

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ : «ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΩΝ»

**ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ : ΚΑΤΣΕΑ ΕΛΕΝΗ
ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ : ΜΑΖΑΡΑΚΗ ΚΥΡΙΑΚΗ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2015

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
Πρόλογος	7
Εισαγωγή	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ	
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ	9
1.1 Ονοματολογία	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ	
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ	11
2.1 Δομή του καψιδίου	11
2.1.1 Ελικοειδή καψίδια	13
2.1.2 Ισομετρικά ή εικοσάεδρα καψίδια	14
2.1.3 Σύνθετα καψίδια	15
2.2 Έλυτρα	15
2.3 Ατελής βίρια	16
2.4 Μέγεθος των ιών	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ	
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΩΝ	17
3.1 Γενετικό κώδικας	17
3.2 Πρωτεϊνοσύνθεση	18
3.3 Μεταγραφή	18
3.3.1 hnRNAs μόρια	19
3.3.2 mRNAs μόρια	20
3.3.3 tRNAs μόρια	21
3.3.4 rRNAs μόρια	21
3.3.5 snRNAs μόρια	21
3.6 Έναρξη, επιμήκυνση και λήξη της πρωτεϊνικής αλυσίδας	22
3.7 Μηχανισμοί ρύθμισης των γονιδίων	22
3.8 Ένζυμα των νουκλεϊνικών οξέων	24
3.9 DNA πολυμεράσες	24
3.10 RNA πολυμεράσες	25
3.11 Μεθυλάσες	25
3.12 Τελικά επιπρόσθετα ένζυμα	26

3.13 Ενδονουκλεάσες	26
3.13.1 DNA-άσες	26
3.13.2 RNA-άσες	27
3.14 Εξωνουκλεάσες	27
3.15 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες	27
3.16 DNA-RNA λιγγάσες	28
3.17 Ανασυνδυασμός του DNA	28
3.18 Σύνθεση του DNA	29
3.19 Νουκλεϊνικά οξέα των ιών	31
3.20 RNA ιοί	32
3.21 DNA ιοί	33
3.22 Πρωτεΐνες των ιών	34
3.23 Λιπίδια των ιών	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ	
ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ	35
4.1 Δομή των βακτηριοφάγων	36
4.2 Προσκόλληση των βακτηριοφάγων στα βακτηριακά κύτταρα	37
4.3 Είσοδος των βακτηριοφάγων στα βακτηριακά κύτταρα	38
4.4 Αναπαραγωγή των βακτηριοφάγων	39
4.5 Μορφογένεση των βακτηριοφάγων	39
4.6 Απελευθέρωση των βακτηριοφάγων	40
4.7 Λυσιγονία	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ	
ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΙΩΝ	41
5.1 Δομή και λειτουργία των κυττάρων των ζώων	41
5.1.1 Κυττοπλασματική μεμβράνη	42
5.1.2 Φωσφολιπίδια	42
5.1.3 Στερόλες	43
5.1.4 Πρωτεΐνες	43
5.1.5 Μεταφορά ατόμων ή μορίων	43
5.1.6 Φαγοκύττωση-Πινοκύττωση	44
5.1.7 Ειδικό υποδοχείς	44
5.1.8 Μιτοχόνδρια	45

5.1.9 Λυσοσώματα	45
5.1.10 Πυρήνας	45
5.1.11 Μικροσώματα	46
5.1.12 Ενδοπλασματικό δίκτυο	47
5.1.13 Ριβοσώματα	47
5.1.14 Συσκευή Golgi	48
5.1.15 Κυττοσκελετός	48
5.2 Αναπαραγωγή των ιών	49
5.2.1 Προσκόλληση των ιών στα κύτταρα του ξενιστή	50
5.2.2 Συνέχιση προσκόλλησης των ιών	51
5.2.3 Είσοδος των ιών στα κύτταρα του ξενιστή	53
5.2.4 Ιοπηξία	53
5.2.5 Σύντηξη	54
5.2.6 Σχηματισμός πόρου στην κυτταρική μεμβράνη	55
5.2.7 Παραγωγή πρωτεϊνών των ιών	55
5.2.8 Μορφογένεση και απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ	
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ	59
6.1 Ορισμός κυτταροκαλλιέργειας	59
6.2 Είδη κυτταρικών σειρών	60
6.3 Καλλιέργεια κυττάρων	61
6.4 Μεθοδολογία	62
6.5 Συντήρηση και ψύξη κυττάρων	62
6.5.1 Πρωτόκολλο ψύξης κυττάρων	62
6.5.2 Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων	63
6.6 Καταμέτρηση κυττάρων	63
6.6.1 Πρωτόκολλο καταμέτρησης κυττάρων	64
6.7 Επίβλεψη κυτταροκαλλιεργειών	64
6.8 Εξοπλισμός εργαστηρίου κυτταροκαλλιεργειών	65
6.9 Χρώσεις ιών	70
6.9.1 Αρνητική χρώση	70
6.9.2 Διάλυμα οξικού ουρανυλίου	71
6.9.3 Διάλυμα ουδέτερου φωσφοβολφραμικού οξέος	71

6.9.4 Διάλυμα αμμωνιακού μολυβδενίου	71
6.10 Μέθοδος απομόνωσης ιών σε κυτταροκαλλιέργειες και κυτταρικές αλλοιώσεις	72
6.11 Μέτρηση του τίτλου ενός καλλιεργήματος ιού	73
6.12 Μέθοδος καλλιέργειας και απομόνωσης ιών γρίπης σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας	74
6.13 Εμβολιασμός του κλινικού δείγματος	75
6.14 Συλλογή αμνιακού και αλλαντοϊκού υγρού	77
6.15 Τιτλοποίηση του ιού	77
6.16 Πειραματόζωα	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ	
ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	78
7.1 Δοκιμή αιμοσυγκόλλησης	78
7.2 Δοκιμή αναστολής της αιμοσυγκόλλησης	81
7.3 Δοκιμή αιμοπροσρόφησης	84
7.3.1 Δοκιμασία	84
7.3.2 Αναγνώριση του ιού	84
7.3.3 Ταυτοποίηση του ιού	85
7.4 Δοκιμή αναστολής αιμοπροσρόφησης	86
7.4.1 Υλικά	86
7.4.2 Διαδικασία	86
7.5 Δοκιμή εξουδετέρωσης	87
7.5.1 Αρχή μεθόδου	88
7.5.2 Αξιολόγηση	89
7.5.3 Δοκιμή εξουδετέρωσης σε μικροπλάκα	90
7.5.4 Σταθεροποίηση των υλικών της δοκιμής	90
7.5.5 Ιός	90
7.5.6 Ορός	91
7.5.7 Κυτταροκαλλιέργεια	91
7.5.8 Διαδικασίες που ακολουθούνται κατά τη δοκιμασία της εξουδετέρωσης	92
7.5.9 Δοκιμασία εξουδετέρωσης – Χρήση αραιώσεων	96
7.5.10 Δοκιμασία μικροεξουδετέρωσης σε καλλιέργειες	98

7.5.11 Δοκιμασίες σε προπαρασκευασμένες κυτταρικές μονοστοιβάδες.....	99
7.5.12 Εξουδετέρωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων.....	100
7.6 Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος	100
7.6.1 Αρχή της μεθόδου	100
7.6.2 Εκτέλεση της αντίδρασης-πρωτόκολλο.....	101
7.6.3 Τιτλοδότηση του αντιγόνου και των αντισωμάτων	101
7.6.4 Τιτλοδότηση του αιμολυτικού ορού και του συμπληρώματος	102
7.6.5 Αξιολόγηση	103
7.6.6 Δοκιμασία σύνδεσης του συμπληρώματος σε μικροπλάκα	103
7.7 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)	104
7.7.1 Αρχή της μεθόδου	105
7.7.2 Υλικά και μέθοδοι	106
7.7.3 Πρωτόκολλο	106
7.7.4 Αναμενόμενα αποτελέσματα	107
7.8 Ανοσοφθορισμός	107
7.8.1 Ανίχνευση ιικών αντιγόνων	108
7.8.2 Σκοπός	108
7.8.3 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	109
7.9 Ραδιοανοσοδοκιμασία	110
7.9.1 Σκοπός	113
7.9.2 Αναμενόμενα αποτελέσματα – Ερμηνεία	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή εργασία αυτή διενεργήθηκε στην Κατεύθυνση Ζωικής Παραγωγής του τμήματος Τεχνολόγων Γεωπόνων της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού και Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη της αναζήτησης και καλλιέργειας των ιών. Αρχικά, υπάρχει μια αναφορά στα χαρακτηριστικά των ιών. Στη συνέχεια αναλύονται τα στάδια αναπαραγωγής και οι κυτταροκαλλιέργειες. Τέλος, αναφέρονται οι ορολογικές δοκιμές.

Ευχαριστώ θερμά την εισηγήτρια μου κα. Μαζαράκη Κυριακή για την συνεχή βοήθεια και την καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας. Και επίσης ευχαριστώ την κα. Πάλλα Ελισάβετ για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση ως προς την υλοποίηση της παρούσας εργασίας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε όλες τις κτηνοτροφικές μονάδες δημιουργούνται προϋποθέσεις για τη διασπορά παθογόνων μικροοργανισμών. Η μόλυνση των ζώων και κατά συνέπεια των προϊόντων τους έχουν μεγάλη σημασία στην υγεία και στην οικονομία. Για αυτό πρέπει να υπάρχουν κανόνες υγιεινής και πρόληψης τέτοιων μολύνσεων. Εξίσου πρέπει να είναι έγκαιρη η αντιμετώπιση των μολύνσεων, ώστε να μην γίνει διασπορά και διάθεση των ζωικών προϊόντων του μολυσμένου ζώου στην αγορά.

Σε αυτή την πτυχιακή εργασία αναλύεται η αναζήτηση και η καλλιέργεια των ιών. Μέσα στα διάφορα κεφάλαια της πτυχιακής αναφέρονται η ταξινόμηση, η μορφολογία όσο και οι βιοχημικές ιδιότητες των ιών.

Ακόμα γίνεται λόγος για τους βακτηριοφάγους και την αναπαραγωγή των ιών. Τέλος αναλύονται η εργαστηριακή διάγνωση των ιικών λοιμώξεων και οι ορολογικές δοκιμές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η παλαιότερη ταξινόμηση έγινε βάσει των παθογόνων ιδιοτήτων των ιών στα όργανα που προσβάλλουν, τον τρόπο μετάδοσης, την επιδημιολογία, τις ορολογικές ιδιότητες (ορότυποι) και την ενδοκυττάρια εντόπιση. Ιοί οι οποίοι προσέβαλαν το ήπαρ όπως π.χ. ιός της ηπατίτιδας Α, ηπατίτιδας Β, κίτρινου πυρετού ανήκαν στην ομάδα των ιών της ηπατίτιδας. Η ταξινόμηση αυτή δεν ήταν ικανοποιητική διότι ένας ιός μπορεί να προσβάλλει περισσότερα από ένα όργανα και άρα να εμφανιστεί σε πολλές ομάδες. Το 1966 συνήλθε η Διεθνής σύνοδος για την ονοματολογία των ιών ICNV (International Committee on Nomenclature of Viruses), στα πλαίσια του διεθνούς συνεδρίου Μικροβιολογίας στη Μόσχα και έγινε δεκτό το σχήμα ταξινόμησης των Lwoff-Horne-Tournier. Βάσει αυτού του σχήματος έγινε δεκτή η διαίρεση των ιών σε οικογένειες, γένη και είδη, βάσει του συνόλου χαρακτηριστικών. Το σύστημα στη συνέχεια άρχισε να ενσωματώνει εξελικτικά δεδομένα. Τώρα η ICNV ονομάστηκε ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses – Διεθνής Σύνοδος Ταξινόμησης των Ιών).

Περίπου 1400 ιοί έχουν ταξινομηθεί, ενώ 500 έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανά μέλη. Χαρακτηριστικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την ταξινόμηση είναι το μέγεθος, το σχήμα, η παρουσία ή όχι ελύτρου, ή συμμετρία, ο τύπος του νουκλεϊκού οξέος DNA ή RNA, η μονή ή διπλή έλικα γραμμική ή κυκλική, θετικής ή αρνητικής κατεύθυνσης, το μέγεθος του γενώματος, το τεμαχισμένο γένωμα, ο αριθμός, το μέγεθος και η λειτουργία των πρωτεϊνών, τα χαρακτηριστικά αντιγραφής-μεταγραφής-μετάφρασης, το σημείο σύνθεσης των ιών, ωρίμανσης και απελευθέρωσης οι αλλοιώσεις των κυττάρων του ξενιστή, η σταθερότητα στο pH – θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε ιόντα Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, η σταθερότητα σε απορρυπαντικά και σε ακτινοβολία, οι ορολογικές ιδιότητες, η γκάμα ξενιστών, η παθογένεια, ο τροπισμός στους ιστούς, η ιστοπαθολογία, η μετάδοση, οι φορείς μετάδοσης και τέλος η γεωγραφική κατανομή.

Οι ιοί ταξινομούνται σε μεγάλες ομάδες τις τάξεις, τις οικογένειες, οι οποίες χωρίζονται σε υποοικογένειες, γένη και είδη.

Επειδή υπάρχουν ομοιότητες σε γενώματα διαφόρων οικογενειών π.χ. Rhabdoviridae και Paramyxoviridae, για αυτό ιεραρχικά το 1966 ετέθει ένα ακόμη ταξινόμικό επίπεδο οι τάξεις για να περιλαμβάνει οικογένειες με τέτοιες ομοιότητες.

Οι τάξεις έχουν δεύτερο συνθετικό –virales. Οι τάξεις είναι οι Mononegavirales, Nidovirales και Caudovirales. Η τάξη Mononegavirales περιέχει τις οικογένειες Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae και Bornaviridae, ενώ η τάξη Nidovirales περιέχει τις οικογένειες Coronaviridae, Arteriviridae και Roniviridae. Η τάξη Caudovirales περιέχει τις οικογένειες Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae

Οι οικογένειες έχουν το συνθετικό –viridae. Οι οικογένειες βασίζονται στο γενωμικό τύπο, την χαρακτηριστική μορφολογία και δομή των βιρίων, τους κύκλους αναπαραγωγής και την εξελικτική αρχή.

Στους DNA ιούς ανήκουν οι οικογένειες των Παρβοϊών (Parvoviridae), Παποβαϊών (Papoviridae), Αδενοϊών (Adenoviridae), Ερπητοϊών (Herpesviridae), Ευλογιοειδών ιών (Poxviridae), Ιών ηπατίτιδας Β (Hepadnaviridae) και Ιριδοϊών (Iridoviridae).

Στους RNA ιούς ανήκουν οι οικογένειες των Πικοναϊών (Picornaviridae), Καλκοϊών (Caliciviridae), Τογκαϊών (Togaviridae), Ρεοϊών (Reoviridae), Φλαβιϊών (Flaviviridae), Αρεναϊών (Arenaviridae), Κοροναϊών (Coronaviridae), Ρετροϊών (Retroviridae), Μπουνυαϊών (Bunyaviridae), Ορθομυξοϊών (Orthomyxoviridae), Παραμυξοϊών (Paramyxoviridae), Ραβδοϊών (Rhabdoviridae), Μπιρναϊών (Birnaviridae), Φιλοϊών (Filoviridae)

Λόγω ποικιλιών μέσα στις οικογένειες θεσπίστηκαν οι υποοικογένειες, οι οποίες έχουν το συνθετικό –virinae. ^[18]

Τα γένη φέρουν το δεύτερο συνθετικό –virus. Τα γένη των διαφόρων οικογενειών έχουν κοινά χαρακτηριστικά, όσο όμως αυξάνει ο αριθμός των ανακαλυπτομένων ιών χρειάζονται περισσότερα γένη να χαρακτηριστούν σε μια οικογένεια και άρα ο χαρακτηρισμός θα γίνει βάσει πλέον λεπτών χαρακτηριστικών, όπως γενετικών, φυσικοχημικών ιδιοτήτων ή ορολογικών διαφορών.

Όσον αφορά τα είδη είναι είτε μεμονωμένοι ιοί ή σύνολο ιών με κοινά χαρακτηριστικά γενετικά, δομικά, φυσικοχημικά, ορολογικά ή βιολογικά. Εφόσον τα μέλη ενός γένους συχνά σχετίζονται γενετικά είναι δύσκολο να καθοριστεί τι είναι είδος και τι είναι υποείδος ή υποτύπος ή ποικιλία ή στέλεχος και τα κριτήρια διαφέρουν από γένος σε γένος.

1.1 Ονοματολογία

Η αναγραφή των τάξεων, οικογενειών, υποοικογενειών και γενών είναι με λατινική πλάγια γραφή ή υπογραμμισμένη και το πρώτο γράμμα είναι κεφαλαίο ενώ η

αναγραφή των ειδών δεν έχει πρώτο γράμμα κεφαλαίο ούτε πλάγια γραφή ή υπογράμμιση. Η ονοματολογία των ιών έχει σχέση με τον τόπο ανακάλυψης, με τη νόσο που προκαλούν, με τη μορφολογία τους ή βασίζεται σε ακρονύμια που είναι τα αρχικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Οι ιοί περιέχουν έναν τύπο νουκλεϊκών οξέων DNA ή RNA, τα οποία περικλείονται μέσα στο πρωτεϊνικό καψίδιο. Οι ιοί δεν έχουν μεταβολικές διεργασίες, ριβοσώματα ή ένζυμα για την παρασκευή μακρομορίων, αλλά ζουν παρασιτικά μέσα στα ζώντα κύτταρα και η ζωή τους εξαρτάται από τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων.

Σε ένα εναιώρημα κεκαθαμένων ιών οι ιοί εμφανίζονται ομοιογενείς ως προς τις φυσικές και χημικές ιδιότητες, πολύ περισσότερο ομοιογενείς από μια κεκαθαμένη καλλιέργεια βακτηρίων ή μυκήτων. Τα εναιωρήματα των ιών είναι τόσο ομοιογενή όσο και τα εναιωρήματα μορίων πρωτεΐνης. Κάθε μόριο πρωτεΐνης ή κάθε ιός έχει τουλάχιστον το ίδιο σχήμα, μέγεθος και σύσταση. Η ομοιογένεια αυτή είναι χαρακτηριστική των μικροοργανισμών που δεν παράγονται κατόπιν ανάπτυξης σε μέγεθος και στη συνέχεια διαίρεσης, αλλά οικοδομούνται ή συντίθενται από μικρότερες υπομονάδες κατά ένα προδιαγεγραμμένο τρόπο. Δηλαδή τα αμινοξέα συνδέονται με χημικό δεσμό και σχηματίζουν πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται χωρίς χημικό δεσμό με τα μόρια των πρωτεϊνών για να σχηματίσουν ιούς.

Τα κύτταρα τα οποία μολύνονται με ιούς, δεν περιέχουν μόνο στοιχεία ιών αλλά επίσης και υλικό σχετικό με τους ιούς, το οποίο μπορεί να είναι προβαθμίδες των ιών ή άλλα παραπροϊόντα της σύνθεσης των ιών. Με την κάθαρση των ιών τα υλικά αυτά απομακρύνονται.

2.1 Δομή του καψιδίου

Η βασική δομή όλων των ιών είναι το καψίδιο το οποίο περιλαμβάνει ή εσωκλείει το νουκλεϊκό οξύ. Τα καψίδια αποτελούνται από δομικές υπομονάδες πρωτεϊνών τα πρωτομερή, οι οποίες συναθροίζονται σύμφωνα με στοιχειώδεις φυσικές θεωρίες για να σχηματίσουν τα καψομερίδια, τα οποία με τη σειρά τους συναθροίζονται για να σχηματίσουν καψίδια. Έτσι οι φάγοι, ιοί ζώων ή ιοί φυτών μπορεί να έχουν καψίδια τα οποία είναι ομοίως δομημένα και σχεδόν δεν διαφέρουν μορφολογικά.

Οι δομικές υπομονάδες πρωτεϊνών είναι βασικές δομικές μονάδες του καψιδίου και αποτελούνται από ανόμοια πολυπεπίδια ή όμοια όταν οι ιοί έχουν στο πυρηνικό τους οξύ λίγη γενετική πληροφορία.

Τα καψομερίδια είναι οι μορφολογικές μονάδες πρωτεϊνών όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πρόκειται για συναθροίσεις των δομικών πρωτεϊνικών μονάδων του καψιδίου των ιών. Οι μορφολογικές μονάδες δεν συμπίπτουν αναγκαία με τις χημικές δομικές υπομονάδες. Η συνάθροιση των δομικών πρωτεϊνικών υπομονάδων σε καψομερίδια αυξάνει τις επαφές αυτών στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και έτσι αποφεύγονται τα χάσματα.

Υπάρχουν δυο τρόποι κατά τους οποίους όμοιες δομικές υπομονάδες πρωτεϊνών μπορούν να συναθροιστούν για να κτίσουν τα καψίδια. Βάσει των τρόπων αυτών διακρίνουμε δυο βασικούς τύπους καψιδίων τα ελικοειδή και τα ισομετρικά καψίδια, τα οποία αντιστοιχούν στις δυο βασικές μορφολογίες ή συμμετρίες των ιών την ελικοειδή και την εικοσάεδρη ή κυβική συμμετρία. Κάθε ένας από αυτούς τους σχηματισμούς των καψιδίων γίνεται με συνάθροιση των πρωτεϊνών, ούτως ώστε ο τύπος του καψιδίου να είναι ένας τύπος ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας για τις ειδικές πρωτεΐνες του δεδομένου ιού. ^[13]

Σε παρασκευάσματα ιών παρατηρούνται άδεια καψίδια, δηλαδή καψίδια χωρίς το νουκλεϊνικό οξύ, τα οποία θεωρούνται προβαθμίδες των ισομετρικών καψιδίων. Τα καψίδια μπορούν να σχηματιστούν χωρίς το νουκλεϊνικό οξύ, μέσω μιας μήτρας η οποία παρέχει το υπόστρωμα για σύνθεση.

Το σχήμα και το μέγεθος του καψιδίου καθορίζεται από το σχήμα των μορίων πρωτεΐνης τα οποία χρησιμεύουν σαν δομικές μονάδες των καψιδίων και το είδος των δεσμών που αυτές οι μονάδες έχουν μεταξύ τους. Η σταθερότητα του τελικού συνδυασμού εξαρτάται από τον αριθμό και τη δύναμη των δεσμών μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών του καψιδίου. Όσο περισσότερη ελεύθερη ενέργεια απελευθερώνεται στο σχηματισμό, τόσο περισσότερο σταθερός είναι ο σχηματισμός αυτός.

Βίρια είναι τα πλήρη ιϊκά σωματίδια. Για τους ιούς που δεν έχουν έλυτρο είναι το νουκλεοκαψίδιο ενώ για τους ιούς που έχουν έλυτρο είναι το νουκλεοκαψίδιο με το περιβάλλον έλυτρο.

2.1.1 Ελικοειδή καψίδια

Στα ελικοειδή καψίδια τα πρωτομερή τα οποία στο ένα άκρο είναι πιο διογκωμένα, δεν συναθροίζονται σε καψομερίδια, αλλά συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μια δομή επιμήκη σαν κορδέλα, η οποία αναδιπλώνεται σε έλικα. Η διάμετρος του ελικοειδούς καψιδίου καθορίζεται από τα χαρακτηριστικά των πρωτομερών, ενώ το μήκος καθορίζεται από το μήκος του νουκλεϊνικού οξέος που περιέχει.

Τα σωματίδια των ιών των ζώων έχουν γυμνά ελικοειδή καψίδια χωρίς έλυτρα, ενώ άλλα φέρουν RNA γένωμα. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία του ιού TMV της μωσαϊκής του καπνού (Tobacco mosaic virus) του περισσότερου γνωστού ιού αυτής της ομάδας, ο οποίος αποτελεί και κλασικό παράδειγμα ελικοειδούς συμμετρίας, δείχνει ραβδία πάχους 15-17nm. Τα ραβδία τα οποία φαίνονται σε μικρογραφίες μπορεί να δείχνουν κάποια ποικιλία στο μήκος, αλλά μόνο τα ραβδία τα οποία έχουν μήκος 3000 Å είναι λοιμογόνα. Τα ραβδία έχουν διάμετρο 175 Å με κεντρική οπή διαμέτρου 40 Å.

Συγκεντρωμένα διαλύματα ιών TMV σχηματίζουν καμιά φορά παρακρυστάλλους (υγρούς κρυστάλλους), δηλαδή σχηματισμούς στους οποίους παρακείμενα σωματίδια τοποθετούνται με κανονικό τρόπο μαζί πλάι-πλάι και όχι κατά μήκος. Σε υγρό gel η απόσταση μεταξύ των κέντρων των σωματιδίων είναι 175 Å. Όταν οι παρακρύσταλλοι ξηραθούν, η απόσταση μεταξύ των κέντρων των σωματιδίων γίνεται 152 Å. Η έλικα του RNA στρέφεται σπειροειδώς σε μια αύλακα που σχηματίζεται από τις πρωτεϊνικές υπομονάδες του καψιδίου περίπου 40 Å από τον κεντρικό άξονα.

Πειραματικά οι πρωτεϊνικές υπομονάδες συνδέονται με το νουκλεϊνικό οξύ κατά ένα περιοδικό τρόπο. Αυτό δεν συμβαίνει στους ιούς με εικοσάεδρη συμμετρία, για αυτό δεν παρατηρούνται άδεια ελικοειδή καψίδια φυσικώς. Όταν γίνει επεξεργασία του ιού TMV με αραιό άλκαλι, ελευθερώνεται η πρωτεΐνη του, η οποία ονομάζεται Α-πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη μπορεί πάλι να συνδεθεί με το RNA των ιών TMV για να σχηματίσει λοιμογόνους ιούς. Η πρωτεΐνη Α μπορεί επίσης να συνδεθεί με το RNA άλλων ιών ή με συνθετικά πολυνουκλεοτίδια. Ακόμη και χωρίς το RNA, η Α-πρωτεΐνη τείνει να συγκεντρωθεί μόνη της σε ραβδία. Η συνάθροιση της TMV πρωτεΐνης *in vitro* αποδεικνύει ότι η σύνδεση των μονάδων των πρωτεϊνών των ιών για να σχηματίσουν ελικοειδή καψίδια είναι ένα φαινόμενο κρυστάλλωσης που αντανάκλα τις εσωτερικές ιδιότητες των υπομονάδων των πρωτεϊνών.

Η TMV πρωτεΐνη στην αρχή συναθροίζεται σε σχήματα πεπλατυσμένων δίσκων με 17 υπομονάδες έκαστος. Κάθε πλατύς δίσκος είναι ένας ανοικτός σχηματισμός. Στη συνέχεια οι δίσκοι υφίστανται μια μετάπτωση από το πλατύ σχήμα στο ελικοειδές σχήμα που αντιστοιχεί περίπου σε ένα γύρο της TMV έλικας. Η στροφή συνοδεύεται από μετάθεση των καρβοξυλικών ομάδων μέσα σε κάθε υπομονάδα και μια σύμφωνη αλλαγή των υπομονάδων των πρωτεϊνών κατά την αλληλεπίδραση της TMV πρωτεΐνης και του RNA. ^[17]

Τα ελικοειδή νουκλεοκαψίδια πολλών ιών ζώων είναι εύκαμπτα και αναδιπλώνονται σε σχήμα μπάλας, ενώ περιβάλλονται από έλυτρα. Τέτοιοι ιοί είναι ο ιός της γρίπης και ο ιός της νόσου New Castle.

2.1.2 Ισομετρικά ή εικοσάεδρα καψίδια

Τα καψίδια αυτά καλούνται ισομετρικά γιατί έχουν όμοιες γραμμικές διαστάσεις κατά μήκος ορθογωνίων αξόνων. Τα ισομετρικά καψίδια παρατηρούνται στους ιούς των ζώων και έχουν την πλέον κατάλληλη δομή για να υπάρχουν μέσα στα κύτταρα. Τα ισομετρικά καψίδια είναι σφαιρικά στα οποία τα πρωτομερή συγκεντρώνονται σε ομάδες των 5 ή 6 για να σχηματίσουν τα καψομερίδια. Το σχήμα και οι διαστάσεις των καψιδίων εξαρτώνται από τα δακτυλίδια με κεντρική οπή. Πολλοί ιοί DNA ή RNA έχουν σφαιρικά καψίδια τα οποία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνονται σαν πολύεδρα παρά σαν σφαίρες.

Σύμφωνα με τη θεωρία των Gaspar και Klug όμοιες πρωτεϊνικές υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους ισοδύναμα και διατίθενται επάνω σε μια σφαιρική επιφάνεια παράγοντας ένα κανονικό εικοσάεδρο, με 20 τριγωνικές πλευρές 20 ακμές και 12 κορυφές. Στις κορυφές οι πρωτεϊνικές υπομονάδες τοποθετούνται σε συγκεντρώσεις ανά 5, ενώ στην υπόλοιπη επιφάνεια τοποθετούνται σε συγκεντρώσεις ανά 6 σαν να βρίσκονται σε μια επίπεδη επιφάνεια. Κάθε τριγωνική επιφάνεια περιέχει τον ίδιο αριθμό καψομεριδίων.

Ο αριθμός των καψομεριδίων για τις διάφορες ομάδες ιών δίνεται από τον ακόλουθο τύπο $N=(n-1)^2 + 2$ όπου n είναι ο αριθμός των καψομεριδίων κάθε ισόπλευρου τριγώνου. Έτσι, ο αδενοϊός έχει 252 καψομερίδια.

Οι μικρότεροι έχουν καψίδια τα οποία συνίσταται από 60 πρωτεϊνικά μόρια. Τα μεγαλύτερα καψίδια έχουν περισσότερες πρωτεϊνικές υπομονάδες αλλά πλέον δεν συνδέονται ισοδύναμα μεταξύ τους. ^[17]

Από το εικοσάεδρο σχήμα κατόπιν απόκλισης μπορεί ναπραχθούν τα εικοσιδελτάεδρα με επιφάνειες λιγότερο πλατιές από το εικοσάεδρο. Τα εικοσιδελτάεδρα έχουν την ικανότητα να παραμορφώνονται υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ανώναλοι τύποι, όπως πχ. επιμήκη καψίδια ή γιγάντια καψίδια.

Το πυρηνικό οξύ πρέπει να αναδιπλωθεί κατά ένα τακτικό τρόπο, ώστε να προσαρμοστεί ένα καψίδιο. Πρωτεΐνες του πυρήνα οι οποίοι κωδικοποιούνται από τους ιούς ή κυτταρικές ιστόνες όπως στην περίπτωση των Παποβαϊών έχουν σχέση με την αναδίπλωση αυτή. Στους ιούς με μονή έλικα RNA ή DNA οι ίνες των νουκλεϊνικών οξέων πιθανόν να υπάρχουν σαν τυχαίες έλικες ή σαν διπλωμένες.

2.1.3 Σύνθετα καψίδια

Μερικοί ιοί έχουν τυπική εικοσάεδρη ή ελικοειδή συμμετρία, αλλά έχουν πιο πολύπλοκη δομή. Πχ. οι ραβδοϊοί έχουν σχήμα σφαίρας με το ένα άκρο αποστρογγυλεμένο, οι ευλογιοϊοί έχουν σχήμα πλίνθου. Οι ρεοϊοί έχουν διπλό εικοσάεδρο καψίδιο με πρωτεϊνικά νημάτια τα οποία αρχίζουν από κάθε κορυφή. Οι προσεκβολές παίζουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη της λοίμωξης. ^[17]

2.2 Έλυτρα

Πολλοί ιοί έχουν εξωτερικά έλυτρα που περιβάλλουν τα καψίδια τους. Ιοί οι οποίοι δεν φέρουν έλυτρο ονομάζονται γυμνοί ιοί. Παραδείγματα ιών που φέρουν έλυτρο είναι οι τογκαϊοί, οι ορθομυξοϊοί, οι ερπητοϊοί και οι ευλογιοϊοί. Η βασική δομή των ελύτρων είναι όπως αυτή όλων των βιολογικών μεμβρανών, δηλαδή διπλή στιβάδα φωσφολιπιδίων στην οποία εντοιχίζονται πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες των ιών. Τα έλυτρα μπορούν να διασπασθούν και να αδρανοποιηθούν από αιθέρα ή άλλους διαλύτες λιπιδίων, να καταστραφούν στην ξηρασία, στα οξέα και στα απορρυπαντικά. Η απώλεια του ελύτρου σημαίνει και απώλεια της μολυσματικότητας των ιών. Ιοί με γυμνά καψίδια αντέχουν στον αιθέρα και τους άλλους διαλύτες λιπιδίων, επίσης στην ξηρασία, τα απορρυπαντικά, τα οξέα και τη χολή, για αυτό μπορούν να επιζήσουν στη δράση των οξέων και της χολής της εντερικής οδού και να διατηρηθούν στους υπονόμους. Τα φωσφολιπίδια του ελύτρου των ιών είναι όμοια με αυτά του κυττάρου του ξενιστή στους περισσότερους ιούς, ενώ οι γλυκοπρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τους ιούς. Η υδατανθρακική ομάδα των γλυκοπρωτεϊνών προέρχεται από το κύτταρο μέσα στο οποίο ο ιός αναπτύσσεται. Τα

έλυτρα των ιών σχηματίζονται στις κυτταροπλασματικές μεμβράνες ή στην πυρηνική μεμβράνη των κυττάρων και περιέχουν ένα μωσαϊκό αντιγόνων προερχόμενο από το κύτταρο του ξενιστή και από τους ιούς. Σε ηλεκτρονικές μικρογραφίες μολυσμένων κυττάρων, οι πρωτεΐνες των ιών εμφανίζονται σαν μπαλώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε σημεία όπου τα ιϊκά καψίδια μεταναστεύουν και τελικά βγαίνουν προς τα έξω.

Το έλυτρο μοιάζει με σάκο μέσα στον οποίο είναι το νουκλεοκαψίδιο του ιού. Η περιοχή ανάμεσα στο νουκλεοκαψίδιο και το έλυτρο ονομάζεται κάλυμμα και περιέχει ένζυμα που διευκολύνουν τη λοίμωξη. ^[7]

Οι ευλογιοϊοί έχουν πολύπλοκα έλυτρα, τα οποία σχηματίζονται αποκλειστικά μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή. Αυτοί οι ιοί δεν είναι ευαίσθητοι στον αιθέρα, δεν δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα αντιγόνα των κυττάρων του ξενιστή και πιθανόν συνίστανται αποκλειστικά από υλικά ειδικά για τους ιούς. Οι γλυκοπρωτεΐνες του ελύτρου μπορεί να επεκτείνονται έξω από την επιφάνεια του ελύτρου σαν άκανθες και έχουν διάφορες λειτουργίες. Οι περισσότερες δρουν σαν πρωτεΐνες προσκόλλησης στο κύτταρο του ξενιστή. Όταν προσκολλώνται στα ερυθρά αιμοσφαίρια ονομάζονται αιμοσυγκολλητίνες, όπως συμβαίνει στον ιό της γρίπης. Άλλες γλυκοπρωτεΐνες του ιού της γρίπης οι νευραμινιδάσες διευκολύνουν την έξοδο του ιού από τα κύτταρα. Επίσης οι γλυκοπρωτεΐνες των ιών είναι αντιγόνα για την παραγωγή προστατευτικών εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Εφόσον βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του ιού εύκολα αντιδρούν με τα παραγόμενα αντισώματα. Σε RNA ιούς με αρνητική έλικα RNA (-) όπως είναι οι ορθομυξοϊοί, παραμυξοϊοί και ραβδοϊοί στο εσωτερικό του ελύτρου υπάρχουν οι πρωτεΐνες της μήτρας, οι οποίες βοηθούν τη σύνθεση του νουκλεοκαψιδίου.

2.3 Ατελή βίρια

Όλα τα παρασκευάσματα των ιών προέρχονται από μολυσμένα κύτταρα και μαζί με τους πλήρεις ιούς περιέχουν και άλλα προϊόντα ιϊκής δράσης. Τα στοιχεία αυτά είναι ή χημικά ή μορφολογικά στοιχεία ιών.

Κύτταρα τα οποία μολύνονται με ιούς με ισομετρικά καψίδια, αποδίδουν εκτός από τους πλήρεις ιούς και κάποιο ποσοστό άδειων καψιδίων. Αρνητική χρώση με ουδέτερο φωσφοβολφραμικό γεμίζει τα άδεια καψίδια και αποκαλύπτει σε

μικρογραφίες το πάχος και την οργάνωση του κελύφους. Τα άδεια καψίδια είναι συχνά προβαθμίδες των ισομετρικών καψιδίων.

2.4 Μέγεθος των ιών

Οι ιοί είναι μικρότεροι από τα βακτήρια και δεν είναι δυνατόν να τους παρατηρήσουμε στο φωτεινό μικροσκόπιο. Το μέγεθος των ιών ποικίλει από 18x26 nm έως 160x300nm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΩΝ

Η βιοχημεία των ιών είναι στην πραγματικότητα βιοχημεία νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών. Τα λειτουργικά νουκλεϊνικά οξέα και οι πρωτεΐνες των ιών είναι ενδοκυττάρια συστατικά, τα οποία δρουν ενεργώς στο μεταβολισμό των κυττάρων. Η γνώση του μηχανισμού και της ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων μέσω της μεταγραφής και της μετάφρασης είναι βασική για την κατανόηση της συμπεριφοράς των ιών μέσα στα κύτταρα του ξενιστή.

Υπάρχει μια γραμμική συνέχεια νουκλεϊνικών βάσεων στο DNA ή RNA. Βάσει της ακολουθίας των βάσεων αυτών σχηματίζονται οι πρωτεΐνες με τη σωστή τοποθέτηση των αμινοξέων.

Ο μηχανισμός με τον οποίον οι πληροφορίες από το DNA μεταγράφονται σε ένα m-RNA και μεταφράζονται σε πρωτεΐνη είναι σαφής. Από την αλληλουχία των νουκλεϊνικών βάσεων του DNA στα γονίδια εξαρτάται η αλληλουχία των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Το mRNA έχει βρεθεί και μελετηθεί στα ζωικά κύτταρα. Πολλά ειδικά μόρια mRNA ιικά ή μη φαίνεται ότι κατευθύνουν την πρωτεϊνική σύνθεση. ^[3]

3.1 Γενετικός Κώδικας

Υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ του DNA και των αλληλουχιών των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων φέρουν την πληροφορία για τη διάταξη των αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα. Η σχέση των δυο μορίων για τη μετάδοση της πληροφορίας του DNA ονομάζεται γενετικός κώδικας.

Το DNA συνίσταται από τέσσερα διαφορετικά νουκλεοτίδια (βάσεις A, T, C, G) ενώ οι πρωτεΐνες από 20 διαφορετικά αμινοξέα.

Η μονάδα του γενετικού κώδικα ονομάζεται κωδικόνιο ή τριπλέτα και αποτελείται από τρία νουκλεοτίδια και κάθε ένα από αυτά αντιστοιχεί σε ένα

αμινοξύ.Ο συνδυασμός των νουκλεοτιδίων ανά τρία δίνει 64 κωδικόνια τα οποία είναι υπεραρκετά για την κωδικοποίηση των 20 αμινοξέων.Αποδείχθηκε ότι διάφορα κωδικόνια κωδικοποιούν ένα αμινοξύ.Στο γενετικό κώδικα υπάρχουν οι θέσεις 1,2 και 3 και κάθε αμινοξύ εκτός από τη μεθειονίνη και την τρυπτοφάνη κωδικοποιείται από περισσότερα από ένα κωδικόνια.Για ένα δεδομένο αμινοξύ πολλαπλά κωδικόνια έχουν όμοιες πρώτες και δεύτερες θέσεις,παραλλαγές υπάρχουν στην τρίτη θέση όπου η κυτοσίνη είναι συχνά ισοδύναμη με την ουρακίλη και η γουανίνη ισοδύναμη με την αδενίνη.

