



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

10-1-2018

Βασιλική Καλότση, PhD, Ε.ΔΙ.Π

□ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

□ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

- Ποιες είναι οι γενετικές και μοριακές αναλύσεις που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη
- Βασικές μεθοδολογικές αρχές
 - ▣ βασικές αρχές PCR

□ ΥΛΙΚΟ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

□ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ/ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

□ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΔΥΟ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ

- Εφαρμογές γενετικών και μοριακές αναλύσεων

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

- Η διαδικασία προσδιορισμού της φύσης συγκεκριμένης ασθένειας μέσω

- **Ιστορικού**

- **Κλινικής εξέτασης**

- **Εργαστηριακών εξετάσεων**

Εργαστηριακές
εξετάσεις

Κλινική
εξέταση

ιστορικό



ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

- Εφαρμόζει την γνώση που έχει κατακτηθεί μέσω της έρευνας στο πεδίο της Μοριακής Βιολογίας στην Ιατρική πρακτική
- Από την έρευνα στην κλινική πράξη
- ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

- Η γενετική και η μοριακή βιολογία συμβάλλουν στη διαγνωστική προσέγγιση των ασθενειών που οφείλονται σε
- **Γενετικές διαταραχές**
 - ▣ Γαμετική σειρά
 - ▣ Σωματική σειρά
- **Λοιμώδη αίτια**

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ

Γαμετικά κύτταρα για

- ▣ Διάγνωση κληρονομικών νοσημάτων
 - Θαλασσαιμίες, κυστική ίνωση, κληρονομική αιμοχρωμάτωση κ.α

- ▣ Προγεννητικός έλεγχος εμβρύων
 - Χοριακές λάχνες, εμβρυϊκά κύτταρα στο αμνιακό υγρό
 - Προεμφυτευτικός έλεγχος σε IVF
 - Κυστική ίνωση
 - Μυοτονική δυστροφία
 - Νόσος Huntington
 - Αχονδροπλασία κ.α
 - Γενετικά σύνδρομα
 - Prader-Willi
 - Angelman κ.α

- ▣ Προσυμπτωματικός έλεγχος (πρώιμη διάγνωση)
 - νευρολογικές διαταραχές, νόσος Huntington
 - οικογενείς μορφές καρκίνου, *BRCA1* *BRCA2*

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ

- ▣ Διαλογή ασυμπτωματικών ατόμων σε
 - ζευγάρια με κίνδυνο για γενετικές βλάβες, λόγω οικογενειακού ιστορικού ή προχωρημένης ηλικίας της μητέρας
 - νεογνά για αιμοσφαιρινοπάθειες, κυστική ίνωση κλπ
- ▣ Φαρμακογενετική
 - Έλεγχος γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό φαρμάκων π.χ. Warfarin, *CYP2C9*

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ

Σωματικά κύτταρα για

- ▣ Διάγνωση νεοπλασματικών νοσημάτων
 - Λεμφώματα
 - Λευχαιμίες
- ▣ Σχεδιασμός θεραπείας
- ▣ Αναζήτηση και
- ▣ παρακολούθηση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου με τον κατάλληλο μοριακό δείκτη

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Λοιμώξεις ↑↑↑↑

Γενετική ταυτοποίηση

- Ιατροδικαστική
- Παρακολούθηση χίμαιρας σε μεταμοσχευμένους ασθενείς

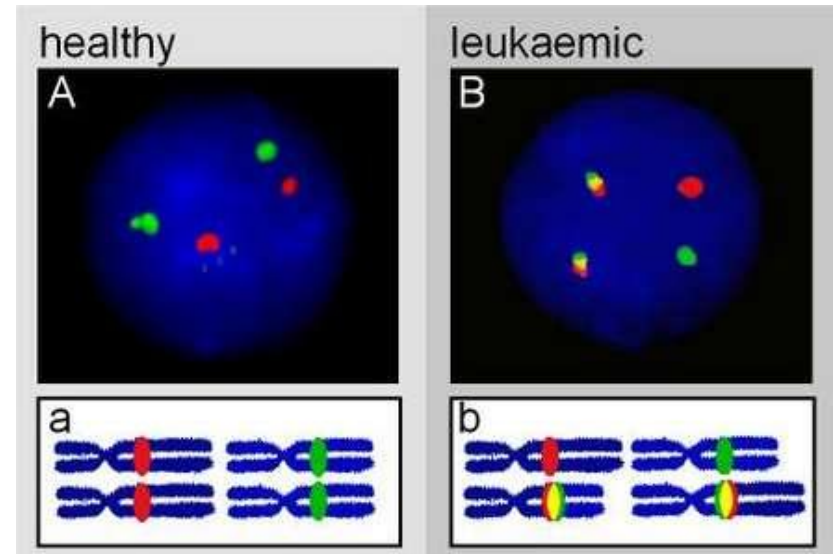
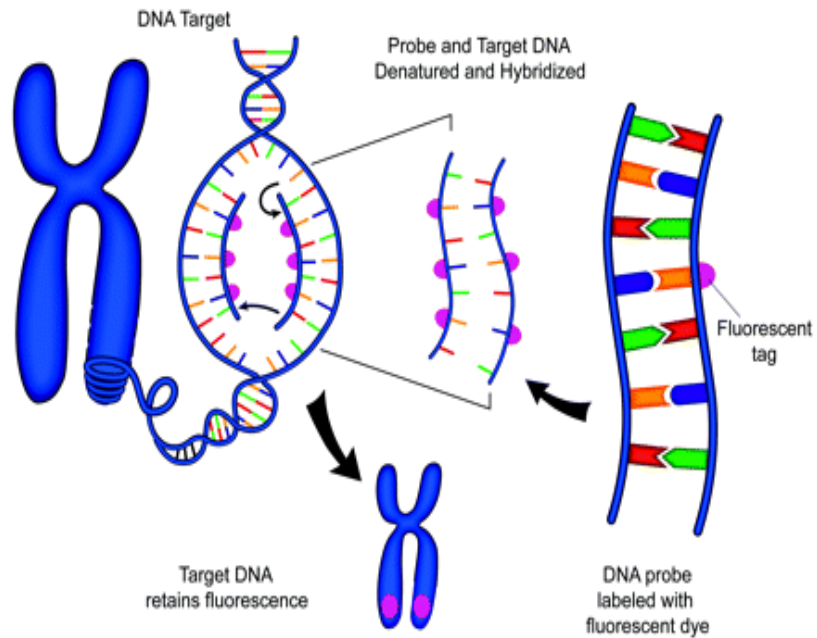
ΣΥΜΒΟΛΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

- Προγεννητική διάγνωση
- Διάγνωση κληρονομικών νοσημάτων
- Διάγνωση νεοπλασματικών νόσων
- Λοιμώξεις
- Φαρμακογενετική
- Γενετική ταυτοποίηση
- κ.α.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

- Καρυότυπος (κυτταρογενετική)
 - ▣ ανίχνευση αριθμητικών ανωμαλιών
 - ▣ χρωσωμικές ανακατατάξεις ή ανωμαλίες μεγέθους 3-5 Mb.
- FISH, αναζήτηση συγκεκριμένου στόχου
- CGH συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός (μοριακός καρυότυπος) ανιχνευτική ικανότητα κάτω από 1Mb

