

Μοριακή διάγνωση ιών (και λοιπών παθογόνων μικροοργανισμών)

Χρήστος Κρούπης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη και εφαρμογή μοριακών διαγνωστικών τεχνικών έχει επιφέρει πραγματική επανάσταση στην ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση των λοιμώξεων κατά την τελευταία εικοσαετία. Η **Μοριακή Μικροβιολογία** βασίζεται στην ανίχνευση χαρακτηριστικών για τον κάθε μικροοργανισμό ακολουθιών DNA ή RNA, σε ποικιλία βιολογικών υγρών (αίμα και πλάσμα, ΕΝΥ, πτύελα, βιοψίες, κυτταρολογικά επιχρίσματα, ούρα, σπέρμα, σάλιο, τρίχες τροφοβλάστη ή αμνιακά υγρά). Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύει την ύπαρξη **ενεργούς λοίμωξης** (ή τουλάχιστον αρκετά πρόσφατης). Πέραν της εμφανούς χρησιμότητά της στη διάγνωση, η Μοριακή Μικροβιολογία προσφέρει επίσης σημαντικά στους τομείς: α) της πρόληψης, όταν πρόκειται για προϊόντα αιμοδοσίας ή μοσχεύματα, β) της πρόγνωσης, όταν από τη τυποποίηση του μικροοργανισμού εξαρτάται η κλινική πορεία της λοίμωξης, γ) της επιλογής θεραπευτικής αγωγής, όταν ανιχνεύονται γονίδια αντίστασης σε αντιβιοτικά και δ) της θεραπευτικής παρακολούθησης, όταν εξαρτάται η συνέχιση ή μη ή η εντατικοποίηση της θεραπείας από τα επίπεδα γενετικού υλικού του μικροοργανισμού¹.

Έως την εισαγωγή των μοριακών τεχνικών, οι παραδοσιακά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στη Μικροβιολογία ήταν: α) οι καλλιέργειες-αντιβιογράμματα, β) η άμεση μικροσκόπηση μετά από ειδική κυτταροχημική χρώση γ) η ανίχνευση τοξινών ή βιοχημικών παραμέτρων ειδικών για τους μικροοργανισμούς και δ) οι ανοσολογικές τεχνικές που ανιχνεύουν είτε το μικροβιακό αντιγόνο είτε αντισώματα στον ανθρώπινο ορό έναντι επιτόπων του μικροοργανισμού.

Μειονεκτήματα παραδοσιακών μικροβιολογικών τεχνικών. Σε πολλές περιπτώσεις οι παραπάνω τεχνικές υπολείπονται τόσο σε ταχύτητα όσο και σε αξιοπιστία π.χ. η καλλιέργεια του βρογχικού εκκρίματος και η ειδική χρώση Ziehl-Neelsen στην ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Επίσης, η ευαισθησία της ανίχνευσης αντιγόνου είναι συνήθως χαμηλή, ενώ η ανίχνευση των αντισωμάτων υστερεί στην πρωτο-λοίμωξη κατά την αρχική κρίσιμη περίοδο (στο HIV, HCV κλπ.). Ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν καλλιεργούνται εύκολα με αποτέλεσμα να αργεί το αποτέλεσμα ή και να αποτυγχάνει η καλλιέργεια ή και ακόμη δεν καλλιεργούνται καθόλου (π.χ. HPV, HCV). Η ηπατίτιδα C είναι χαρακτηριστική περίπτωση, όπου λόγω

της αδυναμίας καλλιέργειας του ιού HCV, προηγήθηκε η μοριακή ταυτοποίηση του ιού και στη συνέχεια με τη βοήθεια του γενετικού κώδικα επινοήθηκαν οι κατάλληλοι επίτοποι για τις διαγνωστικές ανοσολογικές δοκιμασίες. Άλλοι δε μικροοργανισμοί είναι είτε επικίνδυνοι για το προσωπικό του εργαστηρίου είτε πρέπει να αποσταλούν σε ειδικά εργαστήρια αναφοράς με αποτέλεσμα να μειωθεί η βιωσιμότητά τους ή/και να υπερσκελισθούν από άλλους φυσιολογικούς μικροοργανισμούς στο παρασκεύασμα.

Τεχνικές Μοριακής Μικροβιολογίας. Αρχικά η πιο συνήθης μέθοδος, αφού απομονώνονταν το γενωμικό υλικό, ήταν η πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες RFLP (restriction fragment length polymorphism) και στη συνέχεια, είτε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και υβριδισμός κατά Southern (Southern blot), είτε μεταγενέστερα PFGE (pulsed field gel electrophoresis). Επακολούθησαν οι τεχνικές υβριδισμού σε φίλτρο (dot blot) ή πάνω στον ιστό ISH (in situ hybridization). Η ανακάλυψη της **PCR μεθοδολογίας** από τον K. Mullis το 1983 πυροδότησε την έκρηξη της χρήσης της και στη Μοριακή Μικροβιολογία². Πρόκειται περί εκλεκτικής και εκθετικής ενίσχυσης του γενετικού υλικού με DNA πολυμεράση και κατάλληλους για την ακολουθία εκκινητές (primers). Χρησιμοποιείται ως έχει είτε με τα παράγωγά της: RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, real-time quantitative PCR, broad range PCR, RAPD κλπ. Τελευταία, αρχίζουν και χρησιμοποιούνται και πολύ ευαίσθητες τεχνικές υβριδισμού, όπου δεν πραγματοποιείται PCR μεθοδολογία και εξειδικευμένος εξοπλισμός όπως TMA (Transcription-mediated amplification), branched DNA, NASBA, Hybrid capture, LCR (ligase chain reaction, με τη χρήση DNA λιγάσης) κλπ.

Πλεονεκτήματα των μοριακών διαγνωστικών τεχνικών αποτελούν η ταχύτητά τους, η χρήση συνήθως πολύ μικρού όγκου του δείγματος, η μακρά αποθηκευτική ικανότητα των αντιδραστηρίων στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, οι δυνατότητες ποσοτικοποίησης και γονοτύπωσης του μικροοργανισμού και πάνω απ' όλα, η υψηλή ευαισθησία (υψηλό % ποσοστό ανίχνευσης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού) και η υψηλή ειδικότητα (υψηλό % ποσοστό μη ανίχνευσης επί αρνητικών δειγμάτων ή με άλλους μικροοργανισμούς). Το κόστος των αντιδραστηρίων είναι χαμηλό όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές in-house ενώ ποικίλλει όταν χρησιμοποιούνται προτυποποιημένα εμπορικά σετ αντιδραστηρίων. Τελευταία, το κόστος επί απλών μοριακών τεχνικών έχει κατέβει σημαντικά λόγω ανταγωνισμού των εταιρειών, ωστόσο παραμένει υψηλό στις περιπτώσεις όπου υπάρχει έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ή σήμα από την Ευρωπαϊκή Κοινότητα (CE mark). Επίσης ο εξοπλισμός είναι φθηνός επί των απλών μοριακών τεχνικών, ενώ ανεβαίνει σημαντικά επί των πιο πολύπλοκων πχ. real-time quantitative PCR ή τυποποίηση με DNA Sequencing. Μερικές τεχνικές είναι απλές στην εκτέλεσή τους, ωστόσο στην πλειοψηφία τους απαιτούν απόλυτα εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό, πιστοποιημένο και με συνεχή εκπαίδευση. Το προσωπικό αυτό θα εργάζεται είτε σε εξειδικευμένα ανεξάρτητα εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας είτε σε υποτμήματα Μοριακής Μικροβιολογίας μέσα σε Μικροβιολογικά ή Παθολογοανατομικά ή άλλα εργαστήρια, είτε στο κεντρικό εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας σε όποια Νοσοκομεία δεν έχουν προκύψει τα παραπάνω εργαστήρια. Είναι απαραίτητος δε ο συνεχής εσωτερικός και εξωτερικός έλεγχος ποιότητας.