3.2 Πρωτεϊνοσύνθεση

Τα στοιχεία τα οποία περιλαμβάνονται στη σύνθεση των πρωτεϊνών είναι τα ριβοσώματα,το tRNA,το mRNA και οι πρωτεϊνικοί παράγοντες,για την έναρξη,επιμήκυνση και λήξη της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Πρώτα οι Jacob και Monod (1961) ανέφεραν ένα μη σταθερό μόριο το οποίο δρα μεταξύ των γονιδίων και σύνθεσης των πρωτεϊνών. Το μόριο αυτό μετέπειτα μελετήθηκε και ονομάστηκε mRNA. Το mRNA κατευθύνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Ο Crick το 1958 ανακάλυψε μόρια τα οποία μετέφραζαν τη γλώσσα της αλληλουχίας των νουκλεϊνικών οξέων στη γλώσσα της αλληλουχίας των πρωτεϊνών. Τα μόρια αυτά αποτελούν τα μεταφορικά RNAs. Για πολλά αμινοξέα υπάρχουν πολλά διαφορετικά tRNAs μόρια ικανά να μεταφέρουν τα διάφορα αμινοξέα. Υπάρχουν ειδικά tRNAs για κάθε αμινοξύ, όπως ειδικές tRNA συνθετάσες για την ενεργοποίηση των αμινοξέων δια της αμινοακυλίωσης της κοινής 3-αδενοσυλικής κατάληξης των tRNAs. Μελέτες ηλεκτρονικής μικρογραφίας απέδειξαν ότι οι ιστοί, οι εκκρίνοντες πρωτεΐνες είναι πλούσιοι σε κοκκία,τα οποία αποδείχθηκε ότι ήταν ριβοσώματα.Τα ριβοσώματα είναι τα σημεία του ενεργού πολυμερισμού των αμινοξέων.Αυτό αποδείχθηκε από έρευνα στα ριβοσώματα της Escherichia coli.

3.3 Μεταγραφή

Με τη μεταγραφή η γενετική πληροφορία μεταγράφεται από το DNA στο RNA.Μια από τις δυο έλικες του DNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη δημιουργία του συμπληρωματικού RNA.Το RNA κρατάει όλη την πληροφορία την οποία παίρνει από το DNA.Η μεταγραφή καταλύεται από τις RNA πολυμεράσες, οι οποίες διαφέρουν στα προκαρυωτικά και στα ευκαρυωτικά κύτταρα.Οι RNA πολυμεράσες

προσκολλώνται στα DNAs και κλειδώνονται επάνω σε αυτά με τον παράγοντα σίγμα και καταλύουν την πρόσθεση νουκλεοτιδίων από την 5' προς την 3' θέση. Τα νουκλεοτίδια προστίθενται επάνω στο 3' άκρο. Αφού προστεθούν μερικά νουκλεοτίδια, ο παράγοντας σίγμα αποσπάται και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί.

Τα μόρια RNAs τα οποία δημιουργούνται είναι το mRNA (αγγελιοφόρο RNA), το tRNA (μεταφορικό RNA), rRNA (ριβοσωμικό RNA), snRNA (μικρό πυρηνικό RNA) και τα μόρια hnRNA (ετερογενές πυρηνικό RNA). Τα hnRNAs είναι τα πρώτα μόρια RNA τα οποία μεταγράφονται από το DNA είναι πιο επιμήκη από τα τελικά και θεωρούνται αντίγραφα των mRNAs ή pre-mRNAs.

Αντίθετα με τα DNAs τα RNAs μόρια είναι μονής έλικας αλλά εμφανίζουν και περιοχές με διπλές έλικες, οι οποίες προέρχονται από αναδιπλώσεις των μονών ελίκων. Οι αλληλουχίες αυτές είναι αναστραμμένες επαναλήψεις. Τα μόρια mRNAs, rRNAs, tRNAs προέρχονται από μεγαλύτερα μόρια στα κύτταρα των θηλαστικών, τα pre-mRNAs, τα pre-rRNAs και τα pre-tRNAs. Τα pre-rRNAs έχουν 14.000 νουκλεοτίδια και υφίστανται τεμαχισμό μέσα στον πυρηνίσκο και μεθυλίωση. Ο τεμαχισμός αποδίδει μόρια rRNAs 18S και 28S. Τα pre-tRNAs έχουν 50 νουκλεοτίδια περισσότερα ή 10-15 νουκλεοτίδια λιγότερα. ^[15]

Το DNA του πυρήνα είναι πολύ συμπυκνωμένο και άρα δεν είναι δυνατόν να παρατηρήσει κανείς τις μεταγραφικές μονάδες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Το σημείο που ενώνεται η DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ονομάζεται προωθητής και είναι το σημείο που αρχίζει η μεταγραφή. Οι μεταγραφικές μονάδες μπορεί να έχουν αντίθετη πολικότητα, εάν χρησιμοποιείται η μία έλικα ή η άλλη.

Τα μόρια τα οποία μεταγράφονται είναι πολύ μικρότερα από τα μεταγραφόμενα. Αυτό γίνεται λόγω της δημιουργίας δευτερογενών δομών των RNAs σε σχήμα φουρκέτας ή παλίνδρομων δομών, οι οποίες σχηματίζονται αμέσως μετά τη σύνθεση των RNAs ή λόγω της δημιουργίας συμπλεγμάτων με τις πρωτεΐνες. Η μεταγραφή σταματά όταν οι RNA πολυμεράσες φθάσουν στις αλληλουχίες λήξης. Στη συνέχεια οι RNA πολυμεράσες είναι πάλι ελεύθερες για να επαναλάβουν τη δράση τους.

3.3.1 hnRNAs μόρια

Τα hnRNAs περιέχουν αλληλουχίες εξόνιων και εσονίων. Οι αλληλουχίες των εσονίων πρέπει να αποκοπούν και οι αλληλουχίες των εξονίων να ενωθούν, ώστε να παραχθούν τα λειτουργικά RNAs. Μικρά μόρια μικρών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (snRNPs) ενώνονται με τα εσόνια και καταλύουν την

αφαίρεση των εσονίων, ενώ τα εξόνια ενώνονται μεταξύ τους με ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες υπάρχουν στα άκρα των εσονίων. Αν και το μέγεθος των εσονίων ποικίλει, μόνο με 30-40 νουκλεοτίδια σε κάθε άκρο του εσονίου απαιτούνται για να μετακινηθεί επαρκώς.

3.3.2 mRNAs μόρια

Το μεγαλύτερο μέρος του μορίου hnRNA καταστρέφεται αμέσως μετά την σύνθεση. Μόνο ένα μικρότερο μέρος μετατρέπεται σε mRNA. Τα πρώτα παραγόμενα pre-mRNAs μόρια είναι επιμήκη και υφίστανται τις ακόλουθες τροποποιήσεις προκειμένου να γίνουν πιο σταθερά. Στο 5' άκρο του μορίου προστίθεται ένα μόριο καλύπτρας. Η δομή κάλυψης δεν έχει ελεύθερες φωσφορικές ομάδες και άρα προστατεύεται από τις φωσφατάσες ή τις νουκλεάσες. Η δομή αυτή βρίσκεται στα περισσότερα αν όχι όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, στα κύτταρα των θηλαστικών, όπως επίσης και σε έλικες αρκετών (+) RNA ιών. Αν δεν υπάρχει δομή κάλυψης, τότε τα mRNAs μόρια ενώνονται με τα ριβοσώματα πολύ φτωχά και άρα η τιμή της πρωτεϊνοσύνθεσης εξαρτάται από την παρουσία της δομής κάλυψης. Εκτός από τις δομές κάλυψης προστίθενται και εσωτερικές μεθυλιωμένες βάσεις όπως το N6-μεθυλοαδενυλικό οξύ. Οι μεθυλιωμένες δομές υπάρχουν στα μεγάλα μόρια mRNAs του πυρήνα όπως επίσης και στα κυτταροπλασματικά mRNAs. Επίσης κατά τη διαδικασία παραγωγής του mRNA στο άκρο 3' προστίθεται ένα πολυαδενυλιωμένο μόριο το οποίο περιέχει 100-200 νουκλεοτίδια. Τα 30-40% των mRNAs τα οποία έχουν απομονωθεί από το πρωτόπλασμα φέρουν τις πολυαδενυλικές αλληλουχίες στο άκρο 3'. Επίσης αρκετοί (+)RNA ιοί φέρουν πολυαδενυλιωμένα 3' άκρα. Η πολυμεράση δεν σταματά την μεταγραφή απότομα αλλά συνεχίζει τη μεταγραφή του DNA για περίπου 150 νουκλεοτίδια. Το μεταγραφικό προϊόν κόβεται και πολυαδενυλιώνεται ενώ ακόμη μεταγράφεται.

Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στον πυρήνα και τα τελικά mRNAs εξέρχονται μέσω των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης στο κυττόπλασμα για τη λειτουργία της μετάφρασης. Το ώριμο mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχει 400-4.000 νουκλεϊνικές βάσεις. Το mRNA του κυττοπλάσματος είναι πάντα συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και σχηματίζει το ριβονουκλεϊνικό σύμπλεγμα. Μόνο μέρος αυτού του ώριμου mRNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνη. ^[15]

Στην αρχή του mRNA ακριβώς μετά το μόριο cap υπάρχει η οδηγός αλληλουχία η οποία αποτελείται από 10-200 νουκλεοτίδια, δε φέρει πληροφόρηση και

δεν μεταφράζεται. Η αλληλουχία αυτή ακολουθείται από μια άλλη μη μεταφραζόμενη αλληλουχία 600 νουκλεοτιδίων. Η αλληλουχία η οποία μεταφράζεται αρχίζει με το κωδικόνιο έναρξης AUG και λήγει με ένα από τα κωδικόνια λήξης UAG, UAA, UGA.

3.3.3 tRNAs μόρια

Τα tRNAs είναι μικρά μόρια 70-90 νουκλεοτιδίων. Μετά τη μεταγραφή γίνεται τροποποίηση του μορίου με τη βοήθεια ενζύμων. Τα tRNAs αναδιπλώνονται και δημιουργούν χαρακτηριστική δευτερογενή δομή σαν τριφύλη. Μια περαιτέρω αναδίπλωση δίνει στα tRNAs χαρακτηριστική τριτογενή δομή, η οποία σταθεροποιείται με τη βοήθεια των σπάνιων και τροποποιημένων βάσεων, οι οποίες αναπτύσσουν επιπρόσθετους δεσμούς υδρογόνου.

Τα tRNAs αναγνωρίζουν τα κωδικόνια των mRNAs μέσω των αντικωδικονίων που φέρουν. Επίσης αναγνωρίζουν τα ανάλογα αμινοξέα. Κάθε tRNA αναγνωρίζει και μπορεί να συνδεθεί με ένα αμινοξύ μέσω της αμινοακυλικής -tRNA συνθετάσης.

Θεωρητικά πρέπει να υπάρχουν 20 tRNAs τα οποία αντιστοιχούν στα 20 αμινοξέα τα οποία υπάρχουν μέσα στο κύτταρο με μέγιστη τιμή 61. Πράγματι υπάρχουν περισσότερα από 21 tRNAs. Ένα tRNA συχνά είναι ικανό να αναγνωρίζει διάφορα κωδικόνια, εφόσον αυτά διαφέρουν μόνο ως προς την 3^η θέση.

3.3.4 rRNAs μόρια

Το ριβοσωμιακό rRNA υπάρχει στη μικρή και στη μεγάλη υπομονάδα των ριβοσωμάτων και συνίσταται από 2 ή 3 rRNAs μόρια διαφόρου μεγέθους. Υπάρχουν 4 τύποι rRNAs οι 5S, 5.8S, 18S και 28S βάσει του συντελεστού καθίζησης.

Τα rRNAs μεταγράφονται από πολλαπλά αντίγραφα DNAs και συντίθενται στον πυρηνίσκο.

3.3.5 snRNAs μόρια

Πρόκειται για μικρά μόρια RNA τα οποία βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων. Τα μόρια αυτά λαμβάνουν μέρος στη μετακίνηση των εσόνιων από τα μόρια hnRNA και στη διατήρηση των άκρων των χρωματοσωμάτων. Συνδεόμενα με πρωτεΐνες δημιουργούν μικρά ριβονουκλεϊνικά μόρια SnRNP.

3.6 Έναρξη, επιμήκυνση και λήξη της πρωτεϊνικής αλυσίδας

Το tRNA είναι ο φορέας των αμινοξέων και τα ριβοσώματα είναι το ενεργό σημείο της σύνθεσης των πεπτιδίων. Για κάθε πεπτιδική αλυσίδα υπάρχει μια καθορισμένη αρχή και τέλος. Οι μελέτες έγιναν στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Το αρχικό αμινοξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης είναι το ίδιο για όλες τις πρωτεΐνες. Στην *Escherichia coli* η N-φόρμυλο-μεθειονίνη, είναι το μόνο αμινοξύ το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έναρξη μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας. Το tRNA ενωμένο με τη μεθειονίνη αναγνωρίζει το κωδικόνιο AUG σαν το ειδικό αρχικό σήμα επάνω στο mRNA, ώστε τα ριβοσώματα να αρχίσουν τον πολυμερισμό των πρωτεϊνών με το σωστό σκελετό ανάγνωσης. Η έναρξη της αλυσίδας στα ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνει επίσης ένα μεθειονιλωμένο tRNA αλλά η μεθειονίνη του δεν είναι φορμυλιωμένη. Κατά την πρωτεϊνοσύνθεση υπάρχουν παράγοντες έναρξης, επιμήκυνσης και λήξης των πρωτεϊνικών αλυσίδων. ^[8]

3.7 Μηχανισμοί ρύθμισης των γονιδίων

Ο μηχανισμός της έκφρασης των γονιδίων, δηλαδή η μεταγραφή και η μετάφραση έχουν μελετηθεί στα βακτήρια και στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Γονίδια είναι περιοχές επάνω στο DNA οι οποίες μπορούν να μεταγραφούν και να δώσουν ένα προϊόν με ειδική κυτταρική λειτουργία. Τέτοια προϊόντα είναι πολυπεπτιδικές αλυσίδες ή μόρια rRNA, tRNA, mRNA και snRNP. Τα γονίδια υπόκεινται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την επιβίωση των οργανισμών. Ρυθμιστικά γονίδια είναι περιοχές επάνω στο DNA που χρησιμεύουν για τη σύνθεση ειδικών πρωτεϊνών οι οποίες δρουν ρυθμιστικά στη μεταγραφή του m-RNA για την παραγωγή ενζύμων. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζεται η δράση και ο αριθμός των μορίων των ενζύμων που υπάρχουν μέσα σε ένα κύτταρο. Τέτοιοι ενεργοποιητές είναι η λακτόζη, η αραβινόζη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη. Στην *Escherichia coli* έχουν μελετηθεί διάφορα συστήματα ενζυμικά. Το πλέον μελετημένο σύστημα είναι αυτό της λακτόζης, το οποίο ονομάζεται συνεργίωμα της λακτόζης.

Η περμεάση είναι απαραίτητη για την είσοδο της λακτόζης μέσα στο βακτηριακό κύτταρο. Η β-γαλακτοσιδάση είναι απαραίτητη για τη διάσπαση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Η δράση της τρανσακετυλάσης δεν είναι γνωστή. Στην περίπτωση απουσίας λακτόζης από το γονίδιο καταστολέα το οποίο βρίσκεται μακριά από τη θέση του χειριστή, παράγεται μια κατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία ενώνεται στην περιοχή του γονιδίου χειριστή, η οποία καλύπτει και

αλληλουχίες στην περιοχή του υποκινητή. Με τον τρόπο αυτό η RNA πολυμεράση το ένζυμο το υπεύθυνο για τη μεταγραφή του DNA σε mRNA δε μπορεί να συνδεθεί στην περιοχή του υποκινητή και άρα να αρχίσει η μεταγραφή του DNA και στη συνέχεια η μετάφραση του στα ένζυμα που προαναφέραμε για τη χρησιμοποίηση της λακτόζης από τα κύτταρα της *Escherichia coli*.

Στην περίπτωση παρουσίας λακτόζης αφού ορισμένα μόρια κατορθώσουν να εισέλθουν στο κύτταρο, ένα μεταβολικό παράγωγο της λακτόζης η αλλολακτόζη συνδέεται με την κατασταλτική πρωτεΐνη, ώστε αυτή δεν μπορεί να συνδεθεί με την περιοχή του χειριστή, με αποτέλεσμα η RNA πολυμεράση να συνδέεται στην περιοχή του υποκινητή και να αρχίζει η μεταγραφή του DNA σε mRNA για να παραχθούν τα ένζυμα.

Ανάλογο σύστημα είναι το συνεργώμα της τρυπτοφάνης, το οποίο έχει ερευνηθεί στη *Escherichia coli* και στη *Salmonella*. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό όταν υπάρχει αρκετή τρυπτοφάνη στο κύτταρο καταστέλλεται η σύνθεση των ενζύμων των υπευθύνων για την παραγωγή του αμινοξέος. Αντίθετα όταν η τρυπτοφάνη βρίσκεται σε μικρές ποσότητες, ενεργοποιείται η σύνθεση των ενζύμων για τη παραγωγή της. Επίσης υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί για την ρύθμιση της μετάφρασης του mRNA. Τα mRNAs τα οποία έχουν περισσότερες αλληλουχίες συμπληρωματικές στα rRNAs των ριβοσωμάτων, συνδέονται με αυτά και μεταφράζονται γρηγορότερα. Ομοίως η δημιουργία δομικών πρωτεϊνών των ριβοσωμάτων, ρυθμίζεται από μια ρυθμιστική πρωτεΐνη, η οποία μπορεί και σταματά την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών των ριβοσωμάτων, κατόπιν ένωσης της με το 5' άκρο του μορίου mRNA, το οποίο ονομάζεται σημείο εισόδου του ριβοσώματος.

Στα προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται γρήγορα, η ρύθμιση των γονιδίων γίνεται μέσω των συνεργιωμάτων, ώστε πολύ γρήγορα να μπορούν να αρχίζουν και να σταματούν τη παραγωγή ενός προϊόντος με γνώμονα πάντα την οικονομία, ώστε να επιτυγχάνονται όλες οι αναγκαίες λειτουργίες. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πλέον σύνθετους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των γονιδίων τους από αυτά των προκαρυωτικών.^[10]

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα των ανωτέρων οργανισμών προέρχονται από ένα γονιμοποιημένο ωάριο το οποίο μετά από συνεχείς διαιρέσεις και μετασχηματισμούς συναθροίζεται σε ομάδες με ορισμένο τύπο κυττάρων και ορισμένες λειτουργίες.

Η ρύθμιση των γονιδίων των κυττάρων αυτών γίνεται από ειδικές ρυθμιστικές ακολουθίες, οι οποίες υπάρχουν σε κάθε γονίδιο. Επίσης υπάρχουν γονίδια τα οποία

ενεργοποιούνται μόνο προσωρινά πχ. λοιμώξεις με ιούς ή επίδραση διαφόρων άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων ή ενεργοποιούνται μέσω προϊόντων άλλων ιστών πχ. ορμονών.

Όπως στα προκαρυωτικά κύτταρα έτσι και στα ευκαρυωτικά χρειάζεται ένας υποκινητής για τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης, η περιοχή αυτή περιέχει βάσεις, οι οποίες ονομάζονται UPE (upstream promoter elements = ανοδικά στοιχεία προαγωγού) και έχουν σχέση με την δύναμη του υποκινητή. Εκτός από τον υποκινητή και τα στοιχεία UPE, η ρύθμιση των γονιδίων επηρεάζεται και από τους επιταχυντές, οι οποίοι αυξάνουν την τιμή σύνθεσης του mRNA. Οι επιταχυντές ανακαλύφθηκαν κατ' αρχήν στον ιό SV-40 και αργότερα στα ευκαρυωτικά κύτταρα από τον W. Schaffner. Η ανακάλυψη τους έριξε φως στην κατανόηση της ρύθμισης των γονιδίων. Οι επιταχυντές και τα στοιχεία UPE ενεργοποιούνται με ειδικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες.

3.8 Ένζυμα των νουκλεϊνικών οξέων

Η ανάπτυξη πολλών νέων τεχνικών όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία και ο ποσοτικός υβριδισμός προώθησε την έρευνα των νουκλεϊνικών οξέων και εμπλούτισε τη γνώση σχετικά με τη βιοχημεία των νουκλεϊνικών οξέων. Τα ένζυμα των νουκλεϊνικών οξέων δρουν στο ενδοκυττάριο χώρο. Αυτά εκτελούν τη λειτουργία του πολυμερισμού, της τροποποίησης και της αποδόμησης.

3.9 DNA πολυμεράσες

Οι DNA πολυμεράσες χρησιμεύουν για να ενσωματώνουν τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια στο 3' OH άκρο της αναπτυσσόμενης DNA αλυσίδας. Τα φωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια προέρχονται από τα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια. Κανένα από τα τρία ένζυμα δεν μπορεί να αρχίσει τη σύνθεση DNA από την αρχή. Μια μικρή DNA ή RNA αλυσίδα χρησιμεύει σαν αρχή για την επιμήκυνση. Η ανάπτυξη της αλυσίδας γίνεται από τη θέση 5' → 3' κατόπιν αντιγραφής.

Πολλοί ιοί διεγείρουν το σχηματισμό ενζύμων τα οποία έχουν δράση όμοια με των DNA πολυμερασών. Στους ρετροϊούς και στους ογκογόνους ιούς RNA έχει περιγραφεί ένας νέος τύπος ενζύμου με δραστικότητα πολυμερισμού. Το ένζυμο μπορεί να αντιγράψει το RNA των ιών σε DNA. Επειδή αυτό το ένζυμο αναστρέφει τη φυσιολογική κατεύθυνση της ροής της πληροφορίας, ονομάζεται αντίστροφη

τρανσκριπτάση.Όπως όλες οι άλλες πολυμεράσες DNA,έτσι και η αντίστροφη τρανσκριπτάση δεν αρχίζει την ανάπτυξη της αλυσίδας,αλλά επιμηκώνει προϋπάρχουσα αλυσίδα RNA από το 3' OH άκρο.

3.10 RNA πολυμεράσες

Οι RNA πολυμεράσες είναι ένζυμα υπεύθυνα για την μεταγραφή του DNA σε RNA. Όταν υπάρχουν τριφωσφορικά ριβονουκλεοτίδια και καλούπια DNA,τότε οι RNA πολυμεράσες μπορούν να ενωθούν σε ειδικά σημεία του DNA,τους υποκινητές και να αρχίσει η έναρξη της αλυσίδας RNA.Το πρώτο νουκλεοτίδιο στην καινούργια αλυσίδα είναι σχεδόν πάντα μια πουρίνη,η οποία παραμένει στο 5' άκρο της νέας αλυσίδας.Η επιμήκυνση της αλυσίδας γίνεται από τη θέση 5'→3' με τη διαδοχική πρόσθεση μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων,με τη σειρά που υπαγορεύεται από τη μια από τις δύο έλικες του DNA.

Η λήξη της RNA αλυσίδας οφείλεται σε ένα πρωτεϊνικό παράγοντα rho ο οποίος βρίσκεται σε ορισμένα σημεία κατά μήκος της αλυσίδας DNA.Τα ευκαρυωτικά κύτταρα κατέχουν τουλάχιστον 3 ευδιάκριτες πολυμεράσες RNA,οι οποίες λειτουργούν χωριστά.Η RNA I πολυμεράση είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του pre-rRNA,η RNA πολυμεράση II υπεύθυνη για το σχηματισμό του hn RNA και η RNA πολυμεράση III υπεύθυνη για το σχηματισμό του pre-Trna και του 5 S RNA.Τα λειτουργικά μόρια πολυμεράσης I και II είναι 2.000-10.000 ανά κύτταρο.Στους χλωροπλάστες υπάρχει ένας άλλος τύπος RNA πολυμεράσης,ο οποίος έχει σχέση με την RNA πολυμεράση των προκαρυωτικών κυττάρων.Επίσης ένας άλλος τύπος RNA πολυμεράσης υπάρχει στα μιτοχόνδρια των ζωϊκών κυττάρων.Ορισμένοι ιοί ζώων χρησιμοποιούν την RNA πολυμεράση II των κυττάρων για το σχηματισμό του mRNA τους.Οι ευλογοιοί έχουν τη δική τους RNA πολυμεράση που κατευθύνεται από του DNA. ^[16]

3.11 Μεθυλάσες

Πολλά ένζυμα μεθυλίωσης έχουν καθαρθεί.Σχεδόν όλες οι αντιδράσεις μεθυλίωσης περιλαμβάνουν τη μεταφορά μιας μεθυλικής ομάδας στο νουκλεϊνικό οξύ από το δότη τη S-αδενοσυλομεθειονίνη.Ο ρόλος των περισσότερων μεθυλίωσεων του RNA παραμένει άγνωστος.Μια άποψη είναι ότι γίνεται για να τροποποιηθούν ορισμένα tRNA,έτσι ώστε να έχουν μεγαλύτερη ενδοκυττάρια λειτουργία.Η μεθυλίωση είναι η πλέον διαδεδομένη τροποποίηση των νουκλεϊνικών οξέων.Στα tRNA μόρια έχουν

περιγραφεί περίπου 40 διαφορετικές μεθυλιωμένες βάσεις. Επίσης τα μόρια pre-tRNA και τα mRNA έχουν μεθυλικές ομάδες. Η 5-μεθυλκυτοσίνη αποτελεί το 1,0-1,5% των βάσεων του ζωϊκού DNA.

3.12 Τελικά επιπρόσθετα ένζυμα

Πολλά ένζυμα έχουν ελεγχθεί, τα οποία μπορούν να προσθέτουν βάσεις ή επαναληπτικά να προσθέτουν πολλές βάσεις στη θέση 3' στο τέλος του RNA ή του DNA χωρίς την ανάγκη ύπαρξης ενός αντιγράφου. Η τελική ομάδα -CCA του tRNA η οποία χρειάζεται για να δεχθεί ενεργητικά το κατάλληλο αμινοξύ προστίθεται μετά το σχηματισμό του tRNA στο 3' άκρο του. Ένζυμα για τη μετακίνηση και την πρόσθεση της -CCA ομάδας στο tRNA έχουν περιγραφεί σε βακτήρια και σε θηλαστικά. Επίσης με τα mRNAs υφίστανται τροποποιήσεις. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η πλειονότητα των mRNA μορίων καταλήγουν στην 3' θέση με πολυαδενυλικό οξύ το οποίο προστίθεται μετά τη μεταγραφή. Το πολυαδενυλικό οξύ αποτελείται από 75-200 νουκλεοτίδια.

3.13 Ενδονουκλεάσες

Μεταξύ των νεωτέρων ενζύμων τα οποία απομονώθηκαν είναι οι DNA-άσες και οι RNA-άσες από το πάγκρεας των θηλαστικών, όπου σχηματίζονται για να χρησιμεύουν σαν πεπτικά ένζυμα στο έντερο. Αυτές οι ενδονουκλεάσες που πέπτουν την DNA ή την RNA αλυσίδα σε μικρά κλάσματα ολιγονουκλεοτιδίων, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σαν εργαστηριακά αντιδραστήρια. Οι ενδονουκλεάσες έχουν σαν σκοπό την ανακύκλωση των βάσεων των πουρινών και πυριμιδινών. Μερικές από τις ενδονουκλεάσες περιέχονται στα λυσοσώματα, τα οποία έχουν σκοπό να πέπτουν τα εισερχόμενα σωματίδια.

3.13.1 DNA-άσες

Η DNA-άση I τέμνει τις μονές έλικες DNA αφήνοντας ένα 3-OH άκρο. Όταν οι τομές είναι αρκετές, τότε οι διπλές έλικες καταστρέφονται. Η DNA-άση II είναι ένα ένζυμο το οποίο έχει απομονωθεί από το σπλήνα και το θύμο και τέμνει τις διπλές έλικες DNA αφήνοντας ένα 3-PO₄ άκρο.

3.13.2 RNA-άσες

Η RNA-άση A και η RNA-άση T1 είναι τύποι ενζύμων που υπάρχουν σε όλα τα είδη των κυττάρων και τέμνουν τις μονές έλικες RNA.

Οι διπλές RNA έλικες είναι ανθεκτικές στις ενδονουκλεάσες και αυτό οφείλεται στη μη διαθεσιμότητα βάσεων σαν σημεία αναγνώρισης, όταν δεσμοί υδρογόνου υπάρχουν μεταξύ των βάσεων. Αυτή η ιδιότητα της αντοχής των διπλών ελίκων RNA στις RNA-άσες έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη των ιών με διπλές έλικες RNA. Πάντως έχει απομονωθεί από την *Escherichia coli* το ένζυμο RNA-άση III, το οποίο είναι ικανό να τέμνει τη διπλή έλικα RNA. Επίσης, η RNA-άση III μπορεί να τέμνει ειδικές αλληλουχίες σε μονές έλικες RNA. Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την επεξεργασία του pre-tRNA. ^[12]

Το ένζυμο RNA-άση υπάρχει στα κύτταρα και στους ρετροϊούς. Αυτό το ένζυμο καταστρέφει εκλεκτικά τμήμα του RNA στα υβριδισμένα συμπλέγματα RNA:DNA.

3.14 Εξωνουκλεάσες

Εξωνουκλεάσες υπάρχουν για όλους τους τύπους $3' \rightarrow 5'$, $5' \rightarrow 3'$ DNA με απλή και διπλή έλικα. Επίσης εξωριβονουκλεάσες για $3' \rightarrow 5'$ ή $5' \rightarrow 3'$ RNA είναι γνωστές. Στο εργαστήριο, οι εξωνουκλεάσες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον τεμαχισμό των ελίκων του DNA εκεί που ενδιαφέρει.

3.15 Περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Μια ομάδα DNA-ασών βακτηριδίων έχουν προστατευτική λειτουργία ως προς την είσοδο ξένου DNA. Αυτά τα ένζυμα ονομάστηκαν περιοριστικά ένζυμα. Τα περιοριστικά ένζυμα λειτουργούν μαζί με τροποποιητικά ένζυμα και μπορούν να αναγνωρίζουν και να διατηρούν το ομόλογο DNA και να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν το ξένο DNA. Η αναγνώριση φαίνεται ότι συντελείται από την παρουσία μιας μεθυλικής ομάδας στην αλληλουχία των ξένων DNA.

Όταν κεκαθαυμένα είδη DNA πέπτονται με περιοριστικά ένζυμα, παράγονται κλάσματα τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε ζέλη και σχηματίζονται χάρτες αυτών των κλασμάτων. Κάθε ιός DNA υπόκειται σε λεπτομερή ανάλυση, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο για να δημιουργηθούν κλάσματα DNA και χάρτες του γενόματός των ιών. Η μέθοδος της χαρτογράφησης των ιών γίνεται με τον τεμαχισμό του DNA με περιοριστικά ένζυμα και στη συνέχεια διαχωρισμό των

κλασμάτων με ηλεκτροφόρηση σε ζέλη, ώστε να καθοριστεί το μοριακό βάρος των κλασμάτων και άρα το μέγεθος τους.

Πολλά περιοριστικά ένζυμα τέμνουν τις έλικες του DNA (διπλής έλικας) κατά τρόπο ώστε να αφήνουν άκρα με μονή έλικα συμπληρωματικά τα οποία μπορούν να κολλήσουν, διότι ακριβώς μπορούν να ενωθούν με άλλα άκρα μονής έλικας κάποιου άλλου DNA (διπλής έλικας), τα οποία θα είναι συμπληρωματικά σε αυτά. Στη συνέχεια τα άκρα αυτά ενώνονται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγγάση και δημιουργούν το ανασυνδυσμένο DNA.

3.16 DNA-RNA Λιγγάσες

Οι λιγγάσες διαιρούνται σε δυο τάξεις. Τις λιγγάσες των ευβακτηρίων, οι οποίες απαιτούν NAD + σαν ενεργό παράγοντα και τις λιγγάσες των ιών, αρχαιοβακτηρίων και ευκαρυωτικών κυττάρων, οι οποίες απαιτούν ATP. Οι DNA λιγγάσες της *Escherichia coli* απαιτούν DPN. Οι DNA λιγγάσες συνδέουν ένα 5' φωσφορικό άκρο με ένα 3' OH άκρο μονών ελίκων DNA, δηλαδή καταλύουν το σχηματισμό φωσφοδιεστέρα μεταξύ παρακείμενων άκρων διπλής έλικας DNA. Αυτό γίνεται στα φυσιολογικά κύτταρα για την αποκατάσταση των βλαβών του DNA πχ. ακτινοβολίας ή κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού του DNA. Οι ιοί διαθέτουν DNA λιγγάσες και RNA λιγγάσες. Οι DNA λιγγάσες των ιών είναι βασικά στοιχεία του αναδιπλασιασμού του DNA, του ανασυνδυασμού και της αποκατάστασης, οι RNA λιγγάσες κωδικοποιούνται από όλους τους ιούς των ευκαρυωτικών κυττάρων και λαμβάνουν μέρος στη σύνδεση και αποκατάσταση του RNA τους.

3.17 Ανασυνδυασμός του DNA

Η τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA υπήρξε μια επανάσταση το 1970. Με τη τεχνολογία του ανασυνδυσμένου DNA μπορούμε να εισάγουμε κλάσματα DNA πχ. γονίδια ενός οργανισμού σε DNA άλλου οργανισμού με αποτέλεσμα την παραγωγή οργανισμών με νέα χαρακτηριστικά. Με την τεχνολογία αυτή ασχολείται ο τομέας της γενετικής μηχανικής. Για να εισέλθει ένα κομμάτι DNA μέσα σε ένα κύτταρο χρειάζεται κάποιος φορέας. Αυτοί οι φορείς είναι οι βακτηριοφάγοι και τα πλασμίδια για τα βακτήρια ή οι ιοί για τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι βακτηριοφάγοι είναι οι ιοί των βακτηρίων ενώ τα πλασμίδια είναι μόρια κυκλικά διπλής έλικας DNA ανεξάρτητα αναδιπλασιαζόμενα, τα οποία ζουν μέσα στα βακτήρια και φέρουν γονίδια τα οποία καθιστούν τα βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά.

Οι ιοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται σαν φορείς γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι μη παθογόνοι ιοί, οι οποίοι μπορούν να ενσωματώνονται μαζί με το ξένο DNA, το οποίο φέρουν στα χρωμοσώματα των ευκαρυωτικών κυττάρων.

Το εισαχθέν τεμάχιο DNA ενός οργανισμού μέσα σε ένα βακτήριο αναπαράγεται μαζί με το βακτήριο και μπορεί να δώσει εκατομμύρια όμοια αντίγραφα. Η τεχνική αυτή ονομάζεται κλωνοποίηση του DNA και υπόσχεται επαναστατικά επιτεύγματα στη βιολογία, ιατρική, φαρμακολογία και γεωργία.

Με τα περιοριστικά ένζυμα τεμαχίζονται μόρια DNA σε ειδικά σημεία αφήνοντας το φυσικό διαχωρισμό των γονιδίων ή των κλασμάτων των γονιδίων. Όταν ένα DNA πλασμίδιο κοπεί με το ίδιο περιοριστικό ένζυμο που κόπηκε και το μόριο δότης DNA, τα κομμένα άκρα του πλασμιδίου και του DNA είναι συμπληρωματικά και μπορούν να ενωθούν με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης και της DNA λιγγάσης.

Τώρα πλέον, ένα καινούργιο γονίδιο ή γονίδια έχουν εισέλθει στο πλασμίδιο, οπότε μετά από επανεισαγωγή του μέσα σε ένα βακτήριο παράγεται ένα κύτταρο ικανό για απεριόριστη παραγωγή του κεκαθαμένου τεμαχίου DNA. Επειδή τα πλασμίδια καθιστούν ανθεκτικά στη τετρακυκλίνη τα βακτηριακά κύτταρα στα οποία θα εισέλθουν, τα κύτταρα που περιέχουν τα πλασμίδια και άρα τα νεοεισαχθέντα τεμάχια DNA μπορούν να επιλεγούν, αφού αναπτυχθούν σε υλικό το οποίο περιέχει τετρακυκλίνη.

Ένας άλλος τρόπος επιλογής των κυττάρων τα οποία περιέχουν το εισαχθέν γονίδιο, είναι η μέθοδος του υβριδισμού μέσω της χρήσης ραδιοσημασμένων ιχνηθετών μονόκλωνων DNA συμπληρωματικών με τα ζητούμενα και ελέγχου μέσω X-ακτινοβολίας.

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια με θραύσματα γενώματος ενός οργανισμού ονομάζονται βιβλιοθήκες γενωμάτων. ^[4]

3.18 Σύνθεση του DNA

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει διακριτικό όριο 0,3nm, άρα οι έλικες των νουκλεϊνικών οξέων με διάμετρο 2,0 nm είναι ευδιάκριτες. Σε κάθε σημείο σύνθεσης παράγονται ένα ή δυο ανοίγματα, άρα υπάρχουν πολλαπλές αρχές σύνθεσης του DNA. Αυτές οι πολλαπλές αρχές, είναι χαρακτηριστικές της σύνθεσης του DNA στο ευκαρυωτικό κύτταρο.

Ο τρόπος αναπαραγωγής του DNA διευκρινίστηκε το 1957 από τους Mathew Meselson και Franklin Stahl και είναι γνωστός σαν ημισυντηρητικός τρόπος.

Πρόκειται για σπάσιμο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ελίκων του DNA με αποτέλεσμα οι δυο έλικες να διαχωρίζονται. Η κάθε έλικα μπορεί να κάνει ζευγάρι με συμπληρωματικά νουκλεοτίδια με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δυο αλυσίδων DNA, εκ των οποίων η μια είναι αρχική ενώ η δεύτερη είναι η συμπληρωματική. Ο ημισυντηρητικός τρόπος αναπαραγωγής του DNA προτάθηκε από τους Crick και Watson αλλά αποδείχθηκε το 1957 από τους Mathew Meselson και Franklin Stahl με το μαρκάρισμα των πατρικών ελίκων DNA της *Escherichia coli* με δυο διαφορετικά ισότοπα αζώτου το ^{15}N (βαρύ) και το ^{14}N (ελαφρύ).

Το άνοιγμα των ελίκων γίνεται με τα ένζυμα DNA ελικάσες, οι οποίες προχωρούν κατά μήκος των ελίκων και τις ανοίγουν. Ειδικά πρωτεϊνικά μόρια αφού συνδεθούν με τις μονές έλικες σταθεροποιούν το άνοιγμα των ελίκων.

Η σύνθεση του DNA γίνεται και στις δυο έλικες με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Για να γίνει η έναρξη της σύνθεσης του DNA απαιτείται μια αρχή RNA μήκους περίπου 5 νουκλεοτιδίων, εφόσον η DNA πολυμεράση μπορεί να προσθέτει νουκλεοτίδια σε προϋπάρχον DNA. Η RNA αρχή κάνει ζευγάρι με τη μονή έλικα DNA στο σημείο έναρξης και τα νουκλεοτίδια προστίθενται στο $3'$ άκρο της RNA αρχής. Αργότερα η αρχή αποσυνδέεται και ο χώρος που κατελάμβανε γεμίζει με DNA.

Η αναπαραγωγή του DNA γίνεται σε ειδικά σημεία στο μόριο του DNA που καλούνται αρχές. Οι δυο έλικες αντιγράφονται ταυτόχρονα αλλά η οδηγούσα έλικα συντίθεται συνέχεια προς την διχάλα του ανοίγματος ($5' \rightarrow 3'$) ενώ η καθυστερούσα έλικα δημιουργείται σε μικρά κομμάτια σε διεύθυνση αντίθετη από τη διχάλα του ανοίγματος ($5' \rightarrow 3'$). Τα κομμάτια αυτά στη συνέχεια ενώνονται με το ένζυμο DNA λιγγάση.

Οι περισσότεροι ιοί έχουν μια αρχή. Τα μολυσμένα με ιούς κύτταρα περιέχουν ιϊκό και κυτταρικό DNA. Το ιϊκό DNA μπορεί να διακριθεί από το βραχύτερο μέγεθος και το ομοιόμορφο σχήμα του.

Η σύνθεση του DNA μπορεί να είναι μονής κατεύθυνσης ή διπλής κατεύθυνσης. Αυτό το συμπεραίνουμε από τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων με τα οποία μαρκάρουμε το DNA. Έτσι, αν η άκρη των ανοιγμάτων έχει ορισμένη απόσταση από το σημείο μαρκαρίσματος, τότε πρόκειται για σύνθεση μονής κατεύθυνσης, ενώ όταν τα κέντρα των ανοιγμάτων έχουν ορισμένη απόσταση από το σημείο μαρκαρίσματος, τότε πρόκειται για σύνθεση διπλής κατεύθυνσης. ^[6]

Υπάρχει και τρίτος τρόπος σύνθεσης, ο οποίος ονομάζεται αναπαραγωγή κυλιόμενου κύκλου. Ο τρόπος αυτός αναπαραγωγής ονομάζεται έτσι λόγω των

πολλαπλών κύκλων αντιγραφής γύρω από ένα κυκλικό αντίγραφο. Πρόκειται για μια σταθερού μεγέθους κυκλική περιοχή DNA, όπου η σύνθεση αρχίζει από ένα σημείο από το οποίο αναδύεται μια ουρά ποικίλου μήκους. Χαρακτηριστικά σημεία επάνω στον κύκλο αναπαράγονται επάνω στη γραμμική ουρά σε ίσες αποστάσεις από το σημείο που αναδύεται η ουρά.