FISH

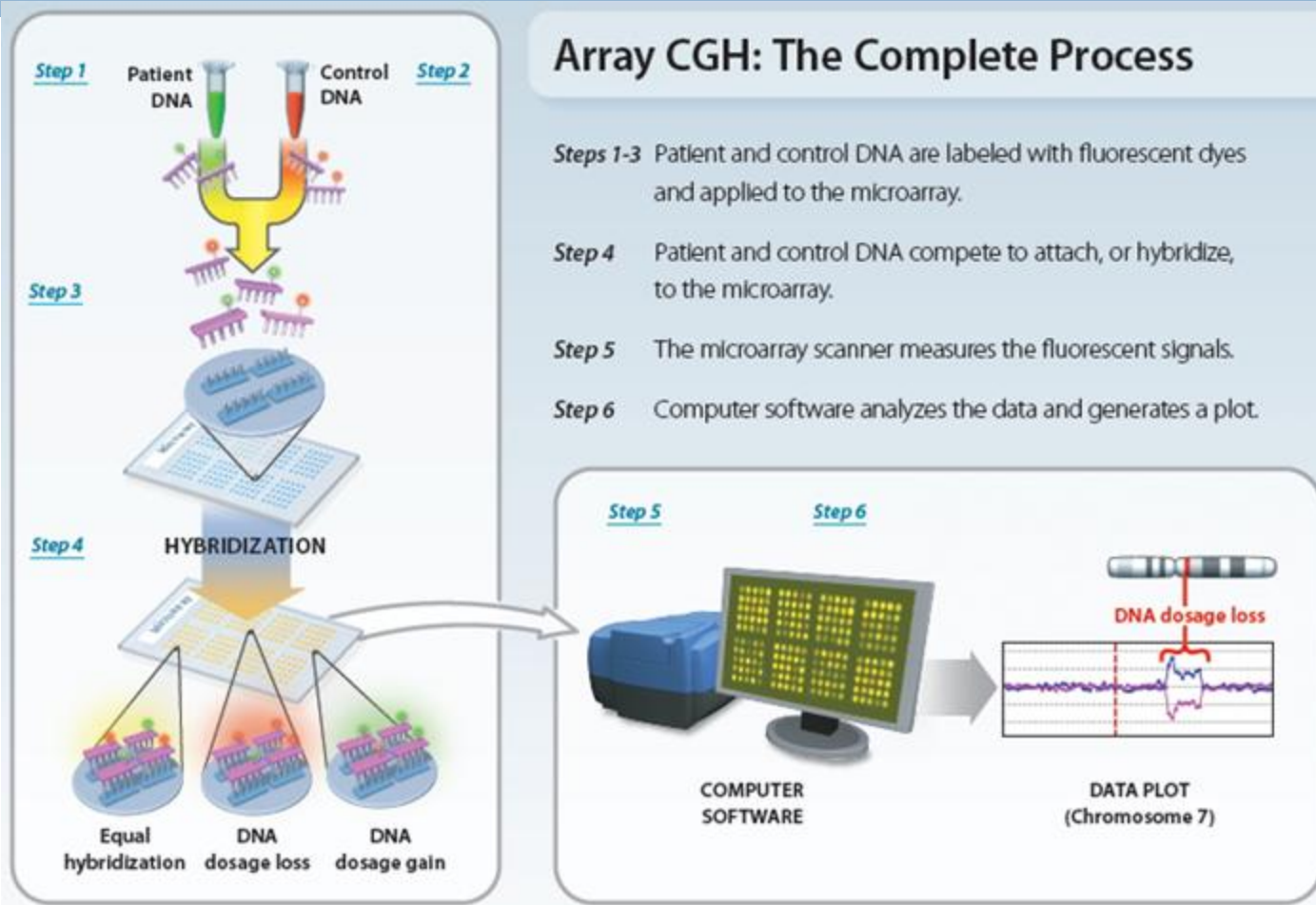


FISH

In Situ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΘΟΡΙΣΜΟ

- Με τη *FISH* είναι δυνατό να ανιχνευθούν υπομικροσκοπικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που δε φαίνονται στον καρυότυπο
- Η τεχνική *FISH* είναι επίσης δυνατό να εφαρμοσθεί σε μη καλλιεργημένους μεσοφασικούς πυρήνες
 - ▣ π.χ. σε αμνιακό υγρό επιτρέπει την ταχεία προγεννητική διάγνωση των συχνότερων χρωμοσωμικών ανωμαλιών του εμβρύου

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ



Array CGH: The Complete Process

Steps 1-3 Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.

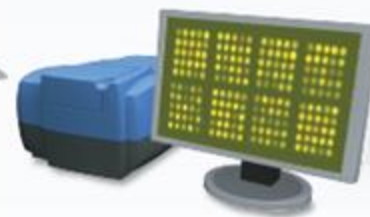
Step 4 Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.

Step 5 The microarray scanner measures the fluorescent signals.

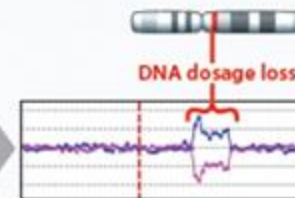
Step 6 Computer software analyzes the data and generates a plot.

Step 5

Step 6



COMPUTER SOFTWARE



DATA PLOT
(Chromosome 7)

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

- Ανίχνευση μικρού μεγέθους χρωσωμικών αλλαγών
- >1Mb
- Δεν χρειάζεται κύτταρα, αλλά μόνο DNA
- Δεν ανιχνεύει ισοζυγισμένες μεταθέσεις και αναστροφές

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

- **PCR**
 - Q-PCR, **Real Time PCR**
 - Multiplex PCR
 - Nested PCR
 - RT-PCR
 - Long PCR
 - Κ.α
- **Sequencing**
- Κλωνοποίηση

ΜΟΡΙΑ «ΚΛΕΙΔΙΑ» ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ I

Περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ένζυμα) «μοριακό» ψαλίδι
Τέμνουν το DNA σε συγκεκριμένες θέσεις

Ενζυμο	Απομονωμένο από	Θέση τομής
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY 13	5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAAG-5'
<i>Hind III</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'
Cas9 CRISPR/Cas 9	<i>Streptococcus pyogenes</i>	RNA καθοδηγούμενη

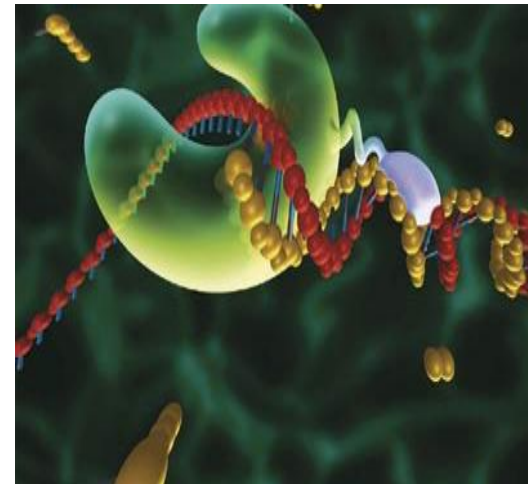
ΜΟΡΙΑ «ΚΛΕΙΔΙΑ» ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ II

□ Πολυμεράσες

- ▣ Ταq DNA πολυμεράση
- ▣ Αντίστροφη μεταγραφάση

Ανέτρεψε το δόγμα της βιολογίας

- **DNA → RNA → πρωτεΐνη**
- **RNA → DNA (cDNA, complementary DNA)**



ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟ ΥΛΙΚΟ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

RNA

Συνήθως μονόκλωνο

Ουρακίλη

Ριβόζη

Ιστοειδικότητα

DNA

δίκλωνο

Θυμίνη

2' δεοξυριβόζη

όχι

□ DNA

- Συνήθως απομονώνεται από αίμα (ολικό αίμα, πλάσμα, ορός) πτύελα, κλπ
- Ανθεκτικό μόριο
- Απλή η διαδικασία της απομόνωσης
- Καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών
- Καθαρισμός μέσω στήλης

□ RNA

- Συνήθως απομονώνεται από τον εξεταζόμενο ιστό
- **Ευαίσθητο μόριο**

ΟΡΘΗ ΑΠΟΣΤΟΛΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

- Αποστολή κατάλληλου είδους και ποσότητας δείγματος
 - ▣ Ορός ?, πλάσμα?, ολικό αίμα?, ούρα?, κλπ
- Αναγνώριση στοιχείων ασθενούς
 - ▣ Ονοματεπώνυμο, ημερομηνία γεννήσεως
 - ▣ Είδος αιτούμενης εξέτασης
 - ▣ Απαιτούμενες πληροφορίες
- Θερμοκρασία αποστολής δείγματος
 - ▣ 18-25⁰C, 2-8⁰C, -10⁰C

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ

- Επιλογή πιστοποιημένων κατά **ISO 9001** εργαστηρίων και **δη** διαπιστευμένων κατά **ISO 15189**
- Πιστοποίηση αφορά συμμόρφωση σε ένα πρότυπο π.χ. **ISO 9001**
- Διαπίστευση για τον έλεγχο τεχνικής ικανότητας του εργαστηρίου (εξειδίκευση)

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Kary Mullis Βραβείο Nobel 1993



PCR

- Q-PCR, Real Time PCR
- Multiplex PCR
- Nested PCR
- RT-PCR
- Long PCR
- K.α

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

- **Sequencing**
- Next Generation Sequencing (NGS)
- Στύπωμα κατά Southern (Southern Blot)
- Κλωνοποίηση

- **FISH (μοριακή κυτταρογενετική)**
- DNA microarrays (έκφραση γονιδίων σε νεοπλάσματα)
- CGH συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός (μοριακός καρυότυπος)

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

□ Η PCR ΣΥΝΙΣΤΑΤΑΙ ΑΠΟ:

▣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΕΠΩΑΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

■ ΧΡΟΝΟΥ

■ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

■ Αποδιάταξη 94⁰C

■ Υβριδισμός εκκινητών 55-65⁰C

■ Επιμήκυνση 72⁰C

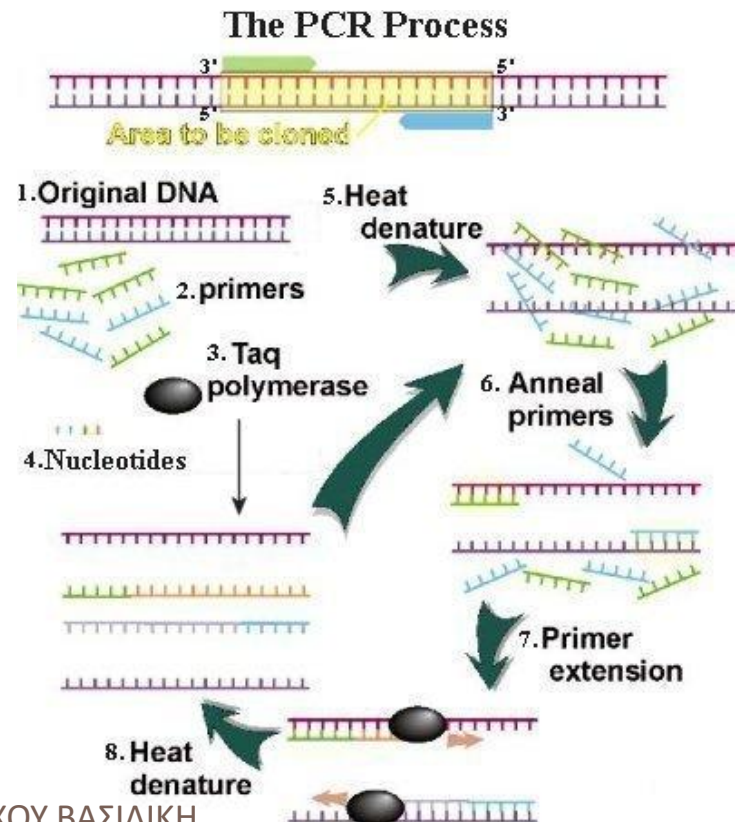
ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ PCR

Βήματα αντίδρασης

Αρχική αποδιάταξη του
δίκλωνου γενωμικού DNA

Αποδιάταξη- denaturation 95°C
Υβριδισμός-annealing εκκινητών
 $55-65^{\circ}\text{C}$