Επί καλής εργαστηριακής πρακτικής, ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών ή ψευδώς θετικών δειγμάτων των μοριακών τεχνικών είναι χαμηλός λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας αντίστοιχα. Ωστόσο, -ειδικά στην μεθοδολογία της PCR αντίδρα-

σης- εάν δεν ληφθούν οι απαραίτητες προφυλάξεις, μπορεί να έχουμε μεγαλύτερο αριθμό ψευδών αποτελεσμάτων απ' αυτόν που δικαιολογείται ενδογενώς από την ίδια τη μέθοδο.

Ψευδώς θετικά δείγματα. Εφόσον έχει προηγηθεί έλεγχος των εκκινητών με κατάλληλα λογισμικά ώστε να μην προσκολλώνται σε άλλες από τις επιθυμητές ακολουθίες, η κύρια πηγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στη PCR αντίδραση είναι η επιμόλυνση (contamination). Τρεις οι πιθανοί τρόποι: α) δείγματα με υψηλό αριθμό μικροοργανισμών επιμολύνουν άλλα, β) η επιμόλυνση των αντιδραστηρίων με θετικά δείγματα και τέλος και ο πιο σημαντικός τρόπος επιμόλυνσης γ) η συγκέντρωση προϊόντων της PCR αντίδρασης στον εργαστηριακό χώρο (amplicon carry-over): επειδή μια τυπική απόδοση μιας PCR αντίδρασης μπορεί να είναι 10^{12} αντίγραφα της ενισχυμένης ακολουθίας έστω και ένα μικρό αερόλυμα (10^{-6} μl) μπορεί να περιέχει 10^5 αντίγραφα και να επιμολύνει³. Το πρόβλημα αυτό επιλύεται είτε ενζυμικά με χρήση ουρακίλο-N-γλυκοζιδάσης (UNG) μετά από ενσωμάτωση στην PCR αντίδραση dUTP αντί dTTP είτε φωτοχημικά με UV ακτινοβολία PCR προϊόντων που περιέχουν ισοψωραλένιο. Για να αποφευχθούν οι ιδιαίτερα ακριβοί ανωτέρω τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος, συστήνονται οι κάτωθι απλές και πρακτικές οδηγίες⁴:

- A) αποστείρωση ή φιλτράρισμα ρυθμιστικών και άλλων διαλυμάτων της αντίδρασης,
- B) χρήση γαντιών μιας χρήσης,
- Γ) χρήση ειδικών πιπεττών (positive displacement) και ακροσυγχιών με φίλτρο,
- Δ) διαχωρισμός των εργαστηριακών χώρων απομόνωσης των δειγμάτων, PCR αντίδρασης και ηλεκτροφόρησης των PCR προϊόντων. Όπου είναι δυνατόν μετά το πέρας της εργασίας, αποστείρωση με λάμπες UV επί τουλάχιστον 20 min⁵.
- Ε) Επίσης αποφυγή αερολυμάτων,
- ΣΤ) ισομοίραση (aliquotting) των βασικών αντιδραστηρίων ώστε εάν μολυνθεί κάποιο να συνεχίσουν τα υπόλοιπα,
- Z) δημιουργία master mix της PCR αντίδρασης με όλα τα απαραίτητα εκτός από το DNA και ισομοίρασή του,
- Η) προσθήκη του DNA μόνο στο τέλος και
- Θ) προσθήκη σωληναρίου χωρίς DNA (αντ' αυτού, H₂O) καθώς και αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης.

Ψευδώς αρνητικά δείγματα. Οφείλονται συνήθως στην μη ικανοποιητική απομόνωση του γενετικού υλικού και την παρουσία αναστολέων της αντίδρασης. Συστήνονται τα ακόλουθα:

- A) Προσθήκη σωληναρίου με θετικό μάρτυρα της αντίδρασης (είτε βιολογικό δείγμα από την αρχή της απομόνωσης είτε απομονωμένο DNA ή Armored RNA στην τελική PCR αντίδραση).
- B) Έλεγχος της διαδικασίας απομόνωσης, της ποιότητας και ποσότητας του απομονωθέντος γενετικού υλικού. Ποιοτικός έλεγχος ώστε να απομονώνεται καλής ποιότητας DNA/RNA (με ικανοποιητικούς λόγους A_{260}/A_{280}) το οποίο να επιδέχεται ενίσχυση με PCR σε γονίδια αναφοράς (β-γλοβίνη, ακτίνη κλπ) και να είναι απαλλαγμένο από αναστολείς της PCR (ειδικά απαιτείται προσοχή στα ούρα). Ποσοτικός έλεγχος ώστε να απομονώνονται χαμηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (πχ. μπορεί να απαιτείται συμπύκνωση του δείγματος)^{6,7}. Επί αρχικού υλικού RNA, απαιτείται είτε άμεση και γρήγορη απομόνωση και αποθήκευσή του στους -80 °C είτε

προσθήκη κατάλληλων σταθεροποιητών (πχ. RNAlater).

- Γ) Επί αδυναμίας ελέγχου των αναστολέων της PCR αντίδρασης, προσθήκη εσωτερικού προτύπου (internal control). Συνήθως διαθέτει τα ίδια άκρα με τη ζητούμενη ακολουθία ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ίδιοι εκκινητές και για την ενίσχυση του εσωτερικού προτύπου ωστόσο περιέχει διαφορετική ακολουθία από τη ζητούμενη στο μέσον αυτού και με διαφορετικό μέγεθος. Σε περίπτωση μη ενίσχυσης του εσωτερικού προτύπου, απορρίπτονται τα αποτελέσματα λόγω παρουσίας αναστολέα⁸.
- Δ) Οι αντιδράσεις να γίνονται εις διπλούν (και ειδικά όταν αναμένονται χαμηλές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών) και να αποφεύγονται τα λάθη στο πιπετάρισμα.
- Ε) Να χρησιμοποιείται και δεύτερο σύστημα ανίχνευσης καθώς δεν είναι σπάνιο να υπάρχουν μεταλλάξεις του μικροοργανισμού στην περιοχή των εκκινητών ή του υβριδιζόμενου ανιχνευτή και τέλος
- ΣΤ) έλεγχος με αραιώσεις ενός ποσοτικοποιημένου θετικού μάρτυρα για να ορισθεί το όριο ανίχνευσης και όταν δεν επιτυγχάνεται υψηλή ευαισθησία >85% στα δείγματα, βελτιστοποίηση συνθηκών στην PCR αντίδραση⁹ και αλλαγή είτε των εκκινητών είτε των διαλυμάτων είτε του θερμοκρασιακού προγράμματος (υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού επί υψηλών σε περιεκτικότητα GC ακολουθιών).

