκολλούνται εξαρτάται από το είδος του ιού.⁸³ Καθώς κάθε παθογόνο συνδέεται σε πολλά ερυθρά αιμοσφαίρια, σχηματίζεται ένα πλέγμα το οποίο δεν επιτρέπει την κατακρήμνιση των ερυθρών, εφόσον οι συγκεντρώσεις παθογόνου - RBC είναι στη βέλτιστη ισορροπία. Ως τίτλος αιμοσυγκόλλησης καθορίζεται η τελευταία αραίωση του παθογόνου που προκαλεί συγκόλληση ορισμένης ποσότητας ερυθρών αιμοσφαιρίων.^{84, 85}

Η δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης είναι μια παραλλαγή του προσδιορισμού αιμοσυγκόλλησης (HA) που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των επιπέδων ειδικών αντισωμάτων έναντι της γρίπης στον ορό του αίματος των ασθενών.^{85,86} Με κάποιους ιούς, όπως της γρίπης A, το αντιγόνο αιμοσυγκόλλησης είναι το ίδιο με το αντιγόνο που είναι υπεύθυνο για την προσρόφηση του ιού στο

κύτταρο, και έτσι αποτελεί στόχο εξουδετέρωσης του ιού, και ως εκ τούτου η μέθοδος ΗΑΙ είναι εξαιρετικά ειδική για τα διάφορα στελέχη του ιού. Στη μέθοδο αυτή, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, διαδοχικές αραιώσεις του ορού του ασθενούς αντιδρούν με μία σταθερή ποσότητα της ιικής αιμοσυγκολλητίνης (ποσότητα ιού γρίπης) και στη συνέχεια προστίθενται ερυθροκύτταρα. Με την παρουσία του αντισώματος, η ικανότητα του ιού να συγκολλά τα ερυθροκύτταρα αναστέλλεται. Τα αντισώματα του ορού συνδέονται με την αιμοσυγκολλητίνη, επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού, παρεμβαίνοντας έτσι στην προσκόλληση του ιού στα ερυθρά κύτταρα του αίματος.⁸⁴ Η αιμοσυγκόλληση αναστέλλεται όταν τα αντισώματα είναι παρόντα σε επαρκή συγκέντρωση.^{85,86}

Θετική ορολογική απόκριση (ορομετατροπή) με τη μέθοδο αναστολής αιμοσυγκόλλησης (ΗΑΙ) θεωρείται όταν ο τίτλος των αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό είναι αυξημένος κατά 4 φορές σε σχέση με τον τίτλο πριν τον εμβολιασμό και είναι >40. Επίσης, συγκρίνονται οι γεωμετρικοί μέσοι τίτλοι ΗΑΙ (geometric mean HAI antibody titers, GMTs) των ορών που συλλέγονται προ και μετά τον εμβολιασμό.⁹

Οι ανοσολογικές απαντήσεις σε ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία είναι γενικά μικρότερες (τετραπλασιασμός του τίτλου των αντισωμάτων στο 17 έως 52% των εμβολιασμένων) σε σχέση με εκείνους που έχουν ολοκληρώσει τη χημειοθεραπεία (50 έως 83%) και τα υγιή άτομα (67-100%).⁹

1.2.5 Πρωτοβάθμια χημειοπροφύλαξη

Η πρωτοβάθμια χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση των αντι-ιικών φαρμάκων για την πρόληψη της μόλυνσης από τον ιό της γρίπης. Διάφορες στρατηγικές χημειοπροφύλαξης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές και συνιστώνται για τους πληθυσμούς ασθενών υψηλού κινδύνου που δεν μπορούν να εμβολιαστούν, ή δεν μπορούν να ανταποκριθούν στον εμβολιασμό (π.χ. σοβαρή πρωτογενής ή δευτερογενής κατάσταση ανοσοκαταστολής), ή δεν έχουν λάβει ακόμη το εμβόλιο.⁸⁷ Η εποχιακή χημειοπροφύλαξη, αναφέρεται στην ημερήσια χορήγηση ενός φαρμάκου κατά της γρίπης για περίοδο από 14 έως 18 εβδομάδες πριν από την εποχική έξαρση των ιών της γρίπης.⁸⁸

1.2.6 Δευτεροβάθμια χημειοπροφύλαξη

Η δευτεροβάθμια χημειοπροφύλαξη αναφέρεται στη χρήση αντιικών φαρμάκων για ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, όταν είναι γνωστό ή υπάρχει υποψία έκθεσης.⁸⁹

1.2.7 Τα αντιικά φάρμακα

Υπάρχουν δύο αντιικά φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τον ΕΟΦ και συνιστάνται για τη θεραπεία ή χημειοπροφύλαξη της γρίπης.^{88,90} Η οσελταμιβίρη και η ζαναμιβίρη έχουν δράση κατά της γρίπης Α και της γρίπης Β. Η οσελταμιβίρη έχει εγκριθεί σε ασθενείς ηλικίας άνω των 2 εβδομάδων. Η ζαναμιβίρη έχει εγκριθεί για χημειοπροφύλαξη σε παιδιά ηλικίας άνω των 5 ετών και για θεραπεία σε παιδιά ηλικίας άνω των 7 ετών. Η θεραπεία με αντιικά φάρμακα έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη διάρκεια του πυρετού, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο επιπλοκών από τη γρίπη, καθώς και να συντομεύσει τη διάρκεια της παραμονής στο νοσοκομείο στο γενικό πληθυσμό. Η έγκαιρη θεραπεία (ιδανικά εντός 48 ωρών) συνιστάται για τους ασθενείς με επιβεβαιωμένα ή ύποπτα συμπτώματα γρίπης που νοσηλεύονται, έχουν σοβαρή ή προοδευτικά επιδεινούμενη λοίμωξη, ή βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για επιπλοκές. Η θεραπεία δεν θα πρέπει να περιμένει την εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου σε ασθενείς οι οποίοι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο επιπλοκών. Οι ασθενείς μπορεί να υπόκεινται σε πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι μπορεί να αυξήσουν περαιτέρω τον κίνδυνο νοσηρότητας, για παράδειγμα: ηλικία μέχρι 2 ετών, διαμονή σε μονάδα χρόνιας φροντίδας, λήψη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, συνλοίμωξη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), και χρόνιες ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της πνευμονικής, καρδιαγγειακής, νεφρικής, ηπατικής, αιματολογικής, νευρολογικής και μεταβολικής κατάστασης, διαβήτη, νοητική υστέρηση ή σοβαρή αναπτυξιακή καθυστέρηση, μυϊκή δυστροφία και βλάβη του ωτιαίου μυελού.⁵⁰

Αντιική θεραπεία εντός 48 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα πιο ήπια κλινική εικόνα, συντόμευση της διάρκειας της λοίμωξης, καθώς και μείωση των επιπλοκών. Η οσελταμιβίρη (Tamiflu) και ζαναμιβίρη (Relenza) στοχεύουν το ένζυμο νευραμινιδάση και είναι αποτελεσματικές

θεραπείες για τη λοίμωξη από γρίπη. Η τυπική δοσολογία για την οσελταμιβίρη είναι 75 mg από το στόμα δύο φορές την ημέρα, και για την ζαναμιβίρη είναι 10 mg (ως δύο εισπνοές των 5 mg) δύο φορές ημερησίως. Και τα δύο φάρμακα χορηγούνται συνήθως για 5 ημέρες, αν και η διάρκεια της θεραπείας μπορεί να παραταθεί εάν ενδείκνυται κλινικά.^{10,91} Η χορήγηση οσελταμιβίρης ή ζαναμιβίρης θα πρέπει να παρέχεται για όλους τους ασθενείς με ασθένειες ή φάρμακα που σχετίζονται με ανοσοκαταστολή κι έχουν υποψία ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη από τον ιό της γρίπης.⁵⁸ Σχεδόν όλα τα στελέχη της γρίπης είναι ευαίσθητα στην οσελταμιβίρη και τη ζαναμιβίρη.⁸⁸ Ωστόσο, υπάρχουν μερικές αναφορές περιπτώσεων αντοχών που αφορούν ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Οι Ison και συν. αναφέρουν τρεις περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών με γρίπη με μοριακούς δείκτες αντοχής σε αντιγριπικά φάρμακα.⁹² Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι οι μισοί από τους ασθενείς που λάμβαναν χημειοθεραπεία είχαν προσβληθεί από ανθεκτικά στην οσελταμιβίρη στελέχη του ιού της γρίπης που εντοπίζονται τόσο πριν όσο και κατά τη διάρκεια της θεραπείας.⁹³

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αποδειχθεί ότι το εμβόλιο της γρίπης είναι δυνατό να διεγείρει την ανοσολογική απόκριση σε παιδιά με καρκίνο που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, παράγοντας αντισώματα σε ικανοποιητικό βαθμό ώστε να προστατευθούν σε μια πιθανή μόλυνση από τον ιό της γρίπης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αρχή μεθόδου

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, ο ιός της γρίπης έχει στην επιφάνειά του πολλά μόρια αιμοσυγκολλητίνης (HA), μια πρωτεΐνη που προσδένεται ειδικά σε υποδοχείς σιαλικού οξέος, όπως αυτοί που βρίσκονται στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Όταν τα ερυθροκύτταρα αναμιγνύονται με τον ιό σε κατάλληλη αναλογία, ο ιός τα συγκολλά και αλλάζει το φυσιολογικό πρότυπο με το οποίο καθιζάνουν, προκαλώντας αιμοσυγκόλληση. Όταν υπάρχει στο διάλυμα ειδικό αντίσωμα για αντιγονικές περιοχές του μορίου της HA, τότε αυτό εμποδίζει την ική HA πρωτεΐνη να προσδεθεί στους υποδοχείς στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων. Το γεγονός αυτό αναστέλλει την αιμοσυγκόλληση και αποτελεί τη βάση για τη δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (HAI).

Η δοκιμασία HAI αναπτύχθηκε από τον Hirst (1941) και αργότερα τροποποιήθηκε από τον Salk (1944). Σε γενικές γραμμές η δοκιμασία HAI πραγματοποιείται αναμιγνύοντας το τυποποιημένο ικό αντιγόνο με σειριακές αραιώσεις του ορού, προσθέτοντας εναιώρημα ερυθροκυττάρων για τον προσδιορισμό ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος στο μόριο της HA.

2.2 Υλικά

Τα υλικά που απαιτούνται για την HAI και περιλαμβάνονται στο 2012-2013 WHO INFLUENZA REAGENT KIT FOR IDENTIFICATION OF INFLUENZA ISOLATES το οποίο παράγεται και διανέμεται από το WHO COLLABORATING CENTER FOR SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF INFLUENZA, είναι τα εξής:

Αντιγόνα γρίπης έναντι της HA: αντιγόνα γρίπης τύπου A(H1N1)pdm09, A(H3) και B, τα οποία αποτελούνται από μολυσμένο αλλαντοϊκό υγρό απενεργοποιημένα σε BPL. Τα παρασκευάσματα ποικίλλουν ανάλογα με τα στελέχη που επιλέγονται για το εμβόλιο και προέρχονται είτε από ένα στέλεχος αναπροσαρμοσμένο με βάση το στέλεχος του εμβολίου, είτε από ένα στέλεχος συγκρίσιμης αναφοράς με τον αγρίου

τύπου ιό. Ορολογικά αντιγόνα γρίπης τύπου Β είναι αιθερικά εκχυλίσματα, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία.

- 1@ 10ml - Influenza A(H1N1)pdm09 Control Antigen (A/California/07/2009 NYMC X-179A), BPL inactivated Lot 1213H1AG (Cat. No. FR-187)
- 1@ 10ml - Influenza A(H3) Control Antigen (A/Victoria/361/2011 IVR-165), BPL inactivated Lot 1213H3AG (Cat. No. FR-43)
- 1@ 5ml - Influenza B Control Antigen, Yamagata lineage (B/Wisconsin/1/2010 BX41A), Ether Extracted Lot 1213BYEX (Cat. No. FR-56)

Αντιροί αναφοράς για ΗΑΙ: υπεράνοσοι αντιροί παράγονται σε πρόβατα μέσω πολλαπλών ενδομυϊκών ενέσεων με καθαρισμένη ΗΑ που προέρχεται από το αντίστοιχο στέλεχος του εμβολίου της γρίπης ή από στέλεχος αναφοράς. Οι αντιροί νυφίτσας παράγονται από νυφίτσες μέσω ενδορινικής πρόσληψης ιών αναφοράς και λήψης αναμνηστικής δόσης με συμπυκνωμένο ιό δύο εβδομάδες μετά την αρχική δόση. Αυτοί οι αντιροί επιτρέπουν την ταυτοποίηση του ιού γρίπης τύπου Α (H3N2), Α (H1N1) pdm09 και τύπου Β και χρησιμοποιούνται επίσης ως θετικός μάρτυρας αντιροών στις ορολογικές δοκιμασίες.

- 1@ 1ml - Influenza A(H1N1)pdm09 Reference Sheep Antiserum Lot 1213H1AS (Cat. No. FR-1099)
- 1@ 1ml - Influenza A(H3N2) Reference Ferret Antiserum Lot 1213H3AS (Cat. No. FR-1100)
- 1@ 1ml - Influenza B Reference Ferret Antiserum, B/Yamagata lineage Lot 1213ASFY (Cat. No. FR-46)

Άλλα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και δεν περιλαμβάνονται στο παραπάνω kit είναι τα εξής:

1. Ερυθροκύτταρα γαλοπούλας (RBC) 0,5%
2. Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2.
3. Φυσιολογικός ορός, 0.85%.
4. Πλάκες μικροτιτλοδότησης, 96 θέσεων, σχήματος V

5. 1 @ 20ml - Receptor Destroying Enzyme (DENKA).