Επιμήκυνση-extension 72°C
Απλή και γρήγορη μέθοδος



ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ RT-PCR

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction RT-PCR

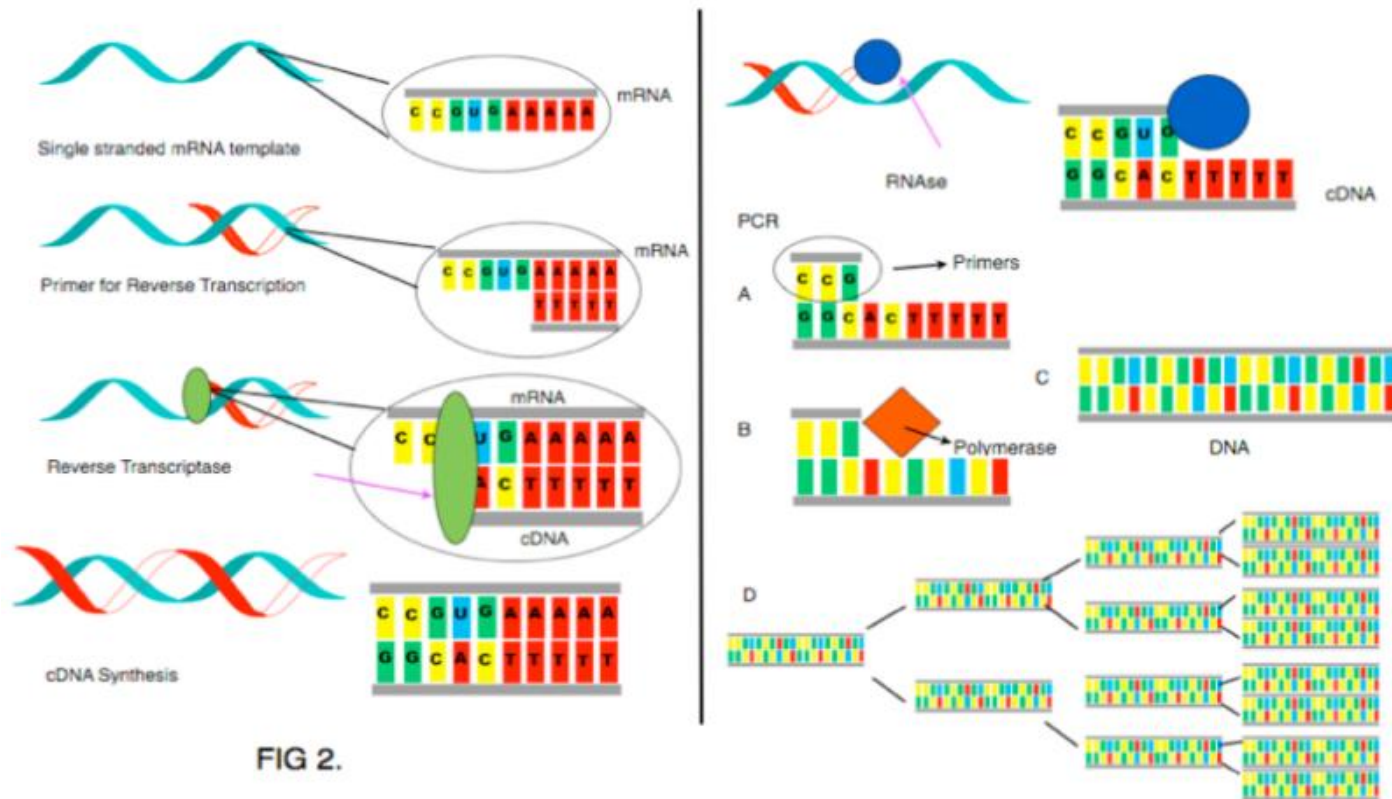


FIG 2.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ PCR

«ΠΡΟΔΡΟΜΗ» ΣΥΣΚΕΥΗ PCR



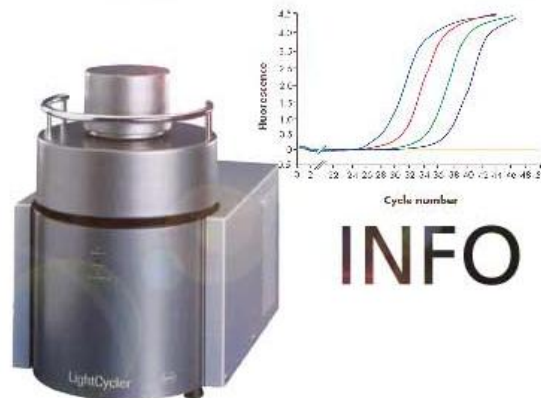
ΑΥΤΟΜΑΤΗ ΣΥΣΚΕΥΗ PCR



Real Time PCR

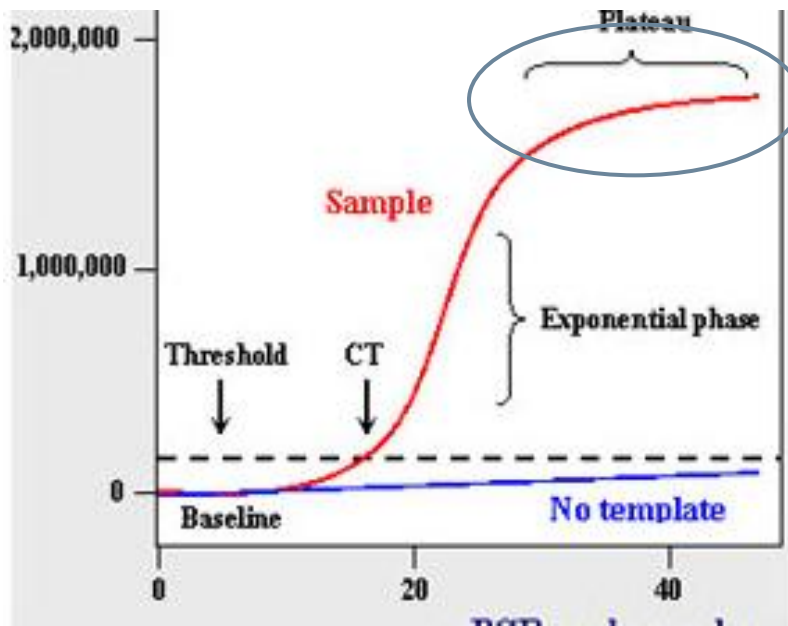
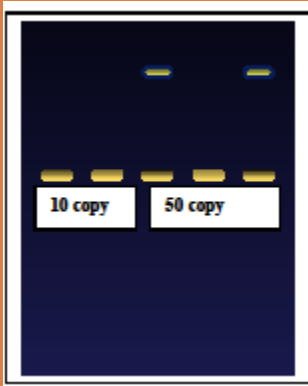
- Ταχεία μεταβολή του χρόνου και της θερμοκρασίας
- Παρακολούθηση της αντίδρασης

Real Time PCR



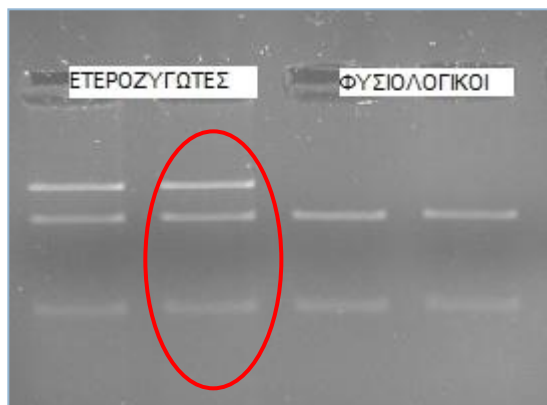
ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗΣ PCR ΚΑΙ REAL TIME PCR

- Η παραδοσιακή PCR μετρά στο τέλος της αντίδρασης το προϊόν (plateau)
- Τα αποτελέσματα στη Real-Time εκφράζονται άμεσα σε αριθμούς
- Είναι αυτοματοποιημένη μέθοδος
- Έχει μεγάλη ευαισθησία
- Έχει μεγάλη ακρίβεια
- Δεν χρειάζεται επεξεργασία μετά από την αντίδραση
- Είναι ταχύτερη 30-45 min
- Ανιχνεύει μικρές ποσοτικές διαφορές
- Η αύξηση του φθορισμού στη Real-Time είναι ανάλογη του προϊόντος

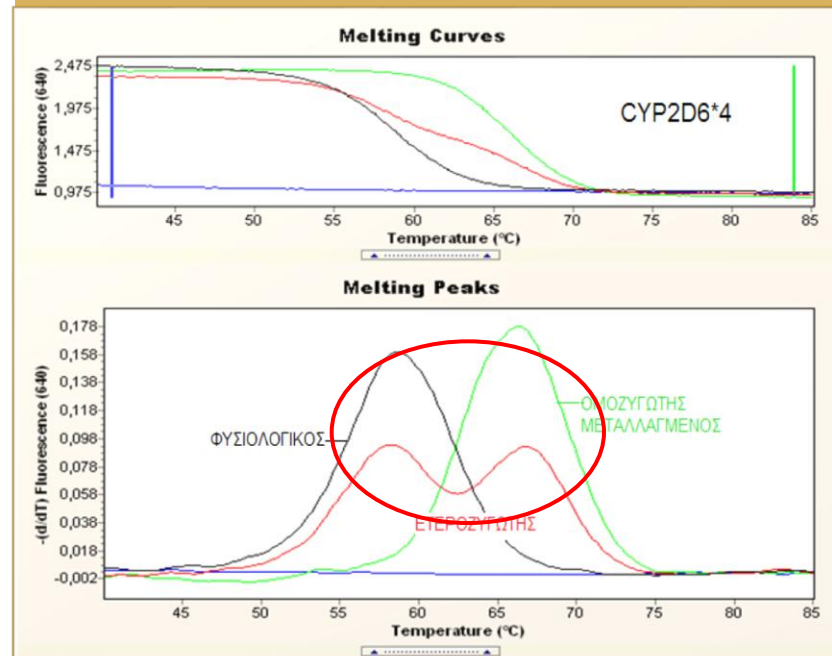


ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ REAL TIME ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ PCR

ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ PCR

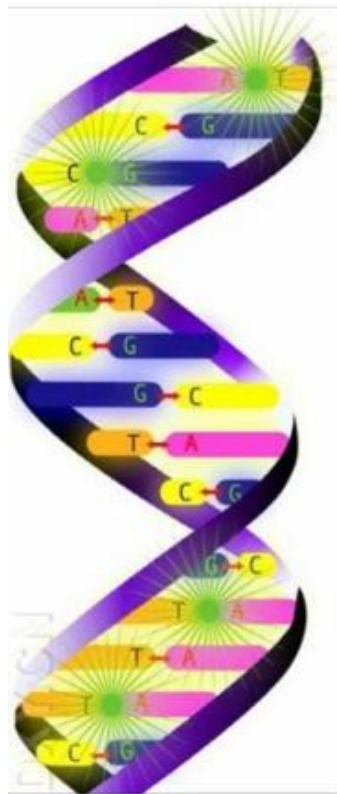
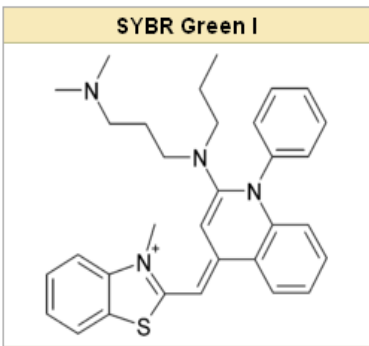


REAL TIME

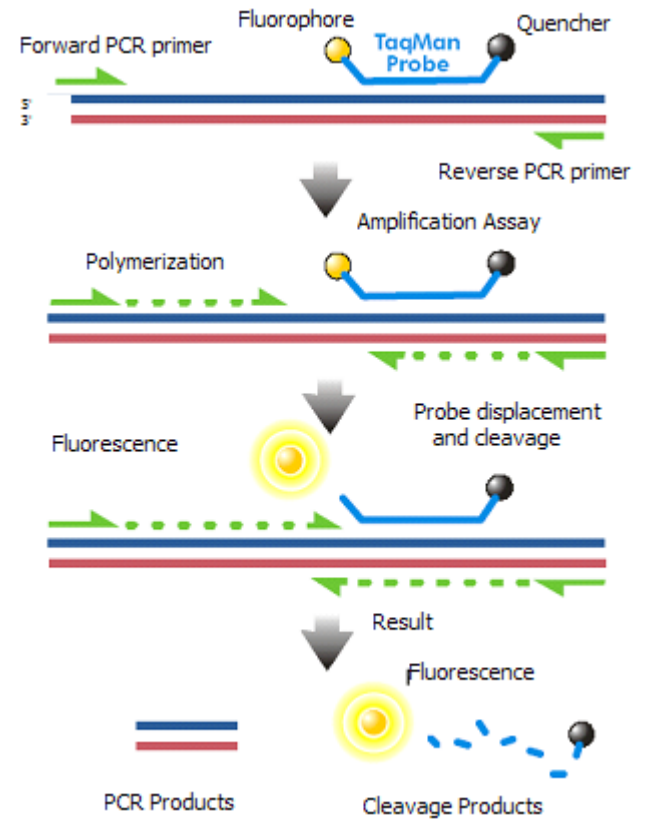


REAL TIME

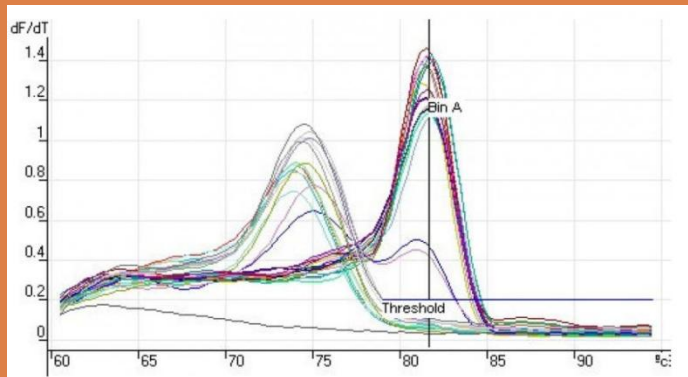
SYBR Green



TaqMan



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ Real Time PCR



- Γονότυπος
- Έκφραση γονιδίων
- Ποσοτικοποίηση αντιγράφων (παρακολούθηση υπολειμματικής νόσου)
- Λοιμώξεις
- Προσδιορισμός ιικού φορτίου κ.α

ΛΑΘΗ ΣΤΗ PCR

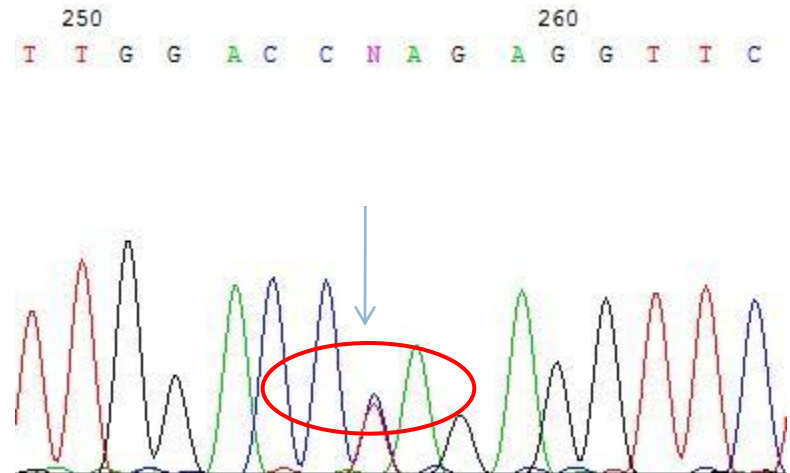
- Όπως κάθε εργαστηριακή τεχνική μπορεί να οδηγήσει σε λάθος αποτέλεσμα
- Μεγάλη ευαισθησία (0.01%-0.001%)
 - ▣ Επιμόλυνση από άλλα δείγματα ή και από τον χειριστή, ειδικά σε δοκιμασίες DNA για μολυσματικές ασθένειες
 - ▣ Λάθη από τις Taq πολυμεράσες
 - ▣ Ποσότητα δείγματος DNA/RNA
 - ▣ Ποιότητα του δείγματος DNA/ RNA
 - ▣ Αναστολείς αντίδρασης
 - ▣ Γραμματειακά λάθη

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ DNA SEQUENCING

30 ΧΡΟΝΙΑ ΠΡΙΝ



ΑΚΟΜΗ ΚΑΙ ΣΗΜΕΡΑ Ο «ΧΡΥΣΟΣ ΚΑΝΟΝΑΣ» ΓΙΑ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ



Next Generation Sequencing (NGS)

Platforms: Ion Torrent



PGM

- Three sequencing chips available:
 - 314 = up to 100 Mb
 - 316 = up to 1 Gb
 - 318 = up to 2 Gb
- 2-7 hour/run
- up to 400 bp read length
- 400kreads up to 5 Mreads



Proton

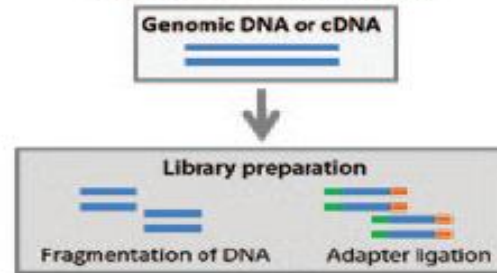
- Two human exomes (Proton 1 chip) or one genome (@20X-Proton 2 chip) per run
- Ion One Touch or Ion Chef preparatory modules
- 2-4 hour/run
- ~200 bp average read length
- Proton 1 produces 60-80 Mreads ≥ 50 bp



NGS

- Απομόνωση του δείγματος DNA, RNA
- Πολλαπλασιασμός με PCR του δείγματος (DNA, RNA).
- Αλληλούχιση μέσω μιας πειραματικής πλατφόρμας NGS.
- Συλλογή αποτελεσμάτων με τη μορφή εκατοντάδων εκατομμυρίων μικρο-αναγνώσεων αλληλουχιών (sequence reads)
- Ποιοτικός έλεγχος των αποτελεσμάτων (τεχνικοί έλεγχοι, διόρθωση σφαλμάτων).
- Χαρτογράφηση και ποσοτικοποίηση.
- Ανάλυση και ερμηνεία.

TEMPLATE PREPARATION



Η πλατφόρμα PGM βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής του pH λόγω απελευθέρωση H⁺ κατά την σύνθεση της αλυσίδας του DNA (Quail *et al.*, 2012).

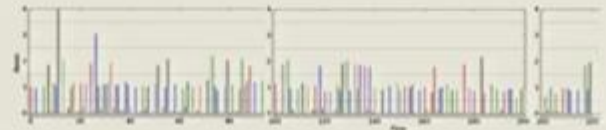
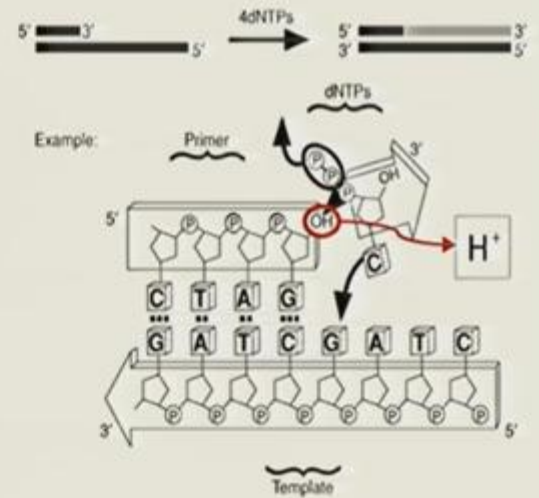
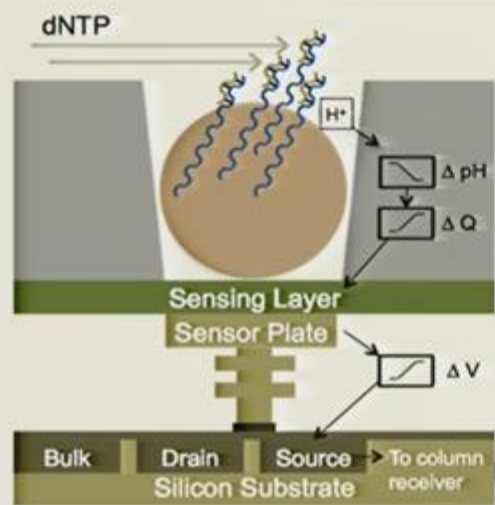
Η πλατφόρμα MiSeq βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού που παράγεται από την ενσωμάτωση των φθοριοσημασμένων νουκλεοτιδίων κατά την σύνθεση της αλυσίδας του DNA (Quail *et al.*, 2012).