2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Στη συνέχεια θα αναφερθούν παραδείγματα των ανωτέρω, σε δύο κλινικά ερωτήματα από την εμπειρία του γράφοντος κατά τη διάρκεια πολυετούς συνεργασίας με το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής στο Μαιευτικό και Χειρουργικό Κέντρο «ΜΗΤΕΡΑ». Το πρώτο αφορά τον γυναικολογικό έλεγχο λοιμώξεων στα κολποτραχηλικά επιχρίσματα και βιοψίες όπου πρωτεύοντα ρόλο έχει ο ιός HPV λόγω της συσχέτισής του με κακοήγη εξαλλαγή και δευτερεύοντα ο ιός του έρπητα (HSV), το βακτήριο των χλαμυδίων, τα μυκοπλάσματα/ουρεαπλάσματα. Το δεύτερο αφορά τον προγεννητικό έλεγχο των συγγενών λοιμώξεων του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του πρωτοζώου τοξοπλάσματος σε αμνιακό υγρό εγκύων γυναικών.

3. ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

3.1. Βιολογία του ιού των θηλωμάτων HPV

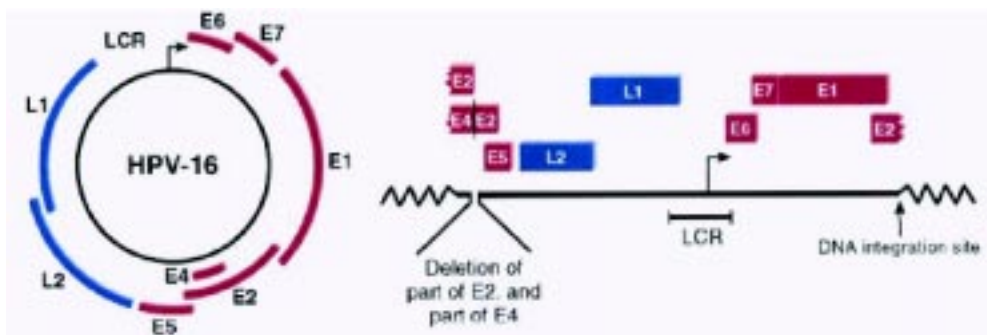
Ο επιθηλιότροπος ιός HPV (**Human Papilloma Virus**) αποτελείται από μικρό δίκλωνο κυκλικό DNA (~8 Kb) και εικοσαεδρικό καψίδιο αποτελούμενο από 72 καψομερίδια. Είναι μικρού μεγέθους (55 nm) και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μοιάζει με μπαλάκι του γκολφ. Έως τώρα έχουν αναγνωρισθεί περισσότεροι από 200 διαφορετικοί γονότυποι του ιού εκ των οποίων οι 85 τύποι είναι καλά χαρακτηρισμένοι¹⁰.

Οι HPV γονότυποι διαίρονται σε δύο κατηγορίες αναλόγως των κυττάρων που μολύνουν: **α) δερματικοί (cutaneous)**, όταν προσβάλλουν την επιδερμίδα των ποδιών και των χεριών και προκαλούν συνηθέστερα μυρμηγκιές και **β) βλεννογονικοί (mucosal)**, όταν προσβάλλουν το επιθήλιο των γεννητικών περιοχών και των δύο φύλων, σχεδόν αποκλειστικά μέσω σεξουαλικής επαφής. Είναι δυνητικά επικίνδυνοι για προ-

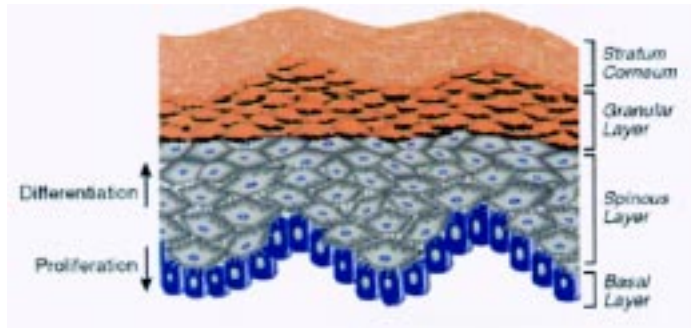
καρκινικές αλλοιώσεις, οι οποίες εάν δεν θεραπευτούν, μπορεί να οδηγήσουν σε **καρκίνο του τραχήλου της μήτρας** στις γυναίκες. Επίσης οι ίδιοι τύποι προσβάλλουν και τον βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα, του οισοφάγου κλπ όπου ενέχονται και σε άλλες νεοπλασίες και στα δύο φύλα.

Προκαλούν την χαρακτηριστική θηλωματώδη υπερπλασία στις θέσεις της μόλυνσης, εξ' ου και η ονομασία τους. Οι διάφοροι τύποι του HPV παρουσιάζουν κοινή διάταξη στο γονιδιώμά τους το οποίο και αποτελείται από τρεις περιοχές¹¹: α) την μη κωδικοποιούσα άνω ρυθμιστική περιοχή ή αλλιώς LCR (Locus Control Region), β) την πρώιμη (early) περιοχή, η οποία μέσω ενός και μόνο ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF, open reading frame) στη μία αλυσίδα του DNA κωδικοποιεί τις ιικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 και τέλος γ) την όψιμη (late) περιοχή, η οποία κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου L1 και L2 (Εικόνα 1).

Ο **μηχανισμός** με τον οποίον οι βλεννογονικοί HPV τύποι είναι σε θέση να προκαλέσουν προκαρκινικές αλλοιώσεις είναι ο ακόλουθος¹²: μέσω ενός τραύματος από τη σεξουαλική επαφή μπορεί να εισέλθει ο ιός στα κερατινοκύτταρα της κατώτερης βασικής στιβάδας (basal layer) του επιθηλίου στη λεγόμενη ζώνη μεταπλάσεως (transformation zone) μεταξύ του πλακώδους επιθηλίου του εξωτραχήλου και του κυλινδρικού επιθηλίου του ενδοτραχήλου (Εικόνα 2). Πρόκειται για μια ζώνη άωρων κυττάρων επιδεχόμενων ορμονικών μηνυμάτων στην αναπαραγωγική γυναίκα αλλά και με προδιάθεση σε μολύνσεις και μεταλλάξεις. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας έχουν τη δυνατότητα να διαιρεθούν και τότε κάποια από τα θυγατρικά κύτταρα μεταναστεύουν στην ακανθώδη παραβασική στιβάδα (spinous layer). Εκεί προσπαθούν να διαφοροποιηθούν αλλά ταυτόχρονα αναγκάζονται από τις E ιικές πρωτεΐνες να οδηγηθούν από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου με δύο συνέπειες: α) δραματική ενίσχυση του πολλαπλασιασμού του ιού και β) κυτταρική υπερπλασία (κοιλοκυτταρική ατυπία, δυσκεράτωση). Στη συνέχεια τα μολυσμένα κύτταρα διαιρούνται και διαφοροποιούνται τελικά στην επόμενη στιβάδα (granular layer), όπου και παράγονται οι πρωτεΐνες L1 και L2, γίνεται συναρμολόγηση (virus assembly) και απελευθέρωση του ιού ο οποίος και οδηγείται σε νέο κύκλο μόλυνσης άλλου ατόμου μέσω της αποπίπτουσας επιπολής κερατινοστιβάδας (superficial cells, stratum corneum) και της σεξουαλικής επαφής.