2.3 Βασικά βήματα

- 1) Επώαση με Receptor Destroying Enzyme (RDE) των αντιορών αναφοράς και των ορών (δείγματα) για απομάκρυνση των μη ειδικών αναστολέων.
- 2) Δοκιμασία αιμοσυγκόλλησης (HA) για την τιτλοδότηση των αντιγόνων αναφοράς. Επιθυμητός τίτλος τα 8 HAunits/50μl.
- 3) Προσαρμογή του τίτλου των αντιγόνων αναφοράς στα 8 HAunits/50μl και ανάστροφη τιτλοδότηση (back titration).
- 4) Εφαρμογή της δοκιμασίας αναστολής της αιμοσυγκόλλησης (HAI) και καταγραφή αποτελεσμάτων.

2.4 Στάδια αναλυτικά

I) Αραίωση των ερυθροκυττάρων γαλοπούλας, ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5%.

II) Επεξεργασία των ορών:

A. Απομάκρυνση των μη ειδικών αναστολέων των ορών

Οροί από πολλά είδη ζώων περιέχουν μη ειδικούς αναστολείς της αιμοσυγκόλλησης, οι οποίοι αν δεν αφαιρεθούν, μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Για την αποφυγή τέτοιων αποτελεσμάτων, πραγματοποιείται επώαση των ορών των δειγμάτων και των αντιορών αναφοράς με RDE. Αν υπάρχει υποψία μη πλήρους απομάκρυνσης των μη ειδικών αναστολέων, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυξημένη συγκέντρωση RDE. Αν η επώαση με το RDE είναι ανεπιτυχής, εναλλακτικές μέθοδοι μπορεί να είναι η θέρμανση ή η επώαση με θρυψίνη σε συνδυασμό με θέρμανση.

Η συνήθης διαδικασία επώασης με RDE, περιλαμβάνει:

1. Ανασύσταση του RDE με 20ml φυσιολογικό ορό.

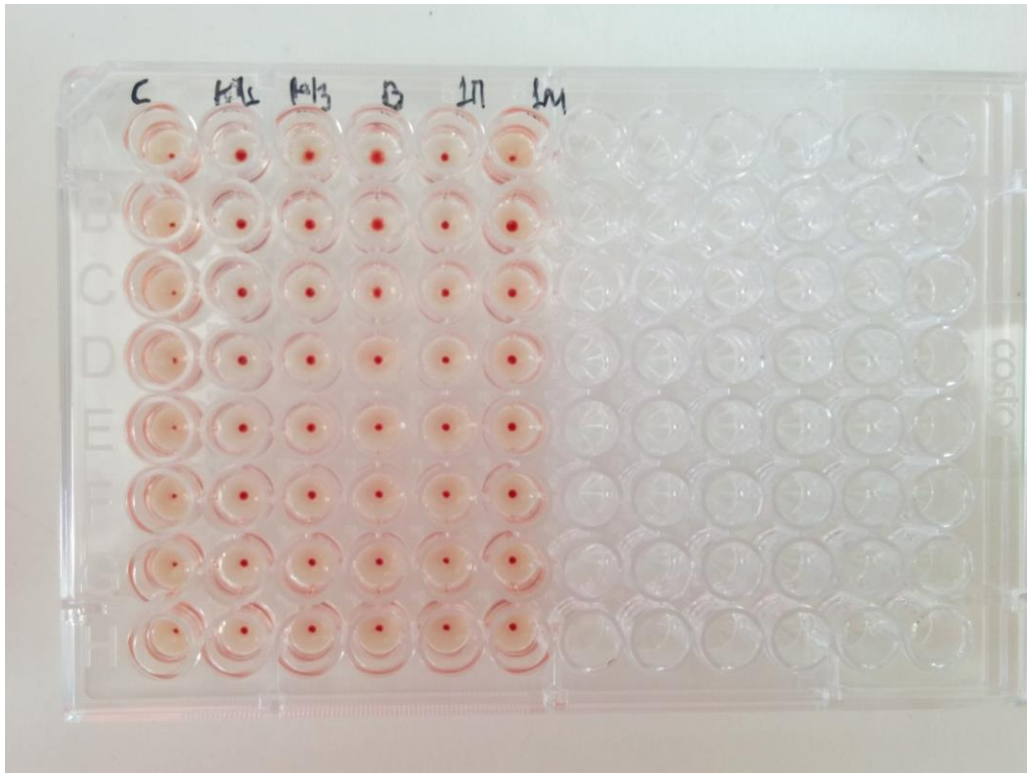
2. Προσθήκη 3 όγκων RDE σε 1 όγκο ορού (0,3ml RDE+0,1ml ορού). Επώαση για 12-18 ώρες στους 37°C.
3. Θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά. Προσθήκη 6 όγκων φυσιολογικού ορού (0,6ml στα 0,4ml RDE+ορός), ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1ml και η αρχική αραίωση του ορού να είναι 1:10.

B. Καθορισμός της ύπαρξης μη ειδικών συσσωματώματων και απομάκρυνσή τους

Για να καθορίσουμε αν υπάρχουν μη ειδικά συσσωματώματα, παρά την επώαση με το RDE, ακολουθούμε τη διαδικασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης, με τη διαφορά ότι προσθέτουμε PBS αντί για αντιγόνο. Τα βήματα που ακολουθούμε είναι:

1. Προσθέτουμε 25ml PBS στις θέσεις B1-H12 στην πλάκα μικροτιτλοδότησης.
2. Προσθέτουμε 50ml του κάθε αραιωμένου ορού στην πρώτη θέση της κατάλληλης αριθμημένης στήλης. Η αρχική αραίωση του κάθε ορού είναι 1:10.
3. Πραγματοποιείται σειριακή αραίωση 1:2 των ορών, μεταφέροντας 25ml από την πρώτη θέση κάθε αριθμημένης στήλης, διαδοχικά μέχρι την 8^η θέση. Απορρίπτουμε τα τελευταία 25ml μετά τη σειρά H.
4. Προσθέτουμε 25ml PBS σε όλες τις θέσεις της πλάκας.
5. Προσθέτουμε 50ml RBC σε όλες τις θέσεις της πλάκας και ανάδευση.
6. Αφήνουμε τα RBCs να κατακρημνιστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45 λεπτά.
7. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα σημειώνοντας “+” στις αραιώσεις που υπάρχει αιμοσυγκόλληση.

Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η ύπαρξη αιμοσυγκόλλησης σε όλες της θέσεις της πλάκας, καθώς η αναστολή θα σήμαινε τη μη απομάκρυνση των μη ειδικών αναστολέων με το RDE.



Εικόνα 4: Αιμοσυγκόλληση σε όλες τις θέσεις για τα reference antisera και το δείγμα #1, που δείχνει ότι μετά από επώαση με το RDE, καλύφθηκαν τυχόν μη ειδική αναστολείς.

Η απομάκρυνση των μη ειδικών συσσωματωμάτων, αν υπάρχουν, γίνεται με την εξής διαδικασία:

1. Σε 1 όγκο RBC, προσθέτουμε 20 όγκους επωασμένου με RDE ορού.
2. Αναδεύουμε και επωάζουμε στους 4°C-8°C για 1 ώρα.
3. Φυγοκεντρούμε στα 300g για 5 λεπτά.
4. Προσεκτικά αφαιρούμε το υπερκείμενο, χωρίς να αναταράξουμε τα RBC.
5. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία ελέγχου των ορών για μη ειδικά συσσωματώματα, που περιγράφηκε παραπάνω, μέχρι να έχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

III) HA τιτλοδότηση των αντιγόνων αναφοράς

Η τιτλοδότηση των αντιγόνων αναφοράς, πρέπει να γίνεται κάθε φορά πριν τη δοκιμασία HAI.

1. Προσθέτουμε 50μl PBS στις θέσεις 2-12 σε κάθε σειρά με γράμμα στην πλάκα μικροτιτλοδότησης.

2. Προσθέτουμε 100μl από κάθε αντιγόνο στην πρώτη θέση κάθε σειράς με γράμμα.
3. Πραγματοποιούμε σειριακές αραιώσεις 1:2 για κάθε αντιγόνο, μεταφέροντας 50μl από την πρώτη θέση, διαδοχικά μέχρι τη 12^η.
4. Προσθέτουμε 50μl RBCs σε όλες τις θέσεις της πλάκας και αναδεύουμε.
5. Επωάζουμε τις πλάκες σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45 λεπτά ώστε να κατακρημνιστούν τα RBCs.
6. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα σημειώνοντας “+” για αιμοσυγκόλληση. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση του ιού στην οποία παρατηρείται πλήρης αιμοσυγκόλληση, θεωρείται και ο τίτλος του ιού. Π.χ. αν η τελευταία αραιώση στην οποία παρατηρείται πλήρης αιμοσυγκόλληση είναι η 1:16, τότε ο HA τίτλος είναι 16.

IV) Προετοιμασία των αντιγόνων για δοκιμασία HAI «αντίστροφη τιτλοδότηση».

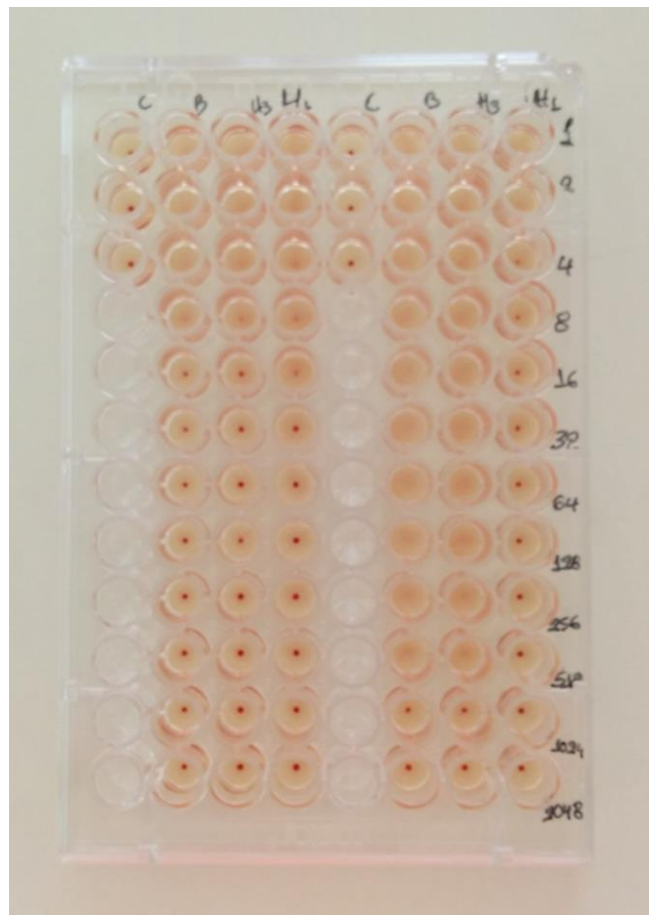
Η «μονάδα» (unit) αιμοσυγκόλλησης δεν είναι μια ποσοτική μέτρηση του ιού, αλλά είναι μια πρακτική μονάδα μέτρησης που εξαρτάται από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την HA τιτλοδότηση. Μια HA unit ορίζεται ως η ποσότητα του ιού που απαιτείται για να συγκολληθεί ίσου όγκου εναιώρημα ερυθροκυττάρων.

1. Καθορίζουμε τον όγκο του αντιγόνου αναφοράς που απαιτείται για τη δοκιμασία HAI. Για παράδειγμα, για την εξέταση 1 δείγματος, δηλαδή 2 ορών αφού για κάθε ασθενή έχουμε ορό πριν και μετά τον εμβολιασμό με το εμβόλιο της γρίπης, ο καθένας από τους οποίους αραιώνεται διαδοχικά σε 8 θέσεις και προστίθενται 25μl αντιγόνου σε κάθε θέση, χρειαζόμαστε: $2 \text{ οροί} * 8 \text{ θέσεις} * 25\mu\text{l} \text{ αντιγόνου} = 400\mu\text{l} \text{ αντιγόνου}$. Προετοιμάζουμε και επιπλέον όγκο για την αντίστροφη τιτλοδότηση και ως πλεόνασμα.

2. Η επιθυμητή συγκέντρωση αντιγόνου για τη δοκιμασία HAI είναι 4 HA units/25μl ή 8 HA units/50μl. Επομένως, υπολογίζουμε την αραιώση που πρέπει να γίνει στο αντιγόνο διαιρώντας τον τίτλο του HA, ο οποίος βασίζεται στα 50μl, με το 8. Για παράδειγμα, ένας τίτλος HA 16 διαιρούμενος με το 8, ισούται με 2. Επομένως, αναμιγνύουμε 1 μέρος από το αντιγόνο με 1 μέρος PBS, ώστε να

αποκτήσουμε τον επιθυμητό όγκο αντιγόνου που έχουμε υπολογίσει ότι απαιτείται. Προετοιμάζουμε την αραιώση και την καταγράφουμε.

3. Προχωράμε σε «αντίστροφη τιτλοδότηση» για να επαληθεύσουμε ότι αραιώσαμε το αντιγόνο στα επιθυμητά units, εφαρμόζοντας για δεύτερη φορά τη δοκιμασία HA. Αν ένα αντιγόνο δεν έχει τίτλο 8, θα πρέπει να προσαρμόσουμε τη συγκέντρωσή του καταλλήλως, είτε προσθέτοντας περισσότερο αντιγόνο για να αυξήσουμε τα units, είτε αραιώνοντας το αντιγόνο για να μειώσουμε τα units. Για παράδειγμα, αν ένα αντιγόνο έχει τίτλο 16, τότε θα πρέπει να αραιωθεί 1:2. Αντίθετα, αν ένα αντιγόνο έχει τίτλο 4, τότε θα πρέπει να του προσθέσουμε ίσου όγκου αντιγόνο, ώστε να διπλασιαστεί η συγκέντρωση του ιού και να έχουμε τίτλο 8.