Ειδικότερα στο γένωμα των ερπητοϊών αφού παραχθούν κυκλικά αντίγραφα κατόπιν ένωσης των άκρων του γραμμικού ερπητικού γενώματος, γίνεται μια τομή σε ένα ειδικό σημείο, ώστε παράγεται μια 3' OH ομάδα, η οποία δρα σαν αρχή για την αντιγραφή της άθικτης έλικας DNA. Από το 5' άκρο αρχίζει άλλη διακεκομμένη αναπαραγωγή του DNA από πολλαπλές RNA αρχές. Οι κύκλοι κατόπιν της συνεχούς σύνθεσης κυκλικών αντιγράφων DNA, ακολουθούνται από διακεκομμένη σύνθεση DNA και παράγουν γραμμικά DNA μόρια τα οποία περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα του γενώματος.

3.19 Νουκλεϊνικά οξέα των ιών

Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι πολυμερή τα οποία συνίστανται από νουκλεοτίδια τα οποία συνδέονται με δεσμούς φωσφοδιεστέρος. Από το σάκχαρο το οποίο υπάρχει στα νουκλεοτίδια διακρίνονται δυο τύποι, τα RNA εάν υπάρχει ριβόζη και τα DNA εάν υπάρχει δεοξυριβόζη. Επίσης υπάρχει διαφορά και στις βάσεις, το DNA περιέχει θυμίνη αντί ουρακίλης που περιέχει το RNA.

Το DNA όλων των οργανισμών συνίσταται από τα ίδια χημικά και φυσικά στοιχεία. Η διάταξη των DNA αλληλουχιών δίνει την πληροφορία για τη δημιουργία ενός ειδικού οργανισμού με τους ιδιαίτερους χαρακτήρες του. Το πλήρες DNA ενός οργανισμού ονομάζεται γένωμα. Το γένωμα διαφέρει σημαντικά σε μέγεθος.

Ειδικά το RNA αλλά και το DNA έχουν τροποποιημένες βάσεις. Μερικές από αυτές είναι ενδιάμεσα προϊόντα της φυσιολογικής σύνθεσης πουρινών και πυριμιδινών. Το DNA περιέχει A (Αδερίνη) και T (Θυμίνη) ή C (Κυτοσίνη) και G (Γουανίνη) αντίστοιχα σε ισοδύναμες ποσότητες. Η αναλογία A+T/C+G είναι ειδική για κάθε είδος. Οι Crick και Watson το 1953 βασιζόμενοι στην ανάλυση της δομής του DNA με ρέντγκεν ακτίνες δημιούργησαν το μοντέλο της δομής του DNA, βάσει του οποίου εξηγείται ο τρόπος αναπαραγωγής του χρησιμοποιώντας και τις δυο έλικες DNA σαν μήτρες. Βάσει αυτού του μοντέλου οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες περιστρέφονται μεταξύ τους σε αντίθετες κατευθύνσεις. Οι βάσεις πουρίνης και

πυριμιδίνης κατευθύνονται προς το εσωτερικό των ελίκων, ενώ τα φωσφορικά μόρια και τα σάκχαρα βρίσκονται προς το εξωτερικό μέρος.

Τα επίπεδα των βάσεων βρίσκονται σε ορθή γωνία προς τον άξονα των ελίκων. Η ακτίνα κάθε έλικας είναι 1,0 nm (κάθε πλήρης γύρος της έλικας έχει ύψος 3,4nm), ενώ η απόσταση μεταξύ των γειτονικών βάσεων είναι 0,34 nm. Οι δυο έλικες ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων πυριμιδίνης και πουρίνης. Η αδενίνη συνδέεται πάντα με τη θυμίνη με δυο δεσμούς υδρογόνου και η γουανίνη με την κυτοσίνη με τρεις δεσμούς υδρογόνου.

Τα νουκλεϊνικά οξέα των ιών είναι DNA ή RNA μονές ή διπλές έλικες, γραμμικές ή κυκλικές ή σε τεμάχια με θετική ή αρνητική πολικότητα. Το μέγεθος ποικίλει, για τους DNA ιούς από 5 kb (kilobases) ή kbp (kilobasepairs) των παρβοϊών, έως 130-280 kbp των ευλογιοϊών και για τους RNA ιούς από 7 kbp των πικορναϊών, έως 27 kbp των κοροναϊών.

Ένα γένωμα ιών 2 kb κωδικοποιεί 3 γονίδια ενώ ένα γένωμα 150 kb κωδικοποιεί περισσότερα από 100 γονίδια. Ο αριθμός των γονιδίων των ιών είναι 3-250 πολύ μικρότερος των μικρότερων βακτηρίων. ^[2]

3.20 RNA ιοί

Το RNA μόριο των πικορναϊών, τογκαϊών, κοροναϊών, είναι μονόκλωνο ssRNA γραμμικό και έχει θετική πολικότητα όπως το mRNA των θηλαστικών και δρα σαν αγγελιοφόρο mRNA. Οι ιοί με θετική πολικότητα RNA έχουν χαρακτηριστικά των mRNAs των θηλαστικών, δηλαδή στο άκρο 5' υπάρχει ένα μόριο κάλυψης το οποίο αποτελείται από ολιγονουκλεοτίδια, στα οποία οι βάσεις συνδέονται κατά τρόπο διαφορετικό από αυτόν των νουκλεϊνικών οξέων, ενώ στο άκρο 3' υπάρχει μια πολυαδενυλιωμένη αλληλουχία μήκους μέχρι 200 νουκλεοτιδίων. Η θετική πολικότητα των RNA ιών τους καθιστά ικανούς να μεταφράζονται αμέσως μετά την εισαγωγή τους στο κύτταρο.

Το RNA μόριο ορθομυξοϊών και παραμυξοϊών είναι μονόκλωνο ssRNA γραμμικό με αρνητική πολικότητα. Για να εκφρασθεί η πληροφόρηση αυτών των αρνητικών RNAs πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε θετικές έλικες.

Τα γενώματα μερικών ιών μπορεί να είναι σε τεμάχια όπως αυτό συμβαίνει με τους ρεοϊούς και με τον ιό της ινφλουέντζας. Αυτό έχει σαν συνέπεια τον γενετικό ανασυνδυασμό των τεμαχίων, όταν δυο διαφορετικά στελέχη του ίδιου ιού μολύνουν ένα κύτταρο.

Στους RNA ιούς ανήκουν οι :

1. Μυξοϊοί οι οποίοι χωρίζονται σε δυο οικογένειες, τους ορθομυξοϊούς και τους παραμυξοϊούς.
2. Πικορναϊοί
3. Τογκαϊοί
4. Φλαβϊοί
5. Μπουνναϊοί
6. Αρεναϊοί
7. Ρεοϊοί
8. Ραβδοϊοί
9. Κοροναϊοί
10. Καλκυοϊοί
11. Φιλοϊοί
12. Ρετροϊοί

3.21 DNA ιοί

Τα περισσότερα νουκλεϊνικά οξέα των ιών είναι γραμμικά όπως τα νουκλεϊνικά οξέα των ερπητοϊών,αδενοϊών και ευλογιοϊών.Οι ερπητοϊοί,αδενοϊοί και οι φάγοι T, P₁,P₂,P₂₂ έχουν γραμμικό ds DNA.Οι Ts φάγοι έχουν ds DNA αλλά η μια έλικα φέρει τομές.Το DNA των παποβαϊών είναι κυκλικό ds DNA με πολλές έλικες και υπάρχει στα ιϊκά σωματίδια υπό μορφή νουκλεοσωμάτων,τα οποία συνίστανται από 4 ιστόνες H3,H4, H2A και H2B γύρω από τις οποίες τυλίγεται το DNA.

Η κυκλικότητα του DNA το καθιστά ικανό να ενσωματωθεί στο γένωμα του κυττάρου του ξενιστή,κάτι που είναι προϋπόθεση για το μετασχηματισμό των κυττάρων.Ομοίως το DNA των αδενοϊών και των ερπητοϊών πριν να ενσωματωθεί στο γένωμα των κυττάρων του ξενιστή παίρνει την κυκλική μορφή.

Τα νουκλεϊνικά οξέα διάφορων ιών μπορεί να έχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα.Το DNA των ερπητοϊών και το RNA των ρετροϊών έχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μήκους περίπου 400 νουκλεοτιδίων.Σε άλλους ιούς όπως τους DNA αδενοϊούς,παρβοϊούς,ευλογιοϊούς και τους RNA ιούς ραβδοϊούς, αρεναϊούς οι τελικές αλληλουχίες είναι συμπληρωματικές του τύπου 5' GATCAT...ATGATC – 3' ονομάζονται αναστραμμένες τελικές επαναλήψεις και έχουν μήκος 20-150 νουκλεοτιδίων.Η ύπαρξη των τελικών αλληλουχιών έχει σχέση με τον τρόπο αναπαραγωγής και την έκφραση του γενώματος των ιών. ^[7]

Στους ευλογοϊούς τα ζεύγη των βάσεων στα άκρα του γενώματος ξεπερνούν τα 10.000 και μπορούν να ενωθούν στις άκρες σε κυκλικούς σχηματισμούς μονής έλικας DNA.Ο ιός Sindbis έχει αναστραμμένες τελικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.Πολλά νουκλεϊνικά οξέα ιών ενώνονται με πρωτεϊνικά μόρια.Το RNA των πικορναϊών ενώνεται στο 5' άκρο με ένα πρωτεϊνικό μόριο μήκους 22 αμινοξέων,το DNA των αδενοϊών ενώνεται στο 5' άκρο με πρωτεΐνη μοριακού βάρους 55.000, η μακρά θετική ss έλικα του RNA του ιού της ηπατίτιδας A ενώνεται με πρωτεΐνη στο 5' άκρο και η θετική έλικα DNA του ιού της ηπατίτιδας B ενώνεται στο 5' άκρο με την αντίστροφη τρανσκριπτάση.Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν σαν αρχές στον αναδιπλασιασμό των νουκλεϊνικών οξέων των ιών.

Μερικοί ιοί περιέχουν βοηθητικές πρωτεΐνες,ένζυμα και RNAs όπως πχ. οι ρετροϊοί περιέχουν tRNA αρχές οι οποίες προέρχονται από το κύτταρο του ξενιστή και αντίστροφη τρανσκριπτάση,οι ερπητοϊοί περιέχουν μια πρωτεΐνη με δράση μεταγραφικού παράγοντα,ενώ οι RNA ιοί με αρνητική έλικα περιέχουν RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση.

Τα γυμνά νουκλεϊνικά οξέα ποικίλων ιών ζώων όπως των πικορναϊών, τογκαϊών,φλαβιϊών,κοροναϊών,παρβοϊών,παποβαϊών,αδενοϊών και ερπητοϊών είναι λοιμογόνα διότι μπορούν να εκφραστούν μέσα στα κύτταρα,ενώ τα γυμνά νουκλεϊνικά οξέα άλλων ιών όπως των ορθομυξοϊών,παραμυξοϊών,ραβδοϊών, ρεοϊών, ευλογοϊών δεν είναι λοιμογόνα.

Τα γυμνά νουκλεϊκά οξέα καταστρέφονται γρήγορα από τις νουκλεάσες στο εξωκυττάριο υγρό και επίσης πολύ λίγο εισδύουν στα κύτταρα.Ο ρόλος του πρωτεϊνικού καψιδίου είναι σημαντικός στη λειτουργία της εισόδου των ιών στα κύτταρα.Όταν όμως τα γυμνά νουκλεϊνικά οξέα μπορούν να εισβάλλουν στα κύτταρα,τότε μπορούν να εισβάλλουν σε περισσότερα είδη κυττάρων από ότι μπορούν να εισβάλλουν οι πλήρεις ιοί.

Καμιά φορά ιοί όπως οι παποβαϊοί αντί να περιέχουν νουκλεϊνικό οξύ δικό τους,περιέχουν νουκλεϊνικό οξύ του κυττάρου που έχουν προσβάλλει σε περίπου το ίδιο μέγεθος με το δικό τους.Αυτοί οι ιοί ονομάζονται ψευδοβίρια.

3.22 Πρωτεΐνες των ιών

Οι δομικές πρωτεΐνες των ιών είναι οι πρωτεΐνες του καψιδίου,του ελύτρου ή οι πρωτεΐνες του πυρήνα και έχουν μέγεθος από 10.000-150.000 daltons.Άλλοι ιοί περιέχουν λίγα είδη πρωτεϊνών πχ. 3 είδη, ενώ άλλοι περιέχουν περισσότερα από 50

είδη.Οι πρωτεΐνες αναγνωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλθειικού νατρίου.Οι πρωτεΐνες έχουν σημανθεί με ³⁵S-methionine και έχουν παρατηρηθεί με αυτοραδιογραφία.

Οι γλυκοπρωτεΐνες βρίσκονται στις άκανθες και τις προσεκβολές των ελύτρων.Κυρίως πρόκειται για ολιγομερή πχ. οι άκανθες της αιμοσυγκολλητίνης του ιού της ινφλουέντζας είναι τριμερή ενώ οι άκανθες της νευραμινιδάσης του ίδιου ιού είναι τετραμερή.

Τα υδατανθρακικά μόρια των γλυκοπρωτεϊνών είναι ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από 10-15 μονοσακχαρίτες όπως γαλακτόζη,γαλακτοζαμίνη,γλυκόζη,γλυκοζαμίνη,φρουκτόζη,μαννόζη και σιαλικό οξύ.Η δομή των ολιγοσακχαριτών εξαρτάται από τη φύση των γλυκοσυλικών τρανσφερασών του κυττάρου και τη φύση των πρωτεϊνών που πρόκειται να γλυκοζυλιωθούν.

Οι αιμοσυγκολλητίνες είναι γλυκοπρωτεϊνικές άκανθες των ορθομυξοϊών και των παραμυξοϊών και έχουν την ικανότητα να συγκολλούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια αφού συγκολληθούν σε ορισμένους υποδοχείς αυτών.Επίσης και άλλοι ιοί ζώων με έλυτρο μπορούν να συγκολλούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια.Η ικανότητα αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ιών ή των αντισωμάτων αυτών.

3.23 Λιπίδια των ιών

Τα έλυτρα των ιών περιέχουν ουδέτερα λιπίδια,φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια.Η λιπιδιακή σύνθεση του ελύτρου των ιών εξαρτάται από τα διάφορα στελέχη και από τα κύτταρα στα οποία αναπτύσσονται χωρίς να αλλάζουν οι βιολογικές ιδιότητες αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΙ

Οι βακτηριοφάγοι είναι παράσιτα των βακτηρίων,προσβάλλουν βακτήρια από τα πολύ μικρά Bdellovibrios,τα οποία αποτελούν παράσιτα άλλων Gram (-) βακτηρίων μέχρι τις μπλε πράσινες άλγες.Οι βακτηριακές καλλιέργειες έχουν περίπου ισοδύναμα κύτταρα,τα οποία δεν διαφοροποιούνται,άρα οι αντιδράσεις βακτηριοφάγου-ξενιστή μπορούν και επαναλαμβάνονται κυκλικά.Η μελέτη των βακτηριοφάγων έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων.

Οι βακτηριοφάγοι είναι μικρότεροι από τα βακτήρια, υπάρχουν ή στο νερό της θάλασσας ή στο χόμα κατά εκατομμύρια και ξεπερνούν σε αριθμό όλα τα έμβια όντα στον πλανήτη συνολικά.

Οι βακτηριοφάγοι ανακαλύφθηκαν από τους Frederick Twort (1915) και Felix d' Herelle (1917). Από τον Felix d' Herelle δόθηκε το όνομα βακτηριοφάγοι δηλαδή ιοί οι οποίοι τρώνε τα βακτήρια. Ο ίδιος χρησιμοποίησε τους βακτηριοφάγους για τη θεραπεία νοσημάτων όπως της χολέρας και της βουβωνικής πανώλης. Από το 1930 και δεκαετίες μετά πρωτοπόροι ιολόγοι όπως οι Luria και Delbruck χρησιμοποίησαν τους βακτηριοφάγους σαν μοντέλα για τον έλεγχο της δομής των ιών, της γενετικής και αναπαραγωγής των ιών κτλ. Υπάρχουν βακτηριοφάγοι της βιομηχανίας, βακτηριοφάγοι της ιατρικής και βακτηριοφάγοι της γενετικής τεχνολογίας. Οι βακτηριοφάγοι των λακτοβακίλλων προκαλούν προβλήματα στη βιομηχανία των γαλακτοκομικών προϊόντων. Οι βακτηριοφάγοι των βακτηρίων (πχ. σταφυλοκόκκου) χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των βακτηρίων, ενώ οι βακτηριοφάγοι της γενετικής μηχανικής χρησιμοποιούνται σαν φορείς ανασυνδυασμένου DNA. ^[21]

4.1 Δομή των βακτηριοφάγων

Μερικοί μικροί βακτηριοφάγοι όπως οι φX174 και MS2 έχουν εικοσάεδρα καψίδια ενώ άλλοι νηματώδεις όπως οι φ1 έχουν ελικοειδή καψίδια.

Τα καψίδια είναι πολύ μικρά αποτελούμενα από 2-3 διαφορετικές πρωτεΐνες. Μερικοί βακτηριοφάγοι έχουν έλυτρο όπως ο φάγος PM2 ο οποίος προσβάλλει τη ψευδομονάδα. Οι μεγάλοι βακτηριοφάγοι έχουν πλέον σύνθετα καψίδια, τα οποία αποτελούνται από ένα κεφάλι, το οποίο περιέχει το γένωμα του φάγου και μια ουρά η οποία χρησιμεύει σαν όργανο προσκόλλησης στα βακτήρια και σαν σωλήνας μέσα από τον οποίο το DNA θα περάσει μέσα στα βακτήρια όταν οι φάγοι τα προσβάλλουν.

Το κεφάλι των φάγων είναι εικοσάεδρο καψίδιο ή επιμηκυσμένο. Το κεφάλι μπορεί να συνίσταται από περισσότερες από δέκα διαφορετικές πρωτεΐνες. Η ουρά των βακτηριοφάγων έχει τρία μορφολογικά πρότυπα. Στους βακτηριοφάγους T3 και T7 η ουρά είναι πολύ βραχεία και συνίσταται από λίγα πρωτεϊνικά είδη. Στους βακτηριοφάγους T1 και λ η ουρά είναι πολύ μακριά αλλά απλή στην σύσταση της. Η ουρά των λ βακτηριοφάγων αποτελείται από ένα ευέλικτο σωλήνα από 35 δίσκους, ενώ ινίδια εξέρχονται από την άκρη της ουράς, τα οποία συνίστανται από 3 κύριες πρωτεΐνες και 8 άλλες.

Στους βακτηριοφάγους T2,T4 και T6 οι οποίοι ονομάζονται και T-even (ζυγοί) φάγοι, οι ουρές τους αποτελούνται από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες και χρησιμεύουν σαν σωλήνες από τους οποίους το DNA περνάει για να εισέλθει στα βακτηριακά κύτταρα. Στην άκρη υπάρχουν ινίδια με τα οποία οι φάγοι προσκολλώνται στους ειδικούς υποδοχείς των βακτηριακών κυττάρων.

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από μεγάλους βακτηριοφάγους όπως τους T-even, είναι ένζυμα για την αποδόμηση του DNA του βακτηριακού κυττάρου, ένζυμα για τον αναδιπλασιασμό του DNA των βακτηριοφάγων, πρωτεΐνες για την έκφραση του γενόματος των βακτηριοφάγων, πρωτεΐνες για τη σύνθεση των σωματιδίων των βακτηριοφάγων, ένζυμα για την αποδόμηση του βακτηριακού κυττάρου και της βακτηριακής μεμβράνης. Οι T7 βακτηριοφάγοι είναι λιγότερο σύνθετοι και εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες των κυττάρων του ξενιστή.^[21]

Οι βακτηριοφάγοι περιέχουν DNA ή RNA ευθύγραμμο ή κυκλικό, μονής ή διπλής έλικας, το οποίο αποτελείται από ένα κομμάτι εκτός από το φάγο φ6 της ψευδομονάδας, ο οποίος αποτελείται από 3 διαφορετικά κομμάτια διπλής έλικας RNA. Οι μικροί βακτηριοφάγοι όπως οι φX174 και M13 έχουν μονή έλικα DNA ή κυκλική ή μονή έλικα RNA γραμμική θετικής πολικότητας όπως οι MS2 και Qb. Οι μεγαλύτεροι βακτηριοφάγοι περιέχουν απλή ή διπλή έλικα DNA. Μερικοί βακτηριοφάγοι όπως ο βακτηριοφάγος PM₂ περιέχουν κυκλικό γένωμα dsDNA, αλλά οι περισσότεροι περιέχουν γραμμικό διπλό dsDNA. Οι T4 βακτηριοφάγοι έχουν 100 διαφορετικά γονίδια σε ένα γραμμικό DNA. Το γένωμα των T7 φάγων έχει 39.936 νουκλεϊνικές βάσεις (nt), ενώ το γένωμα των λ φάγων έχει 48.504 νουκλεϊνικές βάσεις (nt). Τα γενόματα ορισμένων βακτηριοφάγων περιέχουν ασυνήθεις νουκλεϊνικές βάσεις.

Βακτηριοφάγοι οι οποίοι μολύνουν τα κύτταρα με διαφορετικά περιοριστικά συστήματα καταστρέφονται. Ορισμένοι όμως επιβιώνουν και οι απόγονοι τους θα έχουν αποκτήσει τις τροποποιήσεις των ξενιστών και άρα θα μπορούν να επιβιώνουν όταν επαναμολύνουν ίδια κύτταρα.

4.2 Προσκόλληση των Βακτηριοφάγων στα βακτηριακά κύτταρα

Οι βακτηριοφάγοι προσκολλώνται στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων. Για τους διάφορους υπάρχουν διάφοροι υποδοχείς.

Τα οργανίδια προσκόλλησης ποικίλουν στους διάφορους βακτηριοφάγους, όπως ο βακτηριοφάγος φX174 προσκολλάται μέσω ακανθών, οι οποίες βρίσκονται

στις κορυφές του εικοσάεδρου, οι νηματώδεις βακτηριοφάγοι όπως ο φ1 προσκολλώνται με το ένα άκρο τους. Οι βακτηριοφάγοι οι οποίοι έχουν ουρά όπως οι T4 φάγοι προσκολλώνται μέσω των ινιδίων που φέρουν στην ουρά τους.

Τα σημεία προσκόλλησης των βακτηριοφάγων στα βακτηριακά κύτταρα ποικίλουν. Τα σημεία προσκόλλησης είναι ο λιποπολυσακχαρίτης, η λιποπρωτεΐνη, άλλες πρωτεΐνες, τα μαστίγια και οι φίμπριες του φύλλου.

Οι T4 φάγοι προσκολλώνται στα βακτηριακά κύτταρα μέσω των ινιδίων της ουράς τους. Τα ινίδια συνδέονται ή σε ένα πολυσακχαρίτη ή σε μια πρωτεϊνική επιφάνεια ompC.

Οι βακτηριοφάγοι P1, T3, T4, T7 προσκολλώνται στον λιποπολυσακχαρίτη της E.coli. Η προσκόλληση γίνεται μέσω ενζυμικής προσβολής ορισμένων δεσμών στο μόριο του λιποπολυσακχαρίτη.

Τα μεταλλαγέντα στελέχη δεν προσκολλούν ένα δεδομένο βακτηριοφάγο, διότι οι υποδοχείς έχουν καλυφθεί από άλλες ουσίες του κυτταρικού ελύτρου, επίσης οι υποδοχείς μπορεί να λείπουν εάν οι μικροοργανισμοί αναπτυχθούν σε ορισμένες θερμοκρασίες. Οι υποδοχείς μπορεί να έχουν σχέση και με άλλες λειτουργίες των κυττάρων πχ. τη μεταφορά ιόντων σιδήρου.

Τα βακτήρια τα οποία είναι ικανά να προσκολλήσουν το ίδιο βακτηριοφάγο σχετίζονται αντιγονικά, για αυτό οι βακτηριοφάγοι χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση βακτηρίων πχ. σαλμονελλών και σταφυλοκόκκων. ^[16]

4.3 Είσοδος των Βακτηριοφάγων στα βακτηριακά κύτταρα

Dna φάγοι

Εάν τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να δεχθούν DNA, τότε το DNA των φάγων μπορεί να περάσει μέσα σε αυτά, αυτό μπορεί να γίνει φυσιολογικά σε ορισμένα στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης του B. Subtilis ή κατόπιν τροποποίησης τεχνητός της E.coli. Το πυρηνικό οξύ των βακτηριοφάγων εισέρχεται μέσα στο βακτήριο, ενώ το πρωτεϊνικό καψίδιο μένει εκτός του βακτηριακού κυττάρου. Μερικές ποσότητες ολιγοπεπτιδίων και πολυαμινών μπορεί να εισχωρήσουν μαζί με το γένωμα των βακτηριοφάγων.

Η αποβολή του πρωτεϊνικού καψιδίου των φάγων και η είσοδος του πυρηνικού τους οξέος μέσα στα κύτταρα έχει μελετηθεί περισσότερο στους T4 φάγους. Μετά την προσκόλληση των T4 φάγων στα βακτηριακά κύτταρα συμβαίνει συστολή του ελύτρου με αποτέλεσμα είσοδο της ουράς στο βακτήριο. Το DNA

κατόπιν κατανάλωσης ενέργειας και συστολών του ελύτρου της ουράς, μετακινείται μέσω του σωλήνα της ουράς και εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο. Σπανίως μια ειδική πρωτεΐνη ενίεται μέσα στο βακτήριο μαζί με το DNA του βακτηριοφάγου για να προφυλάξει τα άκρα του DNA από αποδόμηση.

RNA φάγοι

Όσον αφορά τους RNA φάγους έχει μελετηθεί η είσοδος και η αναπαραγωγή των βακτηριοφάγων με μονή έλικα ssRNA όπως είναι οι βακτηριοφάγοι MS2, f2, fr και Qβ. RNA βακτηριοφάγος με διπλή έλικα dsRNA είναι ο βακτηριοφάγος φ6, ο οποίος προσβάλλει την *Pseudomonas phaseolica*. Ο βακτηριοφάγος αυτός κατ' εξαίρεση φέρει λιπιδιακό έλυτρο.

Τα σημεία προσκόλλησης των βακτηριοφάγων αυτών βρίσκονται στις φίμπριες του φύλλου αρσενικού τύπου βακτηρίων. Το RNA το οποίο είναι θετικού τύπου, εισέρχεται στο κύτταρο από το 3' άκρο μαζί με την πρωτεΐνη A.

4.4 Αναπαραγωγή των Βακτηριοφάγων

Η είσοδος του γενώματος των βακτηριοφάγων σε ευαίσθητα κύτταρα μπορεί να δώσει λυτική αναπαραγωγική λοίμωξη ή λυσιγόνο λοίμωξη, αυτό εξαρτάται από τη φύση των βακτηριοφάγων, των βακτηρίων και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος όπως πχ. η θερμοκρασία.

Κατά τη λυσιγονία το γένωμα των βακτηριοφάγων αναπαράγεται και μεταφέρεται από γενεά σε γενεά χωρίς λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή τα λυσιγόνα βακτήρια είναι άνοσα στο γένωμα του βακτηριοφάγου που περιέχουν. Οι βακτηριοφάγοι οι οποίοι μπορούν να εγκαταστήσουν λυσιγονία ονομάζονται λυσιγόνοι ή μετριοπαθείς, ενώ αυτοί οι οποίοι προκαλούν λύση ονομάζονται λοιμογόνοι. Αλλά και οι μετριοπαθείς βακτηριοφάγοι μπορεί να κάνουν αναπαραγωγική λοίμωξη εάν μολύνουν ευαίσθητα κύτταρα.

4.5 Μορφογένεση των Βακτηριοφάγων

Η μορφογένεση των βακτηριοφάγων έχει ελεγχθεί στους βακτηριοφάγους T4, T7, λ και P22. Η μορφογένεση των βακτηριοφάγων έχει ευδιάκριτα μονοπάτια. Υπάρχουν τρία κύρια και ανεξάρτητα μονοπάτια που οδηγούν στο σχηματισμό κεφαλών, ουρών και ινιδίων. Κύτταρα βακτηριακά μολυσμένα με βακτηριοφάγους εκτός από ώριμους

βακτηριοφάγους περιέχουν προκεφαλές, κεφαλές, ουρές και ινίδια, τα οποία συντίθενται για τη δημιουργία των ωρίμων βακτηριοφάγων.

Για τη σύνθεση των βακτηριοφάγων υπάρχουν διάφορα συμπεράσματα. Ο βακτηριοφάγος P22 συνθέτει μια προκεφαλή μέσω πρωτεΐνης, η οποία μπορεί και συγκεντρώνει γύρω της τις δομικές πρωτεΐνες. Μόλις το DNA εισέλθει στην κεφαλή, η πρωτεΐνη αυτή εξέρχεται. Επίσης κατά τη μορφογένεση η πρόσθεση μιας πρωτεΐνης στην αυξανόμενη δομή διευκολύνει την πρόσθεση της επόμενης πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες οι οποίες λαμβάνουν μέρος στη μορφογένεση των βακτηριοφάγων προέρχονται από τεμαχισμό μεγαλύτερων πρωτεϊνών μέσω πρωτεολυτικών ενζύμων.

Η σύνθεση των ουρών έχει μελετηθεί στο βακτηριοφάγο λ. Μια πρωτεΐνη του γονιδίου H υπάρχει σε 6 αντίγραφα ανά ουρά και οδηγεί στη δημιουργία ουρών του αυτού μήκους. Ουρές στις οποίες δεν υπάρχει η πρωτεΐνη H γίνονται πολύ μακριές, ενώ γίνονται πιο βραχείες, όταν λείπουν ορισμένα αμινοξέα από την πρωτεΐνη αυτή.^[21]

4.6 Απελευθέρωση των Βακτηροφάγων

Οι βακτηριοφάγοι κυρίως αποβάλλονται με λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των απογόνων φάγων. Η λύση των κυττάρων στην περίπτωση των T-even βακτηριοφάγων οφείλεται σε δυο ένζυμα τα οποία κωδικοποιούνται όψιμα, τη λιπάση η οποία προσβάλλει τη κυτταρική μεμβράνη και τη λυσοζύμη, η οποία υδρολύει το βακτηριακό τοίχωμα. Οι νηματοειδείς βακτηριοφάγοι fl, fd και M13 δεν εξέρχονται με λύση του κυττάρου του ξενιστή αλλά μέσω προσεκβολών.

4.7 Λυσιγονία

Κατά τη λυσιγονία οι εισερχόμενοι βακτηριοφάγοι δεν αναπαράγονται ώστε να εξέλθουν μέσω λύσης του προσβεβλημένου κυττάρου αλλά συμβιών με το κύτταρο ή ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα του κυττάρου ή σαν ελεύθερα πλασμίδια όπως ο βακτηριοφάγος P1. Μόνο λίγα γονίδια εκφράζονται όπως οι καταστολείς της έκφρασης γονιδίων των βακτηριοφάγων, τα οποία έχουν σχέση με τη λυτική λοίμωξη.

Οι βακτηριοφάγοι σε αυτή τη κατάσταση ονομάζονται προφάγοι και αναπαράγονται συγχρόνως με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία φιλοξενούν τους προφάγους είναι φυσιολογικά με μόνο λίγες αλλαγμένες ιδιότητες και ονομάζονται λυσιγόνα, οι βακτηριοφάγοι οι οποίοι μπορούν να υπάρχουν σε αυτή την κατάσταση ονομάζονται λυσιγόνοι ή μετριοπαθείς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ

ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

5.1 Δομή και λειτουργία των κυττάρων των ζώων

Τα κύτταρα ενός πολυκυττάριου οργανισμού εξετάζόμενα με το φωτεινό μικροσκόπιο διαφέρουν πολύ ανάλογα με τον ιστό στον οποίο ανήκουν. Έν τούτοις, παρατηρώντας τα κύτταρα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ελέγχοντας τη χημική τους δομή συμπεραίνουμε ότι :

- α) το RNA, το DNA και οι πρωτεΐνες είναι όμοιες
- β) η σύσταση της πρωτοπλασματικής μεμβράνης είναι ίδια αποτελούμενη από πρωτεΐνες, συχνά γλυκοπρωτεΐνες, που τοποθετούνται μέσα σε μια διπλή στοιβάδα φωσφολιπιδίων
- γ) τα περισσότερα κύτταρα περιέχουν τα ίδια δομικά οργανίδια, όπως πυρήνα, πυρηνίσκο, μιτοχόνδρια, ριβοσώματα, σωμάτια Golgi, λυσοσώματα, μικροσωληνώδη στοιχεία, μικρονημάτια, μερικά από τα οποία μπορεί να προέχουν σε εξειδικευμένα κύτταρα.

Τα κύτταρα των ζώων είναι αρκετά μεγάλα. Έχουν βάρος της τάξης 1×10^{-6} έως και 5×10^{-8} mg. Τέτοια κύτταρα είναι του ήπατος, σπληνός, εντέρου, πνεύμονος, νεφρού, μυελού των οστών και συνεκτικού ιστού. Εξαιρέση αποτελούν οι μυϊκές ίνες και μερικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος που είναι πολύ μεγαλύτερα σε όγκο παρά άλλα κύτταρα του ζωϊκού σώματος. Το ξηρό βάρος ενός κυττάρου μιας E.coli είναι $2-4 \times 10^{-10}$ mg.

Το 60% του ξηρού βάρους του μέσου ζωϊκού κυττάρου είναι πρωτεΐνη, το 5-20% λιπίδια, το 10% είναι RNA και το 5% είναι DNA. Αποθηκευμένοι υδατάνθρακες υπό μορφή γλυκογόνου αποτελούν το 10% του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Όλο το DNA στους οργανισμούς δεν είναι αφιερωμένο στην κωδικοποίηση των πρωτεϊνών, αλλά οι περισσότερες μεταλλάξεις επιδρούν στη λειτουργία των πρωτεϊνών. Η πλειονότητα του DNA των ευκαρυωτικών κυττάρων φαίνεται ότι σχηματίζει σύμπλεγμα με πρωτεΐνες (ιστόνες), σε ένα σχηματισμό που ονομάζεται νουκλεόσωμα. Επίσης υπάρχει ένας ουσιαστικός αριθμός πρωτεϊνών, οι οποίες δεν είναι ιστόνες και έχουν σχέση με το DNA. Μέχρι σήμερα λίγα είναι γνωστά για τη λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών που έχουν σχέση με το DNA, αν και αναμφίβολα παίζουν ρόλους κλειδιά στην αντιγραφή και τον αναδιπλασιασμό του DNA. ^[9]

Μέσα στα κύτταρα υπάρχει δεξαμενή ελεύθερων μορίων και ιόντων. Τα μόρια αυτά είναι ελεύθερα από τα δομικά μακρομόρια του κυττάρου και αποτελούνται από διάφορες ουσίες, όπως αμινοξέα, ριβονουκλεοτίδια και δεοξυριβονουκλεοτίδια, βιταμίνες, συνένζυμα, προδρόμους λιπιδίων, ανόργανα ανιόντα και κατιόντα. Η γνώση της δυναμικής της δεξαμενής αυτής των μορίων κυρίως των αμινοξέων και νουκλεοτιδίων είναι βασική για την κατανόηση της αναπαραγωγής των ιών, διότι τα συστατικά των ιών κατασκευάζονται από τα διαλυτά συστατικά της δεξαμενής. Η δεξαμενή αμινοξέων αντιπροσωπεύει το 1/20 της ολικής περιεκτικότητας σε αμινοξέα του κυττάρου, τα οποία ανταλλάσσονται κάθε 1-2 min με τα αμινοξέα που υπάρχουν στο εξωκυττάριο υγρό.

Τα ριβονουκλεοτίδια και δεοξυριβονουκλεοτίδια επειδή φωσφορυλιώνονται μέσα στο κύτταρο, δεν μπορούν πάλι να ανταλλάγουν έξω από το κύτταρο.

5.1.1 Κυττοπλασματική μεμβράνη

Τα κύτταρα των ζώων δεν έχουν εξωτερικό στερεό τοίχωμα. Έχουν μόνο μια πλασματική μεμβράνη η οποία συγκρατεί και δέχεται ενδοκυττάρια μόρια, ενώ αποβάλλει άλλα και επίσης αποτελεί φραγμό στην είσοδο ξένων σωματιδίων όπως είναι οι ιοί.

Η επικρατούσα θεωρία για τη σύνθεση της κυττοπλασματικής μεμβράνης είναι ότι υπάρχουν δυο στιβάδες φωσφολιπιδίων και πρωτεΐνες διαφόρων σχημάτων οι οποίες τοποθετούνται μέσα και διάμεσα της μεμβράνης. Έτσι εξηγείται η εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης.

5.1.2 Φωσφολιπίδια

Χαρακτηριστικά τα φωσφολιπίδια έχουν δυο ευδιάκριτες περιοχές μια υδρόφοβη και μια υδρόφιλη. Οι υδρόφοβες ουρές είναι αλυσίδες λιπαρών οξέων που κατευθύνονται και συναντώνται προς το μέσον της μεμβράνης και δεν έρχονται σε επαφή με το νερό. Οι υδρόφιλες κεφαλές οι οποίες συνίστανται από γλυκερόλη, φωσφατιδική ομάδα και χολίνη κατευθύνονται προς τα έξω και έρχονται σε επαφή με το νερό που περιβάλλει το κύτταρο.

Οι διπλές στιβάδες φωσφολιπιδίων συμπεριφέρονται σαν υγροί κρύσταλλοι λόγω της διάταξης που έχουν, δηλαδή οι κεφαλές προς τα έξω και οι αλυσίδες προς τα μέσα. Οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων και οι πρωτεΐνες της μεμβράνης βρίσκονται σε συνεχή κίνηση.^[7]

5.1.3 Στερόλες

Οι μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε στερόλες, ειδικά η χοληστερόλη δρα σαν ρυθμιστικός παράγοντας της υγρής κατάστασης της μεμβράνης και σε χαμηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζει τη κρυσταλλοποίηση, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζει την υπέρμετρη κίνηση των αλυσίδων των λιπαρών οξέων και άρα την επικίνδυνα αυξημένη διαπερατότητα.

Κατά τη σύντηξη των μεμβρανών οι δυο στιβάδες των φωσfolιπιδίων συντήκονται και γίνονται συνεχόμενες. Με τον τρόπο αυτό στοιχεία από το εξωτερικό του κυττάρου εισέρχονται μέσα στο κύτταρο, ενώ στοιχεία από το εσωτερικό του κυττάρου μπορούν να εξέρχονται από το κύτταρο.

5.1.4 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες της μεμβράνης αποτελούν μωσαϊκό, ορισμένες εκτείνονται διαμέσου, της διπλής στιβάδας των φωσfolιπιδίων, άλλες υπάρχουν στην έσω ή έξω επιφάνεια της μεμβράνης και μόνο λίγο εισέρχονται στην διπλή στιβάδα των φωσfolιπιδίων, ενώ άλλες βρίσκονται μέσα στην υδρόφοβη περιοχή. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται ενσωματωμένες πρωτεΐνες, ενώ υπάρχουν και οι περιφερικές πρωτεΐνες, οι οποίες συνήθως συνδέονται με τις ενσωματωμένες πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος των μεμβρανών φέρουν υδατανθρακικές αλυσίδες, τις οποίες αποκτούν κατά την παραγωγή τους από το ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια διέρχονται από τη συσκευή Golgi και μέσω κυστιδίων μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου όπου και τοποθετούνται.

Οι πρωτεΐνες των μεμβρανών έχουν διάφορες λειτουργίες όπως την ένωση δυο παρακείμενων κυττάρων, τη μεταφορά μορίων, τη μεταφορά μηνυμάτων, τη μεταφορά μορίων μεταξύ δυο γειτονικών κυττάρων και τέλος υπάρχουν πρωτεΐνες με ενζυμική δράση.^[8]

5.1.5 Μεταφορά ατόμων ή μορίων

Η μεταφορά ατόμων ή μορίων δια των μεμβρανών γίνεται μέσω της διάχυσης. Η κίνηση των σωματιδίων αυτών μέσω της μεμβράνης γίνεται λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης αυτών στα δυο μέρη της μεμβράνης. Διάλυσις ονομάζεται η μεταφορά διαλυμένων ουσιών μέσω των μεμβρανών, ενώ όσμωση είναι η μεταφορά του διαλυτού π.χ. του νερού δια μέσω των μεμβρανών.