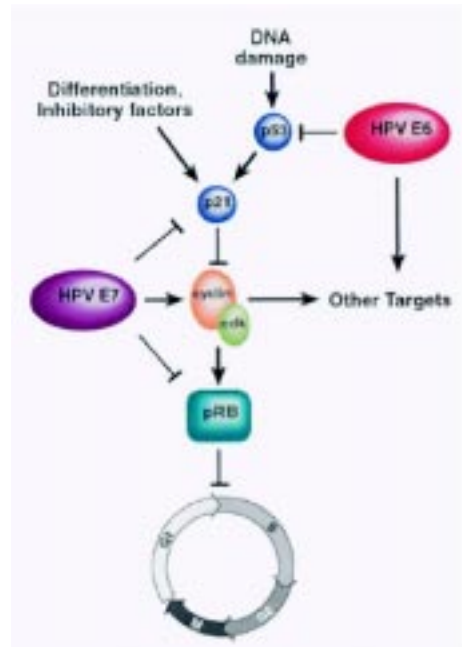


Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του HPV 16 και του τρόπου της ενσωμάτωσης του ιού στο ανθρώπινο γονιδίωμα (από¹¹).



Εικόνα 2. Πορεία μόλυνσης με ιό HPV στο διαστρωματωμένο πλακώδες επιθήλιο (από¹¹).

Οι πιο καλοήθεις HPV τύποι προκαλούν στο διαστρωματωμένο (stratified) πλακώδες επιθήλιο συνήθως απλά θηλώματα είτε υποκλινικά επίπεδα (flat) κονδυλώματα είτε εξωφυτικά οξυτενή κονδυλώματα (condylomata acuminata). Κακοήθη εξαλλαγή μπορεί να συμβεί ωστόσο σε ορισμένους HPV τύπους όταν υπάρξει υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών E6 και E7 καθώς αλληλεπιδρούν και αδρανοποιούν τις ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p53 και Rb αντίστοιχα (Εικόνα 3). Συνηθέστερα αυτό συμβαίνει όταν ο ιός από την επισωματική κυκλική μορφή με την οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων, ευθυγραμμίζεται μέσω διάσπασης της περιοχής E2/E4 και ενσωματώνεται στο ανθρώπινο γενωμικό DNA (Εικόνα 1). Σε αυτή την περίπτωση, χάνεται ο έλεγχος της μεταγραφής των γονιδίων E6 και E7 από τα κατασταλτικά γονίδια E2 και E4 και αρχίζει η ανεξέλεγκτη μεταγραφή των E6 και E7 και η υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών τους. Τα γονίδια **E6 και E7 των πιο επικίνδυνων HPV τύπων** από μόνα τους αποτελούν **ογκογονίδια** καθώς όταν επιμολύνουν φυσιολογικά κύτταρα επάγουν την καρκινογένεση¹³.



Εικόνα 3. Απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω των ιϊκών πρωτεϊνών E6 και E7 (από¹¹).

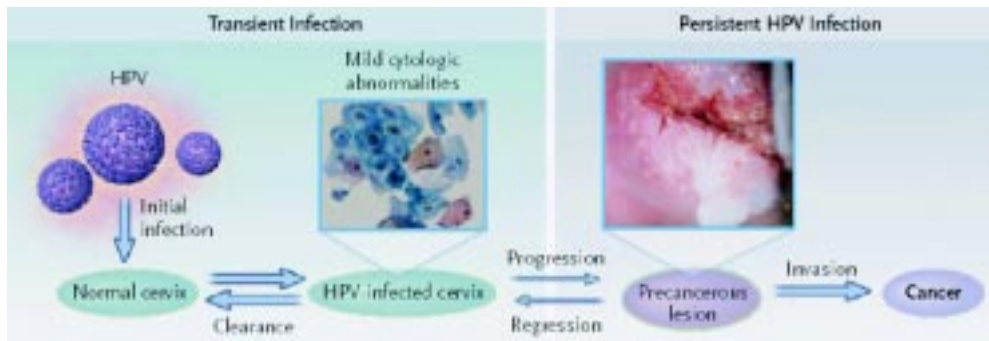
3.2. Κλινική σημασία και αξιολόγηση της λοίμωξης από τον ιό HPV

Το πιο σημαντικό μέτρο πρόληψης για τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας αποτελεί το **Pap test** (εκ του Γ. Παπανικολάου) όπου λαμβάνεται κολποτραχηλικό

επίχρισμα από τη γυναίκα, επιστρώνεται και μονιμοποιείται σε πλακάκι και στη συνέχεια βάφεται κυτταροχημικά και αξιολογείται στο Κυτταρολογικό εργαστήριο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να ανιχνευθούν δυσπλαστικές κυτταρικές αλλοιώσεις συμβατές με λοίμωξη από τον ιό HPV, όπως κοίλοκυτταρική ατυπία και δυσκεράτωση. Συνηθέστερα η HPV λοίμωξη ξεκινάει με την παρουσία στο pap test άτυπων πλακωδών κυττάρων αγνώστου σημασίας (ASC-US, atypical squamous cells of unknown significance, κριτήρια κατά Bethesda). Σ'αυτή την περίπτωση η Αμερικανική Εταιρεία Κολποσκόπησης και Παθολογίας του Τραχήλου της Μήτρας συστήνει **μοριακή ανίχνευση του ιού HPV** για την επιβεβαίωση ή όχι της ύπαρξης του ιού¹⁴. Εάν πρόκειται πράγματι για λοίμωξη από HPV, τότε σε αυτό το στάδιο αναλόγως του αποτελέσματος της **τυποποίησης του ιού HPV**, της ηλικίας (< 30 ετών) και της ανοσολογικής κατάστασης της γυναίκας καθώς και άλλων παραγόντων που δεν έχει ακόμη αποδειχθεί η σημασία τους (τρόπος ζωής, διατροφή, κάπνισμα) ο ιός μπορεί να καταπολεμηθεί ικανοποιητικά και η μόλυνση να είναι παροδική (transient). Οι εξετάσεις επαναλαμβάνονται μετά από 6-μηνο ή 12-μηνο και εάν η μόλυνση επιμένει (persistent), είναι δυνατόν οι κυτταρικές αλλοιώσεις να γίνουν πιο έντονες και να προχωρήσουν στο στάδιο LG-SIL (low grade squamous intraepithelial lesion ή αλλιώς με βάση παλαιότερη ορολογία, CIN I, cervical intraepithelial neoplasia στάδιο I). Τότε επιβάλλεται ο **κολποσκοπικός έλεγχος** -ιδιαίτερα στη ζώνη μετάπλασης- καθώς και η **λήψη τραχηλικής βιοψίας** και αποστολή στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο όπου και σταδιοποιείται ιστολογικά η προκαρκινική αλλοίωση (Εικόνα 4).

Κατά την κρίση του θεράποντος ιατρού σ' αυτό το στάδιο ή ακόμη πιο επιτακτικά εάν η ιστολογική βλάβη έχει προχωρήσει σε HG-SIL (high grade squamous intraepithelial lesion ή CIN στάδια II και III), παρέχεται θεραπευτική αγωγή. Η αγωγή μπορεί να είναι φαρμακευτική με ποδοφυλλίνη ή 5-φθοριουρακίλη ή μικουϊμόδη αλλά μπορεί και επεμβατική με κρυοπηξία, ηλεκτροκαυτηρίαση, εξαχνωση με laser ή κωνοειδή εκτομή. Σκοπός της θεραπείας είναι να εξαλειφθεί η βλάβη και ο ιός και μακροπρόθεσμα να αποφευχθεί το καρκίνωμα in situ αρχικά και το διηθητικό καρκίνωμα στη συνέχεια. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας κρίνεται και από το αρνητικό αποτέλεσμα της μοριακής ανίχνευσης του ιού μετά από νέα λήψη κολποτραχηλικού υλικού.