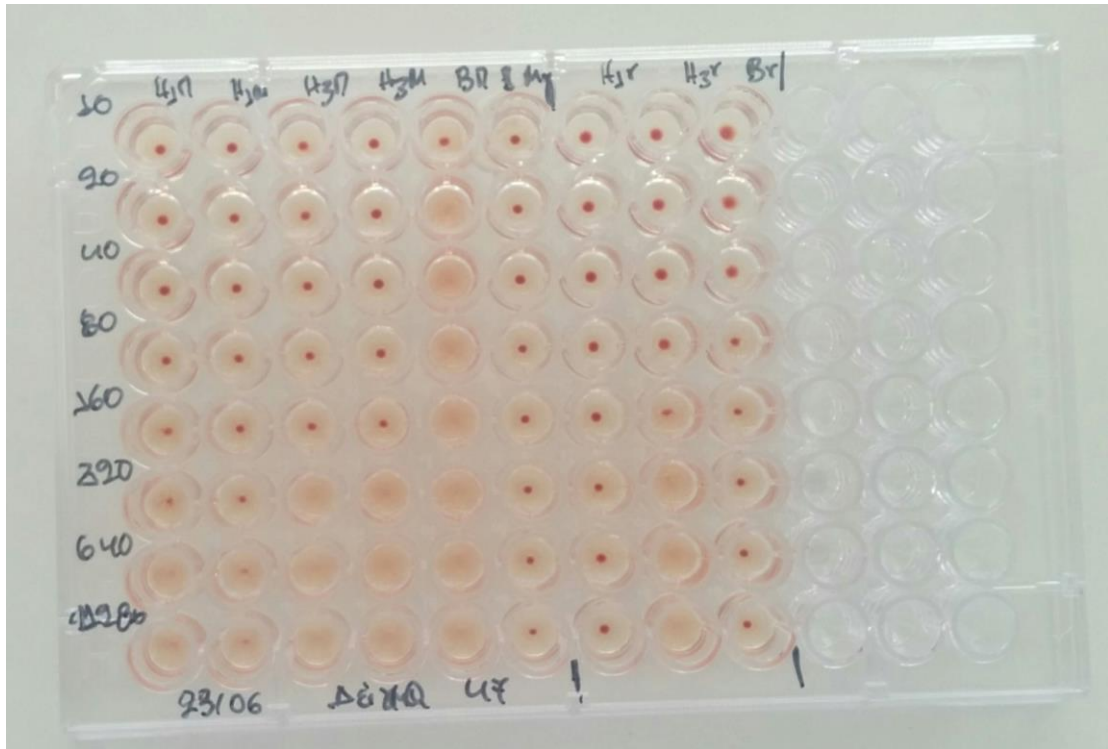


Εικόνα 5: Στο δεξί μισό της πλάκας είναι η πρώτη τιτλοδότηση των αντιγόνων αναφοράς, ενώ στο αριστερό μισό η «αντίστροφη» τιτλοδότηση μετά από αραιώση των ιών στα 8 units/50μl.

V) Δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης (HAI)

Η δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης πραγματοποιείται και για τα 3 στελέχη που περιλαμβάνει το εμβόλιο [A(H1N1)pdm09, A(H3), B/Wisconsin/1/2010]. Σε αυτό το σημείο οι οροί και οι αντιοροί αναφοράς έχουν επωαστεί με RDE και τα αντιγόνα αναφοράς έχουν καθορισμένο τίτλο, 4 units/25μl. Το μισό μέρος κάθε πλάκας μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιείται για 1 δείγμα, με 2 στήλες να αντιστοιχούν σε καθένα από τα 3 αντιγόνα, 1 στήλη για τον ορό πριν τον εμβολιασμό και 1 στήλη για τον ορό μετά τον εμβολιασμό. Χρησιμοποιούμε 3 επιπλέον στήλες για τους αντιορούς αναφοράς, οι οποίοι αποτελούν τα control για κάθε ιό.

1. Προσθέτουμε 25μl PBS στις θέσεις B1-H12 στην πλάκα μικροτιτλοδότησης.
2. Προσθέτουμε 50μl του κάθε αραιωμένου ορού στην πρώτη θέση της κατάλληλης αριθμημένης στήλης. Η αρχική αραιώση του κάθε ορού είναι 1:10.
3. Πραγματοποιείται σειριακή αραιώση 1:2 των ορών, μεταφέροντας 25μl από την πρώτη θέση κάθε αριθμημένης στήλης, διαδοχικά μέχρι την 8^η θέση. Απορρίπτουμε τα τελευταία 25μl μετά τη σειρά Η.
4. Προσθέτουμε 25μl από τα αντιγόνα, στις στήλες που αντιστοιχεί το καθένα.
5. Αναδεύουμε το περιεχόμενο της πλάκας και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 50μl RBC σε όλες τις θέσεις της πλάκας και αναδεύουμε.
7. Αφήνουμε τα RBCs να κατακρημνιστούν σε θερμοκρασία δωματίου για 30-45 λεπτά.
8. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα σημειώνοντας “+” στις αραιώσεις που υπάρχει αιμοσυγκόλληση. Ο τίτλος HAI είναι η τελευταία αραιώση στην οποία η αιμοσυγκόλληση αναστέλλεται πλήρως.



Εικόνα 6: Αποτέλεσμα ΗΑΙ (ενδεικτικό δείγμα #47). Φαίνεται η διαφορά στην αιμοσυγκόλληση πριν και μετά τον εμβολιασμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Δείγμα

Όπως αναφέρθηκε στον πρόλογο της εργασίας, ο σχεδιασμός της έρευνας και η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο Ογκολογικό τμήμα του Νοσοκομείου Παιδών Π&Α Κυριακού (ΟΤΑΚ) και τη Β' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική (ΒΠΠΚ) του Νοσοκομείου. Ως εκ τούτου, το δείγμα αποτέλεσαν 80 παιδιά που νοσηλεύθηκαν στο Νοσοκομείο κι εμβολιάστηκαν με το τριδύναμο εμβόλιο της γρίπης την περίοδο 2012-2013. Τα χαρακτηριστικά των παιδιών αυτών είναι τα εξής:

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ
Φύλο	
Αγόρια	39
Κορίτσια	41
Είδος Καρκίνου	
Λευχαιμίες (ΟΛΛ/ΟΜΛ)	48
Συμπαγείς Όγκοι	32
Κατάσταση Θεραπείας (όταν εμβολιάστηκαν)	
Σε Θεραπεία	68
Εκτός Θεραπείας (>120 ημέρες)	10
Πριν τη Θεραπεία	2
Τύπος Θεραπείας (για τα άτομα σε θεραπεία)	
Εντατική	34
Συντήρηση	34
Χρόνος Εμβολιασμού από Τελευταία Θεραπεία	ΗΜΕΡΕΣ
Διάμεση Τιμή	3
Μέση Τιμή	58
Εύρος	0-1141
Χρόνος Δειγματοληψίας μετά τον Εμβολιασμό	
Διάμεση Τιμή	47
Μέση Τιμή	57
Εύρος	10-173

3.2 Αποτελέσματα ΗΑΙ

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας της αναστολής αιμοσυγκόλλησης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες. Σημειώνεται το σύμβολο «+» στις περιπτώσεις τετραπλασιασμού του τίτλου των αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με τον τίτλο πριν τον εμβολιασμό κι επομένως επιτυχή ανοσοποίηση. Το σύμβολο «-» δηλώνει μη αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, δηλαδή ίδιος τίτλος πριν και μετά τον εμβολιασμό, γεγονός που δείχνει ότι δεν είχε κάποια επίδραση το

εμβόλιο στις περιπτώσεις αυτές. Τέλος, το σύμβολο «+/-» δηλώνει αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων που όμως δεν έφτασε τον τετραπλασιασμό.

- Για το στέλεχος H1N1 του ιού της γρίπης Α:

Δείγμα	Τίτλος H1N1		H1N1
	Πριν από τον εμβολιασμό	Μετά τον εμβολιασμό	Αποτέλεσμα
1	40	160	+
2	160	1280	+
3	0	0	-
4	0	80	+
5	40	160	+
6	10	1280	+
7	0	0	-
8	320	320	-
9	320	320	-
10	160	1280	+
11	10	0	-
12	0	0	-
13	10	10	-
14	40	160	+
15	160	320	+/-
16	40	160	+
17	20	320	+
18	0	320	+
19	20	80	+
20	640	640	-
21	0	10	-
22	80	160	+/-
23	80	1280	+
24	160	160	-
25	40	160	+
26	320	1280	+
27	160	1280	+
28	10	40	+
29	10	320	+
30	80	1280	+
31	40	80	+/-
32	20	1280	+
33	160	1280	+
34	10	640	+
35	40	320	+

36	10	40	+
37	160	160	-
38	20	40	+/-
39	0	40	+
40	1280	1280	-
41	80	160	+/-
42	320	640	+/-
43	10	10	-
44	20	20	-
45	40	40	-
46	40	1280	+
47	80	320	+
48	0	0	-
49	80	80	-
50	20	20	-
51	20	20	-
52	10	0	-
53	20	20	-
54	80	160	+/-
55	40	40	-
56	10	80	+
57	20	40	+/-
58	40	10	?
59	0	40	+
60	80	640	+
61	0	40	+
62	0	0	-
63	40	640	+
64	40	640	+
65	0	0	-
66	160	160	-
67	0	0	-
68	40	1280	+
69	20	80	+
70	160	160	-
71	0	1280	+
72	10	40	+
73	40	40	-
74	40	160	+
75	160	1280	+
76	80	160	+/-
77	0	0	-
78	20	80	+

79	40	40	-
80	20	40	+/-

- Για το στέλεχος H3N2 του ιού της γρίπης Α:

Δείγμα	Τίτλος H3N2		H3N2
	Πριν από τον εμβολιασμό	Μετά τον εμβολιασμό	Αποτέλεσμα
1	40	160	+
2	640	1280	+/-
3	10	80	+
4	320	320	-
5	1280	1280	-
6	160	1280	+
7	160	320	+/-
8	80	80	-
9	0	0	-
10	0	20	-
11	10	10	-
12	0	0	-
13	20	320	+
14	160	1280	+
15	640	1280	+/-
16	0	0	-
17	160	640	+
18	0	20	-
19	160	160	-
20	10	160	+
21	1280	1280	-
22	0	0	-
23	20	160	+
24	80	80	-
25	20	320	+
26	640	1280	+
27	160	1280	+
28	40	40	-
29	160	320	+/-
30	10	160	+
31	0	10	-

32	10	32	+/-
33	10	80	+
34	160	0	?
35	320	1280	+
36	10	40	+
37	20	80	+
38	80	160	+/-
39	80	1280	+
40	20	20	-
41	40	40	-
42	0	0	-
43	0	0	-
44	0	10	-
45	80	80	-
46	0	0	-
47	160	160	-
48	10	10	-
49	40	320	+
50	20	20	-
51	20	20	-
52	20	20	-
53	20	40	-
54	20	80	+
55	0	0	-
56	80	80	-
57	40	40	-
58	0	0	-
59	0	0	-
60	80	160	+/-
61	40	160	+
62	320	320	-
63	10	1280	+
64	0	320	+
65	10	160	+
66	80	320	+
67	80	80	-
68	80	1280	+
69	320	320	-

70	80	80	-
71	0	40	+
72	20	20	-
73	80	160	+/-
74	40	160	+
75	160	1280	+
76	20	40	+/-
77	160	1280	+
78	0	40	+
79	40	40	-
80	40	80	+

- Για τον ιό της γρίπης Β:

Δείγμα	Τίτλος Β		Β Δείγμα
	Πριν από τον εμβολιασμό	Μετά τον εμβολιασμό	
1	20	20	-
2	10	10	-
3	0	40	+
4	40	1280	+
5	320	1280	+
6	0	320	+
7	0	0	-
8	0	40	+
9	0	20	-
10	0	20	-
11	10	0	-
12	0	0	-
13	160	1280	+
14	0	0	-
15	1280	1280	-
16	0	0	-
17	20	20	-
18	1280	1280	-
19	320	640	+/-
20	0	20	-
21	1280	1280	-
22	0	10	-
23	40	640	+
24	40	10	-

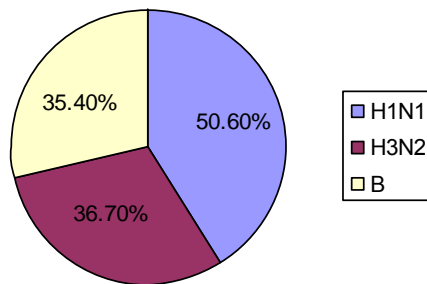
25	160	1280	+
26	80	640	+
27	160	1280	+
28	10	10	-
29	0	0	-
30	10	10	-
31	0	10	-
32	0	80	+
33	10	40	+
34	80	0	-
35	80	320	+
36	0	10	-
37	0	0	-
38	160	160	-
39	80	640	+
40	20	20	-
41	640	640	-
42	0	20	-
43	320	320	-
44	10	10	-
45	40	40	-
46	0	10	-
47	10	1280	+
48	0	0	-
49	20	80	+
50	10	10	-
51	10	10	-
52	10	10	-
53	80	80	-
54	80	320	+
55	0	0	-
56	80	80	-
57	40	40	-
58	10	20	-
59	0	0	-
60	40	40	-
61	20	320	+
62	0	0	-
63	40	640	+
64	80	320	+
65	10	10	-
66	40	640	+

67	0	0	-
68	40	320	+
69	20	80	+
70	80	80	-
71	20	320	+
72	160	1280	+
73	20	0	-
74	0	0	-
75	0	640	+
76	10	40	+
77	10	0	-
78	80	160	+
79	20	80	+
80	40	40	-

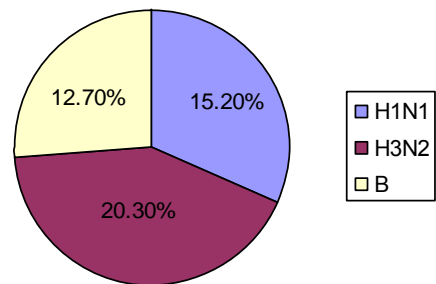
3.3. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS Statistics. Από τα 80 άτομα εξαιρέθηκε 1 άτομο από τη στατιστική ανάλυση, λόγω εργαστηριακής απώλειας του δείγματος. Τα ποσοστά των επιτυχών απαντήσεων, δηλαδή των ατόμων που πέτυχαν τετραπλασιασμό του τίτλου των αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό και θεωρούνται προστατευμένα, καθώς και ο αριθμός αυτών στο σύνολο 79 ατόμων είναι τα εξής: 50.6% (40/79) για τον H1N1, 36.7% (29/79) για τον H3N2 και 35.4% (28/79) για τον ιό της γρίπης B. Εκτός από τα άτομα αυτά, υπήρχαν και άλλα στα οποία παρατηρήθηκε μερική αύξηση του τίτλου, μικρότερη από τετραπλασιασμό, κι επομένως τα άτομα αυτά θεωρούνται μερικώς προστατευμένα. Τα ποσοστά τους διαμορφώθηκαν ως εξής: 15.2% (12/79) για τον H1N1, 20.3% (16/79) για τον H3N2 και 12.7% (10/79) για τον ιό της γρίπης B. Αθροιστικά, τα ποσοστά των ασθενών που θεωρούνται είτε πλήρως είτε μερικώς προστατευμένα από το εμβόλιο της γρίπης είναι τα εξής: 65.8% (52/79) για τον H1N1, 57% (45/79) για τον H3N2 και 48.1% (38/79) για τον ιό της γρίπης B.