Μεγάλα πολικά μόρια όπως γλυκόζη και αμινοξέα δεν μπορούν να περάσουν από τις μεμβράνες με απλή διήθηση αλλά η μεταφορά τους στο εσωτερικό των κυττάρων γίνεται μέσω της διευκολυμένης διήθησης, οπότε ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς συνδέονται με τα μόρια αυτά και διευκολύνουν τη μεταφορά τους μέσω της μεμβράνης.

Η μεταφορά ιόντων K^+ μέσα στο κύτταρο και η έξοδος ιόντων Na^+ έξω από το κύτταρο γίνεται μέσω της αντλίας $Na - K$. Η αντλία λειτουργεί διά μιας ειδικής πρωτεΐνης στις μεμβράνες των ζώων, μέσω ενέργειας, η οποία παράγεται από τη διάσπαση του ATP σε ADP και P δια του ενζύμου ATPάση. Κάθε μόριο ATP που καταναλίσκεται, δύο ιόντα K^+ αντλούνται μέσα στο κύτταρο, ενώ τρία ιόντα Na^+ εξέρχονται έξω από το κύτταρο.

Μεγαλύτερα σωματίδια όπως μικροοργανισμοί, ερυθρά αιμοσφαίρια ή τροφή εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της ενδοκύττωσης και προϊόντα μεταβολισμού των κυττάρων εξέρχονται μέσω της εξωκύττωσης. Η ενδοκύττωση περιλαμβάνει τη φαγοκύττωση, την πινοκύττωση και την εκλεκτική ενδοκύττωση μέσω υποδοχέων.

5.1.6 Φαγοκύττωση – Πινοκύττωση

Κατά τη φαγοκύττωση τα κύτταρα εγκλωβίζουν στερεά σωματίδια όπως πχ. βακτήρια. Το κυστίδιο με την τροφή μέσα στο κύτταρο συντήκεται με τα λυσοσώματα και γίνεται η πέψη των τροφών. Κατά την πινοκύττωση τα κύτταρα εγκλωβίζουν διαλυμένο υλικό.

Η ενδοκύττωση μέσω ειδικών υποδοχέων είναι και ο τρόπος που διάφορα μόρια εισέρχονται στα κύτταρα όπως πχ. τα σωματίδια LDC τα οποία μεταφέρουν χοληστερόλη, εισέρχονται μέσω ειδικών υποδοχέων για την απελευθέρωση της χοληστερόλης μέσα στα κύτταρα.

5.1.7 Ειδικοί υποδοχείς

Οι ιοί εισέρχονται μέσα στα κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς είναι πρωτεϊνικής ή γλυκοπρωτεϊνικής φύσης και βρίσκονται στη πλασματική μεμβράνη. Τα φαγοκυτταρωθέντα μόρια εγκλείονται στα καλυμμένα κυστίδια. Διάφορα κυστίδια ενώνονται και σχηματίζουν τα ενδοσώματα τα οποία συντήκονται με τα λυσοσώματα.

5.1.8 Μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια 2-8 μm έχουν σχήμα νεφροειδές το οποίο μπορεί να αλλάξει τάχιστα. Επίσης μπορούν να διαιρούνται. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο. Τα ηπατικά κύτταρα περιέχουν 1000 μιτοχόνδρια. Μεταξύ της έσω και έξω μεμβράνης δημιουργείται το διαμεμβράνιο διάστημα, ενώ ο χώρος μέσα στην εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται μήτρα. Η εσωτερική μεμβράνη φέρει πολλές πτυχές και ένζυμα για την παραγωγή του ATP.

Τα μιτοχόνδρια είναι το κέντρο της μεταφοράς ενέργειας και της παραγωγής ATP, μέσω της μεταβολικής οξειδωσης και της φωσφορυλίωσης. Σε πολλές λοιμώξεις από ιούς παρατηρούνται ανώμαλα μιτοχόνδρια και η ελαττωμένη παραγωγή ATP μπορεί να είναι η αιτία της παύσης της ανάπτυξης, των ιών στα κύτταρα που πεθαίνουν. Η παρουσία διαφορετικού DNA στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες ενισχύει την θεωρία ότι πρόκειται για προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι εισέβαλαν σε μεγαλύτερα κύτταρα με τα οποία συμβίωσαν. ^[10]

5.1.9 Λυσοσώματα

Τα λυσοσώματα είναι πυκνά σωμάτια τα οποία περιέχουν υδρολυτικά ένζυμα. Εδώ δρα ένα σύστημα πέψης υλικού, το οποίο έχει φαγοκυτταρωθεί από τα κύτταρα. Τα ένζυμα των λυσοσωμάτων πέπτουν λίπη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα σε pH 5. Τα λυσοσώματα συντήκονται με τα φαγοκυτταρικά κυστίδια και πέπτουν το περιεχόμενο τους. Αυτοπεψία παρατηρείται σε κύτταρα τα οποία δεν έχουν επαρκή θρεπτικά υλικά. Επίσης, μετά το θάνατο των κυττάρων τα λυσοσώματα ελευθερώνουν τα πεπτικά τους ένζυμα μέσα στο κυττόπλασμα και προκαλούν ταχύτερη καταστροφή.

Οι ιοί οι οποίοι έχουν εισέλθει στα κύτταρα με φαγοκύτωση απελευθερώνονται κατόπιν λύσης του πρωτεϊνικού τους καλύμματος με τη δράση των λυσοσωμάτων.

5.1.10 Πυρήνας

Ο πυρήνας είναι πλέον προέχων οργανίδιο των κυττάρων σφαιρικός ή οβάλ διαμέτρου περίπου 5 μm . Ο πυρήνας είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των κυττάρων και την αναπαραγωγή. Ο πυρήνας περιβάλλεται από δυο πυρηνικές μεμβράνες. Κατά διαστήματα οι δυο μεμβράνες συντήκονται και σχηματίζουν τους

πυρηνικούς πόρους, μέσω των οποίων ο πυρήνας επικοινωνεί με το πρωτόπλασμα αφήνοντας την εκλεκτική διέλευση ορισμένων μορίων.

Ο πυρήνας περιέχει το DNA του κυττάρου το οποίο οργανώνεται στα χρωμοσώματα, τα οποία διαφέρουν σε αριθμό και μέγεθος στα διάφορα είδη. Υπάρχουν είδη ζώων τα οποία έχουν 46 χρωμοσώματα. Τα περισσότερα είδη ζώων έχουν 10-50 χρωμοσώματα. Όταν το κύτταρο δεν βρίσκεται σε διαδικασία διαίρεσης κάθε χρωμόσωμα περιέχει ένα γραμμικό διπλής έλικας μόριο DNA. Το DNA περιτυλίγεται γύρω από πρωτεΐνες οι οποίες καλούνται ιστόνες και σχηματίζουν τα νουκλεοσώματα. Περίπου 140 βάσεις(bp) DNA τυλίγονται γύρω από 8 πρωτεϊνικά μόρια. Άλλα μόρια ιστόνης συνδέονται με το DNA το οποίο συνδέει δυο νουκλεοσώματα. Οι ακάλυπτες 30-40 νουκλεϊνικές βάσεις(bp) είναι ευαίσθητες στη δράση των νουκλεασών. Το DNA το οποίο ενεργά υφίσταται αντιγραφή δεν προστατεύεται από ιστόνες. Τα νουκλεοσώματα σχηματίζουν μακρά κοκκιώδη νημάτια τις ίνες χρωματίνης, οι οποίες σχηματίζουν μεγάλες αγγύλες που συγκρατούνται μεταξύ τους με πρωτεΐνες, οι οποίες δεν είναι ιστόνες. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν ρόλο κλειδί στην αντιγραφή και στην αναπαραγωγή του DNA. ^[11]

Στα χρωμοσώματα οι αλληλουχίες των βάσεων επαναλαμβάνονται πολλές χιλιάδες φορές και πιθανόν ακόμα περισσότερο ή υπάρχει μια μέση τιμή επανάληψης των αλληλουχιών, όπως πολλές εκατοντάδες φορές. Το 50-70% του DNA έχει αλληλουχίες που δεν επαναλαμβάνονται.

Μέσα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων υπάρχει ο πυρηνίσκος. Ο πυρηνίσκος αποτελείται από δυο μέρη : α) το ινώδες μέρος και β) το κοκκιώδες μέρος το οποίο συνίσταται από σωματίδια ριβονουκλεοπρωτεΐνης (r-RNA και πρωτεΐνη). Το DNA του πυρηνίσκου συνίσταται από τα γονίδια για την παραγωγή των 5.8 S, 18S και 28S r-RNA. Τα γονίδια αυτά μεταγράφονται μαζί και σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα r-RNA 45S. Το γονίδιο για το 5S r-RNA μεταγράφεται χωριστά. Λόγω του ότι τα πολλαπλά αντίγραφα r-RNA μεταγράφονται συγχρόνως, σχηματίζεται μια διάταξη φτερού, στο οποίο το στέλεχος είναι το μεταγραφόμενο DNA ενώ οι πλευρικές έλικες είναι τα σχηματιζόμενα RNAs.

5.1.11 Μικροσώματα

Τα μικροσώματα είναι οργανίδια τα οποία περικλείονται σε μεμβράνη και περιέχουν διάφορα ένζυμα, τα οποία εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες. Ένας τύπος

μικροσωμάτων είναι τα περοξεισώματα τα οποία περιέχουν ένζυμα με τα οποία διασπών το υπεροξειδίο του υδρογόνου ή την αιθανόλη στα ηπατικά κύτταρα.

5.1.12 Ενδοπλασματικό δίκτυο

Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι σύμπλεγμα μεμβρανών με παράλληλη διάταξη, οι οποίες περιβάλλουν τον πυρήνα και επεκτείνονται στο κυττόπλασμα. Ανάμεσα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου σχηματίζονται χώροι οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους και ονομάζονται χώροι αποθήκευσης(δεξαμενές). Η εξωτερική μεμβράνη του πυρήνα είναι συνεχόμενη με τις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου.

Επάνω στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και στους ενδιάμεσους χώρους υπάρχουν ένζυμα, τα οποία καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις.

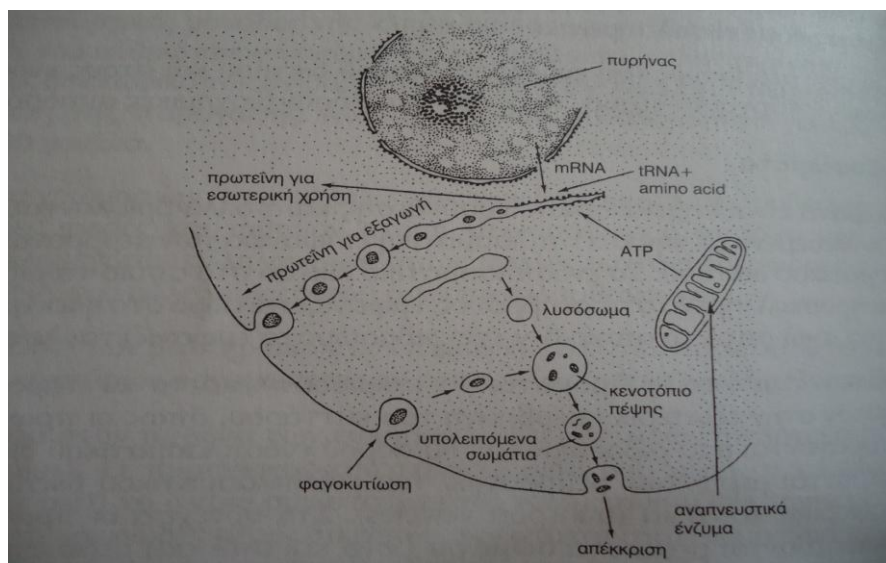
5.1.13 Ριβοσώματα

Τα ριβοσώματα είναι σημεία πρωτεϊνοσύνθεσης και πολλά βρίσκονται κατά καιρούς συνδεδεμένα με την κυττοπλασματική επιφάνεια των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου. Το ενδοπλασματικό δίκτυο στο οποίο τα ριβοσώματα είναι προσκολλημένα στις μεμβράνες, εμφανίζεται αδρό στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ αυτό το οποίο δεν έχει ριβοσώματα εμφανίζεται λείο.^[7]

Οι πρωτεΐνες οι οποίες πρόκειται να εκκριθούν από το κύτταρο ή να τοποθετηθούν στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, όπου οι πρωτεΐνες των ιών παράγονται στα ριβοσώματα του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου και μεταφέρονται μέσω των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου με μικρά μεταφορικά κυστίδια. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται μέσα στα σωμάτια Golgi και από εκεί μέσα από την κυττοπλασματική μεμβράνη απελευθερώνονται έξω από το κύτταρο.

Στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο γίνεται ο μεταβολισμός των φωσφολιπιδίων, στερολών και λιπαρών οξέων και είναι σημείο αποτοξίνωσης. Οι πρωτεΐνες οι οποίες πρόκειται να εκκριθούν ή να τοποθετηθούν στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων περιέχουν μια αλληλουχία αμινοξέων σήμα, η οποία αναγνωρίζεται από ορισμένα μόρια αναγνώρισης. Τα μόρια αυτά συνδέονται με τις αλληλουχίες σήματα και έτσι κατευθύνονται οι πρωτεΐνες μαζί με τα ριβοσώματα στα οποία παράγονται, στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο ενδοπλασματικό δίκτυο τα ριβοσώματα συνδέονται μέσω μιας πρωτεΐνης. Η σχηματιζόμενη πρωτεΐνη περνάει στο εσωτερικό του

ενδοπλασματικού δικτύου από όπου μέσω κυστιδίων μεταφέρεται στην κυττοπλασματική μεμβράνη όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 1 : Παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες πρόκειται να εκκριθούν ή να τοποθετηθούν στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων. [7]

5.1.14 Συσκευή Golgi

Η συσκευή Golgi περιγράφηκε πρώτη φορά το 1898 από τον Camillo Golgi και πρόκειται για αναδιπλούμενες μεμβράνες σε πλάκες, οι οποίες σχηματίζουν κυστίδια ή σάκκους. Άλλα ζωικά κύτταρα έχουν μια συσκευή Golgi και άλλα έχουν πολλές συσκευές Golgi.

Η συσκευή Golgi χρησιμεύει για την επεξεργασία και την τροποποίηση των πρωτεϊνών και κυρίως πρόκειται για γλυκοζυλίωση δηλαδή πρόσθεση υδατανθράκων στα πρωτεϊνικά μόρια μέσω ορισμένων βημάτων ή πρόσθεση λιπαρών οξέων στα πρωτεϊνικά μόρια.

Ο τρόπος της τροποποίησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών συνθημάτων που τις κατευθύνουν στο σωστό σημείο του κυττάρου.

5.1.15 Κυττοσκελετός

Μικρονήματα-Μικροσωλήνες

Ο κυττοσκελετός είναι ένα σύμπλεγμα νηματιών μέσα στο κύτταρο. Ο κυττοσκελετός είναι σε δυναμική ισορροπία και αλλάζει συνεχώς. Τα νημάτια χωρίζονται σε μικρονήματα ή νημάτια ακτίνας 4-7 nm διαμέτρου και μικροσωλήνες 25 nm διαμέτρου. Οι σχηματισμοί αυτοί παίζουν ρόλο στην κατασκευή των ιϊκών

σωματιδίων και σε μερικές περιπτώσεις είναι στόχοι της υϊκής καταστροφής των κυττάρων. Τα στοιχεία αυτά προέρχονται από μια σφαιρική πρωτεΐνη, ενώ τα ενδιάμεσα νημάτια προέρχονται από μια ινώδη πρωτεΐνη.

Τα κεντρομερίδια είναι δυο σωληνώδεις δομές στο κέντρο του κυττάρου, τα οποία αποτελούνται από μικροσωλήνες, οι οποίοι διατάσσονται ανά τρεις σε εννέα σχηματισμούς. Οι μικροσωλήνες αποτελούνται από μια πρωτεΐνη την tubulin MB 55.000. Κατά τη διαίρεση των κυττάρων ο κυττοσκελετός σπάζει και πολλοί μικροσωλήνες σχηματίζουν την άτρακτο, με οδηγό της οποίας διαχωρίζονται τα χρωμοσώματα. Τα οργανίδια κίνησης των κυττάρων τα μαστίγια και οι βλεφαρίδες περιέχουν μικροσωλήνες. Στα ζωικά κύτταρα παρατηρούμε μαστίγια στα σπερματικά κύτταρα και βλεφαρίδες στα κύτταρα της αναπνευστικής οδού. Η διάταξη των μικροσωλήνων στα μαστίγια και στις βλεφαρίδες είναι κυλινδρική με εννέα ζευγάρια μικροσωλήνων στην περιφέρεια και δυο μικροσωλήνες στο κέντρο. Η κίνηση δίδεται από πρωτεΐνες τις δυνεΐνες οι οποίες προσκολλώνται στους μικροσωλήνες.

Τα μικρονημάτια συνίσταται από την πρωτεΐνη ακτίνα, η οποία συνδέεται με την πρωτεΐνη μυοσίνη για να δημιουργήσει ίνες υπεύθυνες για την κίνηση των κυττάρων.

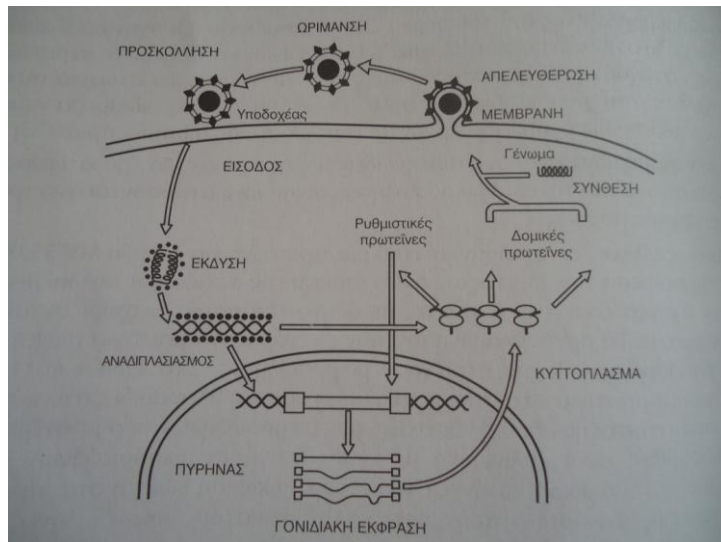
Οι ίνες stress είναι δέσμες ακτίνας, βρίσκονται στους ινοβλάστες κοντά στην κυττοπλασματική μεμβράνη και κάνουν τα κύτταρα να παίρνουν πεπλατυσμένο σχήμα. Οι μικρολάχνες είναι δακτυλιοειδείς προσεκβολές των κυττάρων συσταλτές, δηλαδή μπορούν να προσβάλλουν και να συστέλλονται λόγω της ακτίνας.

Τα ενδιάμεσα ινίδια είναι σκληρά πολυπεπτιδικά ινίδια και προέρχονται από μια ινώδη πρωτεΐνη. Τα ινίδια αυτά ενδυναμώνουν τον κυττοσκελετό και υπάρχουν κυρίως σε κύτταρα, τα οποία υφίστανται πίεση.

5.2 Αναπαραγωγή των ιών

Κάθε ιός ζώου μπορεί να αναπτυχθεί μόνο σε ορισμένους τύπους κυττάρων, τα οποία διαθέτουν τους ειδικούς υποδοχείς ή τους παράγοντες που απαιτούνται για την έκφραση των υϊκών γονιδίων.

Τα στάδια της αναπαραγωγής των ιών είναι η προσκόλληση, η είσοδος, η έκδυση (αποβολή του καψιδίου των ιών), η αναπαραγωγή του γενώματος των ιών, η ωρίμανση και η απελευθέρωση των ιών όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 2 : Τα στάδια της αναπαραγωγής των ιών [7]

Έχει μεγάλη σημασία η είσοδος στα κύτταρα των καψιδίων των ιών, διότι αυτό κάνει την αποτελεσματικότητα της λοίμωξης μεγαλύτερη. Εάν η έκφραση όλων των ιικών λειτουργιών παραμποδίζεται στα κύτταρα, τότε τα κύτταρα αυτά ονομάζονται ανθεκτικά. Όταν τα κύτταρα στα οποία μόνο ορισμένες δράσεις των ιών εκφράζονται, διότι λείπουν ορισμένοι παράγοντες από τα κύτταρα αυτά, ονομάζονται μη επιτρέποντα.

5.2.1. Προσκόλληση των ιών στα κύτταρα του ξενιστή

Για να διέλθουν οι ιοί στο κύτταρο του ξενιστή πρέπει πρώτα να προσκολληθούν στην επιφάνεια αυτών. Μέχρι το 1980 λίγα ήταν γνωστά για την προσκόλληση των ιών στα κύτταρα του ξενιστή, με την ανάπτυξη όμως των μονοκλωνικών αντισωμάτων και των μεθόδων του ανασυνδυασμού DNA κατέστη δυνατή η αναγνώριση αυτών των υποδοχέων και η μοριακή αντίδραση τους με τους ιούς.

Η αρχική επαφή κυττάρου-ιού στην αρχή είναι ασθενής, δηλαδή ο ιός μπορεί να αποσπασθεί από την επιφάνεια του κυττάρου, ενώ στη συνέχεια γίνεται πιο δυνατή. Αυτή η πιο σταθερή ένωση προσκολλάται σε πολλαπλά σημεία πιθανόν και σε σημεία μέσα στο υγρό μωσαϊκό της μεμβράνης. Όσο περισσότερα σημεία προσκολληθούν στην επιφάνεια των ιών τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα λοίμωξης.

Τα σημεία της επιφάνειας του ιού μπορεί να είναι προσεκβολές ειδικών πρωτεϊνών του ιού, όπως οι άκανθες των τογκαϊών, των μυξοϊών και παραμυξοϊών ή

πρωτεϊνικές προσεκβολές των αδενοϊών ή δομικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των ιών ή ένα μωσαϊκό διαφόρων πρωτεϊνών του καψιδίου των πικορναϊών.

Τα σημεία υποδοχής στα κύτταρα του ξενιστή είναι πιθανόν πρωτεΐνες της επιφάνειας συχνά γλυκοπρωτεΐνες. Διάφοροι ειδικοί υποδοχείς υπάρχουν στην επιφάνεια του κυττάρου για τους διάφορους ιούς.

Οι δυνάμεις που συγκρατούν τους ιούς επάνω στην επιφάνεια του κυττάρου είναι ηλεκτροστατικές, δηλαδή η ένωση κυττάρου-ιού εξαρτάται από τη δύναμη των ιόντων και το pH.

Η ταχύτητα δράσης του κυττάρου-ιού ποικίλει, είναι ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία αλλά είναι απ'ευθείας ανάλογη με τη συγκέντρωση των κυττάρων δηλαδή τη διαθέσιμη επιφάνεια στην οποία ο ιός μπορεί να προσκολληθεί. Η σταθερότητα σύνδεσης των ιών στα κύτταρα εξαρτάται από τη θερμοκρασία και απαιτεί πολυσθενή προσκόλληση των ιών στα κύτταρα δηλαδή προσκόλληση σε πολλούς υποδοχείς.

Μικρογραφίες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δείχνουν ότι αμέσως μετά την προσκόλληση, οι ιοί περιβάλλονται μερικώς από πλασματική μεμβράνη. Ο σχηματισμός αυτός πρέπει να είναι αποτέλεσμα προσκόλλησης των ιών σε ένα αριθμό πρωτεϊνικών μονάδων της πλασματικής μεμβράνης, κάνοντας έτσι τη μεμβράνη να διπλώνεται γύρω από τους ιούς. [22]

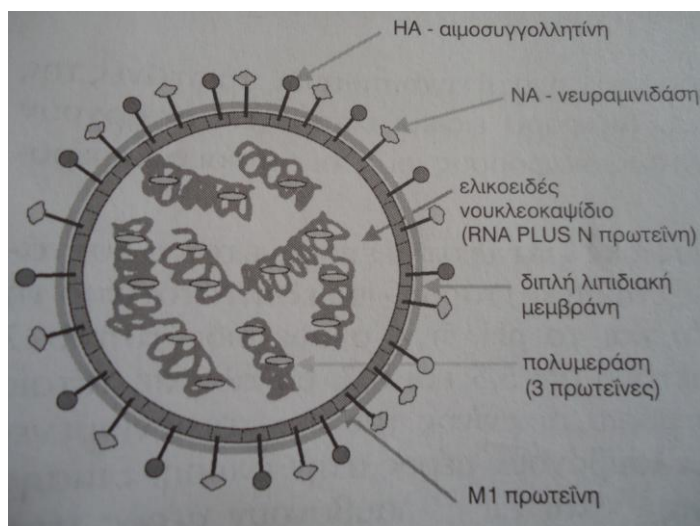
5.2.2 Συνέχεια προσκόλλησης των ιών

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρούμε στους ιούς των ζώων λεπτά νηματοειδή στοιχεία στην επιφάνεια, διαμέτρου περίπου 2 nm και μήκους από 10-30 nm. Αυτά τα στοιχεία ονομάζονται άκανθες και είναι τα οργανίδια με τα οποία οι ιοί κατά πρώτον προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων. Τέτοιοι ιοί που έχουν άκανθες είναι οι μυξοϊοί, οι παραμυξοϊοί, οι ραβδοϊοί. Οι ιοί αυτοί έχουν και έλυτρο.

Οι άκανθες συνίστανται στις περισσότερες περιπτώσεις από ένα ή δυο πολυπεπίδια εκ των οποίων το ένα ή και τα δυο είναι γλυκονυλιωμένα. Το μόριο του σακχάρου ποικίλει από ιό σε ιό και εξαρτάται επίσης και από το κύτταρο του ξενιστή στο οποίο παράγεται ο ιός.

Πολλοί ιοί ζώων έχουν την ικανότητα να συγκολλούν ερυθρά αιμοσφαίρια. Η ιδιότητα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό των ιών. Ο ιός Influenza έχει την ικανότητα να συγκολλά ποικιλία διαφόρων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αιμοσυγκόλληση οφείλεται σε μια από τις δυο πρωτεΐνες των

ακανθών και ειδικότερα στην ΗΑ αιμοσυγκολλητίνη. Οι άκανθες αυτές είναι πολλαπλές και οι ιοί σχηματίζουν πολλαπλές γέφυρες μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων τα οποία συγκολλώνται. Η νευραμινιδάση είναι ένα ένζυμο και παίζει κυρίως ρόλο στο τέλος του κύκλου ζωής του ιού αλλά και στη δίοδο των ιών Influenza από τα ρινικά εκκρίματα.



Εικόνα 3 : Οι επιφανειακές άκανθες του ιού Influenza A (Σχεδιαστικά).^[8]

Τα ρινικά εκκρίματα και τα εκκρίματα των αναπνευστικών οδών περιέχουν βλεννοπολυσακχαρίτες. Ο ιός για να περάσει μέσα από αυτά και να φθάσει στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων τα οποία θα προσβάλλει, χρησιμοποιεί την ενζυμική δράση της νευραμινιδάσης. Η νευραμινιδάση ή σιαλιδάση επίσης μετακινεί το σιαλικό οξύ από τα γλυκοσυζεύγματα και διευκολύνει την απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων από τις επιφάνειες των μολυσμένων κυττάρων κατά την έξοδο των ιών μέσω εκβλαστωμάτων.

Οι αδενοϊοί με εικοσάεδρη συμμετρία έχουν προσεκβολές που αποτελούνται από πρωτεΐνη, η οποία συνίσταται από 2-3 πολυμερισμένα πολυπεπίδια και μια τελική πρωτεΐνη. Τα ινίδια αυτά προσκολλώνται στα ευαίσθητα κύτταρα.

Οι ιοί οι οποίοι δεν έχουν άκανθες προσκολλώνται μέσω των δομικών στοιχείων της επιφάνειάς τους στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή. Όλα τα δομικά στοιχεία της επιφάνειας των ιών με εικοσάεδρη συμμετρία, θεωρούνται μέρος ενός μεγάλου πολυμερικού πρωτεϊνικού δικτύου. Σημεία σύνδεσης υπάρχουν στο πολυπεπτιδικό αυτό μωσαϊκό.

5.2.3. Είσοδος των ιών στα κύτταρα του ξενιστή

Ο μοριακός μηχανισμός εισόδου των ιών στα κύτταρα ποικίλει για τους διάφορους ιούς, ενώ η έναρξη αναπαραγωγής των ιών μέσα στα κύτταρα είναι η ίδια, δηλαδή η σύνθεση των πρωτεϊνών των ιών. Οι ιοί οι οποίοι έχουν έλυτρο και οι γυμνοί ιοί έχουν διάφορο τρόπο εισόδου στο κύτταρο. Το 1948 ήταν γνωστός ο μηχανισμός εισόδου μεγάλων πρωτεϊνών στο κύτταρο με τη φαγοκύττωση και υπέθεσαν ότι με ένα περίπου ίδιο τρόπο θα εισέρχονται οι διάφοροι ιοί στα κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός ονομάστηκε ιοπηξία.

5.2.4 Ιοπηξία

Με παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατήρησαν ότι συμβαίνει ενδοκύττωση κατευθυνόμενη από τους υποδοχείς των κυττάρων και έγκλειση των ιών στα ενδοσώματα. Η είσοδος αδενοϊών σε κύτταρα με ιοπηξία φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Στην ιοπηξία δεν παρατηρείται καμιά μορφολογική αλλαγή του ιού.

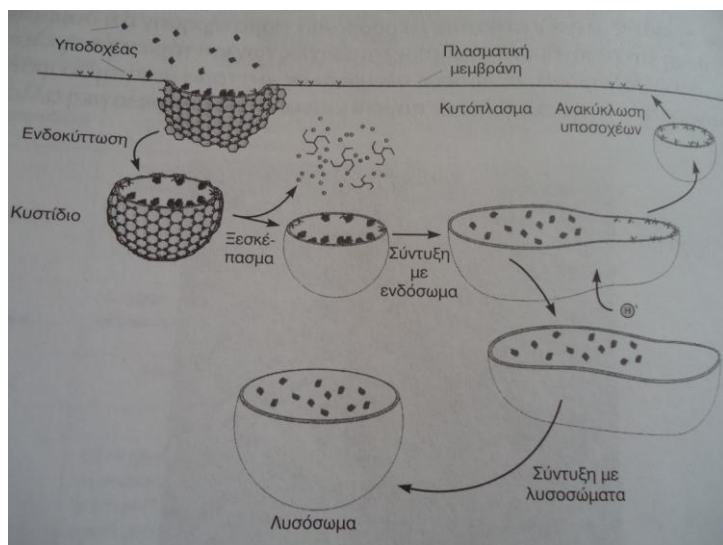


Εικόνα 4 : Είσοδος αδενοϊών σε κύτταρο με ιοπηξία. Παρατηρείται ένας ιός στην επιφάνεια του κυττάρου, ενώ ένας άλλος ιός σε κενοτόπιο μέσα στο κύτταρο. ^[7]

Ο τρόπος εισόδου των γυμνών ιών και των ιών με έλυτρο μέσα στα κύτταρα με ενδοκύττωση διαφέρει :

Οι γυμνοί ιοί, όπως οι αδενοϊοί αφού προσκολληθούν στους υποδοχείς βυθίζονται σε εκκολπώματα. Τα εκκολπώματα τελικά κλείνουν και σχηματίζουν κυστίδια μέσω των οποίων οι ιοί έρχονται στο κυττόπλασμα. Τα κυστίδια μεταφέρουν τους ιούς στα

πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία οξινίζονται με τη δράση της αντλίας H^+ μέσω της ΑΤΡάσης. Οι υποδοχείς ανακυκλώνονται ερχόμενοι στην επιφάνεια των κυττάρων μέσω μεταφορικών κυστιδίων. Το περιεχόμενο από τα πρώιμα ενδοσώματα έρχεται στα όψιμα ενδοσώματα μέσω των μικροσωλήνων. Τα όψιμα ενδοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα και οι ιοί εξέρχονται στο πρωτόπλασμα του κυττάρου μέσω λύσης των ενδοσωμάτων οπότε συμβαίνει και το ξεσκεπάσμα των ιών και η απελευθέρωση του πυρηνικού του οξέος.



Εικόνα 5 : Είσοδος και απελευθέρωση ιών μέσα στο κύτταρο με τη δράση των λυσοσωμάτων. ^[7]

Οι ιοί οι οποίοι έχουν έλυτρο όπως ο ιός Influenza εισέρχονται στα κύτταρα με ενδοκύτωση, η οποία ρυθμίζεται από τους υποδοχείς. Αφού οι ιοί εγκλειστούν μέσα στα κυτταρικά ενδοσώματα σε χαμηλό pH (λόγω της αντλίας H^+) συντήκονται με την μεμβράνη των ενδοσωμάτων μέσω της πρωτεΐνης σύντηξης που διαθέτουν και το νουκλεϊκό τους οξύ εξέρχεται στο πρωτόπλασμα. Το πυρηνικό οξύ των ιών μέσα στα ενδοσώματα προστατεύεται από τις νουκλεάσες μέσω των νουκλεοπρωτεϊνών που το περιβάλλουν.

5.2.5 Σύντηξη

Αργότερα διατυπώθηκε η θεωρία του μηχανισμού σύντηξης ή συνάντησης μεμβρανών των ιών οι οποίοι φέρουν έλυτρο με τα στοιχεία της μεμβράνης. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή υπάρχουν φυσικές αντιδράσεις μεταξύ των πλασματικών μεμβρανών και της επιφάνειας των ιών που επιφέρουν φυσικές αλλαγές στους ιούς

και στη μεμβράνη με αποτέλεσμα την είσοδο των ιών στα κύτταρα. Η σύντηξη γίνεται μέσω μιας βραχείας πρωτεϊνικής αλυσίδας σύντηξης η οποία διαθέτει υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία προκαλούν τη σύντηξη των λιπιδίων των ιών με τα λιπίδια της μεμβράνης του κυττάρου του ξενιστή.

5.2.6 Σχηματισμός πόρου στην κυτταρική μεμβράνη

Ένας τρίτος τρόπος εισόδου των ιών στα κύτταρα είναι η απευθείας διείσδυση των ιών αφού περάσουν την κυτταρική μεμβράνη μέσω σχηματισμού πόρου. Με τον τρόπο αυτό εισέρχονται οι ιοί χωρίς έλκτρο (γυμνοί), όπως είναι οι κοροναϊοί οι ιοί αυτοί προσκολλώνται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή και απελευθερώνουν το γένωμα τους, το οποίο διαπερνά την κυττοπλασματική μεμβράνη μέσω πόρου, ο οποίος έχει σχηματιστεί από αυτούς.

Αμέσως ή λίγο μετά την είσοδο των ιών στα κύτταρα και την πέψη του καψιδίου των ιών με πρωτεολυτικά ένζυμα κυττάρων, γίνεται η έκδυση δηλαδή η απελευθέρωση των νουκλεϊκών οξέων των ιών από το πρωτεϊνικό τους κάλυμμα. Η διάλυση αυτή των στοιχείων των ιών είναι απαραίτητο βήμα πριν από την αναπαραγωγή τους. Η φάση αυτή του κύκλου ανάπτυξης των ιών ονομάζεται περίοδος έκλειψης και διαρκεί μέχρι το σχηματισμό των πρώτων απογόνων ιών. Κατά τη διάρκεια της έκλειψης δεν μπορούν να παρατηρηθούν πλήρη ιϊκά σωματίδια μέσα στα κύτταρα.

Μερικοί ιοί απελευθερώνουν το γενετικό τους υλικό σχεδόν αμέσως μετά την είσοδο, ενώ άλλοι το μεταφέρουν στον πυρήνα του κυττάρου μέσω μιας πρωτεΐνης.

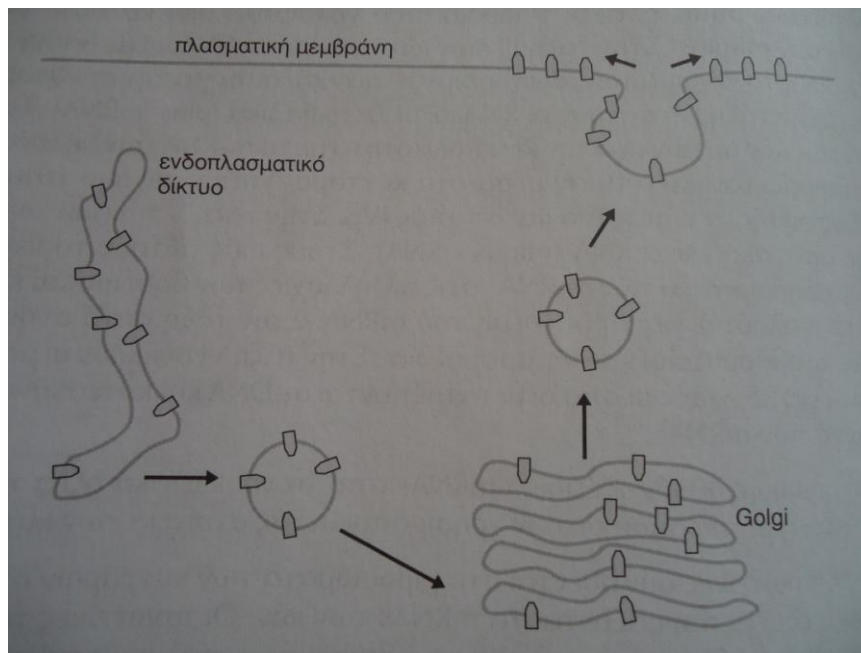
5.2.7 Παραγωγή πρωτεϊνών των ιών

Για τους ιούς των ζώων ο κύκλος αναπαραγωγής είναι από λίγα λεπτά μέχρι 5-6 ώρες ή ημέρες. Η σύνθεση των mRNAs και η πρωτεϊνοσύνθεση διαρκούν περίπου το ίδιο, ενώ η διαφορά χρόνου οφείλεται στη μορφογένεση, στο μέγεθος των ιών και την πολυπλοκότητα του γενώματος. Σε όλους τους ιούς ζώων DNA ή RNA γίνονται οι ίδιες διαδικασίες αναπαραγωγής τους δηλαδή : α) η αναστολή των κυτταρικών λειτουργιών, β) η μεταγραφή σε mRNA, γ) ο αναδιπλασιασμός του γενώματος των ιών, ο οποίος συνήθως αρχίζει λίγη ώρα μετά την μεταγραφή και συνεχίζεται λίγο μετά ή καθόλη τη διάρκεια του κύκλου αναπαραγωγής των ιών, δ) η μορφογένεση και η απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα. Οι οδοί μεταγραφής και αναδιπλασιασμού ονομάζεται ιϊκά γενετικά συστήματα.

Με βάση τη σχέση των mRNA ή DNA των ιών και των mRNAs διαχωρίζουμε 6 τάξεις ιών των ζώων. Στην τάξη I των ιών ανήκουν οι DNA ιοί, οι οποίοι έχουν διπλή έλικα, όπως πχ. ο ιός Vaccinia, το γένωμα του ιού χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση των mRNAs. Στην τάξη II των ιών ανήκουν οι DNA ιοί με μονή έλικα, όπως είναι οι παρβοϊοί που χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση των mRNAs. Στην τάξη III των ιών ανήκουν οι RNA ιοί με διπλή έλικα RNA (ρεοϊοί) το γένωμα των ιών χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση των mRNAs. Στην τάξη IV ανήκουν οι RNA ιοί με θετική έλικα. Το RNA γένωμα των ιών αυτών έχει την ίδια πολικότητα με το mRNA των θηλαστικών και μεταφράζεται κατευθείαν μέσα στο κύτταρο. Υπάρχουν δυο τύποι ιών της τάξης αυτής, ο τύπος IVα και IVβ. Στην τάξη V των ιών ανήκουν οι ιοί με αρνητική έλικα RNA. Στους ιούς αυτούς το ιϊκό RNA είναι συμπληρωματικό των m-RNAs στις αλληλουχίες των βάσεων και είναι το πρότυπο καλούπι για τη σύνθεση του mRNA. Στην τάξη αυτή ανήκουν οι ραβδοϊοί, ορθομυξοϊοί και οι παραμυξοϊοί. Στην τάξη VI ανήκουν οι ρετροϊοί. Πρόκειται για RNA ιούς οι οποίοι μετατρέπονται σε DNA και κατευθύνουν την παραγωγή των mRNAs. ^[22]

Αφού δημιουργηθούν τα ειδικά mRNAs από τα νουκλεϊκά οξέα των ιών, τότε αρχίζει η μετάφραση αυτών χρησιμοποιώντας στοιχεία των κυττάρων.