Οι διάφοροι HPV τύποι πιθανότατα ανάλογα με την πρωτεϊνική ακολουθία των E6



Εικόνα 4. Κλινική πορεία λοίμωξης από HPV (από¹⁵).

και Ε7 διαθέτουν διαφορετικό ογκογενετικό δυναμικό. Χωρίζονται σε τρεις ομάδες με βάση επιδημιολογικές ή φυλογενετικές παρατηρήσεις¹⁶:

(Σπανιότερα απαντώμενοι τύποι διεθνώς)

Χαμηλού κινδύνου (low risk): 6, 11 (40, 42, 43, 44, 53, 66, 72, 81)
Ενδιαμέσου κινδύνου: 31, 33 (35, 39, 51, 52, 58, 59, 68, 82)
Υψηλού κινδύνου (high risk): 16, 18 (45, 56)
 (ή και δύο μόνο ομάδες, εάν ενωθούν η δεύτερη και η τρίτη σε μία).

Οι χαμηλού κινδύνου HPV τύποι συσχετίζονται συνήθως με κονδυλώματα και έως χαμηλού βαθμού δυσπλασίες (ASC-US, LG-SIL, CIN I) του τραχήλου της μήτρας ενώ οι υψηλού κινδύνου HPV τύποι ανευρίσκονται σε όλο το φάσμα των δυσπλασιών καθώς και στα καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας. Στις υψηλού βαθμού δυσπλασίες (HG-SIL, CIN II και III) και στα καρκινώματα σχεδόν αποκλειστικά ανευρίσκονται ενδιαμέσου και υψηλού κινδύνου τύποι. Η τυποποίηση του ιού συνεπώς διαθέτει προγνωστική σημασία. Ο χρόνος επώασης ποικίλλει αναλόγως του τύπου του ιού και μπορεί είναι και χρόνια εκτός του ιού HPV 18 ο οποίος δρα πιο γρήγορα (από εβδομάδες έως 18 μήνες).

Πιστεύεται πλέον ότι **δεν υπάρχει καρκίνος τραχήλου της μήτρας χωρίς να συνυπάρχει και ιός HPV**. Στην πιο πρόσφατη σχετική μελέτη ο ιός ανιχνεύθηκε στο 99.7% των καρκινωμάτων τραχήλου της μήτρας που εξετάστηκαν¹⁷. Πιθανολογείται ότι η παρασκευή ενός εμβολίου εναντίον των 7 πιο συχνών HPV τύπων διεθνώς θα συνέβαλε στη μείωση κατά 87% των νέων περιπτώσεων καρκίνου τραχήλου της μήτρας ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου και αποτελεί μάλιστα¹⁸. Ήδη έχουν αρχίσει και χρησιμοποιούνται προληπτικά, εμβόλια εναντίον των 2 ή 4 πιο επικίνδυνων HPV τύπων.

3.3. Μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του ιού HPV

Πρέπει να σημειωθεί ότι στην εποχή της βασιζόμενης σε στοιχεία Ιατρικής (evidence-based Medicine) δεν νοείται ισχυρισμός ότι υπάρχει λοίμωξη HPV χωρίς να υπάρχει ταυτόχρονα απόδειξη. Και ο μόνος αντικειμενικός τρόπος απόδειξης είναι μέσω της μοριακής ανίχνευσης καθώς η κυτταρολογική εξέταση, η κολποσκοπική εικόνα και η ιστολογική διάγνωση αποτελούν ενδείξεις της παρουσίας του ιού. Είναι γνωστό δε, ότι στη μικροσκόπηση υπεισέρχονται τόσο υποκειμενικοί παράγοντες όσο και η εμπειρία του εξεταστή. Η αξία της ανίχνευσης του ιού HPV καταδεικνύεται εμφανέστερα όταν υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα μεταξύ των τριών άλλων εξετάσεων. Σ' αυτή τη περίπτωση, η απάντηση που δίδει η μοριακή ανίχνευση ξεδιαλύνει την εικόνα. Επί αρνητικού αποτελέσματος, καθησυχάζει τη γυναίκα καθώς η μοριακή εξέταση διαθέτει υψηλή αρνητική προβλεπτική αξία (NPV). Επί θετικού αποτελέσματος και εν συνεχεία επιτυχούς τυποποίησης, προσδίδει την αίσθηση κινδύνου όταν ο ανιχνευόμενος HPV τύπος είναι υψηλού κινδύνου ενώ όταν ο ανιχνευόμενος HPV τύπος είναι χαμηλού κινδύνου, υπάρχει η προσδοκία ότι η μόλυνση μπορεί να είναι παροδική και ότι δεν απαιτείται άμεσα επεμβατική θεραπεία.

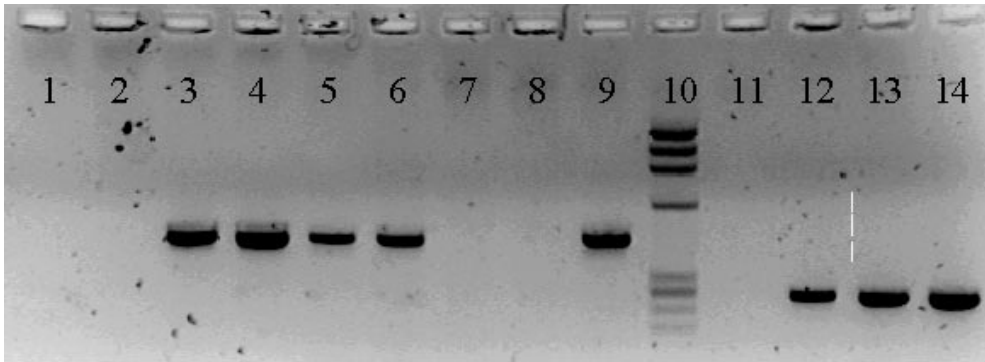
Οι **μέθοδοι** που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν πιο πολύ ήταν το Southern blot και ο in situ υβριδισμός. Ωστόσο πλέον, έχουν επικρατήσει δύο μέθοδοι: α) η αντίδραση PCR

(σε συνδυασμό με RFLP ή ELISA ή reverse dot blot) λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της και β) η μέθοδος του υγρού υβριδισμού Hybrid Capture της εταιρείας Digene λόγω της προτυποποίησής της και στην οποία και θα αναφερθούμε εκτενέστερα στη συνέχεια. Δυναμικά στο χώρο εισέρχεται πλέον και η Roche όπου με καινούργια προτυποποιημένα σετ αντιδραστηρίων προσπαθεί α) με τη μορφή PCR-ELISA να ανιχνεύσει 13 HPV τύπους (Amplisor HPV) και β) επί θετικού αποτελέσματος, να τυποποιήσει ανάμεσα σε 37 διαφορετικούς HPV τύπους με το Linear array HPV (InnoLiPa). Τέλος, το μέλλον ανήκει σαφέστατα και στα microarrays για HPV¹⁹ και μάλιστα πιστεύεται ότι εάν προστεθούν και ανιχνευτές για άλλους μικροοργανισμούς ότι θα μπορέσουν να συνεπικουρήσουν ή και να συναγωνισθούν σημαντικά την κυτταρολογική εξέταση στο μέλλον.