SEQUENCING AND IMAGING

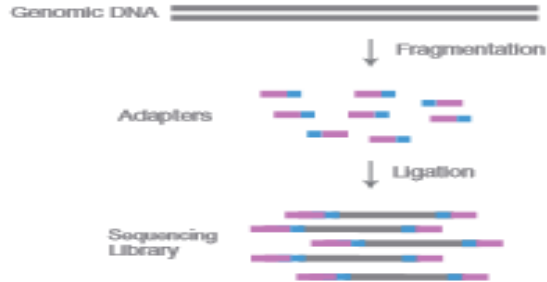


DATA ANALYSIS

ION Torrent-pH Sensing of Base Incorporation

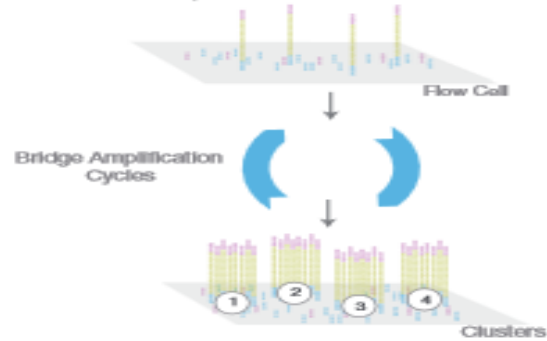


A. Library Preparation



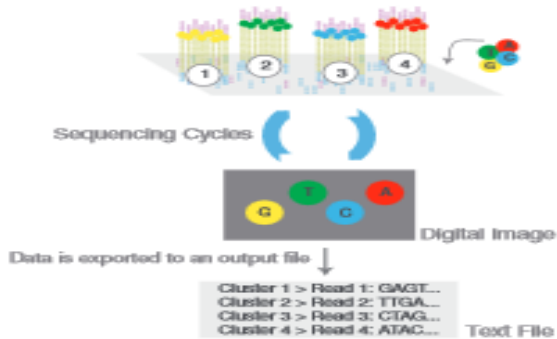
NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

A. Cluster Amplification



Library is loaded into a flow cell and the fragments hybridize to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

C. Sequencing



Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

D. Alignment & Data Analysis



Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

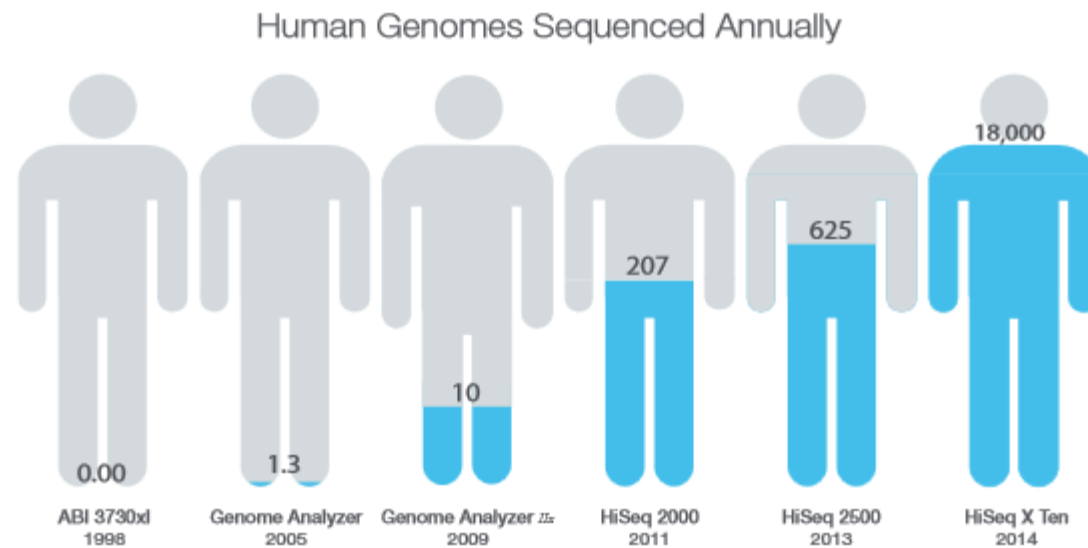


Figure 2: Human Genome Sequencing Over the Decades—The capacity to sequence all 3.2 billion bases of the human genome (at 30x coverage) has increased exponentially since the 1990s. In 2005, with the introduction of the Illumina Genome Analyzer System, 1.3 human genomes could be sequenced annually. Nearly 10 years later, with the Illumina HiSeq X Ten fleet of sequencing systems, the number has climbed to 18,000 human genomes a year.

NGS

- παραγωγή και επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων με την NGS
- “κατευθυνόμενη από τα δεδομένα” επιστήμη (data-driven science)
- “κατευθυνόμενη από υποθέσεις” (hypothesis-driven science)
- οι μικροαναγνώσεις αλληλουχιών (sequence reads), αναλογούν σε μερικά Gigabyte ανεπεξέργαστης πληροφορίας (raw data) για κάθε πείραμα NGS.
- **ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΖΛ ΜΕ 15×10^6 ΚΟΜΜΑΤΙΑ (ανάλογα με το μέγεθος του κομματιού-amplicon) (υπολογιστική βιολογία)**

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ

- **Αναλυτική ευαισθησία:** πόσο καλή είναι η δοκιμασία για την ανάδειξη του μοριακού στόχου.
- **Κλινική ευαισθησία (ειδικότητα):** πόσο καλή είναι η δοκιμασία για την ανάδειξη της σχετιζόμενης νόσου.
- Π.χ. Η PCR μπορεί με 100% ευαισθησία να αναδείξει μία μετάθεση (αναλυτική ευαισθησία)
- Αλλά είναι 40% ευαίσθητη για την ανάδειξη ενός τύπου λεμφώματος όταν τα μισά λεμφώματα αυτού του τύπου (π.χ. λέμφωμα μανδύα) έχουν σημεία θραύσης εκτός των παραπάνω σημείων θραύσης που αναδεικνύει η PCR (κλινική ευαισθησία)

ΤΥΧΑΙΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥΣ

- Πως γίνεται διαχείριση του τυχαίου ευρήματος
- Ανακαλύπτονται συμπτωματικά, χωρίς να εμπίπτουν στον αρχικό σκοπό της εξέτασης ή της έρευνας μπορεί να υπάρχει και επιστημονική αβεβαιότητα για την κλινική σημασία αυτών
- Ενημέρωση του ασθενούς
- Σεβασμός στο δικαίωμα «στην άγνοια» των ενδιαφερομένων

ΤΥΧΑΙΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Παθογενετικά ευρήματα,
μεταλλάξεις που με βεβαιότητα σχετίζονται με νόσο

Μη παθογενετικά ευρήματα

- Μεταλλάξεις με υπολειπόμενο χαρακτήρα, που μπορεί να επηρεάσουν τους απογόνους του
- Ανακάλυψη ασύμβατης πατρότητας

΄Αλλα ευρήματα άγνωστης κλινικής σημασίας....

ΤΥΧΑΙΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

- Σεβασμός της αυτονομίας του ασθενούς
- Συναίνεση ύστερα από ενημέρωση για την εκτέλεση της εξέτασης και για την πληροφόρηση του αποτελέσματος
- Δικαίωμα του ασθενούς στην «άγνοια»
- «Καθήκον αληθείας» ιατρού ή ερευνητή

1^η Κλινική περίπτωση

Αιτία εισόδου: Ασθενής άνδρας 25 ετών εισέρχεται στην κλινική λόγω αδυναμίας και εμφάνισης αιμορραγικών εκδηλώσεων από το δέρμα και τους βλεννογόνους.

Παρούσα νόσος: Από 20ημέρου ο ασθενής αναφέρει αίσθημα αδυναμίας και κόπωσης στην προσπάθεια. Από πενθημέρου παρατήρησε αιμορραγικές εκδηλώσεις στα κάτω άκρα και από διημέρου ουλορραγίες.

Αναμνηστικό: Ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό, γονείς εν ζωή χωρίς ιατρικά προβλήματα.

Ανασκόπηση συστημάτων: Αναπνευστικό: Δύσπνοια κατά την προσπάθεια που εμφανίσθηκε από 20ημέρου και επιδεινώνεται σταδιακά.

Δέρμα-βλεννογόνοι: Από πενθημέρου μικρές πολλαπλές ερυθρές βλάβες στα κάτω άκρα που αυξήθηκαν σε μέγεθος σε ορισμένες περιοχές. Παρατήρησε μικρές ουλορραγίες κατά το βούρτσισμα των οδόντων αλλά και

Εργαστηριακές εξετάσεις:

Γενική αίματος: Hb: 8g/dl, Ht: 25%, MCV: 90 fl, WBC: 92.000/mm³ (βλάστες: 98%, χωρίς εμφανή κοκκία στο πρωτόπλασμα, Πολυ: 1%, Μονο: 1%), αιμοπετάλια: 5.000/κχ, DH: 2,5 κανώτερη φυσιολογική τιμή, λοιπός βιοχημικός και χρόνοι PT, APTT εντός φυσιολογικών ορίων.