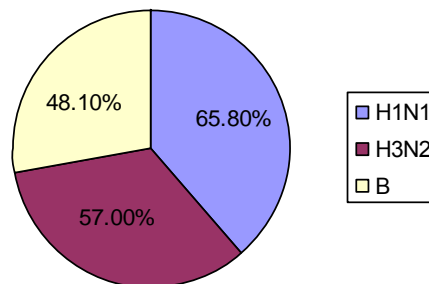
Συνολικό Ποσοστό Επιτυχίας



Μερική Αύξηση Τίτλου

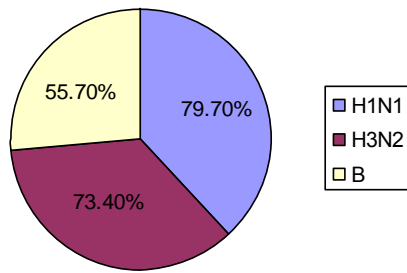


Οποιαδήποτε Αύξηση Τίτλου

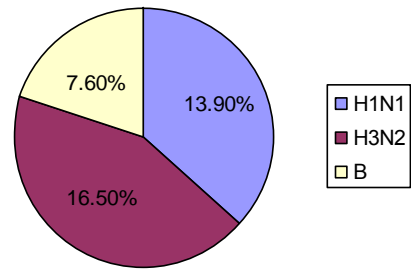


Μια επιπλέον ανάλυση αφορά ασθενείς για τους οποίους ο τίτλος της ΗΑΙ μετά τον εμβολιασμό ήταν μεγαλύτερος του 40, το οποίο θεωρείται προστατευτικό όριο. Στην περίπτωση αυτή τα ποσοστά ανοσοποιημένων ασθενών των οποίων η ανοσοποίηση προέρχεται είτε από τον πρόσφατο εμβολιασμό, είτε από παλαιότερο εμβολιασμό, είτε από προηγούμενη λοίμωξη είναι τα εξής: 79.7% (63/79) για τον Η1Ν1, 73.4% (58/79) για τον Η3Ν2 και 55.7% (44/79) για τον ιό της γρίπης Β. Τα ποσοστά των ατόμων που είχαν προηγούμενη επαφή με κάποιο στέλεχος ιού γρίπης είναι τα εξής: 13.9% (11/79), 16.5% (13/79) και 7.6% (6/79), αντίστοιχα.

Τίτλος Μεγαλύτερος του 40

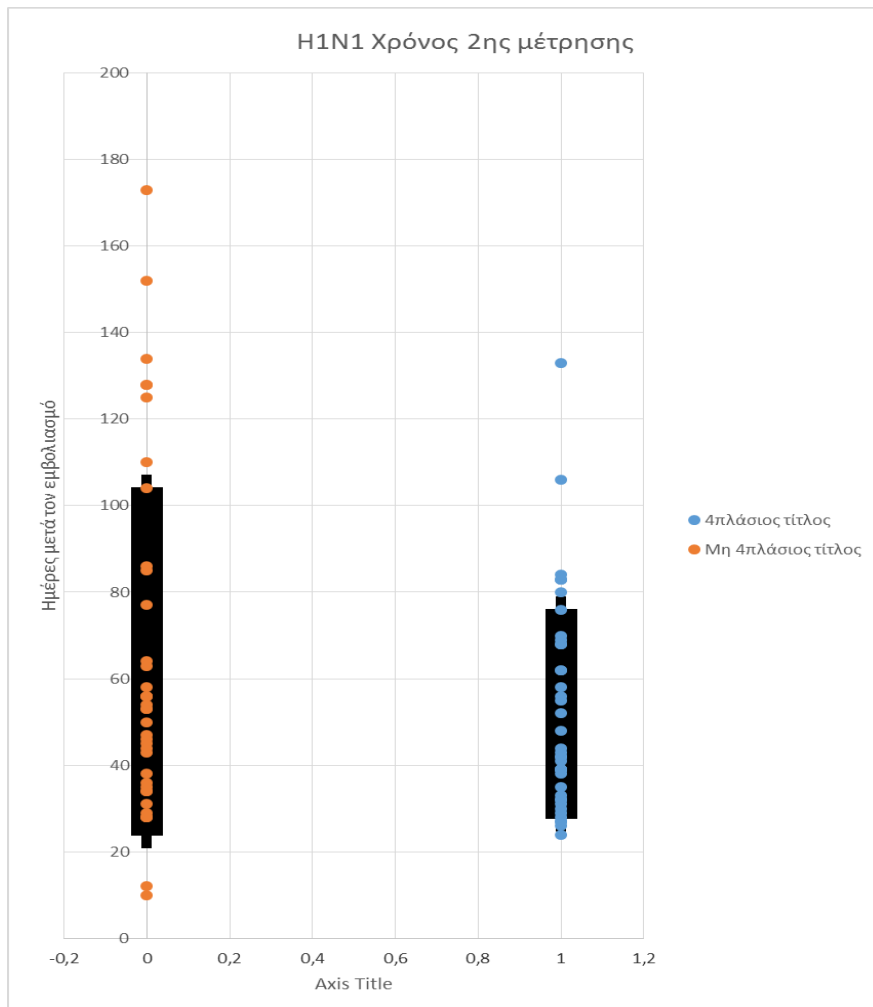


Προηγούμενη Επαφή με τον Ιό

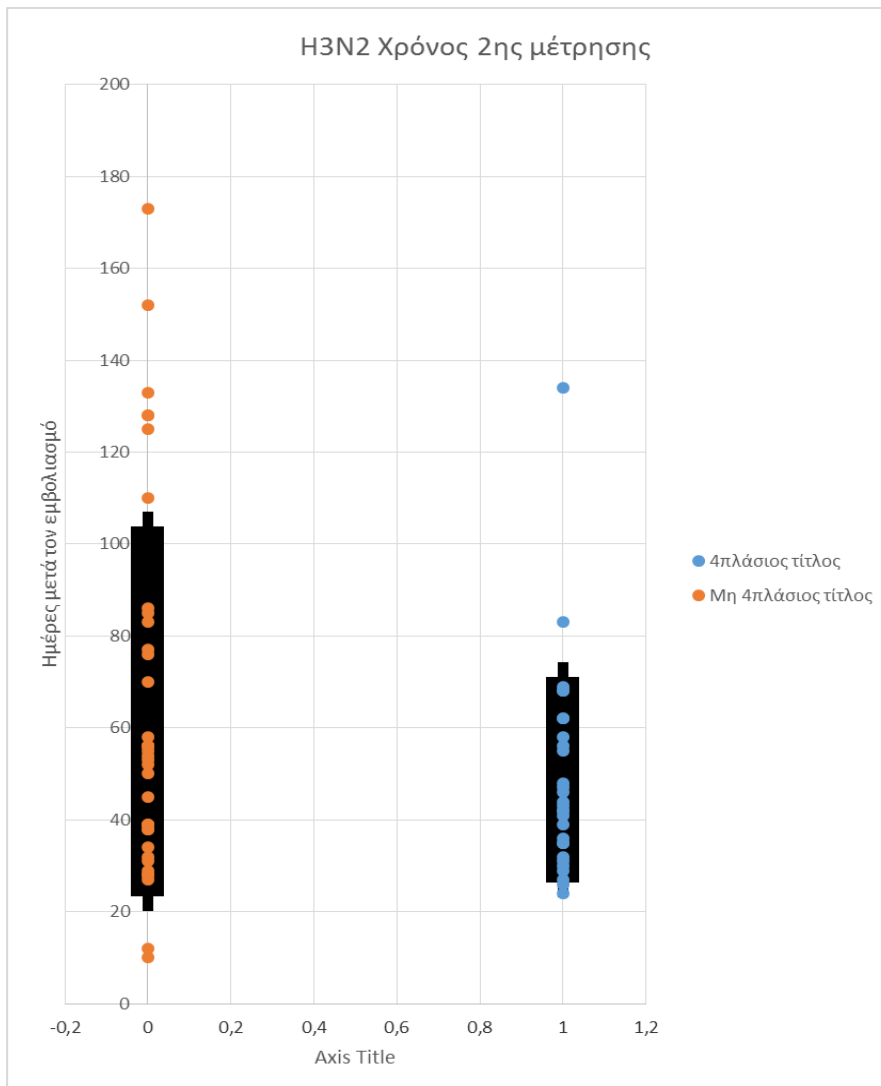


Ακολουθούν γραφήματα που δείχνουν τα δείγματα με τετραπλασιασμό των τίτλων έναντι όλων των υπολοίπων δειγμάτων με βάση την ανάλυση που έγινε στο χρόνο (ημέρες).