Μέθοδος PCR-RFLP

Η απομόνωση DNA γίνεται από κυτταρολογικό επίχρισμα συλλεγμένο σε ειδικό βαζάκι με ρυθμιστικό διάλυμα ή από βιοψία ή από τομές και μπλοκ ιστού εγκλωβισμένου σε παραφίνη. Συνηθέστερα για την αντίδραση PCR, επιλέγονται εκκινητές ευρέως φάσματος (consensus primers) ώστε η αντίδραση να καλύπτει όσο το δυνατόν περισσότερους τύπους HPV και μάλιστα συστήνεται να χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά σετ ώστε να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου²⁰. Καλό επίσης είναι να υπάρχουν και σετ εκκινητών ειδικών (specific primers) για τους πιο συχνούς τύπους ώστε να χρησιμοποιούνται για επαλήθευση των αποτελεσμάτων με μεθοδολογία PCR-SSP. Το σετ εκκινητών MY που χρησιμοποιήσαμε είναι αρκετά διαδεδομένο, ανιχνεύει 45 HPV τύπους και δίνει καθαρά αποτελέσματα όπως φαίνεται και στην εικόνα 5²¹.

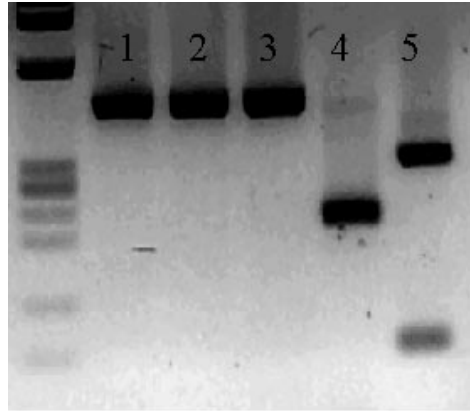
Επί θετικού αποτελέσματος, η τυποποίηση γίνεται με μέθοδο RFLP: το προϊόν της MY-PCR αντίδρασης κατεργάζεται με περιοριστικές ενδοκλεάσες οι οποίες το αποκόπτουν κατά διαφορετικό τρόπο μεταξύ των διαφόρων τύπων^{22,23}. Στην εικόνα 6 δίνεται



Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε αгарόζη PCR προϊόντων της αντίδρασης MY-PCR για την μοριακή ανίχνευση του ιού HPV. Θέση 1: τυφλό, θέση 2: αρνητικός HPV μάρτυρας, θέσεις 3 και 4: δείγμα #1 (θετικό), θέσεις 5 και 6: δείγμα #2 (θετικό), θέσεις 7 και 8: δείγμα #3 (αρνητικό), θέση 9: θετικός HPV μάρτυρας. Στη θέση 10 μοριακός δείκτης φχ174-*HaeIII* και στις θέσεις 11-14 PCR προϊόντα από αντιδράσεις ελέγχου ποιότητας του απομονωμένου DNA για β-γλοβίνη: τυφλό και δείγματα #1-3 αντίστοιχα.

παράδειγμα από ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη με την τυποποίηση του ιού HPV 16. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να ξεχωρίσει διπλές ή τριπλές μολύνσεις, το οποίο είναι χρήσιμο για την επιδημιολογία της νόσου.

Με βάση τα δικά μας αποτελέσματα, με τον ανώτερο τρόπο ανίχνευσης και τυποποίησης, επί συνόλου 661 τυποποιηθέντων HPV ιών στον ελληνικό χώρο στις διάφορες δυσπλασίες, πρωτοστατεί ο HPV 16 στο 20,4% των περιπτώσεων, ακολουθούμενο από το HPV 53 στο 10,7% των περιπτώσεων, το HPV 6 στο 9,3% των περιπτώσεων ενώ ανιχνεύθηκε πληθώρα άλλων τύπων εκ των οποίων κανείς δεν ξεπερνά το 5% (Χ. Κρούπης και Ν. Βουρλίδης, αδημοσίευστα αποτελέσματα).



Εικόνα 6. Πέψη του προϊόντος MY-PCR για τον HPV 16 με πέντε διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Μέθοδος Hybrid Capture II

Στη μέθοδο αυτή το DNA αποδιατάσσεται με NaOH, χωρίζεται στα δύο και υβριδίζεται σε διάλυμα με δύο μίγματα RNA ανιχνευτών: το ένα για 5 χαμηλού κινδύνου HPV τύπους (6/11/42/43/44) και το δεύτερο για 13 υψηλού κινδύνου HPV τύπους (16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68) για μία ώρα στους 65 °C. Η ανίχνευση γίνεται με χημειοφωταυγή τρόπο σε λουμιμόμετρο, χρησιμοποιώντας ειδικά επισημασμένο αντίσωμα έναντι RNA/DNA υβριδίων, με τεχνική sandwich σε ειδικά πλακίδια μικροτιτλοδότησης. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι προτυποποιημένη μέθοδος, η οποία επιδέχεται αυτοματισμού και δεν απαιτεί ιδιαίτερη εμπειρία. Συγκρινόμενη δε, με τη μέθοδο αναφοράς της PCR και με κλινικά ευρήματα, έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα, γι' αυτό και έχει πάρει FDA έγκριση²⁴. Μειονεκτήματά της ότι δεν τυποποιεί επί της ουσίας καθότι προσφέρει αποτέλεσμα επί ενός συνόλου τύπων, ότι δεν καταδεικνύει τις διπλές ή τριπλές λοιμώξεις και ότι δεν καλύπτει όλο το φάσμα των ανιχνευόμενων τύπων στην Ελλάδα.

3.4 Άλλες λοιμώξεις ανιχνευόμενες μοριακά κατά τον γυναικολογικό έλεγχο

Με το ίδιο DNA που απομονώθηκε από το κολποτραχηλικό επίχρισμα, μπορούν να γίνουν και οι κάτωθι έλεγχοι για άλλους λοιμώδεις παράγοντες:

Ιός του έρπητα (HSV, Herpes Simplex Virus). Ο ορισμός περιλαμβάνει δύο τύπους: τον HSV-1 και τον HSV-2. Πρόκειται για επιθηλιοτρόπους DNA ιούς με κυτταρολυτική δράση οι οποίοι ενέχονται στις εξαιρετικά επικίνδυνες εγκεφαλίτιδες και μηνιγγίτιδες. Στον γυναικολογικό έλεγχο, μας ενδιαφέρει κυρίως ο HSV-2, ο οποίος κατά την έξαρσή του προκαλεί χαρακτηριστική εικόνα εξέλκωσης και φλύκταινες στη περιοχή μόλυνσης. Η ανίχνευσή του είναι πολύ σημαντική και στην έγκυο γυναίκα γιατί υπάρχει φόβος για μόλυνση του νεογνού. Αυτό μπορεί να γίνει τόσο στην ενδομήτριο ζωή του και τότε η

ανίχνευσή του γίνεται στο αμνιακό υγρό αλλά πιο συχνά κατά τη γέννησή του, εάν γίνει με φυσιολογικό τρόπο. Η ανίχνευσή του DNA του έρπητα γίνεται με απλή μεθοδολογία PCR σε διάφορα γονίδια²⁵.