Οι ιϊκές πρωτεΐνες συντίθενται στα ριβοσώματα των κυττάρων στο πρωτόπλασμα. Εδώ μεταφράζονται τα mRNAs των ιών. Οι πρωτεΐνες του καψιδίου των ιών συντίθενται στα ελεύθερα ριβοσώματα ενώ οι πρωτεΐνες του ελύτρου συντίθενται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, οι πρωτεΐνες αυτές αφού γλυκοζυλιωθούν (πρόσθεση ενός υδατάνθρακος) μέσω κυστιδίων μεταφέρονται στην μεμβράνη των κυττάρων όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 6 : Η δημιουργία των πρωτεϊνών της μεμβράνης των ιόν στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου και η μεταφορά τους μέσω κυστιδίων. ^[7]

Εκτός από τις δομικές πρωτεΐνες των ιόν, σχηματίζονται και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες επηρεάζουν τη μεταγραφή του γενώματος και τη μετάφραση των mRNAs. Επίσης επικαλυπτόμενα γονίδια μπορεί να δώσουν δυο διαφορετικές πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς σκελετούς ανάγνωσης ή χρησιμοποιώντας τον ίδιο σκελετό ανάγνωσης μέσω δυο διαφορετικών mRNAs τα οποία σχηματίζονται από διαφορετικά σημεία έναρξης.

Όπως παρατηρήθηκε στους αδενοϊούς, οι αλληλουχίες των mRNAs που κωδικοποιούν μια δεδομένη πρωτεΐνη, προέρχονται από ξεχωριστές αλληλουχίες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους. Το μήνυμα διαβάζεται πάντα χρησιμοποιώντας την αρχή AUG. Μέσω αυτών των τρόπων αποδίδονται περισσότερες πρωτεΐνες από μικρά γενώματα.

Εάν υπάρχουν μεταλλάξεις παρεμβολής ή εξάλειψης μιας βάσης τότε παρατηρείται απόκλιση του σκελετού ανάγνωσης και η παραγόμενη πρωτεΐνη έχει διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων από την αρχική. Επίσης εάν λόγω μεταλλάξεων έχει δημιουργηθεί ένα κωδικόνιο λήξης τότε η πρωτεΐνη η οποία δημιουργείται είναι μικρότερου μεγέθους. Οι μυξοϊοί υφίστανται συχνές μεταλλάξεις με αποτέλεσμα την απόδοση διαφορετικών πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες των ιών όταν παραγχθούν αναδιπλώνονται για να πάρουν την ενεργό μορφή τους μέσα στο πρωτόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο αμινοξύ μετακινείται, αφού η αλυσίδα είναι ακόμη συνδεδεμένη με το ριβόσωμα.

Οι πρωτεΐνες των ιών εκτός από γλυκοζυλίωση υφίστανται και άλλες τροποποιήσεις όπως πρόσθεση φωσφορικών, θειϊκών ή ακυλικών ομάδων.

Μερικοί ιοί έχουν πολυμεράσες όπως οι ερπητοϊοί και οι ευλογοϊοί οι οποίοι είναι μεγαλύτεροι ιοί και άρα πλέον ανεξάρτητοι μέσα στο κύτταρο και πλέον εύαλωτοι στην αντιϊκή θεραπεία.

Το ιϊκό DNA κυρίως αναπαράγεται στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ το ιϊκό RNA γενικά αναπαράγεται στο πρωτόπλασμα των κυττάρων.

5.2.8 Μορφογένεση και απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα

Τα γενώματα των ιών και οι πρωτεΐνες των καψιδίων συνθέτουν τους προιούς. Εικοσάεδρα καψίδια μπορούν να σχηματιστούν χωρίς την παρουσία νουκλεϊκού οξέος ενώ δεν συμβαίνει αυτό σε καψίδια με ελικοειδή συμμετρία RNA ιών.

Η ωρίμανση των ιών γίνεται κυρίως στην περιοχή του αναδιπλασιασμού του πυρηνικού οξέος των ιών. Άλλοι ιοί όπως οι ευλογοϊοί συντίθενται στο πρωτόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή, ενώ οι ερπητοϊοί και οι αδenoϊοί συντίθενται στον πυρήνα.

Η απελευθέρωση των ιών από τα κύτταρα γίνεται ή μέσω λύσης των κυττάρων ή μέσω δημιουργίας εκβλαστωμάτων των κυττάρων.

Ο τρόπος απελευθέρωσης των γυμνών ιών εξαρτάται από τον τύπο των ιών και τον τύπο των κυττάρων. Οι RNA γυμνοί ιοί αφού ωριμάσουν απελευθερώνονται ταχέως από το κύτταρο. Αντίθετα οι DNA γυμνοί ιοί με εικοσάεδρη συμμετρία οι οποίοι ωριμάζουν στον πυρήνα των κυττάρων του ξενιστή παραμένουν στα μολυσμένα κύτταρα για μακρές περιόδους και συναθροίζονται σε έγκλειστα σωματίδια στο σημείο ωρίμανσης. Οι ιοί αυτοί εξέρχονται από τα κύτταρα κατόπιν αυτόλυσης των κυττάρων ή χωρίς λύση των κυττάρων.

Λύση και θάνατος των κυττάρων προκαλείται από τις βλαβερές επιδράσεις της αναπαραγωγής των ιών και τις κυτταπαθολογικές αλλοιώσεις που αναπτύσσονται.

Οι ιοί που φέρουν έλυτρο, έχουν ένα αντιγονικό μωσαϊκό στο έλυτρο τους χαρακτηριστικό των ιών και των κυττάρων του ξενιστή και εξέρχονται μέσω εκβλαστωμάτων από τα κύτταρα από τροποποιημένα μέρη της μεμβράνης, στα οποία έχουν ενσωματωθεί πρωτεΐνες του ελύτρου των ιών. Τα εκβλαστώματα δεν γίνονται

μόνο από την πλασματική μεμβράνη αλλά και από άλλες μεμβράνες των κυττάρων. Τα εκβλαστώματα αποκόπτονται από το κύτταρο και δημιουργούνται νέοι ιοί. Στην περίπτωση που οι ιοί εξέρχονται μέσω εκβλαστωμάτων, αφενός μεν τα κύτταρα δεν λύνονται, αφετέρου δε οι ιοί δεν συγκεντρώνονται μέσα στα κύτταρα τόσο όσο να σχηματίζονται εμφανή έγκλειστα σωματίδια.

Οι ερπητοϊοί μπορούν να εξαπλώνονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω πόρων των κυττάρων ή μέσω σύντηξης των μεμβρανών των κυττάρων.

Οι ευλογιοϊοί είναι σύνθετοι ιοί και ωριμάζουν σχηματίζοντας δυο μεμβράνες γύρω από τον πυρήνα(DNA), η εσωτερική περιέχει τον χαρακτηριστικό πυρήνα ενώ η εξωτερική αποτελεί την επιφάνεια των ιών. Οι ιοί αυτοί σχηματίζουν κυττοπλασματικά σωματίδια και εξέρχονται από τα κύτταρα με λύση των κυττάρων. ^[17]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΙΪΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Ταχείες και ευαίσθητες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τον έλεγχο των ιών. Η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έχει φέρει επανάσταση στην εργαστηριακή διάγνωση των ιών. Επίσης η εμπορική διάθεση έτοιμων αντιδραστηρίων έχει διευκολύνει πολύ το εργαστήριο.

Η εργαστηριακή διάγνωση βασίζεται είτε στον έλεγχο των ιών είτε στον έλεγχο των αντιγόνων ή των αντισωμάτων.

Υπάρχουν τρία συστήματα για την ανάπτυξη των ιών, οι κυτταροκαλλιέργειες, τα εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και τα θηλάζοντα ποντίκια. Από αυτές τις μεθόδους η πλέον ευαίσθητη και εφαρμοζόμενη ευκολότερα είναι οι κυτταροκαλλιέργειες.

Ο έλεγχος των αντισωμάτων είναι η πλέον εφαρμοσμένη μέθοδος σε εργαστήρια. Η μέθοδος ELISA για τον έλεγχο των αντισωμάτων έχει σχεδόν εκτοπίσει άλλες παλαιότερες τεχνικές όπως την αναστολή αιμοσυγκόλλησης, τη σύνδεση του συμπληρώματος, ακόμη και τον ανοσοφθορισμό.

Νεότερες μέθοδοι μοριακής βιολογίας έχουν προστεθεί όπως ο υβριδισμός και η PCR. Οι μέθοδοι αυτές έχουν υψηλή ευαισθησία και αυξανόμενη εφαρμογή, ειδικά ο υβριδισμός έχει ήδη γίνει μέθοδος ρουτίνας.

6.1 Ορισμός κυτταροκαλλιέργειας

Κυτταροκαλλιέργεια είναι η διατήρηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων in vitro, τα οποία δεν είναι οργανωμένα πλέον σε ιστούς. Για την παρασκευή

κυτταροκαλλιιεργειών αφαιρείται ο ιστός ή όργανο από έμβρυο πειραματόζωου, τεμαχίζεται κάτω από αυστηρά άσηπτες συνθήκες και αποδιοργανώνεται σε απλά κύτταρα με τη βοήθεια πρωτεολυτικού ενζύμου. Στη συνέχεια τα κύτταρα τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και επωάζονται στους 37°C, 5% CO₂ για να αναπτυχθούν.

6.2 Είδη κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές διακρίνονται σε πρωτογενείς, διπλοειδείς και συνεχείς. Πρωτογενής κυτταρική σειρά είναι η απευθείας πρώτη καλλιέργεια κυττάρων, που προέρχονται από τον ιστό ενός οργανισμού, όπως είναι η καλλιέργεια νεφρών πιθήκου, νεφρών κουνελιού κτλ. Η πρωτογενής καλλιέργεια περιέχει περισσότερα του ενός είδη κυττάρων, όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα ινοβλαστών, νευρικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κ.ά. και έτσι παρουσιάζει ευρύ φάσμα ευαισθησίας σε πολλές ομάδες ιών, δηλαδή επιτρέπει την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών ομάδων ιών.

Μετά από ανακαλλιέργεια αυτών των κυττάρων επικρατεί ένα είδος κυττάρων, συνήθως ινοβλάστες ή επιθηλιακά κύτταρα, που ονομάζονται διπλοειδής κυτταρική σειρά. Αυτά διατηρούν αναλλοίωτο τον αριθμό των χρωμοσωμάτων τους και μπορούν να ανακαλλιεργηθούν μέχρι 50 φορές. Στη συνέχεια αρχίζουν να μεγαλώνουν αργά, παρουσιάζουν αλλοιώσεις και τελικά πεθαίνουν. Ορισμένα κύτταρα της διπλοειδούς σειράς στα οποία έγιναν αλλαγές στον χρωμοσωμικό τους μηχανισμό, συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται δίνοντας έτσι γένεση σε συνεχή κυτταρική σειρά.

Οι συνεχείς κυτταρικές σειρές προέρχονται από ιστούς νεοπλασιών ή από διπλοειδείς σειρές, τα κύτταρα των οποίων παρουσιάζουν αλλαγές στον καρυότυπό τους, είναι δηλαδή πολυπλοειδικά. Τα κύτταρα των σειρών αυτών έχουν απεριόριστες ικανότητες για ανακαλλιέργεια και όταν ενεθούν σε πειραματόζωα προκαλούν τη δημιουργία όγκων. ^[2]

Κάποιες φορές είναι δυνατό να συγχωνεύσουμε μια διπλοειδή κυτταρική σειρά με μια συνεχή κυτταρική σειρά, δημιουργώντας υβριδώματα. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων : Τα Β λεμφοκύτταρα που απομονώνονται με το αίμα ενός ανοσοποιημένου ζώου συγχωνεύονται με κύτταρα όγκων και καλλιεργούνται μέσα σε ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό στο οποίο επιβιώνουν μόνο μικτογενή κύτταρα.

6.3 Καλλιέργεια κυττάρων

Όταν τα κύτταρα απομονώνονται από τον οργανισμό και καλλιεργούνται, το θρεπτικό υλικό πρέπει να παρέχει όλες τις ουσίες και τους παράγοντες αύξησης στους οποίους έχει εκτεθεί το κύτταρο *in vivo*, μόνο τότε θα είναι σε θέση να επιζήσει, να πολλαπλασιαστεί και να διαφοροποιηθεί. Το θρεπτικό υλικό περιέχει αμινοξέα, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, αντιβιοτικά, γλυκόζη και 5-10% ορό. Ο ορός είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο μίγμα πολλών μικρών και μεγάλων βιομορίων με διαφορετικές ιδιότητες :

Μερικά είδη κυττάρων αναπτύσσονται ελεύθερα σε εναιώρημα θρεπτικού υλικού, ενώ άλλα αφού πρώτα προσκολληθούν σε κατάλληλο στερεό υπόστρωμα. Μετά την προσκόλληση τους συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μέχρι να καλυφθεί όλος ο πυθμένας του δοχείου από μια ομοιόμορφη κυτταρική μονοστοιβάδα.

Μετά το σχηματισμό της κυτταρικής μονοστοιβάδας γίνεται ανακαλλιέργεια, όπου τα κύτταρα αρχικά πρέπει να αποκολληθούν από τον πυθμένα και να διαχωριστούν από τους μεταξύ τους δεσμούς, ώστε να αρχίσει ξανά ο πολλαπλασιασμός τους. Η αποκόλληση αυτή επιτυγχάνεται με τη βοήθεια πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως η θρυψίνη. Η δράση του ενζύμου είναι μέγιστη στους 37°C και μέσα σε 10 λεπτά τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πυθμένα του δοχείου, γίνονται σφαιρικά και διαχωρίζονται.

Τέλος, προστίθεται καινούργιο θρεπτικό υλικό, ομογενοποιεί και το κυτταρικό εναιώρημα και μοιράζεται σε νέες φλάσκες. Σε μικρό χρονικό διάστημα τα κύτταρα καθιζάνουν και αρχίζουν να διαιρούνται μέχρι να σχηματίσουν τη νέα κυτταρική μονοστοιβάδα.

Τα κύτταρα κατά την ανάπτυξη τους *in vitro* διατηρούν όλες τις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες και έχουν την ίδια συμπεριφορά κατά τον πολλαπλασιασμό τους, όπως όλοι οι μονοκύτταροι οργανισμοί. Δηλαδή η καμπύλη ανάπτυξης τους ακολουθεί 4 στάδια ή φάσεις :

1. Φάση προσαρμογής ή λανθάνουσα
2. Φάση λογαριθμική
3. Φάση στασιμότητας
4. Φάση θανάτου

6.4 Μεθοδολογία

Όταν τα κύτταρα αφαιρούνται από τον οργανισμό και καλλιεργούνται, το θρεπτικό υλικό πρέπει να παρέχει όλες τις ουσίες και τους παράγοντες αύξησης στους οποίους έχει εκτεθεί το κύτταρο *in vivo*, μόνο τότε θα είναι σε θέση να επιζήσει, να πολλαπλασιαστεί και να διαφοροποιηθεί. Το θρεπτικό υλικό περιέχει αμινοξέα, βιταμίνες, ανόργανα άλατα, αντιβιοτικά, γλυκόζη και 5-10% ορός. Ο ορός είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο μίγμα πολλών μικρών και μεγάλων βιομορίων με διαφορετικές ιδιότητες :

1. ορμονικοί παράγοντες που υποκινούν την αύξηση και τη λειτουργία των κυττάρων
2. παράγοντες σύνδεσης και
3. πρωτεΐνες για τη μεταφορά ορμονών, λιπιδίων κλπ.

Τα συστατικά του ορού συμβάλλουν στο σχηματισμό της κυτταρικής μονοστοιβάδας. Αυτή αναπτύσσεται στον πυθμένα του δοχείου ή της φιάλης, όπου κολλάνε τα κύτταρα και αρχίζουν οι μιτωτικές διαιρέσεις. Οι κυτταρικές διαιρέσεις συνεχίζονται μέχρι να καλυφθεί όλος ο πυθμένας του δοχείου από μια ομοιόμορφη κυτταρική μονοστοιβάδα. ^[5]

6.5 Συντήρηση και ψύξη κυττάρων

Τα κύτταρα μπορεί να παρουσιάσουν αστάθεια και αλλαγές στην μορφολογία, λειτουργία και ανάπτυξη τους μετά από πολλές ανακαλλιέργειες. Ευτυχώς, κύτταρα τα οποία ψύχονται και αποθηκεύονται σωστά μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς να αλλάξουν βασικά χαρακτηριστικά τους. Για να επιβιώσουν τη διαδικασία ψύξης και απόψυξης, στα κύτταρα προστίθεται μια ειδική κρυοπροστατευτική ουσία, η οποία καθιστά την κυτταρική μεμβράνη διαπερατή και αναστέλλει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό των κυττάρων.

6.5.1 Πρωτόκολλο ψύξης κυττάρων

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα και πρωτεόλυση με την προσθήκη θρυψίνης
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού και φυγοκέντρωση στους 4°C

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και προσθήκη υλικού ψύξης. Υλικό ψύξης :80% IMDM, 10% ορός, 10% DMSO
- Μοίρασμα σε ειδικά σωληνάρια ψύξης και μεταφορά στους -70°C για 18 ώρες.
- Τελική μεταφορά σε υγρό άζωτο

6.5.2 Πρωτόκολλο απόψυξης κυττάρων

- Μεταφορά κυττάρων από τη δεξαμενή υγρού αζώτου σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 37°C και παραμονή τους για 2 λεπτά.
- Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο φυγοκέντρησης falcon το οποίο περιέχει 20ml θρεπτικού υλικού.
- Φυγοκέντρηση στα 1500rpm για 6 λεπτά.
- Απόρριψη υπερκείμενου και ανασύσταση κυττάρων σε 10ml θρεπτικού υλικού.
- Παραμονή των κυττάρων στο θάλαμο νηματικής ροής για 10 λεπτά.
- Καταμέτρηση κυττάρων

6.6 Καταμέτρηση κυττάρων

Σε πολλά εργαστήρια, γίνεται καταμέτρηση κυττάρων πριν από κάθε ανακαλλιέργεια. Τα κύτταρα στην συνέχεια τοποθετούνται στα δοχεία κυτταροκαλλιέργειας σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, με στόχο την μεγιστοποίηση του ρυθμού ανάπτυξης τους.

Για να καθοριστεί η συγκέντρωση των κυττάρων και ο αριθμός ζωντανών κυττάρων, χρησιμοποιείται η τεχνική αποκλεισμού χρωστικής ουσίας. Τα ζωντανά κύτταρα θα αποκλείσουν τη χρωστική και θα φαίνονται φωτεινά κατά την μικροσκοπική εξέταση, ενώ τα νεκρά κύτταρα θα απορροφήσουν την χρωστική και θα χρωματιστούν μπλε.

Η καταμέτρηση των κυττάρων γίνεται σε ειδική πλάκα, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml.

6.6.1 Πρωτόκολλο καταμέτρησης κυττάρων

Αφαιρέστε ένα μικρό δείγμα (50ml) των κυττάρων από τις καλλιέργειες. Τοποθετήστε το δείγμα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα (δεν χρειάζεται να είναι αποστειρωμένος).

Προσθέστε 50ml χρωστικής (tryphan blue) (διάλυση 1 προς 2) και αναμίξτε καλά. Τοποθετήστε μια καλυπτρίδα επάνω στην πλάκα Neubauer και μεταφέρεται ένα μικρό ποσό του διαλύματος κυττάρων-χρωστικής. Τοποθετήστε την πλάκα στο μικροσκόπιο (10x ή 40x μεγέθυνση).

Μετρήστε όλα τα κύτταρα (τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται μπλε ενώ τα ζωντανά παραμένουν αδιαφανή) στα 8 ανώτερα τετράγωνα της περιοχής A και 8 χαμηλότερα τετράγωνα της περιοχής C. Κρατήστε μια χωριστή αρίθμηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων. Λιγότερο από το 25% των κυττάρων πρέπει να είναι νεκρά. Τα κύτταρα μπορούν να καταψυχθούν εάν περισσότερα από 75% των κυττάρων είναι ζωντανά.

Η συγκέντρωση των κυττάρων υπολογίζεται ως εξής :

$$\text{Αριθμός κυττάρων} \times 10,000 \times 2 = \text{κύτταρα ανά ml}$$

6.7 Επίβλεψη κυτταροκαλλιιεργειών

Η γενική υγεία των κυτταροκαλλιιεργειών πρέπει να αξιολογείται σε καθημερινή βάση και πριν εκτελεστεί οποιοδήποτε είδος χειρισμού. Αυτό μπορεί να γίνει γρήγορα και ποιοτικά κάνοντας τις ακόλουθες παρατηρήσεις :

1. Ελέγξτε το pH του θρεπτικού υλικού εξετάζοντας το χρώμα του. Όσο πιο όξινο γίνεται το θρεπτικό υλικό το χρώμα του αλλάζει από κόκκινο σε πορτοκαλί και τέλος σε κίτρινο. Σε περίπτωση που αλλάζει μόλυνση με βακτήρια ή μύκητες, το θρεπτικό υλικό θα γίνει αρκετά κίτρινο και θαμπό, λόγω της συσσώρευσης όξινων μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων αποβλήτων. Όταν το θρεπτικό υλικό γίνει πιο αλκαλικό, το χρώμα του αλλάζει από κόκκινο σε ένα βαθύ πορφυρο-κόκκινο. Αυτό συνήθως υποδηλώνει κάποιο πρόβλημα με τη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα. Γενικότερα, τα κύτταρα μπορούν να ανεχθούν την ελαφριά οξύτητα καλύτερα από ότι μετατοπίσεις στο pH πάνω από 7,5.
2. Η εμφάνιση των κυττάρων είναι επίσης ένας σημαντικός οδηγός. Τα κύτταρα πρέπει να έχουν ομαλές άκρες. Κύτταρα που περιέχουν πολλές κύστες στα όρια τους είναι συνήθως μη υγιή.

6.8 Εξοπλισμός εργαστηρίου κυτταροκαλλιιεργειών

1.Θάλαμος νηματικής ροής

Υπάρχουν δυο τύποι θαλάμου νηματικής ροής : Κάθετος και οριζόντιος. Και οι δυο χρησιμοποιούν φίλτρο HEPA (High efficiency particle) το οποίο απομακρύνει τα σωματίδια από τον εισερχόμενο αέρα. Ο κάθετος θάλαμος είναι ιδανικός για την επεξεργασία επικίνδυνων οργανισμών διότι τα αερολύματα που παράγονται φιλτράρονται πριν απελευθερωθούν στο περιβάλλον. Στον οριζόντιο θάλαμο ο αέρας κατευθύνεται προς τον χειριστή, και ως εκ τούτου παρέχει την καλύτερη προστασία για τις κυτταροκαλλιέργειες.

Οι θάλαμοι είναι εξοπλισμένοι με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV light), η οποία χρησιμοποιείται για μερικά λεπτά με στόχο την αποστείρωση των επιφανειών του θαλάμου. [1]



Εικόνα 7 : Θάλαμος νηματικής ροής [27]

2. Επωστήρας CO₂

Τα κύτταρα χρειάζονται CO₂ σε ποσοστό 5-10% για να αναπτυχθούν, διότι το θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας περιέχει διατανθρακικό άλας νατρίου/ανθρακικό οξύ και πρέπει να έχει σταθερό pH. Τα κύτταρα πρέπει να παραμένουν έξω από τον επωστήρα ως το δυνατό λιγότερο.



Εικόνα 8 : Επωαστήρας CO₂ [28]

3. Μικροσκόπιο

Η παρατήρηση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου, ενώ η καταμέτρηση τους με απλό μικροσκόπιο.



Εικόνα 9 : Μικροσκόπιο [29]

4.Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας

Τα κύτταρα χρειάζονται μια μη τοξική, βιολογικά αδρανή και οπτικά διαφανή επιφάνεια για να αναπτυχθούν. Τα καταλληλότερα δοχεία είναι φτιαγμένα από πολυστηρένιο, κατασκευάζονται σε διάφορα μεγέθη και είναι αποστειρωμένα.



Εικόνα 10 : Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας [30]

5. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι μια ταχεία μέθοδος για τον έλεγχο των ιών είτε σε κλινικά δείγματα είτε σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά χρησιμοποιείται όλο και λιγότερο για διαγνωστικούς σκοπούς σήμερα. Λόγω του ότι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι πολύ ακριβό δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρά εργαστήρια. Επίσης για να είναι δυνατή η ανεύρεση των ιών θα πρέπει η συγκέντρωσή τους να είναι αρκετά υψηλή 10^6 - 10^7 /ml. Όταν οι ιοί είναι μικρού μεγέθους όπως οι πικορναϊοί και οι παρβοϊοί, τότε απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Η μέθοδος της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας χρησιμοποιήθηκε κατά το παρελθόν σε περιπτώσεις που δεν υπήρχαν κατάλληλες μέθοδοι καλλιέργειας ή ανοσοδιάγνωσης, υβριδισμού ή PCR.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων αντί για δέσμη φωτός και μαγνήτες αντί φακών. Τα ηλεκτρόνια διαπερνούν το δείγμα όπως ακριβώς το φως στο φωτεινό συμβατικό μικροσκόπιο. Επειδή το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων είναι πολύ πιο μικρό από αυτό του φωτός, η διακριτική ικανότητα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι πολύ πιο μεγάλη αυτής του φωτεινού μικροσκοπίου. Μεγεθύνσεις 350.000 φορές μπορεί να επιτευχθούν για πολλά στοιχεία. Οι μεγεθύνσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που παρατηρούνται οι ιοί κυμαίνονται από $\times 55.000$ έως και $\times 300.000$. [1]



Εικόνα 11 : Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ^[31]

TEM (Transmission electron microscope)

Η ενέργεια των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (TEM) καθορίζει το σχετικό βαθμό διείσδυσης των ηλεκτρονίων στο δείγμα. Ηλεκτρονικά μικροσκόπια TEM 400 kV δίνουν τη μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και επιτρέπουν την παρατήρηση σχετικά παχέων δειγμάτων. Τα συμβατικά TEM ηλεκτρονικά μικροσκόπια ισχύος 100kV ή 200kV. Τα δείγματα για TEM πρέπει να παρασκευάζονται σε τομές ορισμένου πάχους ώστε να επιτρέπουν στα ηλεκτρόνια να διαπερνούν μέσω αυτών. ^[23]

SEM (scanning electron microscope)

Το σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM), είναι ικανό να δίνει εικόνες υψηλής διακριτικής ικανότητας της επιφάνειας των δειγμάτων. Οι εικόνες έχουν τρισδιάστατη εμφάνιση και προσφέρονται για τη μελέτη της επιφάνειας των δειγμάτων. Το σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποτελείται από μια πηγή ηλεκτρονίων από βολφράμιο.

Η δέσμη των πρωτογενών ηλεκτρονίων εστιάζεται από ένα ή δυο συμπακνωτικούς φακούς σε πολύ μικρό εστιακό σημείο 1-5nm και μέσω ενός αντικειμενικού φακού πέφτουν στην επιφάνεια του δείγματος. Όπως τα ηλεκτρόνια χτυπούν στην επιφάνεια διασκορπίζονται από τα άτομα της επιφάνειας του δείγματος δημιουργώντας έναν όγκο αντίδρασης έκτασης λιγότερο από 100nm και βάθους 5μm, με αποτέλεσμα την εκπομπή ηλεκτρονίων, τα οποία δημιουργούν την εικόνα. Τα δευτερογενή αυτά ηλεκτρόνια είναι χαμηλής ενέργειας <50eV και ελέγχονται με μια συσκευή φωτοπολλαπλασιαστή. Το τελικό μήνυμα μπορεί να γίνει ορατό και να αποθηκευτεί σαν ψηφιακή εικόνα.

Όσο μεγαλύτερη είναι η γωνία πρόσπτωσης των πρωτογενών ηλεκτρονίων τόσο περισσότερα δευτερογενή ηλεκτρόνια εκπέπονται. Άρα οι άγριες επιφάνειες και τα άκρα είναι πιο λαμπερά και έχουν καλύτερη τρισδιάστατη εμφάνιση. Η επεξεργασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου το σκανάρισμα των πλεγμάτων τελειώσει και μετά επαναλαμβάνεται μέχρι 30 φορές ανά sec.

Η διακριτική εικόνα των σαρωτικών ηλεκτρονικών μικροσκοπίων είναι 1nm-20nm. Τα δείγματα για επεξεργασία τίθενται σε μεταλλικά πλέγματα και στη συνέχεια μπαίνουν σε ειδικό κώδωνα όπου εξαερώνεται άνθρακας ή χρυσός ο οποίος και επικάθεται στο δείγμα. ^[19]



Εικόνα 12 : Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ^[32]

IEM (immune electron microscopy)

Για τον έλεγχο των ιών σε υγρά κλινικά δείγματα, χρησιμοποιείται κυρίως η ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία κατά την οποία αφού οι ιοί αναμειχθούν με ειδικό αντιγόνο λαμβάνεται το ίζημα κατόπιν υπερφυγοκέντρωσης και παρατηρείται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα κλινικά δείγματα, εκχυλίσματα κοπράνων ή υγρό φυσαλίδων κ.ά. τοποθετούνται επάνω σε μικρά χάλκινα πλέγματα διαμέτρου περίπου 2mm τα οποία είναι καλυμμένα με film άνθρακα ή πλαστικού και άνθρακα. Στην συνέχεια ξηραίνονται στον αέρα και ακολουθεί η αρνητική χρώση με φωσφοροβολφραμικό οξύ.

ISEM (immunosorbent electron microscopy)

Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία χρησιμοποιείται επίσης και η μέθοδος της ανοσοπροσρόφησης. Η μέθοδος μοιάζει με την DAS ELISA, η διαφορά είναι ότι αντί για πλάκες μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιούμε τα παραπάνω αναφερόμενα πλέγματα.

6.9 Χρώσεις ιών

6.9.1. Αρνητική χρώση

Η μέθοδος της αρνητικής χρώσης στηρίζεται στην προσρόφηση μορίων της χρωστικής (που περιέχουν βαρύ μέταλλο) μέσα σε κοιλότητες αλλά και γύρω από τη δομή. Έτσι η πραγματική δομή σκιαγραφείται μετά τη σκέδαση των ηλεκτρονίων από το βαρύ μέταλλο και κατά συνέπεια η εικόνα είναι αρνητική.

Διαδικασία

Τοποθετούμε μια σταγόνα του υλικού στο πλέγμα με το πλαστικό (ή και με τον άνθρακα) και αφήνουμε 1-5' για να γίνει προσρόφηση των μορίων. Ξεπλένουμε και συγχρόνως χρωματίζουμε ρίχνοντας 2-5 σταγόνες χρωστικής (συνήθως 2% υδατικού οξεικού ουρανυλίου). Μετά ακουμπάμε στο πλάι το πλέγμα σε διηθητικό χαρτί ώστε να φύγει η χρωστική. Μόλις στεγνώσει, το πλέγμα είναι έτοιμο για παρατήρηση.

Η επιτυχία της χρώσης εξαρτάται πολύ από τη δυνατότητα των πλεγμάτων για προσρόφηση. Έτσι η επιφάνεια του πλαστικού πρέπει να είναι υδρόφιλη. Αυτό επιτυγχάνεται είτε έχοντας τα πλέγματα στο ψυγείο (οπότε μετά την έξοδο τους

γίνονται υδρόφιλα λόγω συμπύκνωσης υδρατμών) είτε δημιουργώντας “εκκένωση αίγλης” σε συσκευή εξάχνωσης. Κατά κανόνα τα φιλμς με κολλόδιο είναι πολύ πιο υδρόφιλα από το formvar(θερμοπλαστικές ρητίνες) ή και όταν υπάρχει στρώμα άνθρακα επάνω είτε στο κολλόδιο είτε στο formvar. Η διακριτικότητα της μεθόδου είναι 25 Å δηλαδή περιορίζεται από την κρυστάλλωση των ατόμων της χρωστικής.^[25]

6.9.2 Διάλυμα οξικού ουρανυλίου

Η πιο διαδεδομένη “χρωστική” είναι υδατικό διάλυμα 1-3% οξικού ουρανυλίου με pH 4,2-4,5 (σε pH μεγαλύτερο του 5 το διάλυμα οξικού ουρανυλίου καθιζάνει). Το οξικό ουρανύλιο παρουσιάζει επίσης το πλεονέκτημα ότι δρα ταυτόχρονα και ως μονιμοποιητής. Λόγω του χαμηλού pH, δεν είναι κατάλληλο για σωματίδια που είναι ασταθή σε όξινα περιβάλλοντα. Το γεγονός αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με ανάμιξη του οξικού ουρανυλίου με οξαλικό οξύ, που οδηγεί σε οξαλικό ουρανύλιο, το pH του οποίου μπορεί να ρυθμιστεί σε περισσότερα ουδέτερα επίπεδα. Το μειονέκτημα στην περίπτωση αυτή είναι ότι το διάλυμα του οξαλικού ουρανυλίου δίνει μια κοκκιώδη υφή στο δείγμα αφού στεγνώσει. Το οξικό ουρανύλιο παράγει τις εικόνες με την υψηλότερη ηλεκτρονική πυκνότητα και αντίθεση, καθώς και με το χαμηλότερο κόκκο σε σχέση με τις άλλες “χρωστικές”. Η αρνητική χρώση με διάλυμα οξικού ουρανυλίου έχει διακριτικό όριο 2,5 nm, εφόσον τόσο περίπου είναι το μέγεθος των κρυστάλλων που σχηματίζει η χρωστική.^[26]

6.9.3 Διάλυμα ουδέτερου φωσφοβολφραμικού οξέος

Χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα σε συγκέντρωση 1-3% και το pH ρυθμίζεται στην τιμή 7, με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου. Το ρόλο του βαρέως μετάλλου στη χρώση αυτή έχει το βολφράμιο, με ατομικό αριθμό Z-74. Πρόκειται για χρήσιμη “χρωστική” σε πολλές περιπτώσεις, κυρίως για ιούς που διαχωρίζονται σε χαμηλό pH, αλλά δεν προσφέρει αντιθέσεις αντίστοιχες του οξικού ουρανυλίου.^[1]

6.9.4 Διάλυμα αμμωνιακού μολυβδενίου

Παρασκευάζεται υδατικό διάλυμα σε συγκέντρωση από 1% -2%, ενώ το pH μπορεί να ρυθμιστεί από 5-7, με την προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου. Σε pH μεγαλύτερο από το 7 μπορεί να προκύψουν κρύσταλλοι μετά το στέγνωμα. Χρησιμοποιείται ευρέως για την αρνητική χρώση ιών, κυρίως για την ανάλυση της ύπαρξης

ελασματοειδών δομών σε ορισμένα κυστίδια. Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται επίσης για την αρνητική χρώση κρυοτομών μονιμοποιημένων κυττάρων.

6.10 Μέθοδος απομόνωσης ιών σε κυτταροκαλλιέργειες και κυτταρικές αλλοιώσεις

Κατά την ανάπτυξη των ιών σε κυτταροκαλλιέργειες, στο κυτταρικό επίπεδο μπορεί να παρατηρηθούν διάφορες αλλοιώσεις των κυττάρων, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε ομάδα ιών. Για παράδειγμα, ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών επιφέρει πλήρη καταστροφή των κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (2-3 ημέρες).

Αντίθετα, κατά τον πολλαπλασιασμό των αδενοϊών τα μολυσμένα κύτταρα γίνονται σφαιρικά, διογκώνονται και ενώνονται σε ομάδες (σαν σταφύλι). Για να ολοκληρωθεί η καταστροφή της κυτταρικής μονοστοιβάδας χρειάζονται 4-7 ημέρες. Παρόμοιες αλλοιώσεις της κυτταρικής μονοστοιβάδας προκαλούν και οι ερπητοϊοί. Κάποιοι ιοί προκαλούν τη δημιουργία συγκυτίων (συνένωση πολλών κυττάρων σε ένα συγκύτιο με πολλούς πυρήνες).

Ιδιαίτερη εκδήλωση της προσβολής των κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό των ιών αποτελεί η δημιουργία των κυτταρικών έγκλειστων. Τα κυτταρικά έγκλειστα είναι συσσωματώματα ιών ή δομικών τους υλικών (νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες) τα οποία ως επί το πλείστον χρωματίζονται με τις συνήθεις κυτταρικές χρωστικές. Χαρακτηριστικά κυτταρικά έγκλειστα που βοηθούν στην διάγνωση της νόσου ή την αναγνώριση του ιού είναι τα σωματίδια Negri που παρατηρούνται στο κυτταρόπλασμα των νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου λυσσασμένου ζώου.

Αυτές οι κυτταρικές αλλοιώσεις είναι ορατές με το ανάστροφο μικροσκόπιο, σε μεγενθύνσεις μέχρι 200 φορές και αποτελούν ένα από τα διαγνωστικά κριτήρια για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των ιών στη διαγνωστική ιολογία.^[14]



Εικόνα 13 : Αριστερά φαίνονται τα κύτταρα πριν την μόλυνση του ιού και δεξιά φαίνονται τα κύτταρα μετά την μόλυνση από τον ιό του αφθώδους πυρετού. [33]

6.11 Μέτρηση του τίτλου ενός καλλιεργήματος ιού

Συχνά δημιουργείται η ανάγκη να γνωρίζουμε τον ακριβή αριθμό των μολυσματικών σωματιδίων που περιέχει ένα καλλιέρημα ιού ή το μολυσματικό του τίτλο. Για παράδειγμα, κατά την μελέτη της μονοβαθμικής αύξησης ενός ιού πρέπει να γνωρίζουμε τον αρχικό αριθμό των βιρίων που ενοφθαλμίστηκαν στην κυτταροκαλλιέργεια καθώς επίσης και τον αριθμό των βιρίων που αναπαρήχθησαν.

Επειδή όμως οι ιοί είναι υπομικροσκοπικά σωματίδια δεν μπορούν να μετρηθούν στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο. Μπορούν βέβαια να μετρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αφού πρώτα καλλιεργηθούν σε μεγάλες ποσότητες, συγκεντρωθούν σε μικρό όγκο, καθαριστούν κλπ., διαδικασία που είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στην καθημερινή πράξη. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί στην ιολογία μέθοδοι που επιτρέπουν να προσδιοριστεί ο ακριβής αριθμός των βιρίων ενός καλλιεργήματος ή να προσδιοριστεί η βιολογική δράση του ιού στον ξενιστή. [14]

Με τη μέθοδο των πλακών προσδιορίζεται ο ακριβής αριθμός των βιρίων του καλλιεργήματος ενός ιού. Παρασκευάζονται συνήθως διαδοχικές υποδεκαπλάσιες (λογαριθμικές) αλλοιώσεις του ιού και ενοφθαλμίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες, οι οποίες έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλία. Με τον ενοφθαλμισμό, η κυτταρική μονοστοιβάδα καλύπτεται με θρεπτικό υλικό και άγαρ. Τα βίρια, μετά από επώαση ορισμένου χρόνου, σχηματίζουν εστίες κυτταρικών αλλοιώσεων οι οποίες ονομάζονται πλάκες. Αυτές είναι συνήθως κυκλικές, με διάμετρο 1-5 mm ανάλογα με το είδος του ιού και σχηματίζονται εκεί όπου υπάρχουν μολυσμένα κύτταρα τα οποία ελευθερώνουν περιμετρικά τους ιούς, καταστρέφοντας έτσι γειτονικά τους κύτταρα κ.ο.κ. Η κάθε πλάκα σχηματίζεται θεωρητικά από ένα βίριο ή μάζα βιρίων. Συνεπώς, ο ολικός αριθμός των πλακών που αναπτύχθηκαν, όταν πολλαπλασιαστεί με την αραιώση του ιού που ενοφθαλμίστηκε, δίνει τον αριθμό των βιρίων του αρχικού καλλιεργήματος. Οι πλάκες είναι μακροσκοπικές και γίνονται ευανάγνωστες μετά από κατάλληλη χρώση της κυτταρικής μονοστοιβάδας.