Τρέχουσα διάγνωση: Οξεία λευχαιμία.

Διαφορική διάγνωση: α) οξεία μυελογενής αδιαφοροποίητη, M0 β) Β-Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, γ) T-οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Διαγνωστική εξέταση: Άνοσοφαινότυπος κυττάρων αίματος: 10% των βλαστών θετικοί στη μυελοϋπεροξειδάση, και 90% αυτών θετικοί στα αντιγόνα CD34, CD33, CD13, ενώ ήταν αρνητικοί για τα αντιγόνα CD3, CD7, CD2, CD19, CD20, TdT.

Διάγνωση: Οξεία μυελογενής λευχαιμία, M0 (αδιαφοροποίητη).

Ερωτήσεις

1. Ο καρυότυπος μυελού των οστών είναι υποχρεωτικός στον ασθενή μας;
2. Υπάρχουν άλλοι μοριακοί δείκτες που συνιστώνται να γίνονται κατά τη διάγνωση σύμφωνα με τις οδηγίες της European Leukemia Net;
3. Ποια είναι η σύγχρονη ταξινόμηση της OMA;
4. Ο ασθενής μετά το πρώτο σχήμα χημειοθεραπείας 3+7 (ανθρακυκλίνη IV 3 ημέρες και αρασιτίνη IV 7 ημέρες) επιτυγχάνει πλήρη ύφεση της νόσου. Από τι θα εξαρτηθεί το λοιπό θεραπευτικό πλάνο του ασθενούς;

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΟΜΛ

- **Παραδοσιακές τεχνικές**
 - ▣ **Μορφολογία κυττάρων**
 - περιφερικού αίματος και
 - μυελού των οστών
 - ▣ **Ανοσοφαινότυπος κυττάρων**
 - περιφερικού αίματος και
 - μυελού των οστών
 - ▣ **Καρυότυπος**
- **Μοριακές τεχνικές**
 - ▣ FISH
 - ▣ PCR, Real-Time PCR
 - ▣ NGS

ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΟΜΛ

- Η κατάταξη της ΟΜΛ βασιζόταν στον κυτταρογενετικό έλεγχο (καρυότυπος)
- Σήμερα η ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια εμπλεκόμενα στη λευχαιμογένεση συμμετέχει στην κατάταξη της ΟΜΛ, συμπληρώνοντας τα κυτταρογενετικά στοιχεία (καρυότυπο)
- Η ΟΜΛ έχει πολλούς υποτύπους και η θεραπεία και πρόγνωσή της ποικίλει ανάλογα με τους τύπους αυτούς

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΟΜΛ

M0	Μυελοβλαστική λευχαιμία από αδιαφοροποίητα κύτταρα
M1	Μυελοβλαστική λευχαιμία με ελάχιστα διαφοροποιημένα βλαστικά κύτταρα
M2	Μυελοβλαστική λευχαιμία με βλαστικά κύτταρα που αρχίζουν να διαφοροποιούνται
M3	Οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία
M4	Οξεία μυελομονοκυτταρική λευχαιμία και M4eo, Οξεία μυελοκυτταρική με ηωσινοφιλία.
M5	Οξεία μονοβλαστική (M5α) και οξεία μονοκυτταρική (M5β) λευχαιμία
M6	Ερυθρολευχαιμία
M7	Μεγακαρυοκυτταρική λευχαιμία
M8	Οξεία βασεοφιλική λευχαιμία

Tables

Table. Cytogenetic Risk Factors

Better Risk	inv(16), t(16;16), t(8;21), t(15;17)
Intermediate Risk	Normal cytogenetics, +8, t(9;11); other chromosomal abnormalities
Poor Risk	-5, 5q-, -7, 7q-, 11q23 other than t(9;11), inv(3), t(3;3), t(6;9), t(9;22), complex findings (≥3 clonal chromosomal abnormalities)

ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΕ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ

ΝΟΣΗΜΑ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΩΜΑΛΙΑ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ
ΧΜΛ	t(9;22)	<i>bcr-abl</i>
ΟΜΛ-Μ2	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1/ETO</i> 30% ασθενών με αρνητικό καρυότυπο <i>NPM1</i> χρ 5 <i>T53</i> χρ 17 <i>CEBPA</i> χρ 19, sequencing <i>FLT-3</i> χρ13, D835Y και ITD
ΟΜΛ-Μ3	t(15;17)(q22;q12)	<i>PML-RARα</i>
Οζώδες λέμφωμα	t(14;18)(q32;q21)	<i>bcl-2/IgH</i> <i>BCL6</i> χρ 3 <i>CREBBP</i> χρ 16 και
Λέμφωμα μανδύα	t(11;14)(q13;q32)	ΚΑΛΟΧΩΣΤΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ <i>CCND1/IgH</i>

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΛ

- **Μεταλλάξεις τύπου I:** αφορούν γονίδια όπως FLT3, KIT, RAS. Οι μεταλλάξεις τους επηρεάζουν τις σηματοδοτικές οδούς που οδηγούν σε συνεχή πολλαπλασιασμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
- **Μεταλλάξεις τύπου II:** αφορούν μεταγραφικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΗΝ ΟΜΛ

• Acute Myeloid Leukemia
▸ CBFβ-MYH11
▸ DEK-NUP214
▸ DNMT3A
▸ FLT3
▸ IDH1
▸ IDH2
▸ KIT
▸ MLL-MLL3
▸ PML-RARA
▸ RBM15-MKL1
▸ RPN1-EVI1
▼ RUNX1-RUNX1T1
RUNX1-RUNX1T1 Fusion

▼ FLT3
FLT3 ITD
FLT3 c.2503G>C (D835H)
FLT3 c.2503G>A (D835N)
FLT3 c.2503G>T (D835Y)
FLT3 c.2504A>C (D835A)
FLT3 c.2504A>T (D835V)
FLT3 c.2505T>A (D835E)
FLT3 c.2505T>G (D835E)
FLT3 c.2506A>T (I836F)
FLT3 c.2506A>C (I836L)
FLT3 c.2506A>G (I836V)
FLT3 c.2506_2507delATinsGA (I836D)
FLT3 c.2506_2507delATinsCA (I836H)
FLT3 c.2508C>G (I836M)

2017 European LeukemiaNet risk stratification of acute myeloid leukemia by genetics

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} ¶
	Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} ¶
	Wild type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} ¶ (without adverse-risk genetic lesions)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> ^Δ
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
	t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EVI1)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)
	Complex karyotype, [◇] monosomal karyotype [§]
	Wild type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} ¶
	Mutated <i>RUNX1</i> [‡]
Mutated <i>ASXL1</i> [‡]	
Mutated <i>TP53</i> [‡]	

This table describes the European LeukemiaNet stratification of acute myeloid leukemia (AML) based on cytogenetic and molecular characteristics. Note the use of "allelic ratio" to stratify based on the *FLT3-ITD* mutation. Various research groups calculate this ratio differently and/or use other cutoff values.

Prognostic value of European LeukemiaNet classification in acute myeloid leukemia

Genetic group	Subsets	CR (%)	DFS (%)	OS (%)
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	Younger adults: 96	Younger adults: 55	Younger adults: 66
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>	Older adults: 83	Older adults: 24	Older adults: 33
	Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)			
	Mutated <i>CEBPA</i> (normal karyotype)			
Intermediate-I*	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)	Younger adults: 76	Younger adults: 23	Younger adults: 28
	Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)	Older adults: 61	Older adults: 10	Older adults: 11
	Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD (normal karyotype)			
Intermediate-II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>	Younger adults: 79	Younger adults: 34	Younger adults: 45
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse [¶]	Older adults: 63	Older adults: 11	Older adults: 16
Adverse	inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i>	Younger adults: 50	Younger adults: 10	Younger adults: 12
	t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i>	Older adults: 39	Older adults: 6	Older adults: 3
	t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> rearranged			
	-5 or del(5q); -7; abn(17p); complex karyotype ^Δ			

The European LeukemiaNet classification in AML uses cytogenetic and molecular data to identify four prognostic groups. When applied to 818 younger adults (<60 years) and 732 older adults with primary AML treated within cooperative group trials, the prognostic groups had significantly different rates of CR, DFS, and OS at three years.

AML: acute myeloid leukemia; WHO: World Health Organization; CR: complete remission; DFS: disease-free survival; OS: overall survival.

* Includes all AMLs with normal karyotype except for those included in the favorable subgroup.

¶ For most abnormalities, adequate numbers have not been studied to draw firm conclusions regarding their prognostic significance.

Δ Three or more chromosome abnormalities in the absence of one of the WHO designated recurring translocations or inversions, that is, t(15;17), t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23), t(6;9), inv(3) or t(3;3).