Βακτήριο των χλαμυδίων του τραχώματος (*Chlamydia trachomatis*). Ορισμένοι υπότυποι του ενδοκυττάριου αυτού βακτηρίου μπορεί να προκαλέσουν την οφθαλμική νόσο του τραχώματος, η οποία εάν δεν θεραπευθεί οδηγεί ακόμη και σε τύφλωση και ιδιαίτερα στα νεογέννητα. Στη γυναικολογική περιοχή, τα χλαμύδια τα οποία μεταδίδονται με σεξουαλική επαφή, μπορεί να προκαλέσουν τραχηλίτιδα, φλεγμονώδη νόσο της πυέλου, σαλπινγίτιδα, μη-γονοκοκκική ουρηθρίτιδα, ενδομητρίωση και αποτελούν αίτιο στειρότητας ή εκτόπου κήρωσης. Ο πλήρης έλεγχος στις γυναίκες, περιλαμβάνει και μοριακή ανίχνευση του DNA των χλαμυδίων και στα ούρα πέραν του κολποτραχηλικού δείγματος²⁶. Εκτός της απλής μεθοδολογίας PCR, η οποία συνηθέστερα ενισχύει είτε το γονίδιο MOMP είτε το κρυπτικό πλασμίδιο, υπάρχουν πολλές προτυποποιημένες μέθοδοι όπως: α) το AMPLICOR της Roche (PCR-ELISA)²⁷, β) το Hybrid Capture της Digene²⁴, γ) η TMA μεθοδολογία της Gen Probe²⁸ και δ) η LCR μεθοδολογία της ABBOTT^{26,27}. Όλα τα παραπάνω kits μπορούν να συνδυασθούν και με ανίχνευση γονόρροιας (*Neisseria Gonorrhoeae*). Επί θετικού αποτελέσματος για χλαμύδια, υπάρχει κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, η οποία πρέπει να χορηγηθεί και στους δύο συντρόφους (αζιθρομυκίνη, δοξυκυκλίνη κλπ).

Μυκοπλάσματα/Ουρεαπλάσματα. Είναι οι μικρότεροι μικροοργανισμοί που υπάρχουν και μπορούν να πολλαπλασιαστούν, με μικρό γένωμα (~0,6 Kb) και χωρίς κυτταρικό τοίχωμα. Υπάρχει δυσκολία στην επιτυχή καλλιέργεια τους, γι' αυτό και έχουν θέση οι μοριακές τεχνικές στην ανίχνευσή τους. Κάποια είδη τους ενέχονται σε μολύνσεις του ουρογεννητικού συστήματος (*Mycoplasma hominis* και *genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* κλπ) και προκαλούν ουρηθρίτιδες και σαλπινγίτιδες. Η εκρίζωσή τους με θεραπευτική αγωγή δεν είναι πάντα εύκολη. Συνηθέστερα η μοριακή ανίχνευσή τους γίνεται με αντίδραση PCR στην περιοχή των rRNA γονιδίων²⁹.

4. ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΓΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ

Θα ασχοληθούμε περισσότερο με τον κυτταρομεγαλοϊό και το τοξόπλασμα καθώς η άλλη σοβαρή λοίμωξη, της ερυθράς (*rubella*), ευτυχώς λόγω του εμβολιασμού από την παιδική ηλικία έχει μειωθεί σημαντικά, ενώ σπάνια υπάρχουν περιπτώσεις συγγενούς λοίμωξης με τον ιό της ανεμοβλογιάς (*varicella zoster virus*) και τον παρβοϊό (*parvovirus*).

4.1. Κυτταρομεγαλοϊός (CMV, cytomegalovirus)

Ο κυτταρομεγαλοϊός ανήκει στην ομάδα των λεμφοτρόπων ερπητοϊών. Διαθέτει δίκλωνο DNA ~240 Kb το οποίο ενσωματώνεται στο ανθρώπινο γενωμικό DNA κατά την λοίμωξη. Μεταδίδεται στους ενήλικες με άμεση επαφή (σάλιο, σεξουαλική επαφή κλπ.), με μετάγγιση μολυσμένου αίματος, με μεταμόσχευση οργάνου από οροθετικό δότη. Συνήθως η CMV ίωση είναι είτε ασυμπτωματική είτε ήπιας μορφής στους ενήλικες, σε λίγες περιπτώσεις παρουσιάζει συμπτώματα, όπως η λοιμώδης μονοκυρήνωση και σπανιότερα εκδηλώσεις ηπατίτιδας. Η οροθετικότητα στον γενικό πληθυσμό είναι

διεθνώς πολύ υψηλή (> 40%).

Ωστόσο, όταν μολυνθεί πρωτογενώς γυναίκα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης της υπάρχει σοβαρός κίνδυνος για την υγεία του εμβρύου. Η συχνότητα συγγενούς λοίμωξης του εμβρύου ανέρχεται στο 0,2-2% των γεννήσεων αναλόγως του κοινωνικοοικονομικού υποστρώματος. Μετά από διαπιστωμένη **ενεργό CMV πρωτογενή λοίμωξη**, η πιθανότητα διαπλακουντιακής μεταφοράς του ιού είναι υψηλή: ~20-40% ανάλογα με το τρίμηνο κύησης (η συχνότητα μεγαλώνει όσο αυξάνουν οι εβδομάδες κύησης ωστόσο η σοβαρότητα της λοίμωξης μειώνεται). Ευτυχώς, η συχνότητα μεταφοράς του ιού σε **δευτερογενή CMV λοίμωξη** σε οροθετικές γυναίκες είναι πολύ χαμηλή: 0,5-1,2%³⁰.

Το 10% των CMV μολυσμένων εμβρύων θα παρουσιάσουν σοβαρά προβλήματα: είτε ενδομήτριο θάνατο είτε μετά τη γέννηση, νεογνική υπολειπόμενη σωματική ανάπτυξη, μικροκεφαλία, υδροκεφαλία, ενδοκρανιακές ασβεστώσεις, ηπατοσπληνομεγαλία, θρομβοκυτταροπενία. Ένα ακόμη 10-15% θα παρουσιάσουν σοβαρά προβλήματα μέσα στα πρώτα 4 έτη της ζωής τους: κώφωση και διανοητική καθυστέρηση. Τα υπόλοιπα 75-80% των μολυσμένων εμβρύων θα παραμείνουν ασυμπτωματικά³¹.

Συνηθέστερα, η λοίμωξη στην έγκυο γυναίκα διαπιστώνεται κατά τον ορολογικό έλεγχο TORCH (TOxoplasma, Rubella, CMV, Herpes) του πρώτου τριμήνου κύησης. Εάν παρουσιασθούν αντισώματα IgM έναντι CMV, τότε για τη πλήρη εξακρίβωση της λοίμωξης απαιτείται επανάληψη της εξέτασης στις επόμενες 2-3 εβδομάδες. Εάν το προφίλ των IgG και IgM αντισωμάτων συνάδει με την εικόνα πρόσφατης ενεργούς CMV λοίμωξης στην έγκυο γυναίκα, τότε επιβάλλεται: α) ο προγεννητικός υπερηχογραφικός έλεγχος για ανίχνευση μικροκεφαλίας ή υπερηχογενούς εντέρου ή υπολειπόμενης σωματικής ανάπτυξης και β) η μοριακή ανίχνευση του CMV ιού σε εμβρυϊκά κύτταρα. Ο σημαντικότερος λόγος για τις παραπομπές αυτές είναι η σωτηρία του εμβρύου από μη-απαραίτητο τερματισμό της κύησης.