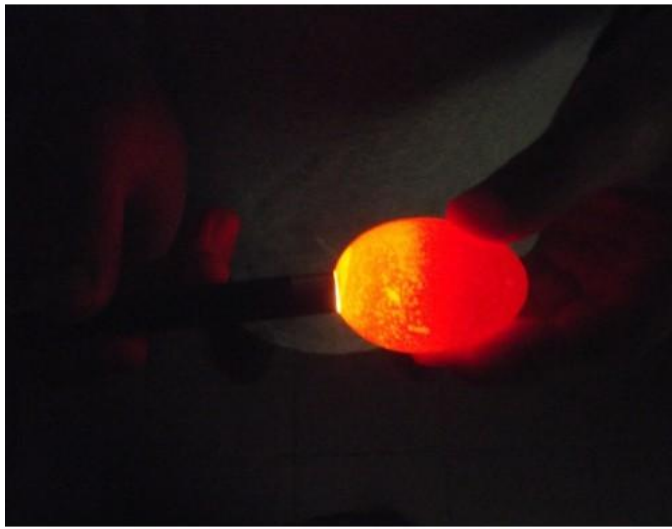
Η βιολογική δράση ενός ιού στις κυτταροκαλλιέργειες ή σε πειραματόζωα σχετίζεται με τη δόση του ιού (αραίωση), η οποία είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στις μισές κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν ή να θανατώσει τα μισά από τα πειραματόζωα που εμβολιάστηκαν. Αυτή η δόση του ιού

αναφέρεται ως “50% Endpoint” και εκφράζεται στην περίπτωση των πειραματοζώων ως θανατηφόρα δόση, ενώ στην περίπτωση των κυτταροκαλλιεργειών ως μολυσματική δόση κυτταροκαλλιεργειών (TCID₅₀).

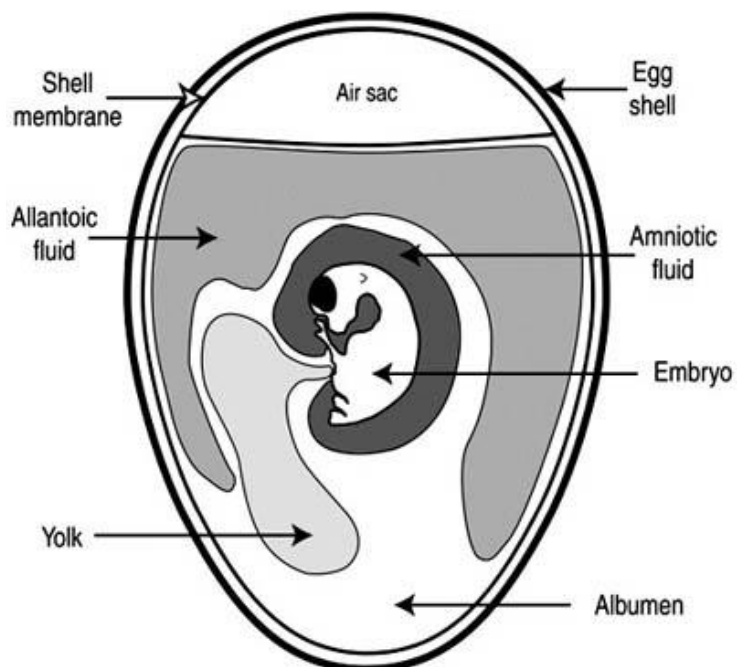
6.12 Μέθοδος καλλιέργειας και απομόνωσης ιών γρίπης σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας

Τα εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας αποτελούν κλασική μέθοδο απομόνωσης ιών με αιμοσυγκολλητική ικανότητα και παραγωγής αντιγριπικών εμβολίων. Η πρώτη απομόνωση ιού πραγματοποιήθηκε σε εμβρυοφόρα αυγά το 1933. Επίσης, οι τεχνικές της αιμοσυγκόλλησης και αναστολής της αιμοσυγκόλλησης αναπτύχθηκαν ως αποτέλεσμα της καλλιέργειας ιών σε εμβρυοφόρα αυγά. Συγκεκριμένα, το περιβάλλον του αναπτυσσόμενου εμβρύου παρέχει τον κατάλληλο ξενιστή για την ανάπτυξη και απομόνωση πολλών ιών. Τα εμβρυοφόρα αυγά είναι τα πλέον κατάλληλα υποστρώματα καλλιέργειας για την παραγωγή ιών σε υψηλή συγκέντρωση για βιοφυσικές και βιοχημικές μελέτες, καθώς και στην παραγωγή εμβολίων και ορολογικών διαγνωστικών αντιδραστηρίων. Ανάμεσα στα μειονεκτήματα της καλλιέργειας σε αυγά είναι η επιμόλυνση με βακτήρια και η δυσκολία της τεχνικής εμβολιασμού των αυγών και συλλογής των αμνιακών και αλλαντοϊκών υγρών.

Ιστορικά το 1933 αναφέρεται η πρώτη απομόνωση σε εμβρυοφόρα αυγά ιού γρίπης τύπου Α. Το αναπτυσσόμενο έμβryo όρνιθας παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη ορισμένων ιών, κυρίως αυτών που αιμοσυγκολλούν, όπως ο ιός της γρίπης. Το εμβρυοφόρο αυγό αποτελεί το πλέον κατάλληλο υπόστρωμα για την ταχεία και αποτελεσματική παραγωγή αντιγριπικών εμβολίων και αντιγόνων του ιού για φυσικοχημικές μελέτες και ανάπτυξη διαγνωστικών αντιδραστηρίων. Τα τελευταία χρόνια τα εμβρυοφόρα αυγά χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση της δράσης αντιικών ουσιών. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο αυξημένος κίνδυνος επιμόλυνσης του χώρου και των αυγών με άλλους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 14 : Έλεγχος εμβρυοφόρου αυγού σε ωοσκόπιο ^[34]



Εικόνα 15: Ανατομία του εμβρυοφόρου αυγού ^[35]

6.13 Εμβολιασμός του κλινικού δείγματος

Η απομόνωση του ιού πραγματοποιείται με εμβολιασμό του κατάλληλα επεξεργασμένου κλινικού δείγματος στην αμνιακή κοιλότητα εμβρυοφόρων αυγών 6-8 ημερών. Κατόπιν του πρώτου περάσματος ή για την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων του ιού, το στέλεχος εμβολιάζεται στην αλλαντοϊκή κοιλότητα αυγών 9-11 ημερών. Στην περίπτωση που τα αυγά δεν είναι ακόμη κατάλληλων ημερών τότε τοποθετούνται σε ειδική εκκολαπτική μηχανής στους 37°C για να συνεχιστεί η

ανάπτυξη των εμβρύων. Το επεξεργασμένο δείγμα αραιώνεται 1/3 έως 1/9 σε αποστειρωμένο PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων) και εμβολιάζονται 4 αυγά ανά κλινικό δείγμα. Για την απομόνωση του ιού πρέπει να πραγματοποιηθούν τουλάχιστον δυο τυφλά πέρασματα, το πρώτο εκ των οποίων στην αμνιακή κοιλότητα όπου πραγματοποιείται ο αρχικός πολλαπλασιασμός του ιού. Συχνά, το πρώτο και ορισμένες φορές και το δεύτερο πέρασμα, ενώ είναι αιμοσυγκόλληση αρνητικό για έναν ιό, μπορεί να περιέχουν ζωντανά ιικά σωματίδια τα οποία βρίσκονται στην φάση προσαρμογής τους στο περιβάλλον του εμβρυοφόρου αυγού.

Κατόπιν αρχικής εξέτασης των αυγών και εφόσον είναι πιστοποιημένα ότι είναι ελεύθερα μικροοργανισμών, τα εμβρυοφόρα αυγά ωσκοποούνται για να διαπιστωθεί ότι είναι εμβρυοφόρα και ότι δεν παρουσιάζουν κάποιο άλλο πρόβλημα. Συνήθως, κατά τη διάρκεια της ωσκόπησης τα έμβρυα κινούνται λόγω της αντίδρασης τους στην αυξημένη θερμοκρασία που παράγεται από τη λάμπα και αυτό αποτελεί ένδειξη ότι το έμβρυο είναι ζωντανό. Η σωστή παρατήρηση των αυγών περιλαμβάνει επίσης την κίνηση του αυγού πάνω στον άξονα του, όπου το έμβρυο πρέπει να κινηθεί σαν σε υγρή μορφή και να μην μείνει κολλημένο στη μεμβράνη του κελύφους του αυγού που είναι ενδεικτικό ότι είναι νεκρό. Αυγά τα οποία περιέχουν νεκρά έμβρυα ή είναι μη-εμβρυοφόρα πρέπει να απορρίπτονται. Ένα ποσοστό 5-10% νεκρών ή μη-εμβρυοφόρων αυγών θεωρείται αναμενόμενο, ενώ το ποσοστό αυτό τείνει να αυξάνεται κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Με μολύβι σημειώνεται η περιοχή όπου βρίσκεται ο αμνιακός σάκος (κοντά στο μάτι του εμβρύου) καθώς και το όριο του αερόσακου. Επίσης, σε κάθε αυγό αναγράφεται ο αριθμός του δείγματος. Τα αυγά αποστειρώνονται με τη χρήση αιθυλικής αλκοόλης και ιωδίου. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τη δημιουργία μικρής οπής με αποστειρωμένη βελόνα και λαβίδα δίπλα στον αμνιακό σάκο. Ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται προσεκτικά και κάτω από αυστηρά στείρες συνθήκες προς αποφυγή πρόκλησης αιμορραγίας στο έμβρυο και τη δημιουργία βακτηριακής μόλυνσης η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού. Ο ενδοαμνιακός εμβολιασμός περιλαμβάνει 100ml δείγματος. Η οπή καλύπτεται με υγρή παραφίνη και τα αυγά τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο στους 33°C-35°C για 48-72 ώρες με 75% υγρασία και υγρόμετρο. Σε κάθε καλλιέργεια περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες (αυγά εμβολιασμένα με αποσταγμένο νερό).^[7]

6.14 Συλλογή αμνιακού και αλλαντοϊκού υγρού

Κατόπιν επώασης τα αυγά τοποθετούνται στους +4°C για μερικές ώρες προς αποφυγή αιμορραγίας κατά τη διάρκεια της συλλογής των υγρών. Η συλλογή γίνεται με σύριγγες των 2,5 ή 5ml. Τα αυγά τοποθετούνται κάθετα στην επιφάνεια της θήκης και απολυμαίνονται με απόλυτη αιθανόλη. Με αποστειρωμένες λαβίδες και ψαλίδια αφαιρείται το κέλυφος που καλύπτει τον αερόσακο ακολουθώντας τα όρια που σημειώθηκαν με μολύβι κατά τη διάρκεια της ωοσκόπησης. Χρησιμοποιώντας μικρές λαβίδες αφαιρείται η εσωτερική και η χοριαλλαντοϊκή μεμβράνη. Προσεκτικά συλλέγουμε 1-3ml αμνιακού υγρού και 10-12ml αλλαντοϊκού υγρού το οποίο πρέπει να είναι διαυγές και να έχει κιτρινωπό χρώμα. Η απομόνωση των ιών γίνεται με τη συλλογή του μολυσμένου αμνιακού (1-3ml) ή αλλαντοϊκού υγρού (7-10ml). Για τη συλλογή των αμνιακών ή αλλαντοϊκών υγρών αφαιρείται το κέλυφος του αυγού με αποστειρωμένο ψαλίδι και λαβίδες και κατόπιν η μεμβράνη του αερόσακου και τα υγρά συλλέγονται με σύριγγα ή πιπέτα σε κωνικούς σωλήνες των 15ml.

6.15 Τιτλοποίηση του ιού

Η ανίχνευση παρουσίας αντιγόνου του ιού γίνεται με τη μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης σε αμνιακό ή αλλαντοϊκό υγρό. Καλλιέργειες θετικές στον ιό αιμοσυγκολλούν και δίνουν συγκεκριμένο τίτλο αιμοσυγκολλητίνης του ιού. Η μέθοδος απομόνωσης του ιού σε εμβρυοφόρα αυγά, παρόμοια με αυτή της καλλιέργειας σε κυτταρικές σειρές, δίνει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης ή τιτλοποίησης του ιού. Συνήθως αυτό γίνεται με τη μέθοδο της αιμοσυγκόλλησης και της μολυσματικής δόσης αυγού.

6.16 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα όπως λευκά ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, κουνέλια κ.α. χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των ιών, είτε για την παραγωγή αντιγόνων. Για τη μελέτη μερικών ιώσεων σαν πειραματόζωα χρησιμοποιούνται τα ίδια τα ζώα που ο ιός προσβάλλει στη φύση πχ. πρόβατο για τη νόσο SCARPIE.

Γενικά τα πειραματόζωα χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατή η χρησιμοποίηση κυτταροκαλλιιεργειών ή εμβρυοφόρων αυγών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ

ΟΡΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Με τις ορολογικές δοκιμές ελέγχονται τα αντισώματα κατά των ιών ακόμα και όταν η απομόνωση των ιών δεν είναι εφικτή, εξ'άλλου η απομόνωση ενός ιού από κλινικά δείγματα δεν αποδεικνύει, ότι ο συγκεκριμένος ιός είναι ο παθογόνος παράγοντας της νόσου. Τα IgM αντισώματα είναι τα πρώτα εμφανιζόμενα αντισώματα, λίγες ημέρες μετά τη νόσο και διατηρούνται για 3-9 μήνες. Τα IgG αντισώματα εμφανίζονται αργότερα στην πορεία της νόσου και διατηρούνται για περισσότερο χρονικό διάστημα. Για τον ορολογικό έλεγχο λαμβάνεται πήγμα αίματος και αποχωρίζεται ο ορός. Οι ορολογικές δοκιμές είναι οι εξής :

7.1 Δοκιμή αιμοσυγκόλλησης (Haemagglutination Assay – HA)

Η αρχή της μεθόδου της αιμοσυγκόλλησης βασίζεται στην ειδική πρόσδεση μορίων αιμοσυγκολλητίνης με τα σταλικά οξέα των υποδοχέων των ερυθρών κυττάρων από διάφορα ζώα. Όταν τα ερυθρά κύτταρα αναμιγνύονται με αντιγόνα του ιού ή ολόκληρο τον ιό στην ανάλογη αραιώση, τότε ο ιός συνδέει ή γεφυρώνει τα ερυθρά κύτταρα και τροποποιεί τη φυσιολογική καθίζηση τους δημιουργώντας έτσι την αιμοσυγκόλληση. Περαιτέρω, με την εφαρμογή της δοκιμής της αιμοσυγκόλλησης είναι δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ή τιτλοποίηση των ιών που αιμοσυγκολλούν, όπως της γρίπης, κατόπιν καλλιέργειας αυτού και σε δοκιμασίες παραγωγής αντιγριπικών εμβολίων σε εμβρυοφόρα αυγά.

Η μέθοδος καλλιέργειας των ιών σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας έδωσε τη δυνατότητα της αιμοσυγκόλλησης. Ο G. Hirst το 1941, πρώτος παρατήρησε αιμοσυγκόλληση ερυθρών όρνιθας, όταν προσπαθώντας να εμβολιάσει ιό γρίπης στην αλλαντοϊκή κοιλότητα προκάλεσε αιμορραγία. Ο Hirst αναγνώρισε τη σημασία της ανακάλυψης του και περιέγραψε την δοκιμή της αιμοσυγκόλλησης ως μέθοδο ανίχνευσης και τιτλοποίησης των ιών. Οι ιοί της γρίπης, περιέχουν στην επιφάνεια τους πολλά μόρια αιμοσυγκολλητίνης, μιας γλυκοπρωτεΐνης που συνδέεται ειδικά με υποδοχείς που περιέχουν σιαλικό οξύ, όπως αυτών που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων από διάφορα ζώα και στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού. Σωματιδιακά αντιγόνα μπορούν να συνδεθούν με αντίσωμα και να δώσουν ορατή συγκόλληση κατά τρόπο ανάλογο με το σχηματισμό ιζημάτων σε διαλυτά αντιγόνα. Η πρόσδεση ειδικού αντισώματος με αντιγόνο αιμοσυγκόλλησης

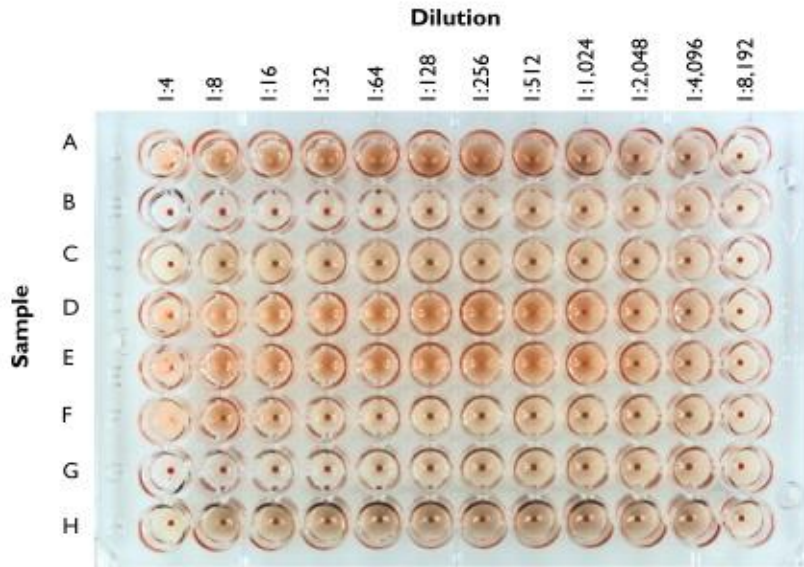
αναστέλλει την αιμοσυγκόλληση και αποτελεί την αρχή της μεθόδου ταυτοποίησης, αναστολής της αιμοσυγκόλλησης.^[20]

Η δοκιμή της αιμοσυγκόλλησης είναι η κλασική μέθοδος ανίχνευσης και τιτλοποίησης ιών που αιμοσυγκολλούν, όπως οι ιοί της γρίπης, οι ιοί της παραγρίπης και ο ιός της ασθένειας Newcastle κατόπιν καλλιέργειας αυτών σε εμβρυοφόρα αυγά ή σε κυτταρικές σειρές. Η αιμοσυγκολλητίνη των ιών της γρίπης συνδέεται με τα αντιγόνα-υποδοχείς των ερυθρών όπως η αντίδραση αντισώματος-αντιγόνου.

Στην περίπτωση των ιών της γρίπης, η συνεχής εξέλιξη των ιών αυτών και ειδικών μορίων της αιμοσυγκολλητίνης, έχει σαν αποτέλεσμα να αναδύονται σε ετήσια σχεδόν βάση, στελέχη του ιού έναντι των οποίων δεν υπάρχει ικανοποιητική ή ελάχιστη ανοσία στον πληθυσμό. Η χημική συγγένεια αιμοσυγκόλλησης-υποδοχέα ξενιστή επηρεάζεται ως συνέπεια αυτής της εξέλιξης. Στη φυσική μόλυνση ο ιός δέχεται συνεχή ανοσολογική πίεση, όπου ο στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι η αιμοσυγκόλληση ως κύριο αντιγόνο της μόλυνσης. Η εξελικτική αυτή πίεση προσαρμογής στη φυσική μόλυνση καθώς και οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί που δρουν πάνω στους ιούς στο περιβάλλον των ξενιστικών συστημάτων καλλιέργειας, έχουν σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή μετάλλαξη της αιμοσυγκόλλησης στη διαδικασία προσαρμογής της στο μικροπεριβάλλον του εμβρυοφόρου αυγού ή της κυτταρικής σειράς. Η εξέλιξη της αιμοσυγκόλλησης έχει ως αποτέλεσμα την κατά περιόδους μείωση της ειδικότητας της χημικής πρόσδεσης αιμοσυγκόλλησης-υποδοχέα ξενιστή. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην ανίχνευση και ταυτοποίηση των απομονωθέντων ιών γρίπης από κλινικά δείγματα, όπου ο απομονωθείς ιός δεν αντιπροσωπεύει πλήρως την αντιγονική σύνθεση του άγριου στελέχους του ιού, λόγω των προσαρμοστικών αλλαγών που υπόκειται στα συστήματα καλλιέργειας. Στα εξειδικευμένα εργαστήρια Ιολογίας και στα κέντρα αναφοράς, χρησιμοποιούνται ερυθρά όρνιθας για την αιμοσυγκόλληση ιών που καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκαν σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και ερυθρά θηλαστικού, σε ιούς που καλλιεργήθηκαν σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών.

Υλικά και Μέθοδοι

Αντιγόνα της γρίπης τύπου A ή B, 1x PBS, x PBS, ερυθρά όρνιθας ή ινδικού χοιριδίου σε αραιώση 0,5%, αντιπηκτικό διάλυμα Alsever, 10% διάλυμα citrate, μικροπλάκες των 96 κοιλοτήτων πολυστυρενίου, πολυπιπέτες, θάλαμος νηματικής ροής κατάλληλου επιπέδου βιοασφαλείας.



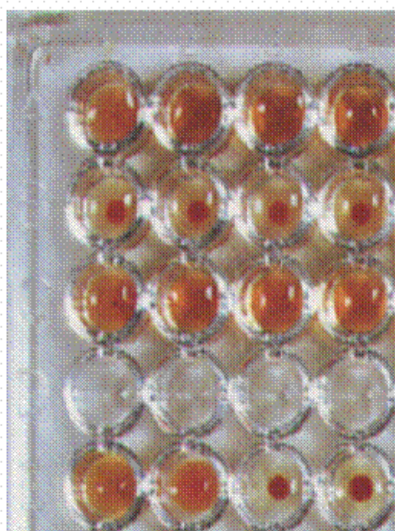
Εικόνα 16 : Μικροπλάκα για τη δοκιμή της αιμοσυγκόλλησης ^[36]

1. Προσθήκη 50μl 1x PBS (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων) σε όλες τις κοιλότητες της μικροπλάκας. Οι πλάκες που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι, αναλόγως τον πυθμένα τους, τύπου U ή V. Οι πλάκες U χρησιμοποιούνται με ερυθρά θηλαστικού, ενώ οι πλάκες τύπου V με ερυθρά από πτηνό (όρνιθας, γαλοπούλας).
2. Προσθήκη 100μl αντιγόνου (απομονωθέντα στελέχη γρίπης A ή B σε αμνιακό ή αλλαντοϊκό υγρό).
3. Διαδοχικές αραιώσεις του αντιγόνου με ειδική πολυπιπέτα, αναραϊώτο, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.
4. Προσθήκη 50μl διαλύματος 0,5% ερυθρών. Το υλικό αίμα σε αντιπηκτικό όπως διάλυμα Alsever φυγοκεντρείται 3 φορές στις 1200 rpm για 5 min και αραιώνεται 0,5% σε 1x PBS.
5. Ανακίνηση της μικροπλάκας και επώαση στους 22°C για 30min ή στους 4°C για 12 ώρες.
6. Αξιολόγηση του ιϊκού τίτλου. Ο τίτλος HA δεν είναι πραγματική μονάδα αλλά δείκτης συγκέντρωσης (η συγκέντρωση στην οποία ένας όγκος διαλύματος ιού ή αντιγόνου αιμοσυγκολλεί έναν όγκο διαλύματος ερυθρών 0,5%).

Στα πηγαδάκια όπου υπάρχει ιός γρίπης, τα ερυθρά συγκολούν. Στα πηγαδάκια όπου η συγκέντρωση του ιού της γρίπης έχει αραιωθεί κάτω από αυτή της κρίσιμης

αραίωσης ή μιας μονάδας HA τα κύτταρα καθιζάνουν στον πυθμένα και δημιουργούν ένα “δάκρυ” όταν γίνει κλίση 35° της μικροπλάκας. [20]

Hemagglutination Assay (Indirect)



Positive Control Negative Control

Test

Positive

Negative

Positive

Εικόνα 17: Κάτω αριστερά φαίνονται τα θετικά αποτελέσματα και δεξιά τα αρνητικά αποτελέσματα της δοκιμής της αιμοσυγκόλλησης. [37]

7.2 Δοκιμή Αναστολής της Αιμοσυγκόλλησης (Haemagglutination Inhibition Assay –HAI)

Η μέθοδος αναστολής της αιμοσυγκόλλησης αναπτύχθηκε από τον G. Hirst το 1942 και τροποποιήθηκε από τον J.Salk το 1944. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αναστολή δράσης της αιμοσυγκολλητικής ιδιότητας των ιών λόγω της σύνδεσης ειδικού αντισώματος με ειδικές αντιγονικές περιοχές του αντιγόνου της αιμοσυγκολλητίνης στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων του ξενιστή, σε περιβάλλον μικροπλάκας και καθίζηση των ερυθρών κυττάρων στον πυθμένα της πλάκας. Η εικόνα της αναστολής είναι όμοια με την απουσία του ιού στην αιμοσυγκόλληση.

Η μέθοδος αναστολής της αιμοσυγκόλλησης εφαρμόζεται στην ταυτοποίηση ιών που αιμοσυγκολλούν όπως της γρίπης, της παραγρίπης και του ιού Newcastle, εξακριβώνοντας ταυτόχρονα την αντιγονική ποικιλομορφία και συγγένεια κλινικών

στελεχών του ιού με αυτά του εμβολίου ή πρότυπων στελεχών. Επίσης, με την αναστολή της αιμοσυγκόλλησης γίνεται έλεγχος των επιπέδων και του επιπολασμού αντισωμάτων έναντι ιών στον πληθυσμό ή οροεπιδημιολογική μελέτη.

Τα είδη των ιών στις ακόλουθες οικογένειες έχουν τη δυνατότητα αιμοσυγκόλλησης : αδενοϊοί, κοροναϊοί, φλαβοϊοί, ορθομυξοϊοί, παραμυξοϊοί, παρβοϊοί, πικορναϊοί, ρεοϊοί, ραβδοϊοί και τογκαϊοί. Η αιμοσυγκολλητική ιδιότητα των ανωτέρω ιών διαφέρει ανάλογα την οικογένεια και το στέλεχος του ιού. Οι παράμετροι επίδρασης στην αποτελεσματικότητα της αιμοσυγκόλλησης και αναστολής αιμοσυγκόλλησης είναι οι εξής : είδος ερυθρών κυττάρων, το pH του διαλύματος και η θερμοκρασία επώασης. Η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης παρέχει ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα και χαμηλό κόστος ως μέθοδος ταυτοποίησης ιών, κατόπιν απομόνωσης αυτών σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας ή σε κυτταρικές σειρές. Παραλλαγή της μεθόδου της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό ζώου με πρόσφατη λοίμωξη, επικυρώνοντας έτσι την ταυτοποίηση ή ύπαρξη λοίμωξης από συγκεκριμένο ιό. Συνήθως, στην εργαστηριακή διάγνωση, χρησιμοποιούνται ζεύγη ορών ασθενή, αμέσως μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και 15 ημέρες κατόπιν για έλεγχο των αναμνηστικών IgG αντισωμάτων.

Η ευαισθησία και κατά συνέπεια η εφαρμογή της μεθόδου αναστολή της αιμοσυγκόλλησης στο ιολογικό εργαστήριο είναι υψηλότερη για ιούς όπου το κύριο αντιγόνο στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι η αιμοσυγκολληση. Ο σχετικός τίτλος αντιγόνων ή αντισωμάτων που αναστέλλουν την αιμοσυγκόλληση στην αναστολή της αιμοσυγκόλλησης, προσδιορίζει την αντιγονική συγγένεια των ιών προς εξέταση με τα αντίστοιχα στελέχη αναφοράς ή στελέχη εμβολίου. ^[1]

Ορολογικά η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης προσδιορίζει την ταυτότητα του ιού ή αιτιολογικού παράγοντα της ασθένειας. Η αναστολή της νευραμινιδάσης ταυτοποιεί την νευραμινιδάση του ιού. Οι οροί κάποιων ζώων καθώς και ορισμένοι ιστοί περιέχουν μη-ειδικούς, αναστολείς που μπορούν να παρέμβουν στη διαδικασία της αναστολής της αιμοσυγκόλλησης δίνοντας έτσι ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ως ειδικά αντισώματα στους μυξοϊούς. Οι μη-ειδικοί αναστολείς έχουν διαφορετική δράση σε συνάρτηση με την άνοδο της θερμοκρασίας.

Υλικά και μέθοδοι

Ρυθμιστικό διάλυμα 1XPBS, ερυθρά όρνιθας ή ινδικού χοιριδίου σε αραιώση 0,5%, καθορισμένο αντιγόνο αιμοσυγκολλητίνης ιών γρίπης Α, αντιοροί αναφοράς, μικροπλάκες, U ή V, πολυπιπέτες, πιπέτες τύπου erpendorf, θάλαμος νηματικής ροής βιοσφάλειας επιπέδου 2.

Το αντιγόνο αραιώνεται σε PBS ώστε να πάρουμε τουλάχιστον 8 μονάδες αιμοσυγκόλλητίνης (HA) (διαιρούμε τον τελικό τίτλο HA/4). Για την ταυτοποίηση ιού με αναστολή της αιμοσυγκόλλησης απαιτείται ελάχιστος τίτλος HA 1/32 → $32/4=8$ μονάδες HA.

Ανασύσταση του RDE (receptor destroying enzyme=υποδοχέας καταστροφής ενζύμου) σε φυσιολογικό ορό (25ml). Προσθέτουμε 3 όγκους RDE σε 1 όγκο αντιορού (0,3 ml RDE + 0,1 ml ορό), επώαση το βράδυ σε υδατόλουτρο στους 37°C. Επώαση στους 56°C για 30 λεπτά, για την εξουδετέρωση του συμπληρώματος. Προσθέτουμε 6 όγκους φυσιολογικό ορό. Οι επεξεργασμένοι αντιοροί φυλάσσονται στους -20°C.

1. Τοποθέτηση του αντιγόνου-ιού παρουσία αντιορών αναφοράς. Σε κάθε δοκιμασία περιλαμβάνεται μια σειρά αντιγόνου μάρτυρα και σε άλλη σειρά ερυθρά παρουσία και μη αντιορών.
2. Προσθήκη 100μl αντιορού στην πρώτη σειρά της πλάκας. 50μl μάρτυρα αντιορού (χωρίς αραιώση).
3. Προσθήκη 50μl PBS σε όλες τις υπόλοιπες κοιλότητες.
4. Διαδοχικές x2 αραιώσεις των αντιορών, από τη 1^η έως την 8^η σειρά.
5. Προσθήκη 50μl αντιγόνου (4 μονάδες HA), 50μl 4U HA στο θετικό μάρτυρα.
6. Επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Προσθήκη 50μl ερυθρών (0,5%) σε όλες τις κοιλότητες.
8. Επώαση 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή 12 ώρες στους 4°C.
9. Αξιολόγηση και αντιγονική ανάλυση-τυποποίηση των στελεχών του ιού σε σύγκριση με τους αντιορούς αναφοράς.

Εξακρίβωση τίτλου αντιγόνου-αντισώματος ή τίτλου αντισώματος-αντιγόνου. Διαδοχικές αραιώσεις της υπερκείμενης καλλιέργειας ή αλλαντοϊκού υγρού.

7.3 Δοκιμή αιμοπροσρόφησης

Υπάρχουν κάποιοι ιοί που δεν προκαλούν εμφανείς κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις όπως είναι οι ιοί της γρίπης και της παραγρίπης. Οι ιοί αυτοί διαθέτουν ορισμένα αντιγόνα, τα οποία εκφράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων στα οποία πολλαπλασιάζονται και συνδέονται με συμπληρωματικές περιοχές των ερυθροκυττάρων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται Αιμοπροσρόφηση.

Η μέθοδος βασίζεται στη σύνδεση του ιού στην επιφάνεια των ερυθρών κυττάρων με τη βοήθεια ειδικών αντιγόνων(πρωτεϊνών) που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Όταν ένα πρόσφατο εναιώρημα ερυθροκυττάρων ινδικού χοιριδίου ή όρνιθας προστεθεί σε μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες, τότε εμφανίζεται το φαινόμενο της αιμοπροσρόφησης. Το φαινόμενο αυτό γίνεται αντιληπτό με μικροσκοπική εξέταση με ανάστροφο μικροσκόπιο μετά από μια ορισμένη περίοδο επώασης. Τα ερυθροκύτταρα φαίνονται ως προσκολλημένα συσσωματώματα που έχουν στοιχηθεί πάνω στις μεμβράνες των κυττάρων. Σε μια τέτοια περίπτωση, το υγρό της καλλιέργειας ανακαλλιεργείται σε πρόσφατη κυτταροκαλλιέργεια για επιβεβαίωση. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται όταν χρησιμοποιούνται παλαιά ερυθροκύτταρα ινδικού χοιριδίου. Συχνά παρουσιάζεται μη ειδική αιμοπροσρόφηση σε μη ενοφθαλμισμένη καλλιέργεια για αυτό και πρέπει να διαχωρίζεται από την ειδική μόλυνση από ιό.

Η δοκιμασία της αιμοπροσρόφησης εκτελείται στους 4°C ή στους 22°C, γιατί εάν τα ερυθροκύτταρα επωαστούν στους 37°C θα αποκολληθούν από την κυτταρική μεμβράνη των ξενιστών κυττάρων.

Η αιμοπροσρόφηση είναι ιδιότητα όσων ιών απελευθερώνονται από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή κατά το στάδιο της ωρίμανσης τους. ^[11]

7.3.1 Δοκιμασία

Εάν κατά τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων αναμένεται ανάπτυξη Ορθομυξοϊών και Παραμυξοϊών τότε απαραίτητως πρέπει να εκτελεστεί η δοκιμασία της αιμοπροσρόφησης.

7.3.2 Αναγνώριση του ιού

Το υλικό διατήρησης απομακρύνεται από το σωληνάριο της κυτταροκαλλιέργειας και η κυτταρική στοιβάδα πλένεται 2 φορές με BSS(Balanced

Salt solution= Ισορροπημένο διάλυμα άλατος) κατά Hanks. Προστίθενται 0,2ml εναιωρήματος 4% πλυμένων ερυθροκυττάρων ινδοχοίρου.

Μετά την πρόσθεση των ερυθροκυττάρων τα σωληνάρια επωάζονται στους 4°C για 30 λεπτά και η κυτταρική στοιβάδα ελέγχεται μικροσκοπικώς για ένδειξη προσρόφησης των ερυθροκυττάρων στην κυτταρική μονοστοιβάδα. Αν η δοκιμασία είναι αρνητική, η διαδικασία επαναλαμβάνεται στους 25°C επί 1 ώρα και επανεξετάζεται εκ νέου για αιμοπροσρόφηση.

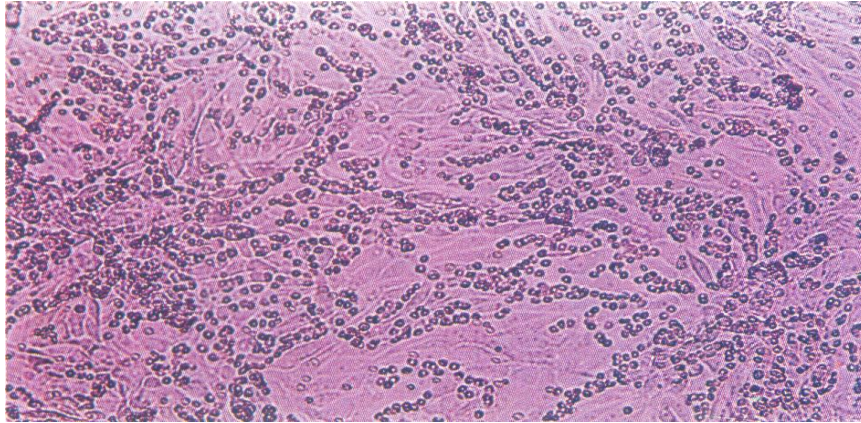
Αν και αυτή η δοκιμασία είναι αρνητική, προστίθεται φρέσκο υλικό διατήρησης, επανεπωάζεται και επανελέγχεται ανά διάστημα 5 ημερών για τουλάχιστον 20 ημέρες. Μυξοϊοί συνήθως ανιχνεύονται μετά από πενταήμερη επώαση. Συνιστάται πλύσιμο της κυτταρικής μονοστοιβάδας της κυτταροκαλλιέργειας τουλάχιστον 2 φορές με BSS κατά Hanks, καθώς σε πολλές περιπτώσεις το υλικό διατήρησης περιέχει αρκετό ιό, ώστε έτσι να εμποδίζεται η αιμοπροσρόφηση.

7.3.3 Ταυτοποίηση του ιού

Αν η δοκιμασία αιμοπροσρόφησης είναι θετική, το υλικό καλλιέργειας διαμοιράζεται σε σωληνάρια τα οποία επωάζονται στους 36°C επί 4 ημέρες.

Μετά την επώαση η κάθε κυτταροκαλλιέργεια πλένεται 2 φορές με BSS του Hanks και προστίθεται 0,6ml φρέσκου BSS του Hanks και επίσης 0,2 ml ειδικού αντιορού (1/10 υπεράνοσος, αδρανοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά) για κάθε ιό που ανιχνεύεται.

Τα μίγματα ορών-ιών επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 0,2ml εναιωρήματος 4% ερυθροκυττάρων ινδοχοίρου και επωάζονται για 30 λεπτά στους 4°C. Η κυτταρική μονοστοιβάδα ελέγχεται για αιμοπροσρόφηση ή αναστολή αιμοπροσρόφησης. Σε κάθε δοκιμασία πρέπει να γίνεται έλεγχος μαρτύρων του ιού. Η ταυτοποίηση του ιού αποδεικνύεται με τον ειδικό αντιορό που αναστέλλει την αιμοπροσρόφηση.



Εικόνα 18 : Παρατηρείται αιμοπροσρόφηση στα ερυθρά προβάτου ^[38]

7.4 Δοκιμή αναστολής αιμοπροσρόφησης

7.4.1 Υλικά

- Κυτταροκαλλιέργειες μολυσμένες με ιό
- Αρνητικοί μάρτυρες των κυτταροκαλλιεργειών
- Αντιοροί για διάφορους ιούς που αιμοπροσροφούν
- Ερυθροκύτταρα σε εναιώρημα
- BSS κατά Hanks
- Φυσιολογικός ορός

7.4.2 Διαδικασία

Το εναιώρημα ερυθροκυττάρων πλένεται 3 φορές με ορό και παρασκευάζεται εναιώρημα 0,08% των πλυμένων κυττάρων σε BSS κατά Hanks. Ετοιμάζονται αραιώσεις 1:5 από κάθε αντιορό με ανάμιξη 0,2ml αντιορού και 0,8ml υλικό κυτταροκαλλιεργειών. Επιλέγονται 2 μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες και 2 αρνητικοί μάρτυρες για κάθε ορό. Ξηραίνονται εντελώς και οι κυτταρικές στοιβάδες πλένονται 2 φορές με υλικό MEM.

Το αρχικό υλικό και τα εκπλύματα συλλέγονται για απόρριψη σε απολυμαντικό. 0,2ml αραιώσης 1:5 από τον ανάλογο αντιορό προστίθενται στις πλυμένες-ξηραμένες καλλιέργειες. Ακόμη προστίθενται 0,2ml φυσιολογικού ορού σε άλλες μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες και άλλους 2 αρνητικούς μάρτυρες για έλεγχο.

Οι καλλιέργειες επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με τον ορό να καλύπτει την κυτταρική στοιβάδα. Στο τέλος της επώασης, οι σωλήνες ξηραίνονται. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 1ml 0,08% ερυθροκυττάρων.

Οι σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά με το εναιώρημα ερυθροκυττάρων να καλύπτει την κυτταρική μονοστοιβάδα. Οι καλλιέργειες πλένονται με κρύο φυσιολογικό ορό ή υλικό MEM και εξετάζονται αμέσως στο μικροσκόπιο για αιμοπροσρόφηση.

Ο προς απομόνωση ιός ανήκει στην ομάδα και τύπο του αντιορού που αναστέλλει την αιμοπροσρόφηση.

7.5 Δοκιμή εξουδετέρωσης

Η δοκιμή εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται στην Ιολογία εδώ και πολλά χρόνια σε σχέση με τις άλλες ορολογικές διαδικασίες. Ερευνητές που βοήθησαν στον προσδιορισμό των βασικών ιδιοτήτων της εξουδετέρωσης είναι οι Tyrell & Horsfall (1953), Salk (1954) και Mandel (1960).

Οι προερχόμενες από ιό μόλυνσεις ή η ανοσοποίηση με τα κατάλληλα εμβόλια οδηγούν στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων συγκεκριμένων εξουδετερωτικών αντισωμάτων που εμφανίζονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η ανεύρεση μιας σημαντικής αύξησης σε οποιαδήποτε εξουδετερωτική αντισωματική δραστηριότητα στο αίμα κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης είναι πιθανό στοιχείο της μόλυνσης με τον ομόλογο ιό-παράγοντα.