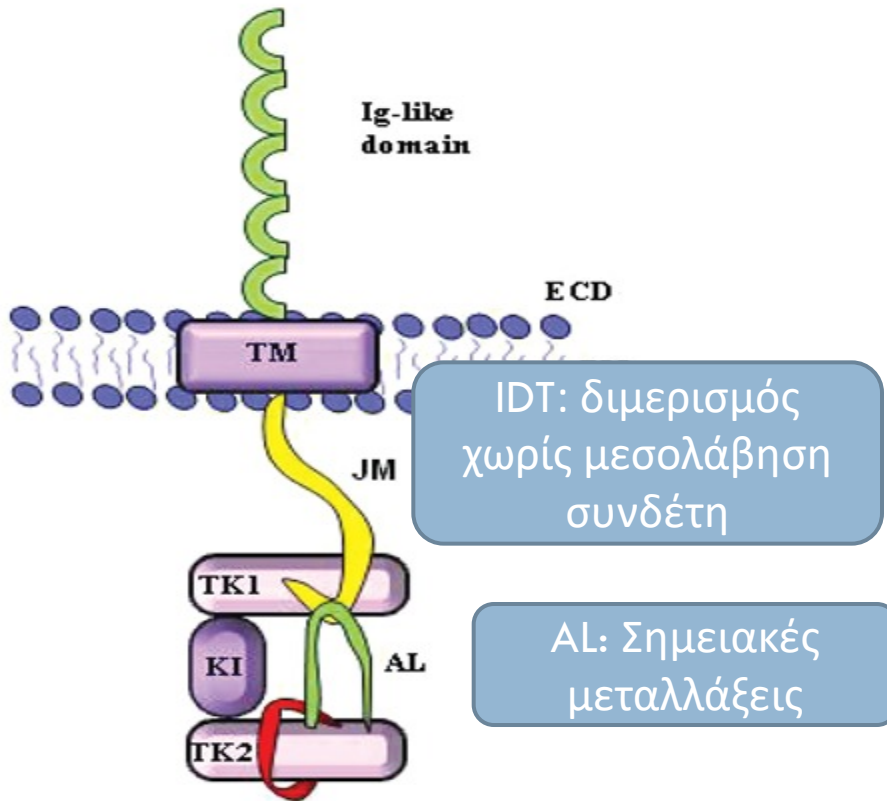
FMS-RELATED TYROSINE KINASE 3; FLT3

FLT3 (ID 2322) 13q12.2

- ❑ FLT3 είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη, υποδοχέας για τυροσινική κινάση που διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
- ❑ Μεταλλάξεις που οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του υποδοχέα
 - ❑ αριθμητικές αλλαγές (*FLT3*-ITD εσωτερικός διπλασιασμός) 20-30% ασθενών με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο
 - ❑ Σημειακές μεταλλάξεις και ελλείψεις στα κωδικόνια 835-836 του FLT3 που βρίσκονται στην περιοχή ενεργοποίησης είναι παρούσες στο 7% περίπου των ΟΜΛ.
- ❑ Το πρότυπο των *FLT3*-ITD μεταλλάξεων παίζει ρόλο στην πρόγνωση της έκβασης της νόσου

FLT3

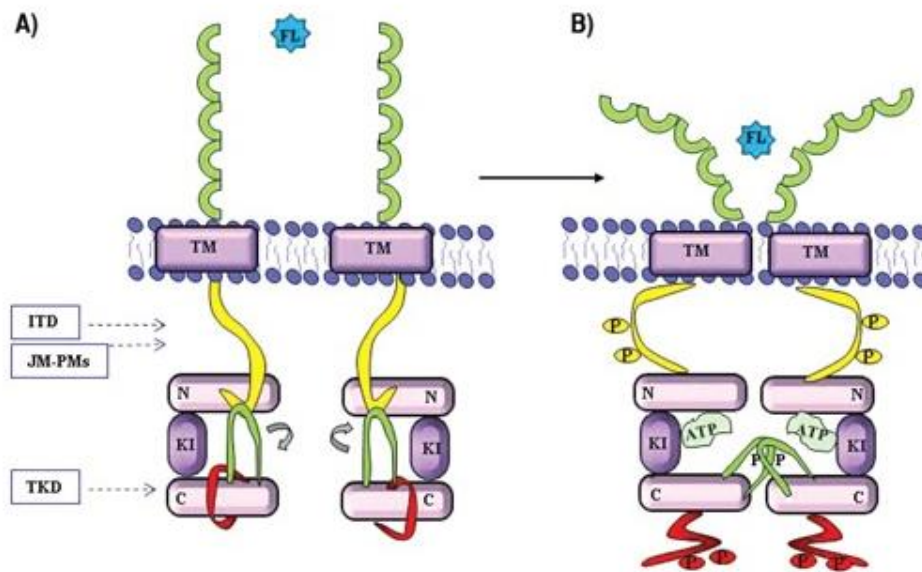
Figure 1



Schematic presentation of FLT3 receptor monomer. ECD, extracellular domain; PM, plasma membrane; CP, cytoplasm; TM, transmembrane domain; JM, juxtamembrane domain; TK1, first tyrosine kinase domain, N-lobe; KI, kinase insert; TK2, second tyrosine kinase domain, C-lobe; AL, activation loop.

ΔΙΜΕΡΙΣΜΟΣ FLT3

Figure 2

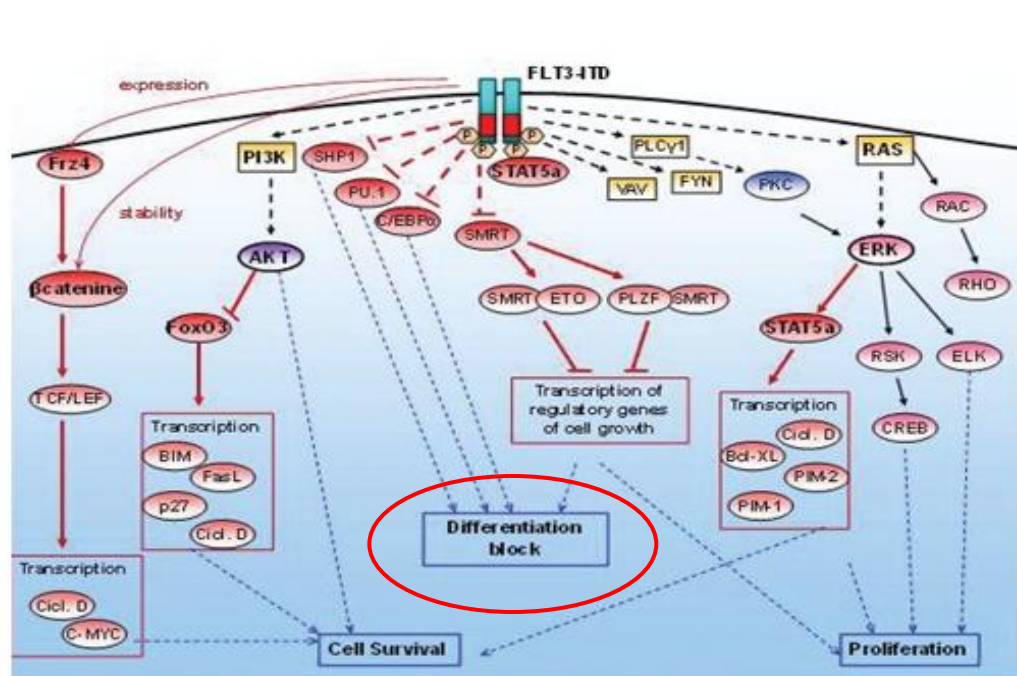


- I. Διμερισμός
 - II. Αυτοφωσφορυλίωση
 - III. Ενεργοποίηση υποδοχέα FLT3
- Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση άλλων μορίων

Activation of FLT3. A) Inactive conformation; B) Active conformation. Juxtamembrane domain (yellow), activation-loop (green), catalytic loop (red). P, phosphorylation site; N, N-lobe, TK1 domain; C, C-lobe, TK2 domain; ITD, internal tandem duplications; JM-PMs, point mutation in the juxtamembrane domain; TKD, point mutation in the tyrosine kinase domain; FL, FLT3 ligand.

Figure 3

Figure 4



Signaling pathways activated by FLT3-ITD

NUCLEOPHOSMIN/NUCLEOPLASMIN FAMILY, MEMBER 1; NPM1

NPM 1 (ID 4869) 12 εξώνια.

- Νουκλεοφωσμίνη: πρωτεΐνη που μετέχει στο σχηματισμό ριβοσωμάτων, σε μεταγραφή και απόπτωση (TP53, CDKN2A).
- Κινείται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος.
- Μεταλλάξεις στο γονίδιο *NPM 1* οδηγούν σε συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα.
- Αλλαγές του γονιδίου σε 20-50% των ασθενών με ΟΜΛ και φυσιολογικό καρυότυπο.
- Ασθενείς με ΟΜΛ που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο ***NPM1*** έχουν καλύτερη έκβαση.

CCAAT/ENHANCER-BINDING PROTEIN, ALPHA; CEBPA

- **CEBPA, (ID 1050)**, χωρίς εσώνια, 19q13.11
- Το **CEBPA** (CCAAT/enhancer binding protein alpha) κωδικοποιεί ουσιώδη μεταγραφικό παράγοντα για την μυελική διαφοροποίηση (καταστολέας της διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων, tumor suppressor gene)
- Ασθενείς με ΟΜΛ και **CEBPA** μεταλλάξεις (7%-5%) έχουν υψηλότερα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης (53 έναντι 30%) όταν συγκρίνονται με ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις.
- Το μεταλλαγμένο γονίδιο επάγει τη διαφοροποίηση των άωρων κοκκιοκυττάρων στους ασθενείς με ΟΜΛ).
- **Ασθενείς με μεταλλάξεις CEBPA έχουν καλύτερη πρόγνωση.**

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΥΧΡΟΝΩΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ NGS

Ανάδειξη και καταγραφή νέων γενετικών βλαβών

- Καλύτερη κατανόηση της παθογένειας των αιματολογικών νόσων
- Καλύτερη κατανόηση της ανθεκτικότητας και της υποτροπής της νόσου

Οι νέες μοριακές βλάβες μπορούν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για την υποκείμενη νόσο

Π.χ *NPM1* μεταλλάξεις σε ασθενείς με ΟΜΛ έχουν καλύτερη ανταπόκριση σε ΑΤΟ και ΑΤΡΑ