Το καλύτερο υλικό για την ανίχνευση έχει διαπιστωθεί ότι είναι το **αμνιακό υγρό** όπου υπάρχουν ούρα και κύτταρα του εμβρύου όπου και αποβάλλεται τυχόν CMV και η καλύτερη χρονική στιγμή είναι μεταξύ της 20-23^{ης} εβδομάδας κύησης. Οι λόγοι είναι οι κάτωθι: α) απαιτούνται τουλάχιστον 6 εβδομάδες από τη πρωτογενή μητρική CMV ιαιμία για τη μεταφορά του ιού μέσω του πλακούντα, β) η λήψη τροφοβλάστης δεν θεωρείται κατάλληλο υλικό γιατί λαμβάνεται νωρίς (10-14^η εβδομάδα) και συνήθως επιμολύνεται με μητρικό αίμα και τέλος γ) η λήψη ομφαλικού αίματος μετά τη 22^η εβδομάδα (και για μέτρηση IgM αντισωμάτων στο εμβρυϊκό πλάσμα) είναι η πιο επικίνδυνη από τις τρεις επεμβατικές πράξεις για την αποβολή ενός υγιούς εμβρύου^{30,32}.

Για την μοριακή ανίχνευση του DNA του ιού επιβάλλεται υπερευαίσθητη **nested PCR** μεθοδολογία συνηθέστερα στο IE CMV γονίδιο³³. Έως τώρα η μέτρηση ιικού CMV φορτίου στο αμνιακό υγρό με μέθοδο **real-time PCR** δεν έχει καταφέρει να διαχωρίσει μολυσμένα έμβρυα τα οποία θα αναπτύξουν συμπτωματολογία από αυτά που θα παραμένουν ασυμπτωματικά³⁴. Έτσι δυστυχώς, η θετική απάντηση για τη παρουσία DNA του CMV ιού στα εμβρυϊκά κύτταρα καταλήγει σε τερματισμό της κύησης καθώς πλέον θεωρείται υψηλού κινδύνου για συγγενείς ανωμαλίες στο κύημα. Αντίθετα, η αρνητική απάντηση καθυστερεί κατά ένα μεγάλο ποσοστό την έγκυο γυναίκα.

4.2. Τοξόπλασμα

Το *Toxoplasma Gondii* είναι ένα ενδοκυττάριο παράσιτο με κύριο ξενιστή τη γάτα. Οι άνθρωποι παθαίνουν τοξοπλάσμωση με την πρόσληψη τροφής ή νερού που είναι μολυσμένα από την ανθεκτική μορφή του παρασίτου (ωοκύστεις) το οποίο αποβάλλεται στα κόπρανα των μολυσμένων γατών και θάβεται συνήθως στο έδαφος ή με τη πρόσληψη της ιστικών κύστεων του παρασίτου που βρίσκεται σε μολυσμένο και όχι καλά μαγειρεμένο κρέας. Η λοίμωξη είναι ήπια στους περισσότερους ενήλικες εκτός από τους ανοσοκατασταλμένους και τους ασθενείς με AIDS. Η οροθετικότητα είναι υψηλή ειδικά στους πληθυσμούς της Β. Ευρώπης και Β. Αμερικής όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός κατοικίδιων ζώων.

Κατά τα αντίστοιχα με το CMV, όταν μολυνθεί πρωτογενώς γυναίκα με τοξόπλασμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης της, υπάρχει σοβαρός κίνδυνος για την υγεία του εμβρύου. Οι συχνότητες διαπλακουντιακής μόλυνσης στα τρίμηνα της εγκυμοσύνης και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων είναι αντίστοιχα με τη λοίμωξη από CMV όπως και ο τρόπος εργαστηριακού ελέγχου^{35,36}. Η διαφορά είναι ότι υπάρχει θεραπευτική αγωγή που μπορεί να δοθεί σε έγκυο γυναίκα με ενεργό τοξοπλάσμωση (π.χ. ροβαμυκίνη κλπ) η οποία είτε θα αποτρέψει τη μετάδοση του παρασίτου είτε θα εμποδίσει τις ανεπανόρθωτες βλάβες στο κύημα. Έτσι, η συνιστώμενη μοριακή ανίχνευση του DNA του παρασίτου μπορεί να γίνει στο αμνιακό υγρό αρκετά νωρίτερα: από τη 16^η εβδομάδα κύησης ώστε να αρχίσει το συντομότερο η θεραπεία. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο γονίδιο για την αντίδραση PCR είναι το B1 γονίδιο καθώς επαναλαμβάνεται 35 φορές στο γονιδίωμα του τοξοπλάσματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem* 1997;43:2021-38.
2. Saiki RK. Amplification of genomic DNA. In: Innis A, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990:13-20.
3. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;29:1281-5.
4. Higuchi R, Kwok S. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;339:237-8.
5. McCreedy BJ, Callaway TH. Laboratory design and work flow. In: Persing DH, ed. *Diagnostic molecular Microbiology; principles and applications*. Washington, DC: ASM Press, 1993:149-59.
6. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA, ed. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press, 1989:31-8.
7. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells and other fluids. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990:146-52.
8. Ballagi-Pordany A, Belak S. The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol Cell Probes* 1996;10:159-64.
9. Saiki RK. The design and optimization of the PCR. In: Erlich HA, ed. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. New York: Stockton Press, 1989:7-16.
10. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:1-17.

11. Alani RM, Munger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 1998;16:330-7.
12. McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 2001;82:15-33.
13. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690-8.
14. Wright TC, Jr., Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002;287:2120-9.
15. Wright TC, Jr., Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical-cancer screening. *N Engl J Med* 2003;348:489-90.
16. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
17. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-9.
18. Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004;111:278-85.
19. Oh TJ, Kim CJ, Woo SK, Kim TS, Jeong DJ, Kim MS et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2004;42:3272-80.
20. Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2095-100.
21. Ting Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990:356-67.
22. Lungu O, Wright TC, Jr., Silverstein S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes* 1992;6:145-52.
23. Labropoulou V, Diakomanolis E, Dailianas S, Kalpaktoglou K, Rodolakis A, Beaudenon S et al. Genital papillomavirus in Greek women with high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J Med Virol* 1996;48:80-7.
24. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C et al. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 1998;36:3248-54.
25. Nicoll JA, Love S, Burton PA, Berry PJ. Autopsy findings in two cases of neonatal herpes simplex virus infection: detection of virus by immunohistochemistry, in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Histopathology* 1994;24:257-64.
26. Lee HH, Chernesky MA, Schachter J, Burczak JD, Andrews WW, Muldoon S et al. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine. *Lancet* 1995;345:213-6.
27. Morre SA, Van Valkengoed IG, Moes RM, Boeke AJ, Meijer CJ, Van den Brule AJ. Determination of *Chlamydia trachomatis* prevalence in an asymptomatic screening population: performances of the LCx and COBAS Amplicor tests with urine specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:3092-6.
28. Crotchfelt KA, Pare B, Gaydos C, Quinn TC. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the Gen-Probe AMPLIFIED *Chlamydia Trachomatis* Assay (AMP CT) in urine specimens from men and women and endocervical specimens from women. *J Clin Microbiol* 1998;36:391-4.

29. Razin S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. *Mol Cell Probes* 1994;8:497-511.
30. Enders G, Bader U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn* 2001;21:362-77.
31. Antsaklis AJ, Daskalakis GJ, Mesogitis SA, Koutra PT, Michalas SS. Prenatal diagnosis of fetal primary cytomegalovirus infection. *BJOG* 2000;107:84-8.
32. Donner C, Liesnard C, Brancart F, Rodesch F. Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 1994;14:1055-9.
33. Brytting M, Sundqvist VA, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991;32:127-38.
34. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* 1999;37:3350-2.
35. Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999;353:1829-33.
36. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994;331:695-9.