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα εκμηδενίζουν τη μολυσματικότητα του ομόλογου ιού με το σχηματισμό μη λοιμογόνων συμπλόκων ιού-αντισωμάτων. Η παρουσία τους ανιχνεύεται από την έλλειψη της μολυσματικότητας ιών στους κατάλληλους ξενιστές. Οι κυτταροκαλλιέργειες έρχονται πρώτες σε προτίμηση ενώ τα αυγά και τα πειραματόζωα χρησιμοποιούνται μόνο όταν δεν υπάρχει άλλη επιλογή. Οι δοκιμασίες εξουδετέρωσης στις κυτταροκαλλιέργειες είναι βασισμένες σε μια από τις ακόλουθες ιδιότητες του αντισώματος :

1. Πρόληψη των κυτταροπαθολογικών επιδράσεων ή αλλοιώσεων (CPE)
2. Πρόληψη του σχηματισμού πλακών
3. Πρόληψη της αιμοπροσρόφησης

Οι μέθοδοι για την πρόληψη των κυτταροπαθολογικών επιδράσεων ή αλλοιώσεων έχουν ευρεία δυνατότητα εφαρμογής και περιλαμβάνουν της ευρέως

χρησιμοποιημένη παλαιότερα δοκιμασία των δοκιμαστικών σωλήνων και τη διαδεδομένη πλέον μέθοδο με τις μικροπλάκες. Οι μέθοδοι μείωσης των πλακών είναι γενικά σύνθετες και η αιμοπροσρόφηση έχει περιορισμένη δυνατότητα εφαρμογής.

Η δοκιμασία της εξουδετέρωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με σταθερή ή μικρότερη ποσότητα ιού και με κυμαινόμενη ποσότητα αντισώματος ή αντιστρόφως με σταθερή ποσότητα αντισώματος και κυμαινόμενη ποσότητα ιού. Η τελευταία μέθοδος είναι και η πλέον χρησιμοποιούμενη. Η εξουδετέρωση της δραστηριότητας ενός ορού εκφράζεται ως η υψηλότερη συγκέντρωση αντισώματος που αδρανοποιεί τη σταθερή δόση του ιού.

Όταν το αντίσωμα βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση και η συγκέντρωση του ιού ποικίλει, είναι σημαντικό να δουλέψουμε με μικρές δόσεις / ποσότητες αντισώματος και η δραστηριότητα ή ο τίτλος υπολογίζεται ανάλογα με την ποσότητα του ιού που έχει εξουδετερωθεί.

Η υπόλοιπη δοκιμασία τιτλοδότησης των ιών είναι μια επέκταση αυτής της μεθόδου στην οποία σταθερές ποσότητες ιού και αντισώματος αντιδρούν και στη συνέχεια γίνεται η τιτλοποίηση της ποσότητας του ιού που δεν αντέδρασε.

Η δοκιμασία της οροεξουδετέρωσης είναι μια ειδική και ευαίσθητη ορολογική μέθοδος στη διάθεση του κλινικού ιολόγου. Οι εφαρμογές της συμπεριλαμβάνουν :

1. ανίχνευση της αύξησης του τίτλου των ειδικών αντισωμάτων κατά τη διάρκεια μιας μόλυνσης με τη σύγκριση των αντισωματικών τίτλων της οξέως και αναρρωτικής φάσης
2. ταυτοποίηση του απομονωμένου ιού
3. αντιγονική διαφορά μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των ιών

Παρόλο που είναι σχετικά παλιά, η εξουδετέρωση είναι μια δοκιμασία ακριβής και χρησιμοποιείται στην Ιολογία για τον προσδιορισμό ενός απομονωμένου ιού ή για τη μέτρηση της αντισωματικής απάντησης ενός ατόμου σε ένα ιό. Λόγω της υψηλής ανοσολογικής ακρίβειας, η εξουδετέρωση είναι συχνά το πρότυπο για την αξιολόγηση των άλλων ορολογικών διαδικασιών. ^[5]

7.5.1 Αρχή μεθόδου

Εξουδετέρωση ενός ιού ορίζεται η απώλεια της μολυσματικότητας του λόγω της αντίδρασης του με ειδικό αντίσωμα. Κατά τη δοκιμασία της εξουδετέρωσης ενός ιού, ιός και ορός αναμιγνύονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες, επωάζονται και στη

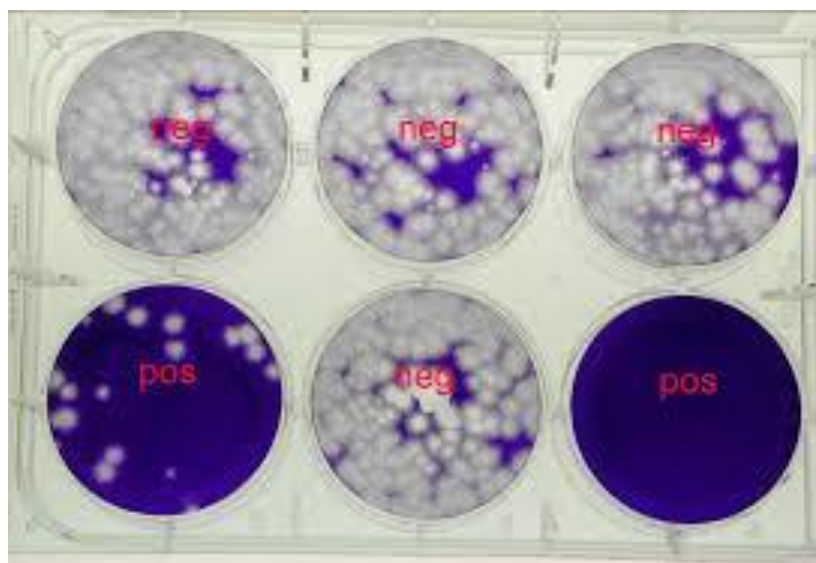
συνέχεια ενοφθαλμίζονται σε ευπαθές κυτταρικό υπόστρωμα για την ανίχνευση του ιού που δεν έχει εξουδετερωθεί. Η παρουσία του ιού που δεν έχει εξουδετερωθεί σε κυτταροκαλλιέργειες ανιχνεύεται με αντιδράσεις όπως κυτταροπαθολογικές επιδράσεις ή αλλοιώσεις, δημιουργία πλακών και αναστολή του μεταβολισμού.

Μια από τις πρώτες αρχές που διαμορφώθηκαν όσον αφορά τις ορολογικές δοκιμασίες των ιών είναι ο λεγόμενος “νόμος του ποσοστού”. Ο νόμος αυτός ορίζει ότι όταν ένας ιός προστίθεται σε περίσσεια αντισώματος, το ποσοστό του ιού που δεν εξουδετερώθηκε είναι το ίδιο ανεξάρτητα από το ποσό του ιού που προστίθεται.

Μετά από την ανακάλυψη της δοκιμασίας των πλακών για τους ιούς, η αντίδραση εξουδετέρωσης υπολογίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Στις μελέτες που έκαναν πάνω στην κινητική της αντίδρασης βρήκαν ότι υπάρχει γραμμική αλληλεξάρτηση μεταξύ του ποσοστού εξουδετέρωσης και της συγκέντρωσης του αντισώματος και επίσης ότι υπάρχει μια ποσότητα ιού η οποία δεν εξουδετερώνεται.

7.5.2 Αξιολόγηση

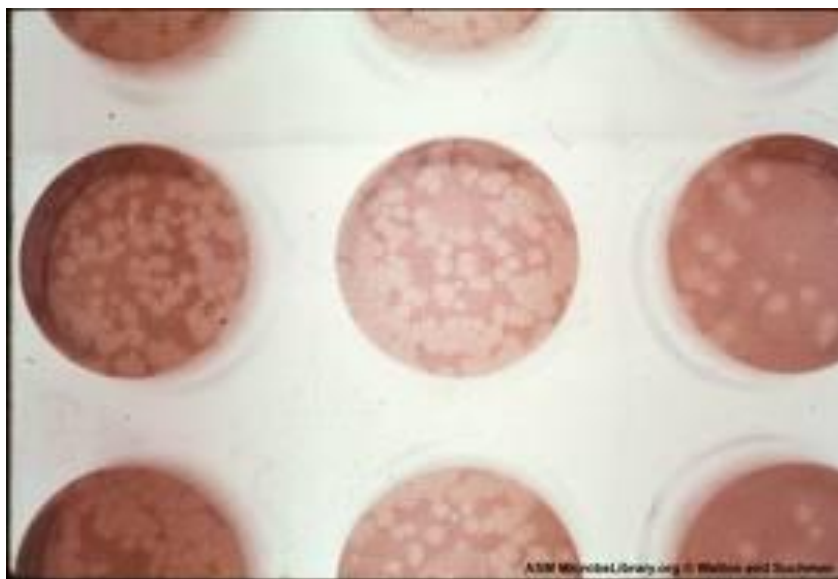
Η διάγνωση ιογενούς λοίμωξης επιτυγχάνεται με τη χρήση ορών που έχουν ληφθεί κατά την οξεία και αναρρωτική φάση (μεσοδιάστημα 2 εβδομάδων). Αυτή η δοκιμασία ανιχνεύει αντισώματα στον ορό. Εάν υπάρχει ανοσιακή απάντηση, τα αντισώματα θα εξουδετερώσουν την ικανότητα του ιού να προσδεθεί σε κυτταρικούς υποδοχείς και θα αναστείλουν την εμφάνιση πλακών κατά τη μέθοδο των πλακών.



Εικόνα 19 : Κάτω αριστερά και δεξιά στην άκρη φαίνονται τα θετικά αποτελέσματα της δοκιμής εξουδετέρωσης, ενώ στην επάνω σειρά και κάτω στη μέση φαίνονται τα αρνητικά αποτελέσματα.^[39]

7.5.3 Δοκιμή εξουδετέρωσης σε μικροπλάκα

Αραιώσεις ορού επώαστηκαν με τιτλοποιημένο ιό, εμβολιάσθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες και ακολούθησε καταμέτρηση πλακών. Σε δείγματα ορών που δεν περιέχουν αντίσωμα, ο ιός μολύνει τα κύτταρα και οδηγεί στη δημιουργία πλακών. Σε δείγματα που περιέχουν αντίσωμα, η ικανότητα του ιού να μολύνει αναστέλλεται ή μειώνεται.



Εικόνα 20 : Δοκιμή εξουδετέρωσης σε μικροπλάκα ^[40]

7.5.4 Σταθεροποίηση των υλικών της δοκιμής

Πριν τη διεξαγωγή της δοκιμής τα γνωστά συστατικά πρέπει να σταθεροποιούνται. Για την ταυτοποίηση ενός απομονωμένου ιού χρησιμοποιείται ένας γνωστός τιτλοποιημένος αντιορός ή ένα σταθεροποιημένο διάλυμα. Αντίθετα, για τη μέτρηση της αντισωματικής απάντησης ενός ατόμου χρησιμοποιείται ένας γνωστός τιτλοποιημένος ιός.

7.5.5 Ιός

Ο γνωστός ιός αποτελείται από εκχυλίσματα μολυσμένων ιστών ή υγρό από κυτταροκαλλιέργειες. Ο ιός μπορεί να αγοραστεί από το εμπόριο ή να παρασκευαστεί με ενοφθαλμισμό ενός ευπαθούς κυτταρικού υποστρώματος με ένα ιό και με τη συλλογή του σε άριστο χρόνο. Ο γνωστός ιός πρέπει πάντοτε να τιτλοποιείται στο κυτταρικό υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή εξουδετέρωσης, είτε αγοράζεται είτε παρασκευάζεται με ενοφθαλμισμό κυτταρικού υποστρώματος.

Για την τιτλοποίηση γνωστού ιού ή απομονωμένου ιού, παρασκευάζονται δεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις σε υλικό διατήρησης και ενοφθαλμίζεται ένα κυτταρικό υπόστρωμα με ίδιους όγκους από την κάθε αραιώση. Το υπόστρωμα εξετάζεται για συμπτώματα μόλυνσης τα οποία δείχνουν το ποσό του ιού που δεν εξουδετερώθηκε. Ο τίτλος End Point αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη αραιώση του ιού που μολύνει το 50% των κυτταροκαλλιιεργειών στις οποίες ενοφθαλμίζεται. Η συγκέντρωση του ιού που χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία της εξουδετέρωσης είναι 100 TCID₅₀ ανά μονάδα όγκου.

7.5.6 Ορός

Ένας ειδικός άνοσος ορός αγοράζεται από το εμπόριο ή παρασκευάζεται με ανοσοποίηση ευπαθών πειραματόζωων και με τη συλλογή του ορού σε άριστο χρόνο. Ο αντιορός, είτε αγοράζεται από το εμπόριο είτε παρασκευάζεται με ανοσοποίηση για τη δοκιμασία της εξουδετέρωσης, πρέπει να τιτλοποιείται εναντίον του ομολόγου ιού. Για την τιτλοποίηση του αντιορού ή του ορού του δείγματος, παρασκευάζονται διαδοχικές διπλάσιες αραιώσεις του ορού. Κάθε αραιώση αναμιγνύεται με ίσο όγκο σταθεροποιημένου ιού. Τα μίγματα ορού-ιού συνήθως επώάζονται για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C. Ο χρόνος και η θερμοκρασία επώασης των μιγμάτων του ορού διαφέρει από ιό σε ιό.

Στη συνέχεια, ένα ευπαθές κυτταρικό υπόστρωμα ενοφθαλμίζεται με κάθε μίγμα ιού-ορού. Ο τίτλος του αντισώματος είναι αντίστοιχος με την μεγαλύτερη αραιώση του αντιορού εκείνου που προστατεύει το κυτταρικό υπόστρωμα εναντίον του ιού.

7.5.7 Κυτταροκαλλιέργεια

Οι κυτταροκαλλιέργειες είναι τα καλύτερα υποστρώματα για τη διεξαγωγή της δοκιμασίας της εξουδετέρωσης διότι είναι ευπαθείς σε ένα ευρύ φάσμα ιών, διατηρούνται εύκολα και δεν έχουν ανοσιακό σύστημα που επηρεάζει την δοκιμασία. Τα δυο είδη κυτταροκαλλιιεργειών που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία εξουδετέρωσης είναι οι καλλιέργειες εναιωρήματος και μονοστοιβάδας. Στην καλλιέργεια εναιωρήματος τα μολυσμένα με ιό κύτταρα αναπτύσσονται αιωρούμενα στο υλικό. Όταν ο ιός αναπτυχθεί στα κύτταρα, τα βίρια απελευθερώνονται μέσα στο υλικό και ο ιός που δεν έχει εξουδετερωθεί ανιχνεύεται με αντιδράσεις όπως οι κυτταροπαθολογικές επιδράσεις ή αλλοιώσεις, η αλλαγή του pH του υλικού ή η αιμοπροσρόφηση. Σε καλλιέργειες με υπόστρωμα άγαρ, το “κάλυμμα από άγαρ”

εμποδίζει την εμφάνιση δευτερογενών εστιών μόλυνσης και διατηρεί περιορισμένη την αρχική μόλυνση, έτσι ώστε να μεγαλώνουν οι πλάκες. Κάθε πλάκα παράγεται από μια μολυσματικά μονάδα, η μια μονάδα που δημιουργεί πλάκες του αρχικού εναιωρήματος. Η μέτρηση των πλακών είναι μια ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ιών. Η παρεμπόδιση της δημιουργίας πλακών από ειδικό αντιορό στην δοκιμασία εξουδετέρωσης ονομάζεται "μείωση πλακών". [1]

7.5.8 Διαδικασίες που ακολουθούνται κατά τη δοκιμασία της εξουδετέρωσης

Η κυτταροκαλλιέργεια είναι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται πάρα πολύ συχνά στη δοκιμασία της εξουδετέρωσης. Εναιωρήματα κυτταροκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στα ακόλουθα είδη δοκιμασιών εξουδετέρωσης :

- α) Σταθερός ιός – Μεταβλητός αντιορός (μεταβλητός τίτλος αντισωμάτων)
- β) Μεταβλητός ιός – Σταθερός αντιορός (σταθερός τίτλος αντισωμάτων)
- γ) Σταθερός ιός – Σταθερός αντιορός (σταθερός τίτλος αντισωμάτων)
- δ) Μεταβλητός ιός – Μεταβλητός αντιορός (μεταβλητός τίτλος αντισωμάτων)

α) Σταθερός ιός – Μεταβλητός αντιορός (μεταβλητός τίτλος αντισωμάτων)

Μια επιλεγμένη αραιώση ιού (συνήθως 100 TCID₅₀, όπως προσδιορίζεται από προηγούμενη τιτλοποίηση) αναμιγνύεται με μεταβλητές αραιώσεις ορών οξείας ή αναρρωτικής φάσης. Το μίγμα ιού – ορού επωάζεται και μετά ενοφθαλμίζεται σε ευαίσθητο υπόστρωμα. Ο τίτλος του ιού αντιστοιχεί στην υψηλότερη αραιώση ορού οξείας και αναρρωτικής φάσης που προστατεύει το υπόστρωμα από τον ιό.

Υλικά

- Ευαίσθητα υποστρώματα κυτταροκαλλιιεργειών
- Υλικό διατήρησης
- Γνωστός θετικός ιός
- Οροί οξείας και αναρρωτικής φάσης

Μέθοδος

1. Καθιστούμε τον ιό στον υπό εξέταση ορό ανενεργό στους 56°C για 30 min.
2. Στην συνέχεια ετοιμάζονται διπλές διαδοχικές αραιώσεις ορών οξείας και αναρρωτικής φάσης (1:10 έως 1:5120) σε όγκους των 0,5ml.

3. 0,5ml σταθεροποιημένου γνωστού θετικού ιού προστίθεται σε κάθε αραιώση ορού.
4. Αραιώνεται ο γνωστός σταθεροποιημένος ιός (1:10 έως 1:1000)
5. Τα μίγματα ιού – ορού επωάζονται στους 37°C για μια ώρα.
6. Μετά την επώαση, το κάθε ένα από τα 3 σωληνάρια κυτταροκαλλιιεργειών ενοφθαλμίζονται με 0,2 ml από το κάθε μίγμα του ορού.
7. Τρεις κυτταροκαλλιιεργειες ενοφθαλμίζονται με 0,1 ml της αραιώσης του γνωστού θετικού ιού. Οι αραιώσεις αυτές χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες τιτλοποίησης για να επαληθεύσουν την εγκυρότητα της δοκιμασίας ως 100 TCID₅₀.
8. Άλλες τρεις κυτταροκαλλιιεργειες στις οποίες δεν ενοφθαλμίσθηκε ιός χρησιμοποιούνται σαν αρνητικοί μάρτυρες.
9. Οι κυτταροκαλλιιεργειες επωάζονται στους 33-37°C σε επικλινή θέση.
10. Γίνεται καθημερινός μικροσκοπικός έλεγχος για εμφάνιση κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Αξιολόγηση της μεθόδου – αποτελεσμάτων

Μια τετραπλή αύξηση του τίτλου αντισωμάτων μεταξύ των ορών οξείας και αναρρωτικής φάσης θεωρείται διαγνωστικά σημαντική. Στη δοκιμασία αυτή, οι κυτταροπαθολογικές αλλοιώσεις στις κυτταροκαλλιιεργειες χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ιού που δεν εξουδετερώθηκε.

β) Μεταβλητός ιός – Σταθερός αντιορός (σταθερός τίτλος αντισωμάτων)

Για την ταυτοποίηση του ιού, μεταβλητές αραιώσεις του ιού αναμιγνύονται με μια αραιώση σταθερού αντιορού. Οι αραιώσεις επωάζονται, έτσι ώστε ο ιός και ο αντιορός να αντιδράσουν. Στη συνέχεια κάθε μίγμα του ορού ενοφθαλμίζεται σε ένα ευαίσθητο υπόστρωμα. Η αραιώση του ιού που μολύνει το υπόστρωμα κατά 50% θεωρείται το τελικό σημείο αραιώσης.

Υλικά

- Ευαίσθητα υποστρώματα κυτταροκαλλιιεργειών
- Υλικό διατήρησης

- Γνωστός θετικός αντιορός (ανενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά και σταθεροποιημένος ώστε να περιέχει 20 Ab/0,1ml)
- Γνωστός αρνητικός ορός (ανενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά)
- Απομονωμένος ιός

Μέθοδος

1. Ετοιμάζονται διπλές δεκαπλάσιες διαδοχικές αραιώσεις (1:10 έως 1:100) του απομονωμένου ιού σε υλικό διατήρησης.
2. 0,5ml από κάθε αραιώση απομονωμένου ιού αναμιγνύονται με 0,5ml γνωστού αρνητικού ορού.
3. Τα μίγματα ιού – ορού επωάζονται στους 37° C για 60 λεπτά.
4. Μετά την επώαση, το κάθε ένα από τα τρία σωληνάρια κυτταροκαλλιιεργειών ενοφθαλμίζεται 0,2 ml από το κάθε μίγμα του ορού.
5. Τρεις κυτταροκαλλιέργειες που δεν ενοφθαλμίσθηκαν χρησιμοποιούνται σαν αρνητικοί μάρτυρες.
6. Οι κυτταροκαλλιέργειες επωάζονται στους 33° - 37°C σε επικλινή θέση.
7. Γίνεται καθημερινός μικροσκοπικός έλεγχος για εμφάνιση κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Αξιολόγηση της μεθόδου – αποτελεσμάτων

Η αραιώση του ορού που μολύνει το 50% του υποστρώματος αποτελεί το τελικό σημείο αραιώσης. Η διαφορά τουλάχιστον 2 λογαρίθμων ή σωληναρίων μεταξύ του κανονικού και του αντιορού πρέπει να είναι ενδεικτική για να εμφανίζει σημαντική εξουδετέρωση. Οι αραιώσεις ιών γίνονται γενικά με τη χρήση δεκαπλάσιων αραιώσεων. Η αραιώση του σταθεροποιημένου αντιορού, στη δοκιμασία αυτή, επιλέγεται ανάλογα με την ικανότητα σταθεροποίησης του στα 100 TCID₅₀ του ιού καθιστά στον μέγιστο βαθμό ευπαθή.

γ) Σταθερός ιός – Σταθερός αντιορός (σταθερός τίτλος αντισωμάτων)

Μια επιλεγμένη αραιώση του ιού (συνήθως 100 TCID₅₀) αναμιγνύεται με μια επιλεγμένη αραιώση ενός γνωστού αντιορού (συνήθως 20 Ab/0,1ml). Το μίγμα επωάζεται και μετά ενοφθαλμίζεται σε ευαίσθητο υπόστρωμα για την παρατήρηση

του ιού που δεν έχει εξουδετερωθεί. Ο ιός ταυτοποιείται εάν ο αντιορός εξουδετερώνει την ικανότητα μόλυνσης του ιού.

Υλικά

- Ευαίσθητα υποστρώματα κυτταροκαλλιιεργειών
- Υλικό διατήρησης
- Γνωστός θετικός αντιορός (ανενεργοποιημένος στους 56°C για 30 λεπτά και σταθεροποιημένος ώστε να περιέχει 20 Ab/0,1ml)
- Άγνωστος απομονωμένος ιός (προτιτλοποιημένος και σταθεροποιημένος ώστε να περιέχει 100 TCID₅₀/0,1ml).

Μέθοδος

1. 0,5ml του σταθεροποιημένου άγνωστου απομονωμένου ιού αναμιγνύονται με 0,5ml του γνωστού θετικού σταθεροποιημένου θετικού αντιορού.
2. Αραιώνεται ο σταθεροποιημένος ιός (1:10 έως 1:1000).
3. Το μίγμα του ιού – αντιορού επωάζεται στους 37°C για μια ώρα.
4. Ενοφθαλμίζονται τρία σωληνάρια με ευαίσθητες κυτταροκαλλιέργειες με 0,1ml της αραιώσης του σταθεροποιημένου άγνωστου ιού (μη αραιωμένο μέχρι 1:1000). Οι αραιώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες τιτλοποίησης για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας της δοκιμασίας των 100 TCID₅₀.
5. Τρία σωληνάρια με κυτταροκαλλιέργειες που δεν ενοφθαλμίστηκαν χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες.
6. Οι κυτταροκαλλιέργειες επωάζονται στους 33°-37°C σε επικλινή θέση.
7. Γίνεται καθημερινός μικροσκοπικός έλεγχος για εμφάνιση κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Αξιολόγηση

Η απουσία κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων στις κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν με μίγματα ιού – ορού ταυτοποιεί τον απομονωμένο ιό. Το αντίσωμα του ορού μπορεί να προσδιοριστεί με μια αραιώση του ορού – δείγματος η οποία αναμιγνύεται με μια σταθερή δόση γνωστού ιού. Η εξουδετέρωση υποδηλώνει την παρουσία ειδικού αντισώματος.

δ) Μεταβλητός ιός – Μεταβλητός αντιορός (μεταβλητός τίτλος αντισωμάτων)

Ο τύπος αυτός της εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται με προσοχή. Βασικό χαρακτηριστικό του είναι ότι οι τίτλοι ενός γνωστού αντιορού δεν έχουν προσδιοριστεί. Διαφορετικές αραιώσεις ιού και αντιορού παρασκευάζονται, συνδυάζονται, επωάζονται και ενοφθαλμίζονται σε ευπαθές κυτταρικό υπόστρωμα στο οποίο ανιχνεύεται η παρουσία του ιού που δεν έχει εξουδετερωθεί. Η σπουδαιότητα της εν λόγω δοκιμασίας συνίσταται στην παροχή πληθώρας πληροφοριών σχετικά με τον ιό και τον αντιορό. Αν και η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε για τη μελέτη των αποτελεσμάτων εξουδετέρωσης χρησιμοποιείται κυρίως ως διαδικασία ρουτίνας για την τιτλοποίηση του αντιγόνου στη διαδικασία καθήλωσης του συμπληρώματος.

7.5.9 Δοκιμασία εξουδετέρωσης (Nt) – Χρήση αραιώσεων

Η δοκιμασία εξουδετέρωσης για την ταυτοποίηση ιών που ανήκουν σε μεγάλες ομάδες και αποτελούνται από μια ποικιλία οροτύπων μπορεί να διευκολυνθεί με τη χρήση τέτοιων προγραμματισμένων οροτύπων. Μια διαδικασία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο για την ταυτοποίηση των εντεροϊών ονομάζεται προγραμματισμός “διασταυρωμένων ορών”. Κάθε ειδικός αντιορός ενσωματώνεται σε δυο διαφορετικά διαλύματα και η ταυτοποίηση γίνεται με την εμφάνιση εξουδετέρωσης ενός απομονωμένου ιού από 2 διαλύματα που περιέχουν το ίδιο ειδικό αντιορό. Ο ίδιος προγραμματισμός διαλυμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταυτοποίηση των Ρινοϊών και Αδενοϊών.

Τα διαλύματα αντιορών παρασκευάζονται και αφού ελεγχθεί η αντίδραση τους με όλους τους τύπους των ιών για τους οποίους έρχονται δείγματα, αποθηκεύονται καταψυγμένα σε κατάλληλους όγκους. Έτσι, δεν χρειάζονται να παρασκευάζονται νέα διαλύματα για κάθε δοκιμασία εξουδετέρωσης. Κάθε μίγμα ιού-ορού ενοφθαλμίζεται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ώστε ο απομονωμένος ιός να ελέγχεται έναντι του ατομικού αντιορού, ο οποίος εξουδετερώνει τον πρώτο σύμφωνα με τον παραπάνω προγραμματισμό.

Δεν χρησιμοποιούνται παραπάνω από 7 αντιοροί για κάθε διάλυμα, διότι αν συνδυαστούν περισσότεροι αυξάνεται η πιθανότητα ετεροτυπικής αντίδρασης.

Διαδικασία

Ο αντιορός αδρανοποιείται στους 56°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια διανέμεται στα αντίστοιχα διαλύματα. Προστίθεται ισορροπημένο αλατούχο διάλυμα του Hanks έτσι ώστε κάθε ορός να βρίσκεται σε αραιώση 1:50. Αντιορός με μεγαλύτερο τίτλο μπορεί να αραιωθεί περισσότερο. Συνήθως όμως για την ταυτοποίηση των απομονωμένων ιών είναι καλύτερα να χρησιμοποιούνται μεγάλες συγκεντρώσεις αντιορού για την ταυτοποίηση πιθανών αντιγόνων. Αντί να χρησιμοποιηθεί μια αραιώση από κάθε αντιορό, κάθε ορός μπορεί να αραιωθεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχει 50 μονάδες αντισώματος σε διάλυμα. Τα διαλύματα διανέμονται σε όγκους κατάλληλους για δοκιμασία μιας ημέρας και διατηρούνται στους 20°C.

Στη συνέχεια, τα διαλύματα ιών ελέγχονται με ιούς που φέρουν ίδιο ορότυπο. Αυτός ο έλεγχος δίνει μια πλήρη εικόνα ομοτυπικής και ετεροτυπικής εξουδετερωτικής δραστηριότητας των διαλυμάτων κάθε τύπου ιού.

Οι απομονωμένοι ιοί ελέγχονται αραιωμένοι 1x10 στη 2^η αν είναι ελαφρώς κυτταροπαθογόνοι έναντι των διαλυμάτων των αντιορών. Η αραιώση του ιού παρασκευάζεται με ισορροπημένου αλατούχο διάλυμα του Hanks.

0,15ml απομονωμένου ιού προστίθενται σε 0,5ml διαλύματος ορού και μετά από περίοδο επώασης 1h σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C κάθε μίγμα ιού-ορού ενοφθαλμίζεται σε όγκο 0,2ml σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας.

Η αραιώση του ιού (0,1ml) ενοφθαλμίζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα ως “έλεγχος” για να προσδιοριστεί αρκετή δόση κυτταροπαθογόνου ιού. Είναι προτιμότερο να παρασκευαστούν δεκαδικές λογαριθμικές αραιώσεις από την αραιώση του προς έλεγχο ιού. Αυτές ενοφθαλμίζονται σε 2-4 κυτταροκαλλιέργειες για να προσδιοριστεί η δόση του ιού στη δοκιμασία με ακρίβεια.

Οι ενοφθαλμισμένες καλλιέργειες επωάζονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες και εξετάζονται σε μικροσκόπια σε διάστημα 7 ημερών. Οι έλεγχοι θεωρούνται ικανοποιητικοί αν οι κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν μόνο με ιό παρουσιάζουν πλήρη ή σχεδόν πλήρη εκφυλισμό στο τέλος της περιόδου επώασης.

Αν η εξουδετέρωση του απομονωμένου ιού εμφανίζεται σε δυο διαλύματα, η ταυτοποίηση γίνεται με έλεγχο του απομονωμένου ιού έναντι του ατομικού αντιορού που βρίσκεται σε δυο διαλύματα.

Η μείωση πλακών είναι πολύ ευαίσθητος δείκτης εμφάνισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Τα μίγματα ιού-ορού, αφού επωαστούν για ορισμένο χρονικό διάστημα, ενοφθαλμίζονται για 1 ½ ώρα στους 36-37°C για να προσροφηθεί ο ιός. Στη συνέχεια

οι μονοστοιβάδες πλένονται με ισορροπημένο αλατούχο διάλυμα του Hanks και τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει στερεοποιητικό παράγοντα. Μετά από κατάλληλη περίοδο επώασης στους 36-37°C οι πλάκες βάφονται με την χρωστική ουδέτερο του ερυθρού εκτός αν απομακρυνθεί το υπόστρωμα οπότε τα κύτταρα βάφονται με τις κατάλληλες χρώσεις.

Η εξουδετερωτική ικανότητα του ορού δείγματος προσδιορίζεται από την ικανότητα του να μειώνει τον αριθμό πλακών του ιού σε σύγκριση με τον αριθμό των πλακών που εμφανίζονται στις κυτταροκαλλιέργειες μάρτυρες που ενοφθαλμίστηκαν με ιό και διαλύτη. Σε ορισμένα συστήματα, μείωση των πλακών σε ποσοστό 80% θεωρείται σημαντική, ενώ σε άλλα ένα ποσοστό μείωσης πλακών 50 θεωρείται ως τελικό σημείο της δοκιμασίας εξουδετέρωσης.

Για την αντιγονική ανάλυση ορισμένων ιών, ο αντιορός ενσωματώνεται στο υπόστρωμα σε διάφορες συγκεντρώσεις και ο ιός είτε ενοφθαλμίζεται σε μονοστοιβάδες πριν από την τοποθέτηση του στο υπόστρωμα είτε σε δίσκους με 100 μονάδες δημιουργίας πλακών του ιού τοποθετούνται πάνω τους άγαρ. Τα ετερόλογα είδη σε υψηλές συγκεντρώσεις ορού παράγουν πλάκες.^[15]

7.5.10 Δοκιμασία μικροεξουδετέρωσης σε καλλιέργειες

Είναι δοκιμασίες μικροεξουδετέρωσης που πραγματοποιούνται με κυτταροκαλλιέργειες σε πηγαδάκια πλακών μικροτιτλοποίησης όσον αφορά τις κυτταροκαλλιέργειες και τα αντιδραστήρια. Επίσης απαιτούν λιγότερο χώρο επώασης, είναι ευκολότερες στην εκτέλεση και στο διάβασμα, συγκριτικά με τις δοκιμασίες που γίνονται σε σωλήνες κυτταροκαλλιεργειών. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνίσταται η χρήση πλακών ειδικά κατασκευασμένων για κυτταροκαλλιέργειες καθώς άλλες πλάκες μπορεί να μην αποδειχθούν κατάλληλες για την ανάπτυξη των κυτταροκαλλιεργειών.

Οι κυτταρικές μονοστοιβάδες ετοιμάζονται πριν ενοφθαλμισθούν με ιό και με μίγματα ορού-ιού, όμως είναι προτιμότερη η ταυτόχρονη πρόσθεση κυττάρων, ορού και ιού. Σε αυτή την τελευταία περίπτωση, ο εξουδετερωποιημένος ιός εκφυλίζει τα κύτταρα με αποτέλεσμα να μην σχηματίζονται μονοστοιβάδες. Το τελικό σημείο βασίζεται στην μικροσκοπική παρατήρηση της λογικής των κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων ή οι δοκιμασίες βασίζονται σε αναστολή του μεταβολισμού οπότε τα αποτελέσματα διαβάζονται χρωματομετρικά.

7.5.11 Δοκιμασίες σε προπαρασκευασμένες κυτταρικές μονοστοιβάδες

Οι δοκιμασίες μικροεξουδετέρωσης που πραγματοποιούνται σε προετοιμασμένες κυτταρικές μονοστοιβάδες είναι επίπονες. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως απαιτείται η εκτέλεση τους. Μερικοί υπεράνοσοι ζωικοί οροί περιέχουν αντισώματα για το υπόστρωμα ή τοξικές ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη κυττάρων σε μονοστοιβάδες. Όμως, τέτοιοι οροί, μπορούν γενικά να χρησιμοποιηθούν στις δοκιμασίες, με προπαρασκευασμένες κυτταρικές μονοστοιβάδες. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση απομόνωσης ιού με διασταυρωμένα διαλύματα ορού στις δοκιμασίες μικροεξουδετέρωσης ή για τη δοκιμασία άλλων ορών που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά στις δοκιμασίες μικροεξουδετέρωσης με βάση την ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία του ορού δοκιμασίας.

Οι πλάκες μικροτιτλοποίησης αυξάνουν την ακρίβεια της εκτέλεσης και της ανάγνωσης του αποτελέσματος της δοκιμασίας. Επίσης ελαττώνουν το χρόνο που απαιτείται για την εκτέλεση της δοκιμασίας.

Οι δοκιμασίες εκτελούνται σε πηγαδάκια αποστειρωμένων πλακών μικροτιτλοποίησης για κυτταροκαλλιέργειες και καλύπτονται με αποστειρωμένα καλύμματα.

Για τις δοκιμασίες χρησιμοποιούνται νεφρικά κύτταρα πιθήκου. Τα κύτταρα αποδιοργανώνονται με διάλυμα θρυψίνης. Τα κύτταρα αυτά αραιώνονται σε συγκέντρωση 150.000-200.000 κύτταρα/ml στο ακόλουθο υλικό ανάπτυξης :

- Ορός μόσχου 10%
- Υλικό ανάπτυξης 90%
- Αντιβιοτικά

Τα εναιωρήματα κυττάρων διανέμονται σε πηγαδάκια ανά 0,2ml και οι κυτταροκαλλιέργειες επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C με ατμοσφαιρικό CO₂ έως ότου σχηματιστεί κυτταρική μονοστοιβάδα. Στη συνέχεια αφαιρείται το υλικό ανάπτυξης και προστίθεται υλικό για τη διατήρηση των κυττάρων σε διαφορετικά ποσοστά.

Στο υλικό διατήρησης ετοιμάζονται διαλύματα ορού (αδρανοποιημένου στους 56°C για 30 λεπτά) και ιού. Οι μικροπλάκες επωάζονται στους 37°C μέχρι έως ότου ο μάρτυρας ιός δείξει ότι η επιθυμητή δόση ιού βρίσκεται στο σύστημα της δοκιμασίας.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ελέγχονται με ανάστροφο μικροσκόπιο για παρουσία κυτταροπαθολογικών αλλοιώσεων.

7.5.12 Εξουδετέρωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων

Τα φυσιολογικά κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας μεταβολίζουν τη γλυκόζη παράγοντας οξύ το οποίο με τη σειρά του προκαλεί μεταβολή της χροιάς του δείκτη στο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιβάλλει την κυτταροκαλλιέργεια. Η δραστηριότητα αυτή αναστέλλεται μετά την προσβολή των κυττάρων από κάποιο ιό. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί τη βάση της ευαίσθητης αλλά κοπιώδους ποσοτικής δοκιμής εναιωρημάτων ιών και αντι-ϊκών αντισωμάτων.

7.6 Δοκιμή Σύνδεσης του Συμπληρώματος

Μετά την ανακάλυψη της από τον Wasserman το 1909, η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στον ορολογικό έλεγχο για τη σύφιλη, ενώ χρειάστηκε να περάσουν αρκετές δεκαετίες για την εφαρμογή της στη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων (ερπητοϊοί, αδενοϊοί κ.ά.). Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος είναι ορολογική διαγνωστική μέθοδος, η οποία ανιχνεύει αντισώματα ή αντιγόνα στον ορό ασθενούς και βασίζεται στην χρήση του συμπληρώματος. Το συμπλήρωμα αποτελεί μέρος του ανοσιακού συστήματος και ονομάζεται έτσι γιατί συμπληρώνει τους μηχανισμούς της χυμικής ανοσίας. Είναι το πολυπλοκότερο από τα λεγόμενα συστήματα ενεργοποίησης, περιλαμβάνει ένα σύνολο διαλυτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών και βρίσκεται φυσιολογικά στον ορό του αίματος των ζώων.

Η δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος είναι οικονομική μέθοδος, με δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού ικών αντιγόνων. Παρόλα αυτά, είναι χρονοβόρα και με χαμηλή ειδικότητα. Τα τελευταία χρόνια έχει αντικατασταθεί με πιο γρήγορες και ευαίσθητες τεχνικές, όπως οι RIA και ELISA.

7.6.1 Αρχή της μεθόδου

Η φύση του συμπληρώματος είναι τέτοια ώστε να μην μπορεί να αντιδράσει μεμονωμένα με ένα αντιγόνο ή ένα αντίσωμα αλλά μόνο με ανοσοσύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος. Η σύνδεση αυτή όμως δεν είναι ορατή και για αυτό στη δοκιμασία σύνδεσης του συμπληρώματος χρησιμοποιείται ένα σύστημα δεικτών. Το σύστημα αυτό αποτελείται από ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου και ορό ζώου που

περιέχει αντισώματα προς τα ερυθρά αυτά. Ο αντιπροβάτειος ορός έχει την ιδιότητα να αιμολύει τα ερυθρά του προβάτου με την παρουσία συμπληρώματος. Εάν το υπό εξέταση δείγμα δεν περιέχει αντισώματα έναντι κάποιου ιού, το συμπλήρωμα θα παραμείνει ελεύθερο και θα αιμολύσει τα ερυθρά (αρνητική αντίδραση). Στην αντίθετη περίπτωση, το συμπλήρωμα θα δεσμευτεί από το σύμπλεγμα αντιγόνου – αντισώματος και δεν θα προκαλέσει αιμόλυση (θετική αντίδραση).^[6]

7.6.2 Εκτέλεση της αντίδρασης – πρωτόκολλο

Πριν τη δοκιμασία, οι οροί των ασθενών αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά (για την απενεργοποίηση του φυσιολογικού συμπληρώματος) και γίνονται αραιώσεις. Η αντίδραση γίνεται σε δυο φάσεις :

- **1^η φάση**
 - Προσθήκη αντιγόνου
 - Προσθήκη τιτλοποιημένου συμπληρώματος εμπορίου
 - Επώαση για 16-20 ώρες στους 4°C

- **2^η φάση**
 - Προσθήκη ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου και αντιπροβάτειου ορού
 - Επώαση για 15 λεπτά
 - Έλεγχος αιμόλυσης

7.6.3 Τιτλοδότηση του αντιγόνου και των αντισωμάτων

Αντιγόνο σε αραιώσεις διαλυμάτων των 1:2 έως 1:512 τιτλοδοτείται παρουσία θετικού ορού μάρτυρα. Οι ακόλουθοι έλεγχοι είναι απαραίτητοι :

1. Έλεγχος αντιγόνου – αντιγόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, συμπλήρωμα και ευαισθησία
2. Έλεγχος αντισωμάτων – αντιγόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, συμπλήρωμα και ευαισθησία

Η ιδανική δόση αντιγόνου είναι η μεγαλύτερη αραιώση αυτού η οποία θα μπορεί να δεσμεύει τουλάχιστον 75% της ανάλογης αραιώσης του αντισώματος.