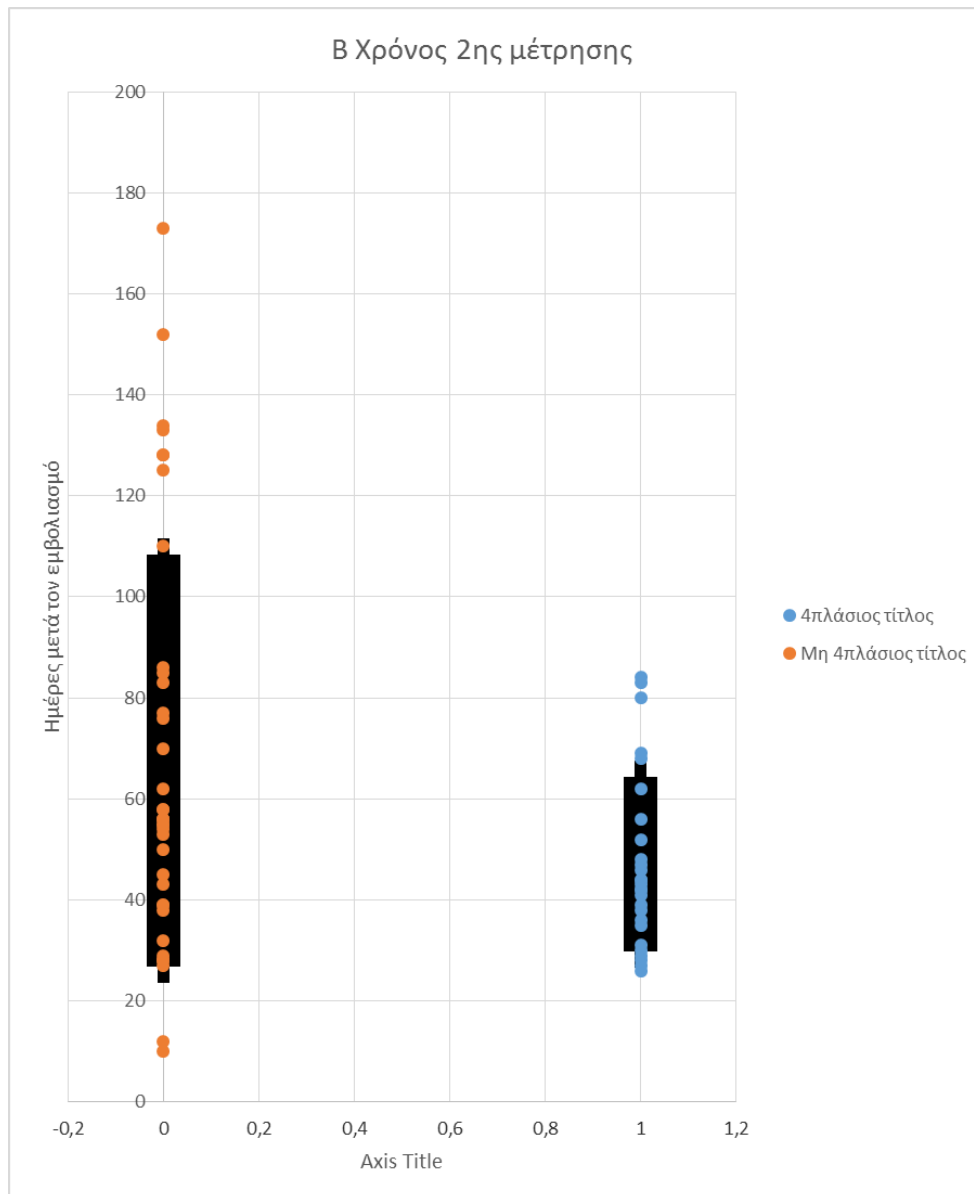
- Για τον H1N1



- Για τον H3N2



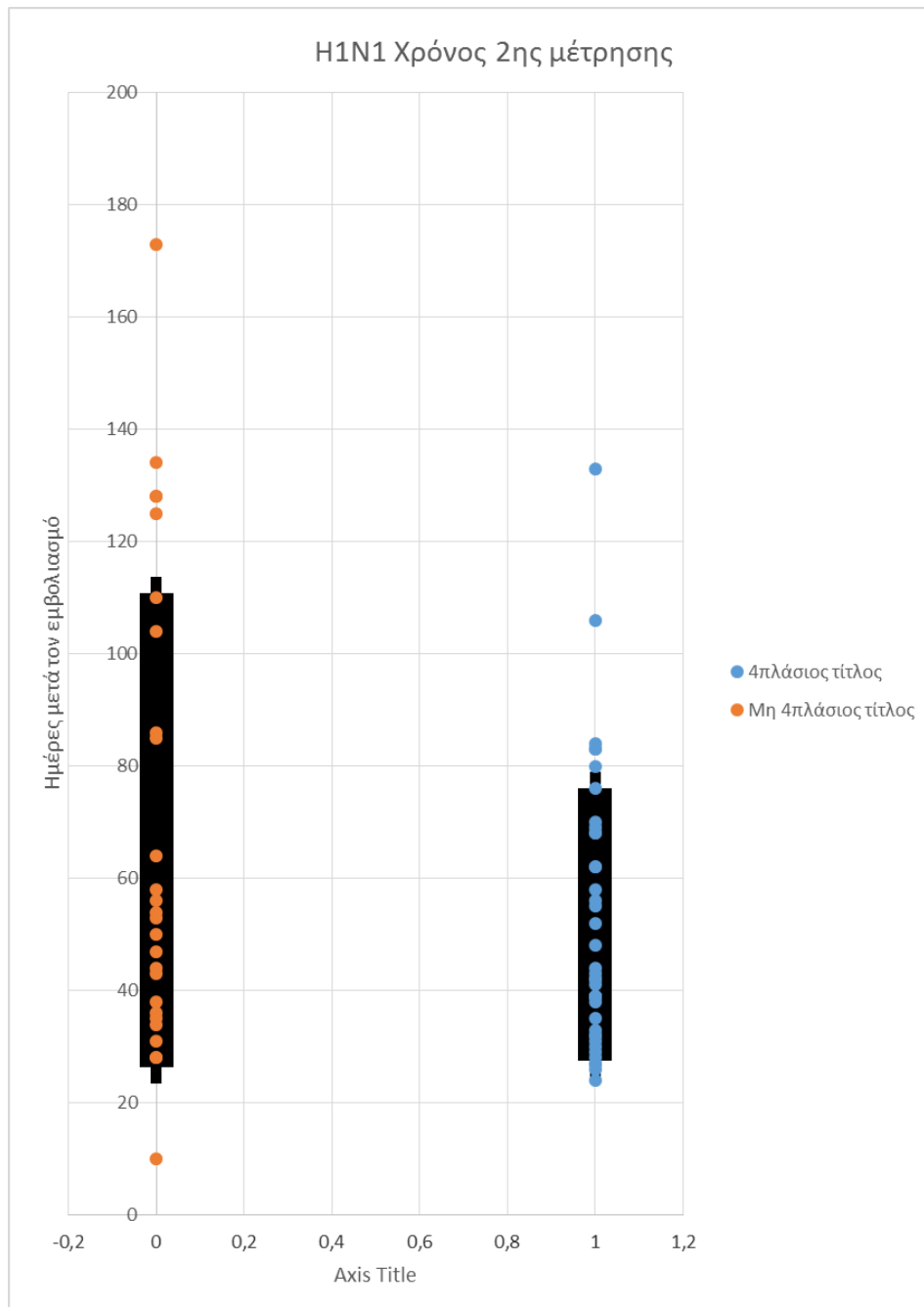
- Για τον ιό της γρίπης Β



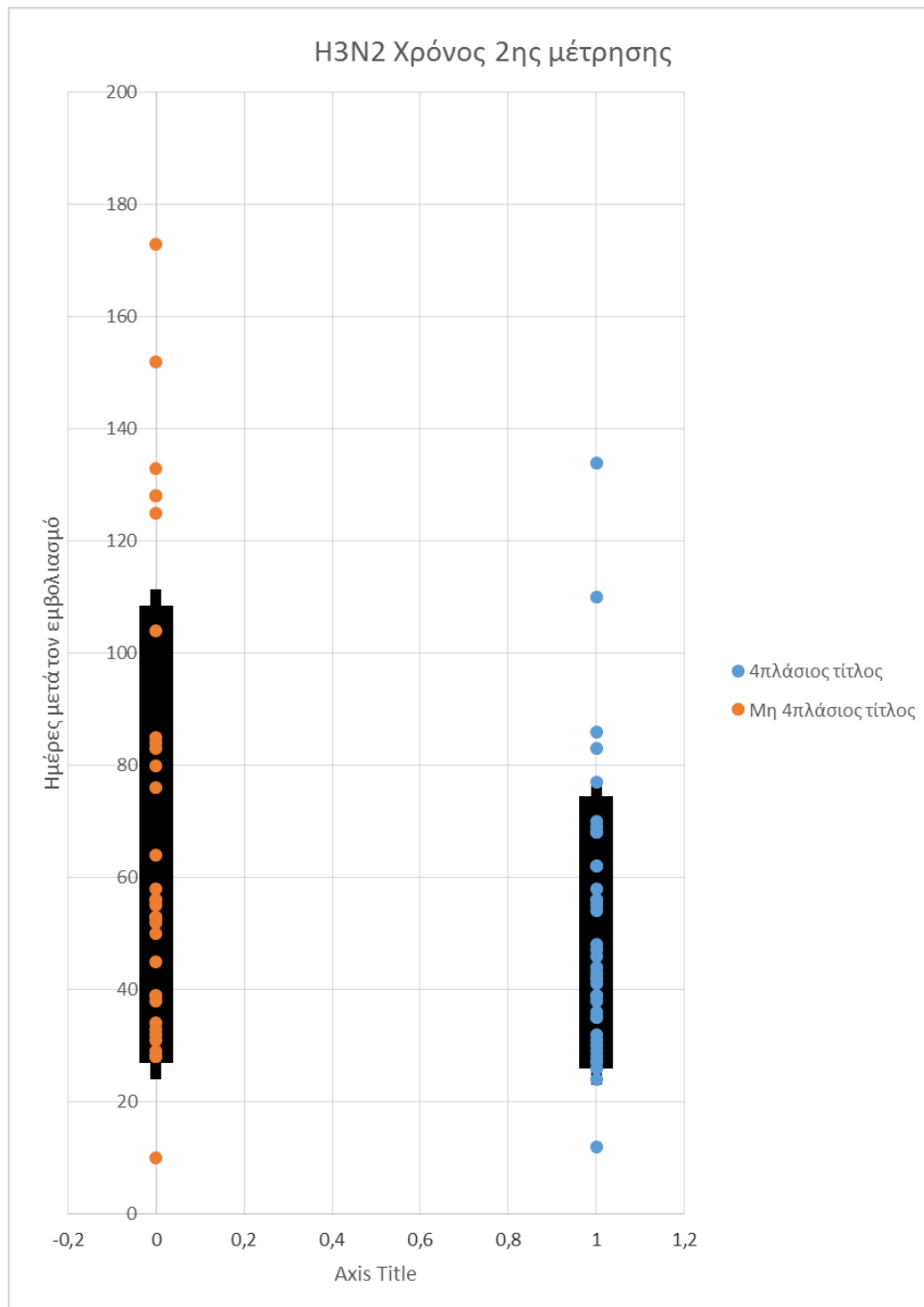
Σχόλια: Η μέση τιμή των ημερών που εμφανίζονται τα αντισώματα σε επίπεδο πληθυσμού για τον καθένα από τους τρεις ιούς είναι 42.5, 43 και 43 αντίστοιχα, για την ομάδα που παρουσίασε τετραπλασιασμό του τίτλου. Ο μέσος όρος των ημερών που εμφανίζονται αντισώματα είναι 51.8, 48.7, 47, αντίστοιχα, αλλά η μέση τιμή θεωρείται ασφαλέστερη τιμή λόγω του μεγάλου χρονικού εύρους που έγινε η δειγματοληψία και του γεγονότος ότι δεν υπάρχει ομάδα ελέγχου προκειμένου να συγκρίνουμε τις τιμές.

Τα παρακάτω γραφήματα αφορούν τα δείγματα με τετραπλασιασμό τίτλου αθροιζόμενα μαζί με αυτά με απλή αύξηση, έναντι όλων των υπολοίπων, με χρονική ανάλυση των ημερών σε σχέση με τον εμβολιασμό.

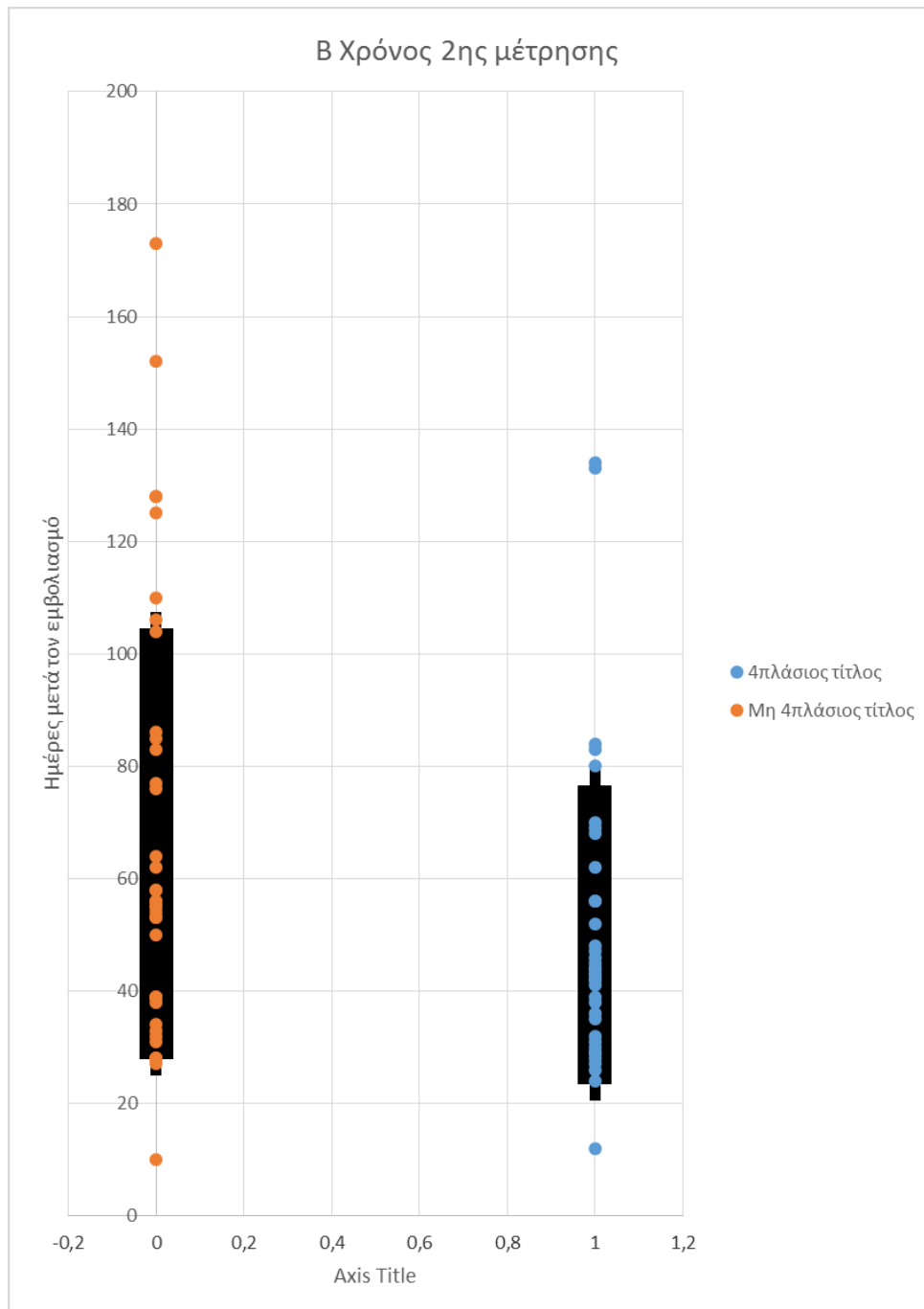
- Για τον H1N1



- Για τον H3N2



- Για τον ιό της γρίπης Β



Σχόλια: Η μέση τιμή των ημερών που εμφανίζονται αντισώματα σε επίπεδο πληθυσμού για την ομάδα των ατόμων που εμφάνισαν οποιαδήποτε αύξηση του τίτλου μετά τον εμβολιασμό σε σχέση με πριν είναι: 44.5, 44, 43 για τους τρεις ιούς, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος των ημερών για την ομάδα αυτή είναι 52.4, 50.8, 49.9, αντίστοιχα. Όμως, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μέση τιμή θεωρείται ασφαλέστερη

τιμή λόγω του μεγάλου χρονικού εύρους που έγινε η δειγματοληψία και του γεγονότος ότι δεν υπάρχει ομάδα ελέγχου προκειμένου να συγκρίνουμε τις τιμές.