Θα πρέπει να εκτελεστούν οι ακόλουθοι έλεγχοι :

1. Έλεγχος ορού : ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει οποιαδήποτε αντισυμπληρωματική δράση στον ορό.
2. Συμπλήρωση επανατιτλοδότησης : για να ελέγξουμε ότι το συμπλήρωμα χρησιμοποιείται στη σωστή ποσότητα
3. Κυτταρικός έλεγχος : ώστε να διαπιστωθεί η καταλληλότητα των κυττάρων.

Όλοι οι έλεγχοι θα πρέπει να δείξουν ολοκληρωτική αιμόλυση. Η υψηλότερη αραιώση του ορού του ασθενή η οποία εμφανίζει δείκτη 3 ή 4 στη μικροπλάκα, είναι ο τίτλος της σύνδεσης του συμπληρώματος. Η διάγνωση μιας πρόσφατης μόλυνσης γίνεται συνήθως από της ανίχνευση μιας τετραπλής ή μεγαλύτερης αύξησης στον τίτλο ή από την ανίχνευση ενός υψηλού τίτλου αντισωμάτων από ένα ενιαίο δείγμα.

7.6.4 Τιτλοδότηση του αιμολυτικού ορού και του συμπληρώματος

Προετοιμάζονται διαλύματα του συμπληρώματος σε αραιώση 1:30 έως 1:240 με διαφορά συγκέντρωσης 20%. Ακολουθεί η προετοιμασία του αιμολυτικού ορού στις ακόλουθες αραιώσεις :

1:400, 1:800, 1:1600, 1:2000, 1:2400, 1:2800, 1:3200

Οι ακόλουθοι έλεγχοι είναι απαραίτητοι :

1. Έλεγχος κυττάρων – μη ευαίσθητα κύτταρα μόνο
2. Έλεγχος συμπληρώματος – συμπλήρωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και κύτταρα μη ευαίσθητα σε αυτό
3. Αιμολυτικός ορός – μόνο ευαίσθητα κύτταρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αιμολυτικού ορού.

Η ιδανική συγκέντρωση ευαισθητοποιημένου αιμολυτικού ορού είναι το διάλυμα το οποίο δίνει τη μέγιστη αιμόλυση παρουσία υψηλής συγκέντρωσης συμπληρώματος. Μια αιμολυτική δόση συμπληρώματος είναι το διάλυμα το οποίο δίνει 50% λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ευαισθητοποιημένο αιμολυτικό ορό του ευαισθητοποιημένου αιμολυτικού ορού. 3 αιμολυτικές δόσεις συμπληρώματος HD₅₀. Χρησιμοποιούνται για την δοκιμασία σύνδεσης του συμπληρώματος.

7.6.5 Αξιολόγηση

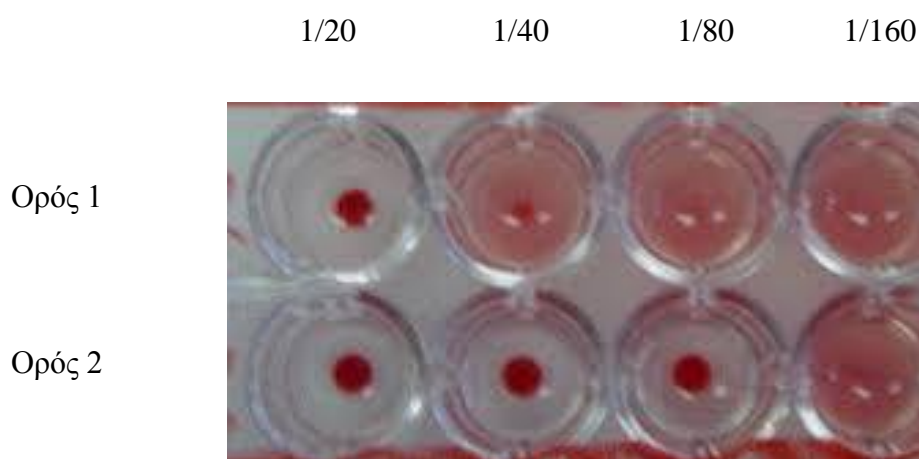
Θετική αντίδραση

Εάν στον εξεταζόμενο ορό υπάρχουν αντισώματα, θα ενωθούν με το αντιγόνο και θα συνδέσουν το συμπλήρωμα. Συνεπώς, όταν στη δεύτερη φάση προσθέσουμε το αιμολυτικό σύστημα, δεν θα υπάρχει ελεύθερο συμπλήρωμα για να προκαλέσει αιμόλυση.

Αρνητική αντίδραση

Εάν στον εξεταζόμενο ορό δεν υπάρχουν αντισώματα, το αντιγόνο δεν θα συνδεθεί με το συμπλήρωμα. Συνεπώς, όταν στη δεύτερη φάση προσθέσουμε το αιμολυτικό σύστημα, το ελεύθερο συμπλήρωμα θα προκαλέσει αιμόλυση.

Για ασφαλή ερμηνεία των ευρημάτων θα πρέπει να εξετάζονται δυο διαφορετικά δείγματα ορών, τα οποία λαμβάνονται σε απόσταση μιας έως δυο εβδομάδων. Η αύξηση του τίτλου τουλάχιστον κατά το 4πλάσιο σε 2 διαφορετικά, παράλληλα εξεταζόμενα δείγματα ορού ισχύει, θεωρείται αποδεικτικό οξείας λοίμωξης.



Εικόνα 21 : Δοκιμή σύνδεσης συμπληρώματος με δυο ορούς και αύξηση του τίτλου κατά 4πλάσιο στα 2 διαφορετικά εξεταζόμενα δείγματα. ^[41]

7.6.6 Δοκιμασία σύνδεσης του συμπληρώματος σε μικροπλάκα.

Οι σειρές 1 και 2 περιέχουν ορούς οξείας και αναρρωτικής φάσης αντίστοιχα (χρησιμοποιήθηκαν υποδιπλάσιες αραιώσεις). Η 4πλάσια αύξηση που παρατηρείται είναι σημαντική και δηλώνει μόλυνση.

Πλεονεκτήματα της δοκιμής σύνδεσης του συμπληρώματος

1. Δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού ικών αλλά και βακτηριακών μολύνσεων συγχρόνως.
2. Οικονομική μέθοδος

Μειονεκτήματα της δοκιμής σύνδεσης του συμπληρώματος

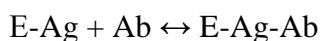
1. Μειωμένη ευαισθησία –δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανοσολογικό έλεγχο.
2. Χρονοβόρα και επίπονη.
3. Συχνά μη ειδική

7.7 Ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA ή EIA βρίσκει σημαντική εφαρμογή στο διαγνωστικό εργαστήριο Ιολογίας από την δεκαετία του 1960 με βελτιώσεις και παραλλαγές της μεθόδου να εμφανίζονται σχεδόν σε ετήσια βάση, ειδικά στον τομέα των εμπορικών παρασκευασμάτων λόγω, αφενός του χρόνου που απαιτείται για την εκτέλεση της μεθόδου και αφετέρου στην αρκετά ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα που παρέχει. Ως ταχεία τεχνική αρχικού ελέγχου των κλινικών δειγμάτων για μια σειρά από ιογενείς λοιμώξεις, η ELISA συνεισφέρει στον έγκαιρο εντοπισμό θετικών δειγμάτων και στην περαιτέρω διερεύνηση αυτών με τεχνικές καλλιέργειας. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ειδικού αντιγόνου ή αντισώματος σε διάφορα κλινικά δείγματα με την βοήθεια ενζύμου ανιχνευτή όπως η υπεροξειδάση ή η αλκαλική φωσφατάση. Με την προσθήκη δευτερογενούς σημασμένου με ένζυμο αντισώματος, κατόπιν αρχικής προσθήκης μονοκλωνικού αντισώματος επιτυγχάνεται η ανίχνευση των ειδικών μορίων. Η ELISA εφαρμόζεται στην ανίχνευση αντιγόνων του ιού απ' ευθείας στο κλινικό δείγμα ή κατόπιν καλλιέργειας ή στην αναζήτηση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του ιού σε δείγμα ορού. Επίσης, εφαρμόζεται σε συνδυασμό με μοριακή τεχνική όπως η PCR. Η ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου σε συνάρτηση με το χαμηλό κόστος της την κατατάσσουν ως μια από τις πλέον διαδεδομένες εργαστηριακές μεθόδους στην ιολογία.

7.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου ELISA στηρίζεται στην ειδική αναγνώριση αντιγόνου ή αντισώματος *in vitro* με τη βοήθεια ενός ενζύμου. Η απλούστερη μορφή της δοκιμασίας είναι η ανταγωνιστικού τύπου τεχνική, όπου το ένζυμο (E) χρησιμοποιείται σε σύζευξη με το Ag (E-Ag), το οποίο με την προσθήκη Ab αντιδρά με αυτό :



Η ενζυμική δραστηριότητα ανιχνεύεται με την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος μετά την προσθήκη κατάλληλου δείκτη του ενζύμου. Στην αντίδραση η ποσότητα του παραγόμενου έγχρωμου προϊόντος είναι ανάλογη προς την αρχική συγκέντρωση του ειδικού Ag ή Ab. Οι δοκιμασίες ELISA ετερογενούς τύπου περιλαμβάνουν τις ανταγωνιστικές και τις μη-ανταγωνιστικές ELISA. Οι ανταγωνιστικές ELISA χαρακτηρίζονται από τον ανταγωνισμό μεταξύ του προς προσδιορισμό αντιγόνου (ή αντισώματος) και της σταθερής ποσότητας αντιγόνου (ή αντισώματος) που έχει σημανθεί με ένζυμο, για συγκεκριμένο αριθμό θέσεων πρόσδεσης επάνω στο ακινητοποιημένο αντίσωμα (ή αντιγόνο). Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υπό ανίχνευση αντιγόνου ή αντισώματος.

Η επιτυχία της ELISA εξαρτάται από τους εξής παράγοντες :

1. το αντιδραστήριο που ακινητοποιείται στο στερεό υπόστρωμα
2. το μονοκλωνικό αντίσωμα που επιλέγεται
3. την παρασκευή του συζεύγματος
4. το σύζευγμα και το δείκτη του ενζύμου
5. τον τρόπο ανίχνευσης του τελικού προϊόντος

Η ακινητοποίηση του αντιγόνου ή του αντισώματος σε στερεό υπόστρωμα μπορεί να γίνει με προσκόλληση σε σφαιρίδια αγαρόζης, κυτταρίνης ή πολυακρυλαμίδης με χημικό δεσμό ή με φυσική προσρόφηση σε πλαστικές επιφάνειες. Ο εύκολος χειρισμός των πλαστικών υλικών, η απλότητα της διαδικασίας προσρόφησης και η χρήση μικροπλακών επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλη κλίμακα. Το μοναδικό ίσως μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι διαφορές προσρόφησης του αντιδραστήριου στις διαφορετικές πλαστικές επιφάνειες. Η δυσκολία αυτή αντιμετωπίζεται με τη χρήση απορρυπαντικών σε συνδυασμό με πρωτεΐνες για τον περιορισμό της μη-ειδικής προσρόφησης κατά τη διάρκεια των επώασεων.^[10]

Η ποιότητα του μονοκλωνικού αντισώματος είναι σημαντική παράμετρος στην ευαισθησία και ειδικότητα της ELISA. Τα ένζυμα επιτρέπουν, αναλόγως του υποστρώματος, τη χρήση διαφόρων μεθόδων ανίχνευσης και μέτρησης του τελικού προϊόντος όπως μέτρηση με φωταύγεια, φθορισμομετρία και χρωματομετρία. Παρά τη μεγάλη ευαισθησία που μπορούν να προσφέρουν οι μέθοδοι ανίχνευσης με φθορισμό ή φωταύγεια, οι χρωματομετρικές ανοσοενζυμικές μέθοδοι είναι πιο διαδεδομένες, λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που προσφέρουν, όπως η οπτική και γρήγορη εκτίμηση των αποτελεσμάτων, η φωτομέτρηση σε ελάχιστο χρόνο και η σταθερότητα για αρκετό χρονικό διάστημα του έγχρωμου προϊόντος μετά τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης.

7.7.2 Υλικά και Μέθοδοι

Πλάκες πολυστυρενίου ELISA 96 κοιλοτήτων με επιστρωμένο ειδικό αντιγόνο της νουκλεοπρωτεΐνης ιών γρίπης τύπου A.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, ως αραιωτικό διάλυμα. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, ως διάλυμα έκλυσης. Αρνητικός μάρτυρας, θετικός μάρτυρας, μονοκλωνικό αντίσωμα, μονοκλωνικό αντίσωμα σημασμένο με βιοτίνη, αβιδίνη περοξειδάση ως σύζευξη, υπόστρωμα (H_2O_2), 3N HCl ως διάλυμα τερματισμού.

7.7.3 Πρωτόκολλο

1. Προσθήκη 100μl από το διάλυμα που περιέχει ιό γρίπης γνωστού τίτλου ή από δείγμα ορού ο οποίος έχει επωστεί στους 56°C για 30 λεπτά σε κάθε κοιλοότητα ή πηγαδάκι της μικροπλάκας.
2. Προσθήκη 100μl αρνητικό και θετικού μάρτυρα.
3. Επώαση στους 37°C για 60 λεπτά.
4. Πλύσιμο των πλακών 4-5 φορές για 30sec με 100μl πλυστικό διάλυμα.
5. Προσθήκη 100μl ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος αραιωμένο 1/1250.
6. Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.
7. Πλύσιμο των πλακών 4-5 φορές για 30sec με 100μl πλυστικό διάλυμα.
8. Προσθήκη 100μl δευτερογενούς αντισώματος σημασμένο με βιοτίνη και αραιωμένο 1/4000 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με 1% αλβουμίνη βόειου ορού και 0,1% Tween-20.
9. Επώαση στους 37°C για 45 λεπτά.

10. Πλύσιμο πλακών 4-5 φορές για 30sec με 100ml πλυστικό διάλυμα.
11. Προσθήκη 100ml συζυγή αβιδίνη αραιωμένη 1/5000 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων με 1% αλβουμίνη βόειου ορού και 0,1% Tween-20.
12. Επώαση στους 37°C για 10 λεπτά.
13. Πλύσιμο 4-5 φορές για 30sec με 100ml πλυστικό διάλυμα.
14. Προσθήκη 100ml υποστρώματος, επώαση στο σκοτάδι για 10-15 λεπτά.
15. Προσθήκη 100ml 3N HCl (διάλυμα τερματισμού) στο υπόστρωμα.
16. Φωτομέτρηση στα 492/630nm και καταγραφή των αποτελεσμάτων.

7.7.4 Αναμενόμενα αποτελέσματα-ερμηνεία

Τα δείγματα με υψηλό τίτλο αντισωμάτων έναντι του ιού, λαμβάνονται ως θετικά και αυτά με χαμηλό ως αρνητικά. Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων γίνεται βάση απλής μαθηματικής πράξης.

7.8 Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός αποτελεί μια κλασική, ταχεία μέθοδο ανίχνευσης αντιγόνων του ιού σε κλινικά δείγματα. Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού είναι δυνατή η ταυτοποίηση συγκεκριμένου ιού απ'ευθείας στο κλινικό δείγμα και κατόπιν καλλιέργειας σε κυτταρικές σειρές ή εμβρυοφόρα αυγά. Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού προσφέρει άριστη ειδικότητα και ικανοποιητική ευαισθησία στη διάγνωση των ιογενών λοιμώξεων. Η μέθοδος καθιερώθηκε από τον Albert H. Coons και τους συνεργάτες του με την ανακάλυψη και εφαρμογή της τεχνικής των φθορίζοντων αντισωμάτων. Ορισμένες φθορίζουσες ουσίες όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη και η ροδαμίνη, αντιδρούν χημικά με ειδικά μόρια, καθιστώντας τα ειδικά μόρια ορατά μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας του μικροσκοπίου φθορισμού. Όταν τέτοιες χρωστικές συζευχτούν με μόρια ανοσοσφαιρινών, τότε έχουμε σημασμένα αντισώματα με την ικανότητα να εντοπίζουν το ειδικό αντιγόνο λόγω της υψηλής ειδικότητας της αντίδρασης αντιγόνου-αντισώματος. Ο Albert H. Coons και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την ειδική αντίδραση σημασμένου με φθορίζουσα ουσία αντισώματος για την ανίχνευση ιικών αντιγόνων *in situ*. Με διάφορες παραλλαγές, η τεχνική του ανοσοφθορισμού βρίσκει εφαρμογή στη βασική βιολογική και βιο-ιατρική έρευνα, όπως στη μελέτη της δομής και λειτουργίας του κυττάρου και στη διαγνωστική ιολογία καθώς είναι η απλούστερη μέθοδος ανίχνευσης και ταυτοποίησης ιών διαφόρων ζώων. Ο ανοσοφθορισμός εφαρμόζεται

στο ιολογικό εργαστήριο ως ταχεία μέθοδος ανίχνευσης ιϊκών στελεχών στο κλινικό δείγμα καθώς και ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων IgG ή IgA ή IgM στον ορό του ασθενούς έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων ενός ιού. Περαιτέρω, ο ανοσοφθορισμός μπορεί να εφαρμοστεί στη διάγνωση μικροβίων, καρκινικών αντιγόνων και άλλων μορίων με βιοϊατρικό ενδιαφέρον.^[5]

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ειδικού δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με φθορίζουσα ουσία-μόριο, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη, προς ανίχνευση της πρωτογενούς αντίδρασης αντιγόνου-μονοκλωνικού αντισώματος στο υπό έλεγχο κλινικό δείγμα ή κυτταρικό υπόστρωμα. Η μέθοδος διακρίνεται σε άμεσο και έμμεσο ανοσοφθορισμό. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός προσφέρει επιπλέον ευαισθησία λόγω της αντίδρασης περισσότερων δευτερογενών αντισωμάτων σημασμένων με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη ανά αντιγονική περιοχή. Στην περίπτωση ελέγχου τίτλου αντισωμάτων, χρησιμοποιείται αποκλειστικά η μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Σε κάθε περίπτωση, η παρουσία ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων (μολυσμένων και μη-μολυσμένων) είναι απαραίτητη για τη δυνατότητα ανίχνευσης-ταυτοποίησης του υπό αναζήτηση ιού με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

7.8.1 Ανίχνευση ιϊκών αντιγόνων

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόζεται στην ανίχνευση-ταυτοποίηση πολλών λοιμογόνων ιών του αναπνευστικού όπως η γρίπη Α των πτηνών και οι αδενοϊοί. Τα βρογχικά εκπλύματα είναι πλέον κατάλληλα κλινικά δείγματα για χρήση στη δοκιμασία του ανοσοφθορισμού διότι περιέχουν αυξημένο αριθμό κυττάρων. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόζεται στη διάγνωση λοιμώξεων από τους ερπητοϊούς HSV, VZV και CMV.

7.8.2 Σκοπός

Ανίχνευση αντιγόνων ιού γρίπης κατόπιν καλλιέργειας σε κύτταρα MDCK.

Υλικά

- Κύτταρα MDCK σε κοιλότητες καλλιέργειας shell-vial.
- Υλικό καλλιέργειας και ορός που περιέχει αυξητικούς παράγοντες για τη διαίρεση των κυττάρων.

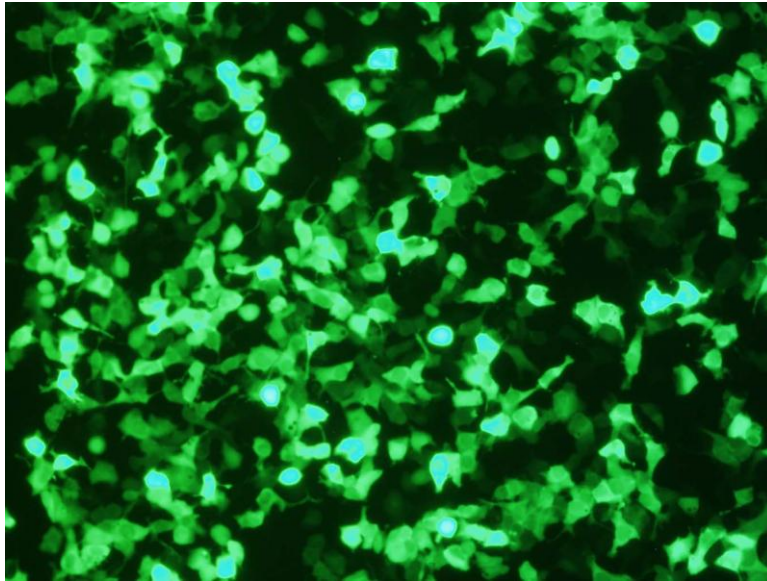
- Βρογχικά εκπλύματα σε φυσιολογικό ορό ή υλικό καλλιέργειας.
- Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της νουκλεοπρωτεΐνης του ιού της γρίπης τύπου Β σε αραιώση 1:1000.
- Δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με ισοθιοκυανική φλουορεσκεΐνη.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων σε αραιώση 1x.
- Tween-20
- Μεθανόλη
- Evans blue χρωστική
- Επωαστικός κλίβανος
- Μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού

Μέθοδος

- Γίνεται επεξεργασία και σπορά των κλινικών δειγμάτων (75μl) εις διπλούν σε πλήρη μονοστοιβάδα κυττάρων MDCK.
- Προσθήκη θετικών και αρνητικών δειγμάτων (100μl).
- Τα κύτταρα επωάζονται στους 35°C για 48-72 ώρες.
- Η δοκιμασία της αιμοσυγκόλλησης συνιστάται στο υπερκείμενο κάθε 24-48 ώρες.
- Κατόπιν επώασης, τα κύτταρα μονομοποιούνται με 500μl μεθανόλης ή ακετόνης στους -20°C για 20 λεπτά.
- Στεγνώνουμε τα κύτταρα και προσθέτουμε 500μl μονοκλωνικό αντίσωμα σε 1XPBS, αραιώση 1:80.
- Επώαση στους 37°C για 60 λεπτά.
- Πλύσιμο 3x με 300μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων –Tween.
- Στέγνωμα των κυττάρων και παρατήρηση στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού σε μεγέθυνση 400x.

7.8.3 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα κύτταρα που περιέχουν ιό ή αντιγόνα του ιού δίνουν ειδικό φθορισμό “πράσινο μήλο” (εικόνα). Μόλυνση κυττάρων MDCK με ιό γρίπης τύπου Β. Ανάλογα με το στάδιο αναπαραγωγής του ιού στο μολυσματικό κύκλο ζωής του, παρατηρούμε φθορισμό σε διαφορετικά σημεία του κυττάρου.



Εικόνα 22 : Μέθοδος του ανοσοφθορισμού όπου τα κύτταρα που περιέχουν ιό ή αντιγόνα του ιού δίνουν ειδικό φθορισμό “πράσινο μήλο”. [42]

7.9 Ραδιοανοσοδοκιμασία

Η τεχνική της ραδιοανοσοδοκιμασίας έχει φέρει επανάσταση στο χώρο της κλινικής έρευνας. Η τεχνική αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε το 1960 από τους Berson και Yalow ως μέθοδος εξακρίβωσης της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στον ορό του αίματος. Ήταν η πρώτη φορά όπου γινόταν ανίχνευση των επιπέδων ορμόνης στο αίμα με μια *in vitro* μέθοδο. Η μέθοδος της ραδιοανοσοδοκιμασίας στηρίζεται στον ανταγωνισμό ενός ραδιενεργά επισημασμένου και ενός μη επισημασμένου ή “ψυχρού” αντιγόνου για την δέσμευση ειδικών αντισωμάτων σε περιορισμένη, ως προς το αντιγόνο, συγκέντρωση. Το ψυχρό αντιγόνο και το ειδικό αντίσωμα αντιδρούν και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο :



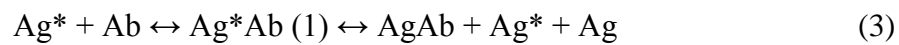
Στην αντίδραση (1) τα Ag, Ab και AgAb συμβολίζουν το αντιγόνο, το αντίσωμα και το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος αντίστοιχα.

Η ίδια αντίδραση γίνεται και όταν το αντιγόνο είναι επισημασμένο με κάποιο ραδιενεργό ισότοπο (Ag*).

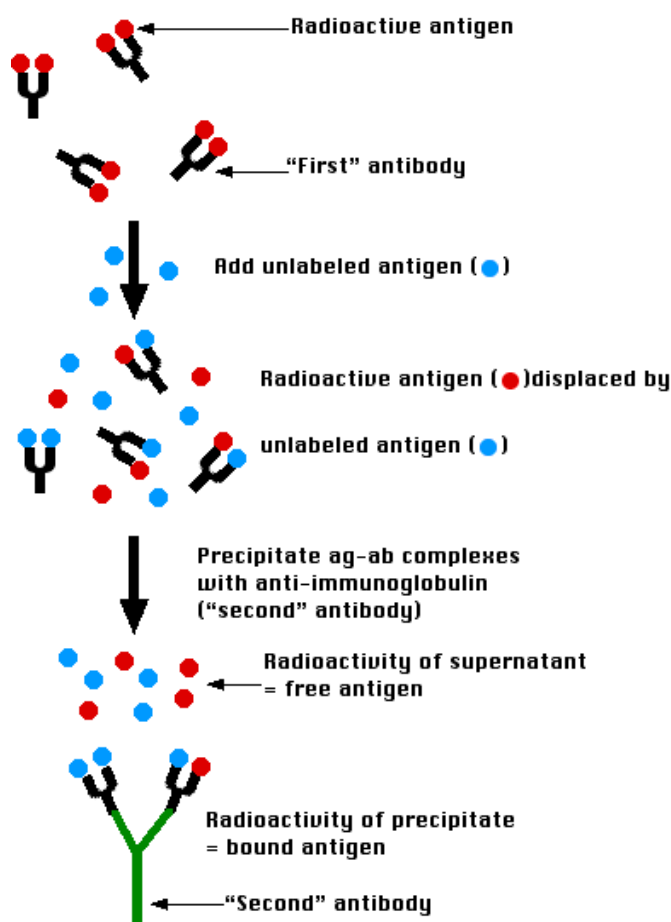


Στην περίπτωση αυτή το σύμπλοκο που σχηματίζεται είναι ραδιοϊχνηθετημένο. Με την προσθήκη ψυχρού αντιγόνου στην αντίδραση (2) δημιουργείται ανταγωνισμός

ανάμεσα στο μη ιχνηθετημένο και στο ιχνηθετημένο αντιγόνα για τα δεσμευτικά κέντρα του αντισώματος, όταν το τελευταίο βρίσκεται σε περιορισμένη συγκέντρωση.



Σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ψυχρού αντιγόνου θα σχηματίζεται μεγάλη, αναλογικά, ποσότητα ραδιενεργού αντιγόνου σε ελεύθερη μορφή, λόγω της ανταγωνιστικής εκτόπισης του ραδιενεργού από το ψυχρό αντιγόνο. Το αντίθετο θα ισχύει όταν η συγκέντρωση ψυχρού αντιγόνου είναι σχετικά χαμηλή.



Εικόνα 23: Αρχή της μεθόδου της ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA). Αντίδραση ιχνηθετημένου ή σημασμένου (ραδιενεργού) αντιγόνου με ειδικό αντίσωμα ή αντιγόνο. ^[43]

Το σύμπλοκο Ag-Ab διαχωρίζεται από το ελεύθερο αντιγόνο και γίνεται μέτρηση της ραδιενέργειας στο καθένα από αυτά.

Οι ανωτέρω μετρήσεις μπορεί να παρουσιαστούν σε μορφή καμπύλης, δηλαδή η συγκέντρωση ραδιενέργειας του συμπλόκου ιχνηθέτη-αντισώματος (•---•) και της ραδιενέργειας του ελεύθερου ιχνηθέτη (o---o) συναρτήσει της συγκέντρωσης ψυχρού αντιγόνου. Η ολική ραδιενέργεια σε όλες τις περιπτώσεις παραμένει σταθερή και ίση με το άθροισμα της ραδιενέργειας των δυο μορφών του ιχνηθέτη.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μπορεί να ειπωθεί ότι οι ραδιοανοσοαναλυτές βασίζονται στην παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ιχνηθετημένου αντιγόνου στο ειδικό αντίσωμα, την οποία λόγω ανταγωνισμού, προκαλεί το μη επισημασμένο αντιγόνο. Σε ένα σύστημα ραδιοανάλυσης το ψυχρό αντιγόνο αντιπροσωπεύουν τα πρότυπα διαλύματα και το άγνωστο δείγμα. Η συγκέντρωση του αντιγόνου σε ένα άγνωστο δείγμα προσδιορίζεται συγκρίνοντας το βαθμό παρεμπόδισης (της πρόσδεσης του ιχνηθέτη στο αντίσωμα) που οφείλεται στην άγνωστη αυτή συγκέντρωση ψυχρού αντιγόνου, με τους βαθμούς παρεμπόδισης που οφείλονται στις γνωστές συγκεντρώσεις (ψυχρού αντιγόνου) των προτύπων διαλυμάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα ποσά αντισώματος και ιχνηθετημένου αντιγόνου παραμένουν σταθερά και ο ιχνηθέτης βρίσκεται σε περίσσεια. Για τον υπολογισμό του βαθμού της αναστολής είναι απαραίτητο η ραδιενέργεια του συμπλόκου ιχνηθέτη-αντισώματος να διακριθεί από τη ραδιενέργεια του ελεύθερου ιχνηθέτη. Αυτό γίνεται δυνατό με το διαχωρισμό της δεσμευμένης φάσης του αντιγόνου (τόσο της ιχνηθετημένης, όσο και της ψυχρής) από την ελεύθερη (ιχνηθετημένη και μη) και με τη μέτρηση, στη συνέχεια της ραδιενέργειας της κάθε φάσης χωριστά. ^[2]

Ιχνηθέτης : Το ιχνηθετημένο αντιγόνο πρέπει να διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης στο αντίσωμα (αντιγονική ικανότητα). Ωστόσο δεν είναι αναγκαία η πλήρης ταύτιση της αντιγονικής του συμπεριφοράς με αυτή του ψυχρού αντιγόνου. Κατά την επισήμανση σκοπός είναι να επισημανθούν όσο το δυνατόν περισσότερα μόρια ώστε να αυξηθεί η ειδική δραστηριότητα, πράγμα που συνεπάγεται μεγαλύτερη ευαισθησία στην ραδιοανοσοδοκιμασία.

Αντίσωμα : Το αντίσωμα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να έχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ειδικότητα ως προς τον επίτοπο του αντιγόνου. Ο τίτλος ενός αντιορού υπολογίζεται με την καμπύλη αραίωσης αντισώματος. Διαδοχικές αραιώσεις του αντιορού σε διάλυμα επωάζονται με συγκεκριμένη και σταθερή ποσότητα ιχνηθέτη. Κατόπιν υπολογίζεται το % ποσοστό ιχνηθέτη που δεσμεύει το κάθε αραιωμένο

διάλυμα και εντοπίζεται έτσι η αραίωση που αντιστοιχεί σε ποσοστό δέσμευσης 50%. Η αραίωση αυτή αναφέρεται και σαν τίτλος του αντισώματος.

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και εφαρμογές της ραδιοανοσοδοκιμασίας :

Με την εφαρμογή των ραδιοανοσοαναλύσεων έγινε δυνατός ο προσδιορισμός σε βιολογικά δείγματα αντισωμάτων, αντιγόνων, ορμονών και λοιπών χημικών ουσιών κλινικού ενδιαφέροντος σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (10-12mol/l). Η μέθοδος ραδιοανοσοδοκιμασίας δεν είναι πολύπλοκη, έχει ευρεία χρήση στο κλινικό και διαγνωστικό ιολογικό εργαστήριο και είναι παρόμοια με την ELISA. Απαιτείται μικρός όγκος δείγματος και μικρή χρονική διάρκεια εκτέλεσης της μεθόδου. Επίσης, παρέχει αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της ραδιοανοσοδοκιμασίας είναι το κόστος και η βιοεπικινδυνότητα της λόγω χειρισμού ραδιενεργών ισotόπων. Επίσης, απαιτούνται ειδικοί μετρητές ραδιενέργειας.

Με την ανάπτυξη των ραδιοανοσοαναλύσεων, η κατάσταση στην Ιατρική έχει αλλάξει θεαματικά. Παράλληλα, πέρα από τον τομέα της έρευνας, η μεθοδολογία των ραδιοανοσοαναλύσεων έχει εισβάλλει στην καθημερινή πράξη των κλινικών εργαστηρίων με τη μορφή διαθέσιμων τυποποιημένων συσκευασιών.

7.9.1 Σκοπός

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι αντιγόνου ιού ηπατίτιδας Α στον ορό του αίματος.

Υλικά

- Αντιγόνο σημασμένο με ^{125}I
- Αντιορός αίματος-δείγμα
- Αραιωτικό ορού
- Αντιδραστήριο κατακρίμνησης συμπλόκου Ag-Ab
- Πιπέττα, σωλήνες
- Ραδιοανοσοαναλυτής

Πρωτόκολλο

1. Αραίωση δειγμάτων αντιορών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
2. Προσθήκη ψυχρού αντιγόνου (50μl).
3. Προσθήκη σημασμένου αντιγόνου (100μl).

4. Ανάδευση των σωλήνων.
5. Επώαση σωλήνων στους 18-25°C για 30 λεπτά.
6. Προσθήκη 2ml αντιδραστηρίου κατακρήμνισης.
7. Ανάδευση και φυγοκέντρηση των σωλήνων σε 1500-2000g για 15 λεπτά σε 18°C.
8. Απόχληση του υπερκείμενου τον σωλήνα σε ειδικό δοχείο ραδιενεργών αποβλήτων.
9. Αναστροφή και στέγνωμα του σωλήνα σε διηθητικό χαρτί για 10 λεπτά.
10. Μέτρηση του ^{125}I σε μετρητή γ-ακτινοβολίας.
11. Καμπύλη αναφοράς και *υπολογισμοί των αποτελεσμάτων. Για κάθε σωλήνα υπολογίζεται ο μέσος όρος κρούσεων ανά λεπτό (cpm) που κατέγραψε ο μετρητής ραδιενέργειας.

$\text{cpm σωλήνα/cpm μάρτυρα ραδιενέργειας} \times 100 = \text{ικανότητα μη ειδικής δέσμωσης του συστήματος Ag και Ab.}$

7.9.2 Αναμενόμενα αποτελέσματα-ερμηνεία

Η εξακρίβωση της συγκέντρωσης του αραιωμένου αντιγόνου ή αντισώματος στο κλινικό δείγμα γίνεται με αυξημένη ευαισθησία λόγω της παρουσίας ραδιενεργού ισότοπου. Ο υπολογισμός της ανωτέρω συγκέντρωσης γίνεται βάση του μάρτυρα ραδιενέργειας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α. ΕΛΛΗΝΙΚΗ

1. Αγγελόπουλος, Β. (2004). *Εργαστηριακή διαγνωστική : επεξήγηση και κλινική σημασία των εργαστηριακών εξετάσεων και δοκιμασιών*. Αθήνα: Παρισιάνος
2. Αρσένη, Α. (1994). *Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων τόμος 2*. Αθήνα: Ζήτα
3. Δουμπόγιας, Ι. & Τσακρής, Α. (2000). *Κλινική μικροβιολογία*. Θεσσαλονίκη: University Studio Press
4. Κοπτόπουλος, Γ. (1987). *Στοιχεία κτηνιατρικής ανοσολογίας*. Θεσσαλονίκη: Αφοί Κυριακίδη
5. Κρικέλης, Β. (2012). *Εργαστηριακό εγχειρίδιο ιολογίας*. Αθήνα: Πασχαλίδης
6. Μαυρίδου-Τσόχα, Ε. (2001). *Επιτομή γενική μικροβιολογία τόμος Ι*. Αθήνα: Λύχνος
7. Μπουσιάκου-Καλκάνη, Ε. (2008). *Ιολογία*. Αθήνα: Ελλήν
8. Μπουσιάκου-Καλκάνη, Ε. (2010). *Γενική μικροβιολογία*. Αθήνα: Ελλήν
9. Παπαβασιλείου, Ι. (1981). *Ιατρική μικροβιολογία*. Αθήνα: Παρισιάνος
10. Παπαπαναγιώτου, Ι. (2005). *Εισαγωγή στην ιατρική μικροβιολογία, ιολογία και ανοσολογία*. Αθήνα: University Studio Press
11. Παυλάτου, Μ. (1990). *Ανοσοδιαγνωστική των λοιμώξεων*. Αθήνα: Λίτσας

Β. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

12. Buxton, A. & Fraser, G. (1977). *Animal Virology Vol II*. Denmark: Blackwell Scientific Publications
13. Levy, J. (1994). *Virology* Pentice Hall
14. Murphy, F., Gibbs, P., Horzinek, M. & Studdert, M. (1999). *Veterinary Virology*. USA: Academic Press
15. Richman, D., Whitley, R. & Hayden, F. (1997). *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone
16. Quinn, P., Markey, B., Leonard, F. & Hartigan, P. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. USA: Wiley Blackwell

Γ. ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

17. <http://en.wikipedia.org/wiki/Virus>
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Virology>

19. http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html
20. <http://www.virology.ws/2009/05/27/influenza-hemagglutination-inhibition-assay/>
21. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A6%CE%AC%CE%B3%CE%BF%CF%82>
22. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%95%CE%B9%CF%83%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%85%CF%82%CE%B9%CE%BF%CF%8D%CF%82>
23. <http://www.microscopemaster.com/transmission-electron-microscope.html>
24. <http://sharedresources.fhcrc.org/services/immunolectron-microscopy>
25. http://en.wikipedia.org/wiki/Negative_stain
26. http://en.wikipedia.org/wiki/Uranyl_acetate

Δ. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ

27. <http://www.technolab.gr/telstar-greece>
28. <http://www.technolab.gr/telstar-greece>
29. <http://www.planitario.gr/academy.html>
30. <http://www.ultident.com/scientific/products.php?product=DL%252d353009>
31. <http://uic.igc.gulbenkian.pt/micro-em.htm>
32. http://serc.carleton.edu/research_educati
33. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/Gemp/avis/A010-fmd/tools/0-imag-cytopathic-effect.html>
34. http://www.pet-eshop.gr/index.php?route=product/product&product_id=286
35. <http://www.fao.org/docrep/005/ac802e/ac802e0v.htm>
36. <http://www.virology.ws/2009/05/27/influenza-hemagglutination-inhibition-assay/>
37. <http://pixshark.com/hemagglutination.htm>
38. http://www.google.gr/imgres?imgurl=http://jpkc.yzu.edu.cn/course/shywshw/pictures/Ch19-01-17.jpg&imgrefurl=http://jpkc.yzu.edu.cn/course/shywshw/skja/wsw/Ch19.html&h=390&w=622&tbnid=GYVN9jVauBTYPM:&zoom=1&docid=gy_tbTHO_LNJyXM&ei=s8_K

39. <http://www.koihealth.org/Veinipuncture/Virus%20Neutralization%20Serology%20testing%20for%20anti%20KHV%20antibody.html>
40. <http://lib.sytu.edu.cn/asm/057-Virus%20-%20Neutralization%20Assay-Introduce.htm>
41. <http://virology-online.com/general/Test3.htm>
42. http://ezbiosystems.com/view2.asp?d_id=189
43. <http://www.biormoniki.gr/v1/ria/paragraph/3>