Δεδομένου ότι το εύρος του χρόνου λήψης του δείγματος μετά τον εμβολιασμό είναι μεγάλο (10-173 ημέρες), κρίθηκε σκόπιμο για την καλύτερη απεικόνιση των περαιτέρω αναλύσεων να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες:

- 1) Αποκρίσεις σε άτομα για τα οποία η δειγματοληψία έγινε μέχρι και 45 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.
- 2) Αποκρίσεις σε άτομα για τα οποία η δειγματοληψία έγινε στο χρονικό διάστημα 46-60 ημερών μετά τον εμβολιασμό.
- 3) Αποκρίσεις σε άτομα για τα οποία η δειγματοληψία έγινε στο χρονικό διάστημα 61-90 ημερών μετά τον εμβολιασμό.
- 4) Αποκρίσεις σε άτομα για τα οποία η δειγματοληψία έγινε σε χρόνο >90 ημερών μετά τον εμβολιασμό.

Να σημειώσουμε στο σημείο αυτό, ότι από τα 79 άτομα εξαιρέθηκαν για τις παρακάτω αναλύσεις 2 ακόμη άτομα τα οποία εμβολιάστηκαν πριν τη θεραπεία. Επομένως, ο συνολικός αριθμός στις παρακάτω αναλύσεις είναι 77 άτομα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τις παραπάνω ομάδες συνοψίζονται ως εξής:

	H1N1	H3N2	B
Ημέρες ≤45	59.5% (22/37)	43.2% (16/37)	48.6% (18/37)
Ημέρες 45-60	31.3% (5/16)	37.5% (6/16)	37.5% (6/16)
Ημέρες 60-90	71.4% (10/14)	35.7% (5/14)	42.9% (6/14)
Ημέρες >90	20% (2/10)	10% (1/10)	0% (0/10)

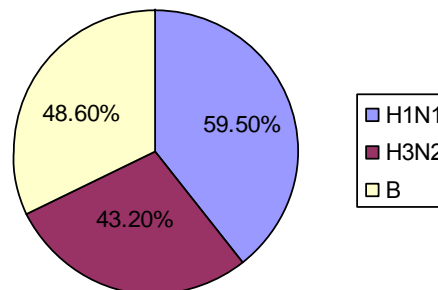
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με όριο τις 60 και τις 90 ημέρες αντίστοιχα, είναι τα εξής:

	H1N1	H3N2	B
Ημέρες ≤60	51% 27/53	41.5% 22/53	45.3% 24/53
Ημέρες ≤90	55.2% 37/67	40.3% 27/67	44.8% 30/67

Ακολουθούν διαγραμματικές απεικονίσεις των ποσοστών επιτυχίας για την κάθε ομάδα.

- Πρώτη ομάδα (σύνολο 37 άτομα)

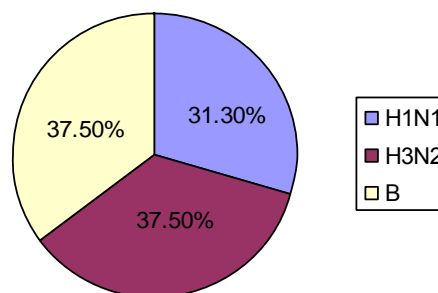
Ποσοστό επιτυχίας μέχρι και 45 ημέρες



Σχόλια: Τα ποσοστά επιτυχούς ανοσολογικής απόκρισης στο εμβόλιο της γρίπης για την ομάδα αυτή είναι πολύ σημαντικά, καθώς δείχνουν ότι το 50% περίπου των παιδιών με καρκίνο ανταποκρίνεται στο εμβόλιο σε προστατευτικά επίπεδα.

- Δεύτερη ομάδα (σύνολο 16 ατόμων)

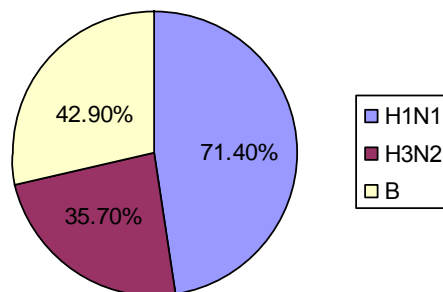
Ποσοστό επιτυχίας στο διάστημα 45-60 ημερών



Σχόλια: Τα ποσοστά επιτυχίας του εμβολίου της γρίπης εμφανίζονται μειωμένα στην ομάδα αυτή, καθώς είναι μεγαλύτερη η χρονική απόσταση της δειγματοληψίας από τον εμβολιασμό και είναι λογικό ο τίτλος των αντισωμάτων στην κυκλοφορία να είναι μικρότερος. Φυσικά, πρέπει να λάβουμε υπόψη και το μειωμένο αριθμό δείγματος στην ομάδα αυτή σε σχέση με την προηγούμενη.

- Τρίτη ομάδα (σύνολο 14 ατόμων)

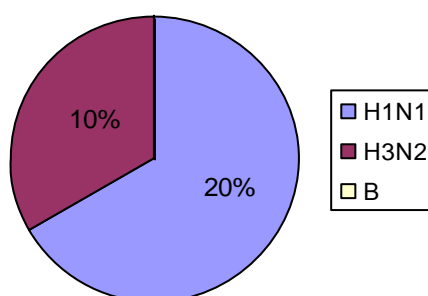
Ποσοστό επιτυχίας στο διάστημα 60-90 ημερών



Σχόλια: Τα ποσοστά επιτυχίας του εμβολίου της γρίπης στην ομάδα αυτή, φαίνονται περίπου ίδια με την προηγούμενη ομάδα για τα στελέχη H3N2 και B, αλλά παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση στο ποσοστό για το στέλεχος H1N1 αναλογικά και με τον αριθμό των ατόμων. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι κάποια λοίμωξη από τον H1N1 σε κάποια από αυτά τα παιδιά.

- Τέταρτη ομάδα (σύνολο 10 ατόμων)

Ποσοστό επιτυχίας για το διάστημα άνω των 90 ημερών



Σχόλια: Τα ποσοστά επιτυχίας στην ομάδα αυτή είναι πολύ χαμηλά και αποτελούν ένδειξη πτώσης του τίτλου των κυκλοφορούντων αντισωμάτων καθώς το διάστημα που μεσολάβησε από τον εμβολιασμό είναι αρκετά μεγάλο.

Στη συνέχεια της ανάλυσης θα επικεντρωθούμε στην πρώτη ομάδα, καθώς περιλαμβάνει τα περισσότερα άτομα και οριοθετήθηκε στις 45 ημέρες εφόσον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα αντισώματα που παράγονται μετά από απάντηση σε εμβολιασμό ή λοίμωξη παραμένουν σε κυκλοφορία κατά μέσο όρο 3-4 εβδομάδες μετά την επίτευξη της μέγιστης τιμής τους (peak). Αν υπολογίσουμε ότι χρειάζονται μέχρι και 2 εβδομάδες για την επίτευξη της μέγιστης τιμής, τότε το διάστημα που πρέπει να δεχτούμε για την μέτρηση της αποτελεσματικότητας του εμβολίου είναι μέχρι 45 ημέρες. Δηλαδή, σε γενικές γραμμές, το εμβόλιο παρέχει προστασία για διάστημα μέχρι και 45 ημέρες με την προϋπόθεση ότι ο ασθενής θα λάβει χημειοθεραπεία μετά την 1^η εβδομάδα μετά το εμβόλιο. Αν ο ασθενής λάβει χημειοθεραπεία πριν προλάβει να δημιουργήσει τη μέγιστη τιμή των αντισωμάτων τότε η ανοσολογική απάντηση από τον εμβολιασμό θα είναι ατελής με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διατηρήσει αντισώματα για διάστημα 3-4 εβδομάδων ή ακόμα και να μην προλάβει καν να δημιουργήσει αντισώματα. Ωστόσο, στο 50% των ατόμων που αποτέλεσαν το δείγμα της παρούσας μελέτης η προϋπόθεση αυτή δε μπορούσε να τηρηθεί, καθώς αναφερόμαστε σε άτομα που βρίσκονταν σε εντατική θεραπεία και δεν ήταν δυνατό να παραμείνουν χωρίς θεραπεία για μία εβδομάδα.

Για την ομάδα αυτή, επομένως, πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω στατιστικές αναλύσεις.

1) Φύλο

Time _{≤45}	H1N1	H3N2	B
ΑΓΟΡΙΑ	52.6% 10/19	52.6% 10/19	63.2% 12/19
ΚΟΡΙΤΣΙΑ	66.7% 12/18	33.3% 6/18	33.3% 6/18

ΓΙΑ B, p=0.1

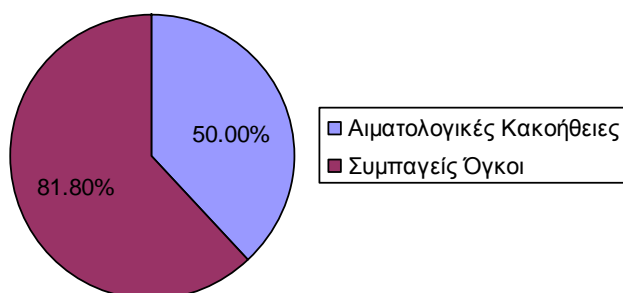
2) Τύπος καρκίνου

Time _{≤45}	H1N1	H3N2	B
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ	50% 13/26	46% 12/26	42% 11/26
ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ	50% 11/22	45.5% 10/22	40.9% 9/22
ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ	50% 2/4	50% 2/4	50% 2/4
ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ	81.8% 9/11	36.4% 4/11	63.6% 7/11

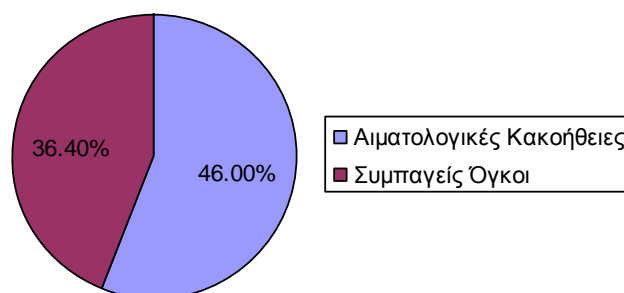
ΓΙΑ H1N1, ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ vs ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ: $p=0.1322$

ΓΙΑ B, ΛΕΥΧΑΙΜΙΕΣ vs ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΙ: $p=0.2818$

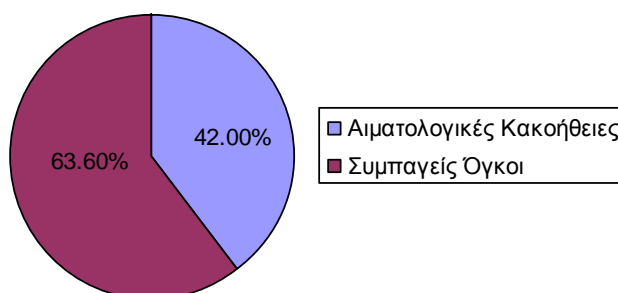
Ποσοστό επιτυχίας για H1N1



Ποσοστό επιτυχίας για H3N2



Ποσοστό επιτυχίας για B



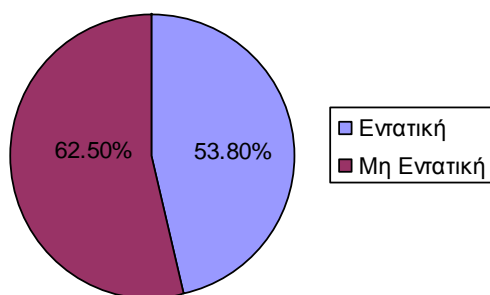
Σχόλια: Τα άτομα με αιματολογικές κακοήθειες (λευχαιμίες και λεμφώματα) είναι περισσότερα αριθμητικά από τα άτομα με συμπαγείς όγκους, όμως τα ποσοστά επιτυχούς απόκρισης στο εμβόλιο στα άτομα με συμπαγείς όγκους είναι αρκετά μεγαλύτερα (με εξαίρεση το ποσοστό για το στέλεχος H3N2), γεγονός που ήταν αναμενόμενο, δεδομένης της διαφοράς στο ανοσοποιητικό σύστημα στις δύο ομάδες.

3) Τύπος χημειοθεραπείας

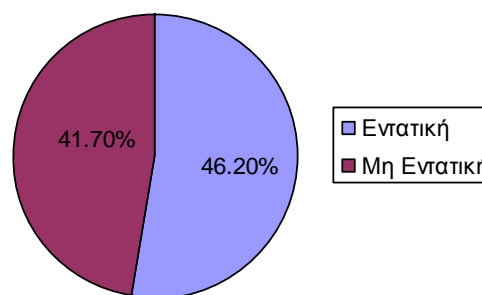
Time _{≤45}	H1N1	H3N2	B
ΕΝΤΑΤΙΚΗ	53.8% 7/13	46.2% 6/13	46.2% 6/13
ΜΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗ	62.5% 15/24	41.7% 10/24	50% 12/24
ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΕΝΤΑΤΙΚΗ (ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ)	62% 13/21	42.8% 9/21	47.6% 10/21
ΕΚΤΟΣ ΧΘ (>6 ΜΗΝΕΣ)	66.6% 2/3	33.3% 1/3	66.6% 2/3

ΓΙΑ H1N1, ΕΝΤΑΤΙΚΗ vs ΜΗ ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ: $p=0.7$

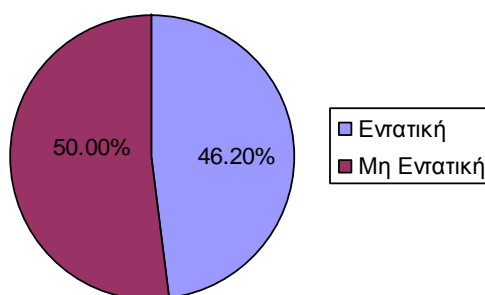
Ποσοστό επιτυχίας για H1N1



Ποσοστό επιτυχίας για H3N2



Ποσοστό επιτυχίας για B



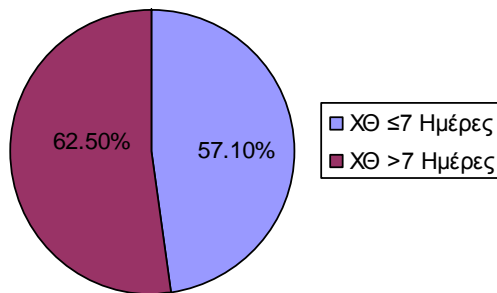
Σχόλια: Κατά τη χρονική στιγμή του εμβολιασμού τα περισσότερα άτομα της ομάδας αυτής βρίσκονταν σε μη εντατική θεραπεία και κυρίως θεραπεία συντήρησης. Τα ποσοστά επιτυχίας του εμβολίου είναι ελαφρώς αυξημένα στην περίπτωση της μη εντατικής θεραπείας, χωρίς όμως μεγάλη διαφοροποίηση, γεγονός που δείχνει ότι ακόμη και σε εντατική θεραπεία το εμβόλιο είναι αποδοτικό.

4) Χρόνος τελευταίας χημειοθεραπείας πριν τον εμβολιασμό

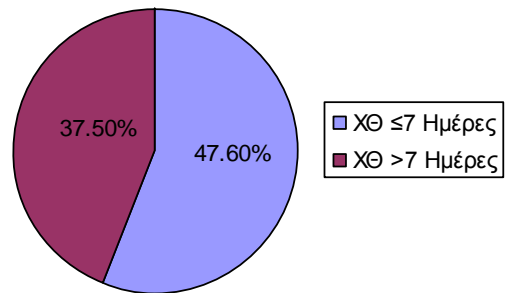
Time \leq 45	H1N1	H3N2	B
CHEMO \leq 7 DAYS	57.1% 12/21	47.6% 10/21	47.6% 10/21
CHEMO >7 DAYS	62.5% 10/16	37.5% 6/16	50% 8/16

p=ns

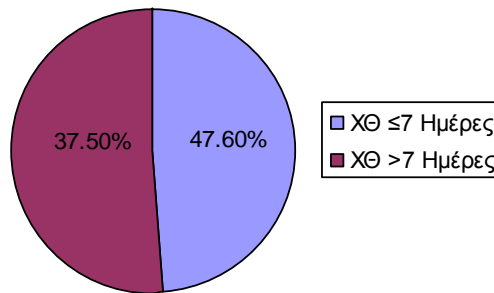
Ποσοστό επιτυχίας για H1N1



Ποσοστό επιτυχίας για H3N2



Ποσοστό επιτυχίας για B



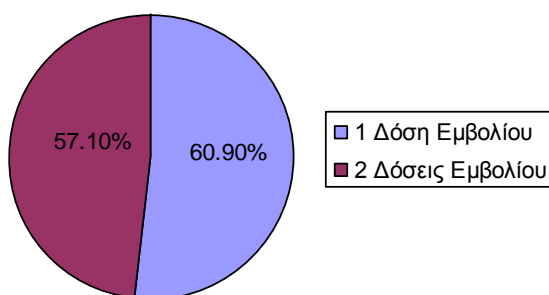
Σχόλια: Τα ποσοστά επιτυχούς απόκρισης στο εμβόλιο της γρίπης, φαίνονται λίγο πιο ανεβασμένα (με εξαίρεση το ποσοστό του H3N2) στην περίπτωση που έχει μεσολαβήσει διάστημα μεγαλύτερο της μιας εβδομάδας άνευ χημειοθεραπείας, αν και θα λέγαμε ότι οι διαφορές στα ποσοστά δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Επομένως, το εμβόλιο φαίνεται να είναι αποδοτικό ακόμη και σε πολύ κοντινό χρονικό διάστημα από τη χημειοθεραπεία.

5) Δόσεις εμβολίου

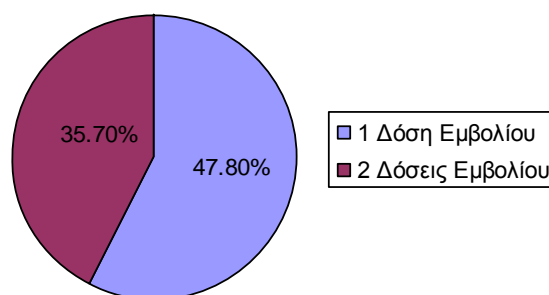
Time≤45	H1N1	H3N2	B
1 ΔΟΣΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ	60.9% 14/23	47.8% 11/23	56.5% 13/23
2 ΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΟΛΙΟΥ	57.1% 8/14	35.7% 5/14	35.7% 5/14

p=ns

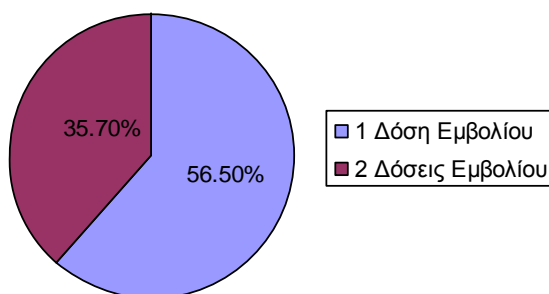
Ποσοστό επιτυχίας για H1N1



Ποσοστό επιτυχίας για H3N2



Ποσοστό επιτυχίας για B



Σχόλια: Στην κατηγοριοποίηση αυτή, τα ποσοστά είναι μεγαλύτερα στην ομάδα των παιδιών που έλαβε μία δόση εμβολίου σε σχέση με τα υπόλοιπα που λόγω της πολύ μικρής ηλικίας τους έλαβαν δύο δόσεις του εμβολίου της γρίπης. Φυσιολογικά, θα αναμέναμε να συμβαίνει το αντίθετο, αλλά μπορούμε να πούμε ότι το αποτέλεσμα αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα μεγαλύτερα παιδιά απαντούν καλύτερα στο εμβόλιο, επειδή πιθανόν να έχουν εμβολιαστεί στο παρελθόν ή να έχουν ξανασυναντήσει τον ιό τις προηγούμενες χρονιές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις διεθνείς κατευθυντήριες γραμμές, συνιστάται ότι τα παιδιά που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο θα πρέπει να εμβολιάζονται κατά της γρίπης. Παραμένει, όμως, ασαφές εάν η ανοσολογική απόκριση τους προστατεύει επαρκώς από λοίμωξη από γρίπη ή τις επιπλοκές της.

Με βάση τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία αναστολής της αιμοσυγκόλλησης που πραγματοποιήθηκε για 79 παιδιά στην παρούσα έρευνα, το εμβόλιο της γρίπης δρα προστατευτικά στο: 50.6% για τον H1N1, 36.7% για τον H3N2 και 35.4% για τον ιό της γρίπης B, των παιδιών με καρκίνο, ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να παράγει τετραπλάσια ποσότητα αντισωμάτων σε σχέση με πριν τον εμβολιασμό. Φαίνεται ότι η απόδοση του εμβολίου για το στέλεχος H1N1 του ιού είναι μεγαλύτερη, το οποίο πιθανώς υποδηλώνει καλύτερη αντιστοιχία του στελέχους του εμβολίου με το κυκλοφορούν στέλεχος.

Επίσης, σε ποσοστά: 15.2% για τον H1N1, 20.3% για τον H3N2 και 12.7% για τον ιό της γρίπης B, παρατηρήθηκε μερική προστασία από το εμβόλιο, με αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων, η οποία όμως ήταν μικρότερη του τετραπλασιασμού. Ωστόσο, τίτλος μεγαλύτερος ή ίσος του προστατευτικού τίτλου 40, εμφανίζεται στο 79.7% για τον H1N1, 73.4% για τον H3N2 και 55.7% για τον ιό της γρίπης B. Η ανοσοποίηση αυτή προέρχεται είτε από τον πρόσφατο εμβολιασμό, είτε από παλαιότερο εμβολιασμό, είτε από προηγούμενη λοίμωξη.

Από τη χρονική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο πληθυσμού βρέθηκε ότι η μέση τιμή των ημερών που εμφανίζονται τα αντισώματα για τον καθένα από τους τρεις ιούς είναι 42.5, 43 και 43 ημέρες αντίστοιχα, για τα παιδιά που παρουσίασαν τετραπλασιασμό του τίτλου, γεγονός που ενισχύει το γενικό κανόνα ότι το διάστημα που δεχόμαστε για την μέτρηση της αποτελεσματικότητας του εμβολίου είναι μέχρι 45 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Προκειμένου να μην οδηγηθούμε σε λανθασμένα συμπεράσματα, θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι αναφερόμαστε σε διαφορετικά άτομα κι όχι σε σειριακές μετρήσεις του ίδιου ατόμου.

Στην αποτελεσματικότητα του εμβολίου υπεισέρχονται σημαντικοί παράγοντες που αφορούν τη συγκεκριμένη ομάδα πληθυσμού. Πρωταρχικός παράγοντας είναι, το είδος του καρκίνου από τον οποίο πάσχουν. Είναι σαφές ότι τα παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες έχουν ασθενέστερο ανοσοποιητικό σύστημα συγκριτικά με τα παιδιά με συμπαγείς όγκους κι επομένως η αποδοτικότητα του

εμβολίου στην πρώτη περίπτωση αναμένεται μικρότερη, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα ευρήματά μας.

Όπως διαπιστώσαμε επίσης, οι αποκρίσεις στο εμβόλιο επηρεάζονται από την ένταση-είδος της χημειοθεραπείας, γεγονός αναμενόμενο, αφού όσο πιο εντατική είναι η θεραπεία τόσο περισσότερο καταστέλλεται το ανοσοποιητικό σύστημα χάνοντας την ικανότητα απόκρισης σε οποιαδήποτε διέγερσή του. Ωστόσο, στα αποτελέσματά μας δεν είδαμε μεγάλες διαφορές στα ποσοστά επιτυχίας μεταξύ παιδιών που λάμβαναν εντατική θεραπεία και αυτών που λάμβαναν μη εντατική, κι αυτό ενισχύει την αναγκαιότητα του εμβολιασμού ακόμη και υπό εντατική θεραπεία.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμβαδίζουν και με τα ποσοστά των θετικών αποκρίσεων των παιδιών που έλαβαν την τελευταία χημειοθεραπεία πριν τον εμβολιασμό σε χρονικό διάστημα μικρότερο της μιας εβδομάδας σε σχέση με τις περιπτώσεις που είχε περάσει μεγαλύτερο διάστημα της μιας εβδομάδας. Είναι βέβαιο ότι στην πρώτη περίπτωση, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι σε θέση να δώσει καλύτερη απάντηση στο εμβόλιο, αλλά είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι ακόμη κι αν δεν ήταν δυνατό να τηρηθεί αυτός ο χρόνος λόγω κρισιμότητας της κατάστασης των ασθενών, τα ποσοστά επιτυχίας του εμβολίου δεν μειώνονται σημαντικά.

Επιπρόσθετα, τα ποσοστά επιτυχούς απόκρισης στο εμβόλιο φαίνεται ότι διαφοροποιούνται στα παιδιά που έχουν λάβει μία δόση του εμβολίου και σε αυτά που έλαβαν δύο δόσεις λόγω μικρής ηλικίας. Στην πρώτη περίπτωση τα ποσοστά επιτυχίας του εμβολίου είναι μεγαλύτερα, παρότι στο σύνολο των 79 παιδιών ισχύει το αντίθετο, όπως θα ήταν και το αναμενόμενο.

Τα παραπάνω συμπεράσματα ισχυροποιούν σαφώς την άποψη ότι το εμβόλιο της γρίπης λειτουργεί προστατευτικά σε ένα σημαντικό ποσοστό των παιδιών με καρκίνο κι επομένως ορθά συνίσταται διεθνώς ο εμβολιασμός. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των παιδιών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη, είναι αρκετά μικρός για να διεξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Επίσης, το εύρος του χρόνου δειγματοληψίας μετά τον εμβολιασμό ήταν πολύ μεγάλο και ως εκ τούτου ήταν δύσκολη η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων.

Σημειώνουμε ότι το p-value αναγράφεται μόνο στις περιπτώσεις που τα αποτελέσματα-συγκρίσεις ήταν στατιστικά σημαντικά ($p > 0.05$). Στις άλλες περιπτώσεις δεν προέκυψε στατιστική σημαντικότητα κι αυτό δικαιολογείται από τον μικρό αριθμό δείγματος και τη μεγάλη ετερογένεια στα χαρακτηριστικά του.

Επομένως, για να αξιολογηθεί η κλινική έκβαση του εμβολιασμού, μια μεγαλύτερη, καλά σχεδιασμένη, τυχαιοποιημένα ελεγχόμενη μελέτη του εμβολιασμού κατά της γρίπης σε παιδιά που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο, είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού κατά της γρίπης σε ασθενείς με καρκίνο, και της βέλτιστης χρονικής στιγμής του εμβολιασμού σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας. Αυτή η μελέτη θα πρέπει να έχει τον ελάχιστο κίνδυνο μεροληψίας και θα πρέπει να καθοριστούν και να μετρηθούν προσεκτικά τα σχετικά κλινικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένων των εργαστηριακά επιβεβαιωμένων λοιμώξεων της γρίπης, της νοσηλείας και της θνησιμότητας.

Καταλήγοντας, υπάρχει επείγουσα ανάγκη για διεθνώς αποδεκτές κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με το είδος του εμβολίου που οδηγεί σε καλύτερα ανοσολογικά αποτελέσματα, τον αριθμό των δοκιμών, καθώς και το χρονοδιάγραμμά τους σε σχέση με τη σοβαρότητα της ανοσοκαταστολής και τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που ακολουθούνται. Οι συστάσεις αυτές, μαζί με μια σαφή απόδειξη της αποτελεσματικότητας του εμβολίου, είναι αναγκαίες για να αυξηθεί η κάλυψη εμβολιασμού κατά της γρίπης σε αυτή την κατηγορία υψηλού κινδύνου των ασθενών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014;61:397-401
2. Jones LD, Nuttall PA. "Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989;**83** (5): 712–4.
3. Raynard RS, Murray AG, Gregory A. "Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland". *Dis. Aquat. Org.* 2001;**46** (2): 93–100.
4. Suzuki Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 2005;28: 399–408.
5. Wilson J, von Itzstein M. Recent strategies in the search for new anti-influenza therapies. *Curr Drug Targets* 2003;4: 389–408.
6. Centers for Disease Control and Prevention Y. Update: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) regarding use of CSL seasonal influenza vaccine (Afluria) in the United States during 2010–11. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59:989–92.
7. Atkinson W, Hamborsky J, McIntyre L, Wolfe S, ed. (2007). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases* (10th ed.). Washington DC: Centers for Disease Control and Prevention.
8. "Avian Influenza (Bird Flu): Implications for Human Disease". Center for Infectious Disease Research & Policy, University of Minnesota.
9. Shehata M, Karim, N. Influenza Vaccination in Cancer Patients Undergoing Systemic Therapy. *Clinical Medicine Insights: Oncocology* 2014;8:57-64.
10. Fitzgerald DA. Human swine influenza A [H1N1]: practical advice for clinicians early in the pandemic. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:154-8.
11. Pollyea DA, Brown JM, Horning SJ. Utility of influenza vaccination for oncology patients. *J Clin Oncol.* 2010;28:2481–90.
12. Nobusawa E, Sato K. "Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses". *J Virol* 2006;**80** (7): 3675–8.
13. Hay A, Gregory V, Douglas A, Lin Y. "The evolution of human influenza viruses" . *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;**356** (1416): 1861–70.

14. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. "Evolution and ecology of influenza A viruses". *Microbiol. Rev.* 1992;**56** (1): 152–79.
15. Zambon M. "Epidemiology and pathogenesis of influenza". *J Antimicrob Chemother* 1999;**44** (Suppl B): 3–9.
16. Monto AS, Kioumehri F. The Tecumseh Study of Respiratory Illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966–1971. *Am J Epidemiol.* 1975;102:553–63.
17. Glezen WP, Couch RB. Interpandemic influenza in the Houston area, 1974–76. *N Engl J Med.* 1978;298:587–92.
18. Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL, Piedra PA, Couch RB. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. *JAMA.* 2000;283:499–505.
19. Barker WH. Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970–78. *Am J Public Health.* 1986;76:761-5.
20. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA.* 2003;289:179–86.
21. Dagan R, Hall CB: Influenza A virus infection imitating bacterial sepsis in early infancy. *Pediatr Infect Dis* 3: 218-221, 1984.
22. International Committee on Taxonomy of Viruses. Διαθέσιμο σε: <http://www.ictvdb.org/Ictv/index.htm>
23. Ghedin E, Sengamalay N, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, et al. Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 2005;437: 1162–6.
24. Suarez, D; Spackman E; Senne D; Bulaga L; Welsch A; Froberg K. "The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR". *Avian Dis* 2003;**47** (3 Suppl): 1091–5.
25. Avian Influenza (Bird Flu): Implications for Human Disease. Physical characteristics of influenza A viruses. UMN CIDRAP.
26. "Flu viruses 'can live for decades' on ice". The New Zealand Herald. Reuters.
27. Wagner R, Matrosovich M, Klenk H. "Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections". *Rev Med Virol* 2002;12 (3): 159–66.

28. Lakadamyali M, Rust M, Babcock H, Zhuang X. "Visualizing infection of individual influenza viruses". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**(16): 9280–5.
29. Cros J, Palese P. "Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses". *Virus Res* 2003;95 (1–2): 3–12.
30. Kash J, Goodman A, Korth M, Katze M. "Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection". *Virus Res* 2006;119 (1): 111–20.
31. Nayak D, Hui E, Barman S. "Assembly and budding of influenza virus". *Virus Res* 2004;**106** (2): 147–65.
32. Dias, Alexandre; Bouvier, Denis; Crépin, Thibaut; McCarthy, Andrew A.; Hart, Darren J.; Baudin, Florence; Cusack, Stephen; Ruigrok, Rob W. H. "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit". *Nature* 2009;**458** (7240): 914–918.
33. Drake J. "Rates of spontaneous mutation among RNA viruses". *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90** (9): 4171–5.
34. Hilleman, M. "Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control". *Vaccine* 2002;**20** (25–26): 3068–87.
35. Influenza. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Disease. Διαθέσιμο σε:<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/flu.html>
36. Potter CW. "A History of Influenza". *Journal of Applied Microbiology* 2001;91(4): 572–579.
37. "Ten things you need to know about pandemic influenza". World Health Organization. 14 October 2005. Archived from the original on 23 September 2009. Retrieved 26 September 2009.
38. Valleron AJ, Cori A, Valtat S, Meurisse S, Carrat F, Boëlle PY. "Transmissibility and geographic spread of the 1889 influenza pandemic". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(19): 8778–81.
39. Mills CE, Robins JM, Lipsitch M. "Transmissibility of 1918 pandemic influenza". *Nature* 2004;432 (7019): 904–6.
40. Donaldson LJ, Rutter PD, Ellis BM, et al. "Mortality from pandemic A/H1N1 2009 influenza in England: public health surveillance study". *BMJ*. 2009;**339**: b5213.

41. "ECDC Daily Update – Pandemic (H1N1) 2009 – January 18, 2010" (*PDF*). European Centre for Disease Prevention and Control. 2010-01-18. Retrieved 2010-01-18.
42. Hicks KL, Chemaly RF, Kontoyiannis DP. Common respiratory viruses in patients with cancer: more than just “common colds”. *Cancer* 2003;97:2576–87.
43. Feldman S, Webster RG, Sugg M. Influenza in children and young adults with cancer. *Cancer* 1977;39:350–3.
44. Kempe A, Hall CB, MacDonald NE, Foye HR, Woodin KA, Cohen HJ, et al. Influenza in children with cancer. *J Pediatr* 1989;115:33–9.
45. Potter MN, Foot ABM, Oakhill A. Influenza A and the virus associated haemophagocytic syndrome: cluster of three cases in children with acute leukaemia. *J Clin Pathol* 1991;44:297–9.
46. Borella L, Webster RG. The immunosuppressive effects of long-term combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission. *Cancer Res.* 1971;31:420–6.
47. Dykewicz CA. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients: focus on community respiratory virus infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7 Suppl: 19S–22S.
48. Raad I, Abbas J, Whimbey E. Infection control of nosocomial respiratory viral disease in the immunocompromised host. *Am J Med* 1997;102:48–52.
49. Wingard JR. Influenza: Preparedness for an inevitable “emergency” for oncology and BMT units. *J Natl Compr Canc Netw* 2008;6:215–22.
50. Treanor JJ. Influenza viruses including avian influenza and swine influenza. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2010 pp 2265–2288.
51. Tran D, Science M, DixDet al. Pandemic (H1N1) 2009 influenza in Canadian pediatric cancer and hematopoietic stem cell transplant patients. *Influenza Other Respi Viruses* 2012;6:e105– e113.
52. Klimov AI, Rocha E, Hayden FG et al. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: Detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J Infect Dis* 1995;172:1352–5.

53. Centers for Disease Control and Prevention X. Updated recommendations for use of meningococcal conjugate vaccines – Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011;60:72–6.
54. Anderson H, Petrie K, Berrisford C, Charlett A, Thatcher N, Zambon M. Seroconversion after influenza vaccination in patients with lung cancer. *Br J Cancer.* 1999;80:219–20.
55. Ring A, Gavin M, Steer C, Harper P. Influenza vaccination and chemotherapy: a shot in the dark? *Support Care Cancer* 2002;10:462–5.
56. Tasian SK, Park JR, Martin ET, Englund JA. Influenza associated morbidity in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:983–7.
57. Kersun LS, Coffin SE, Leckerman KH, Ingram M, Reilly AF. Community acquired influenza requiring hospitalization: Vaccine status is unrelated to morbidity in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:79–82.
58. Caselli D, Carraro F, Castagnola E, Ziino O, Frenos S, Milano GM, et al. Morbidity of pandemic H1N1 influenza in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:226–8.
59. Malik PS, Broor S, Bakhshi S. H1N1 infection in children with hematological malignancies. *Indian Pediatr* 2011;48:971–973.
60. Ozdemir N, Celkan T, Midilli K, Aygün G, Sinekbasan S, Kılıç O, et al. Novel influenza a (H1N1) infection in a pediatric hematology oncology clinic during the 2009–2010 pandemic. *Pediatr Hematol Oncol* 2011;28:288–93.
61. Arrowood J, Hayney M. Immunization recommendations for adults with cancer. *Ann Pharmacother.* 2002; 36:1219-29.
62. Steinherz PG, Brown AE, Gross PA, et al. Influenza immunization of children with neoplastic diseases. *Cancer.* 1980;45:750–6.
63. Brydak LB, Guzy J, Starzyk J, Machala M, Gozdz SS. Humoral immune response after vaccination against influenza in patients with breast cancer. *Support Care Cancer.* 2001;9:65–8.
64. Eickhoff TC, Sherman IL, Serfling RE. Observations on excess mortality associated with epidemic influenza. *JAMA* 1961;176: 776-82
65. Housworth J, Langmuir AD. Excess mortality from epidemic influenza, 1957-1966. *Am J Epidemiol* 1974;100: 40-8

66. Feldman S, Webster RG, Suog M. Influenza in children and young adults with cancer: 20 cases. *Cancer* 1977;39:350-3
67. Brydak LB, Machala M. Humoral immune response to influenza vaccination in patients from high risk groups. *Drugs* 2000;60: 35–53.
68. Engelhard D, Nagler A, Hardan I, Morag A, Aker M, Baciu H, et al. Antibody response to a two-dose regimen of influenza vaccine in allogeneic T cell-depleted and autologous BMT recipients. *Bone Marrow Transplant* 1993;11:1-5.
69. Gross PA, Gould AL, Brown AE. Effect of cancer chemotherapy on the immune response to influenza virus vaccine: review of published studies. *Rev Infect Dis.* 1985;7:613-8.
70. Ortals DW, Liebhaber H, Present CA, Van Amburg AL 3rd, Lee JY. Influenza immunization of adult patients with malignant diseases. *Ann Intern Med.* 1977;87:552-7.
71. Sommer AL, Wachel BK, Smith JA. Evaluation of vaccine dosing in patients with solid tumors receiving myelosuppressive chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract.* 2006;12:143–54.
72. Boehmer L, Waqar S, and Govindan R. Influenza Vaccination in Patients With Cancer: an Overview. *Oncology Journal.* 2010. Published on Cancer Network (<http://www.cancernetwork.com>)
73. Goossen G, Kremer L, and van de Wetering M. Influenza vaccination in children being treated with chemotherapy for cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;8:CD006484
74. Chisholm J, Howe K, Taj M, Zambon M. Influenza immunization in children with solid tumours. *European Journal of Cancer* 2005;41:2280–7.
75. Brydak LB, Rokicka-Milewska R, Machala M, Jackowska T, Sikorska-Fic B. Immunogenicity of subunit trivalent influenza vaccine in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17:125-9.
76. Brydak LB, Rokicka-Milewska R, Jackowska T, Rudnicka H, Regnery H, Cox N. Kinetics of humoral response in children with acute lymphoblastic leukemia immunized with influenza vaccine in 1993 in Poland. *Leuk Lymphoma* 1997;26:163-9.

77. Lange B, Shapiro SA, Waldman MT, Proctor E, Arbeter A. Antibody responses to influenza immunization of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Infect Dis* 1979;140:402-6.
78. Smithson WA, Siem RA, Ritts RE Jr, Gilchrist GS, Burgert EO Jr, Ilstrup DM, et al. Response to influenza virus vaccine in children receiving chemotherapy for malignancy. *J Pediatr* 1978;93:632-4.
79. Gross PA, Lee H, Wolff JA, Hall CB, Minnefore AB, Lazicki ME. Influenza immunization in immunosuppressed children. *J Pediatr* 1978;92:30-5.
80. Sumaya CV, Williams TE, Brunell PA. Bivalent influenza vaccine in children with cancer. *J Infect Dis* 1977;136:656-60.
81. Neuzil KM, Edwards KM. Influenza vaccines in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13:174-81.
82. Hirst GK. (1942) The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J Exp Med* 1942;75:49-64
83. Haemagglutination Inhibition Test. Διαθέσιμο σε: <http://virology-online.com/general/Test4.htm>
84. Miller GL. Improved Measurement of Influenza Virus Hemagglutinin Titer. *J Immunol* 1965;95:336-44.
85. Hemagglutination assay. Διαθέσιμο σε: http://en.wikipedia.org/wiki/Hemagglutination_assay
86. Influenza hemagglutination inhibition assay. Διαθέσιμο σε: <http://www.virology.ws/2009/05/27/influenza-hemagglutination-inhibition-assay/>
87. Whitley RJ, Monto AS. Prevention and treatment of influenza in high-risk groups: Children, pregnant women, immunocompromised hosts, and nursing home residents. *J Infect Dis* 2006;194: S133-S138.
88. Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2011;60:1-24.
89. Kersun LS, Reilly AF, Coffin SE, Sullivan KE. Protecting Pediatric Oncology Patients From Influenza. *Oncologist* 2013;18:204-211

90. Wang K, Shun-Shin M, Gill P, Perera R, Harnden A. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in children (published trials only). *Cochrane Database Syst Rev* 2012;4:CD002744.
91. Centers for Disease Control and Prevention. Updated interim recommendations for the use of antiviral medications in the treatment and prevention of influenza for the 2009-2010 season. Available from: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm>.
92. Ison MG, Gubareva LV, Atmar RL, Treanor J, Hayden FG. Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: A case series. *J Infect Dis* 2006;193:760–4.
93. Carr S, Ilyushina NA, Franks J, Adderson EE, Caniza M, Govorkova EA, Webster RG. Oseltamivir resistant influenza A and B viruses pre- and postantiviral therapy in children and young adults with cancer. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:284–8.