FLT-3 μεταλλάξεις σε ασθενείς με ΟΜΛ στοχεύονται με αναστολείς του

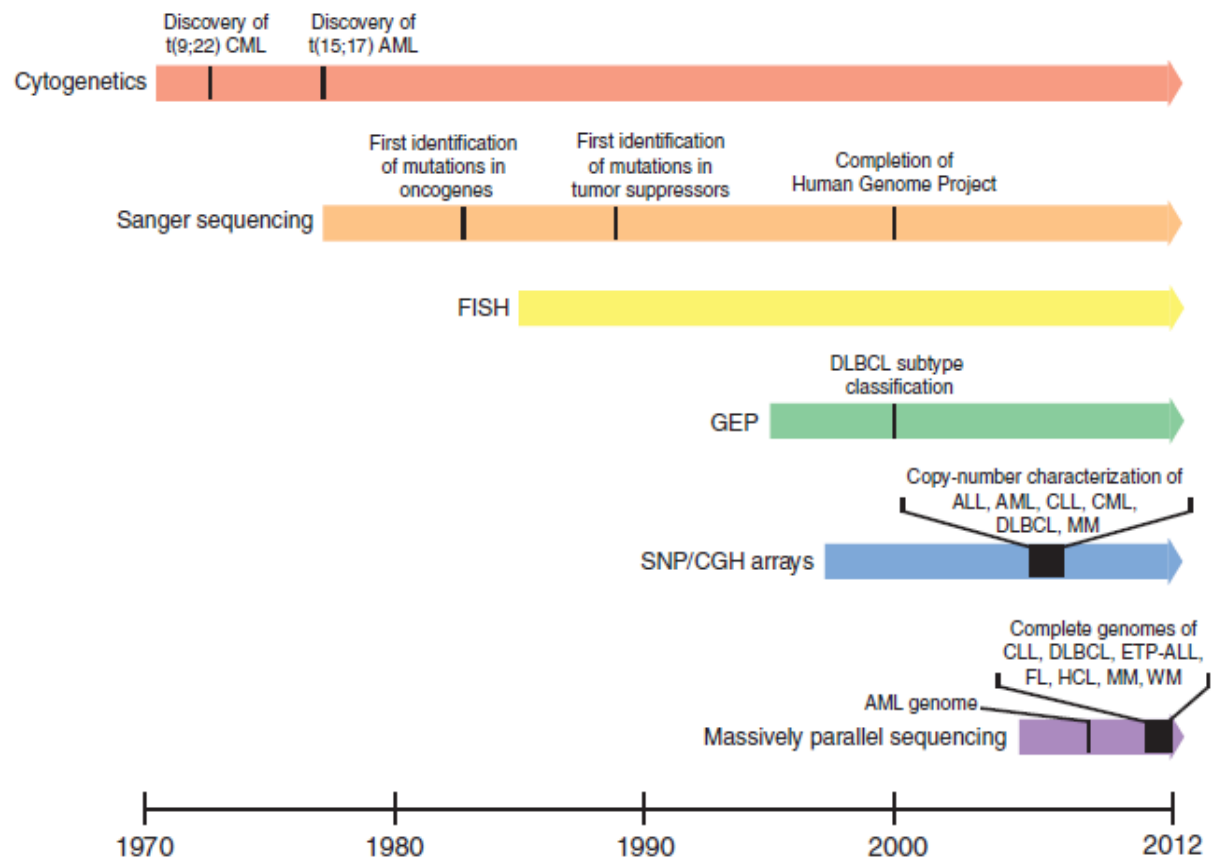


Figure 1. Evolution of genetic detection methods and discoveries. Landmark findings from each method are indicated.

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΤΗΝ ΟΜΛ

- Η ανάδειξη του μοριακού δείκτη βοηθά στη
 - ▣ Διάγνωση
 - ▣ Κατάταξη της νόσου
 - ▣ Παρακολούθηση της νόσου
 - ▣ Ανταπόκριση στη θεραπεία
 - ▣ Εκτίμηση υπολειμματικής νόσου

2^η Κλινική περίπτωση

Αιτία εισόδου: Ασυμπτωματικός άνδρας 50 ετών προσέρχεται στο εξωτερικό αιματολογικό ιατρείο λόγω τυχαίας ανεύρεσης θρομβοκυττάρωσης με αιμοπετάλια 720.000.

Ατομικό αναμνηστικό: Ελεύθερο.

Κληρονομικό: Γονείς εν ζωή, μητέρα 72 ετών με διαβήτη τύπου 2, πατέρας 75 ετών με υπέρταση υπό αγωγή.

Συνήθειες-Τρόπος ζωής: Δεν καπνίζει, δεν καταναλώνει αλκοόλ, αθλείται συστηματικά.

Ανασκόπηση ανά συστήματα: Ελεύθερη ευρημάτων.

Αντικειμενική εξέταση: Αρνητική για ευρήματα.

Εργαστηριακά ευρήματα: Η γενική αίματος που φέρει είναι: Ht: 48%, Hb: 16 g/dl, MCV: 80 fl, WBC: 11.0000/mm³ (Π: 70%, Λ: 25%, Μ: 3, ηωσινόφιλα: 1%, βασεόφιλα: 1%), PLT: 720.000/mm³

Ο ασθενής είναι προς το παρόν ανασφάλιστος και παρακαλεί να γίνουν μόνον οι αναγκαίες διαγνωστικές εξετάσεις καθόσον θα τις χρεωθεί ατομικά.

Τρέχουσα διάγνωση: Θρομβοκυττάρωση δευτεροπαθής ή ιδιοπαθής.

- 166 -

Ερωτήσεις

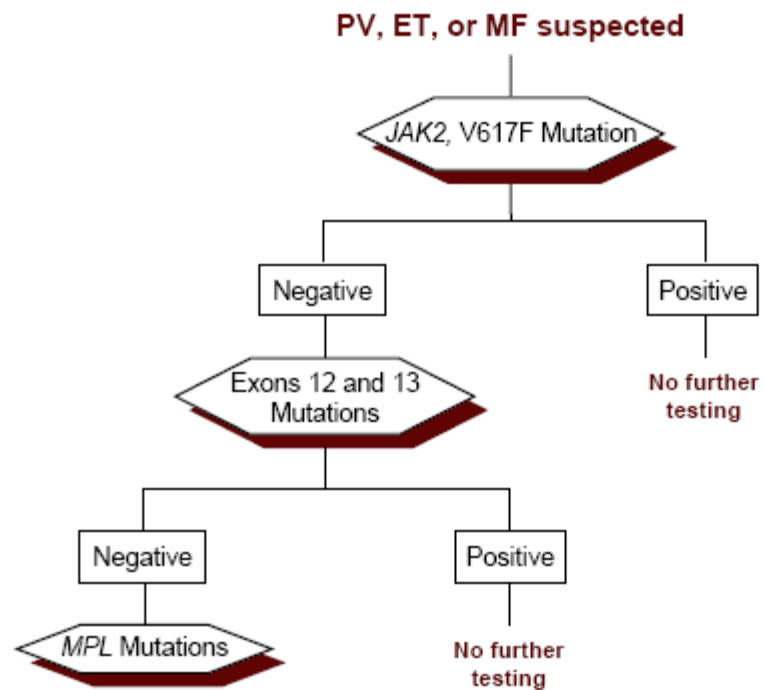
1. Ποια είναι τα συνηθέστερα αίτια δευτεροπαθούς θρομβοκυττάρωσης και ποιες εξετάσεις είναι αρκετές για να αποκλειστούν;
2. Υπάρχουν μοριακές εξετάσεις που σύμφωνα με τον WHO πρέπει να γίνουν για να διαγνωσθεί η ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση;
3. Υπάρχει μοριακή βλάβη που ανιχνεύεται μόνο στην ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση;
4. Υπάρχει κλινικό όφελος για να διαγνωστεί αν μια θρομβοκυττάρωση είναι ιδιοπαθής;

ΙΔΙΟΠΑΘΗΣ ΘΡΟΜΒΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ

- Μυελοϋπερπλαστική διαταραχή που οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεγακαρυοκυττάρων και αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων
- Χρόνια νόσος που αφορά το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο

Κριτήρια διάγνωσης ET, WHO 2008	Αναθεωρημένες προτάσεις WHO 2014
<p style="text-align: center;"><i>Μείζονα:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Αιμοπετάλια $\geq 450 \cdot 10^9/l$ 2. Πολλαπλασιασμός μεγάλων και ώριμων μεγακαρυοκυττάρων 3. Δεν πληρούνται τα κριτήρια για ΧΜΛ, ΡV, ΡΜF, ΜDΣ ή άλλο μυελικό νεόπλασμα 4. Παρουσία της μετάλλαξης JAK2V617F ή άλλου κλωνικού δείκτη ή ανυπαρξία αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης 	<p style="text-align: center;"><i>Μείζονα</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Αιμοπετάλια $\geq 450 \cdot 10^9/l$ 2. Πολλαπλασιασμός μεγάλων και ώριμων μεγακαρυοκυττάρων 3. Δεν πληρούνται τα κριτήρια για ΧΜΛ, ΡV, ΡΜF, ΜDΣ ή άλλο μυελικό νεόπλασμα 4. Παρουσία της μετάλλαξης JAK2 ή της CALR ή της MPL
	<p style="text-align: center;"><i>Ελάσσονα</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Παρουσία κάποιου άλλου δείκτη κλωνικότητας (π.χ. παθολογικός καρυότυπος) ή ανυπαρξία ενδείξεων αντιδραστικής θρομβοκυττάρωσης
<p><i>Απαιτείται η παρουσία όλων των μειζόνων κριτηρίων.</i></p>	

Πίνακας 2 Κριτήρια διάγνωσης ιδιοπαθούς θρομβοκυττάρωσης (ET) κατά WHO 2008 και οι αναθεωρημένες προτάσεις WHO 2014



JANUS KINASE 2; JAK2

- **JAK 2**, 9p24.1, 24 εξώνια
- Η JAK2 είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη κινάσης της τυροσίνης που μετέχει στη μετάδοση σήματος από μέλη της οικογένειας των υποδοχέων κυτοκινών (υποδοχείς ιντερφερόνης, GM-CSF, Τρο-R, IL-6R, Ερο-R, κλπ).
- Η συχνότερη μεταλλαγή V617F αφορά αμινοξική αλλαγή της βαλίνης σε φαινυλαλανίνη στη θέση 617.

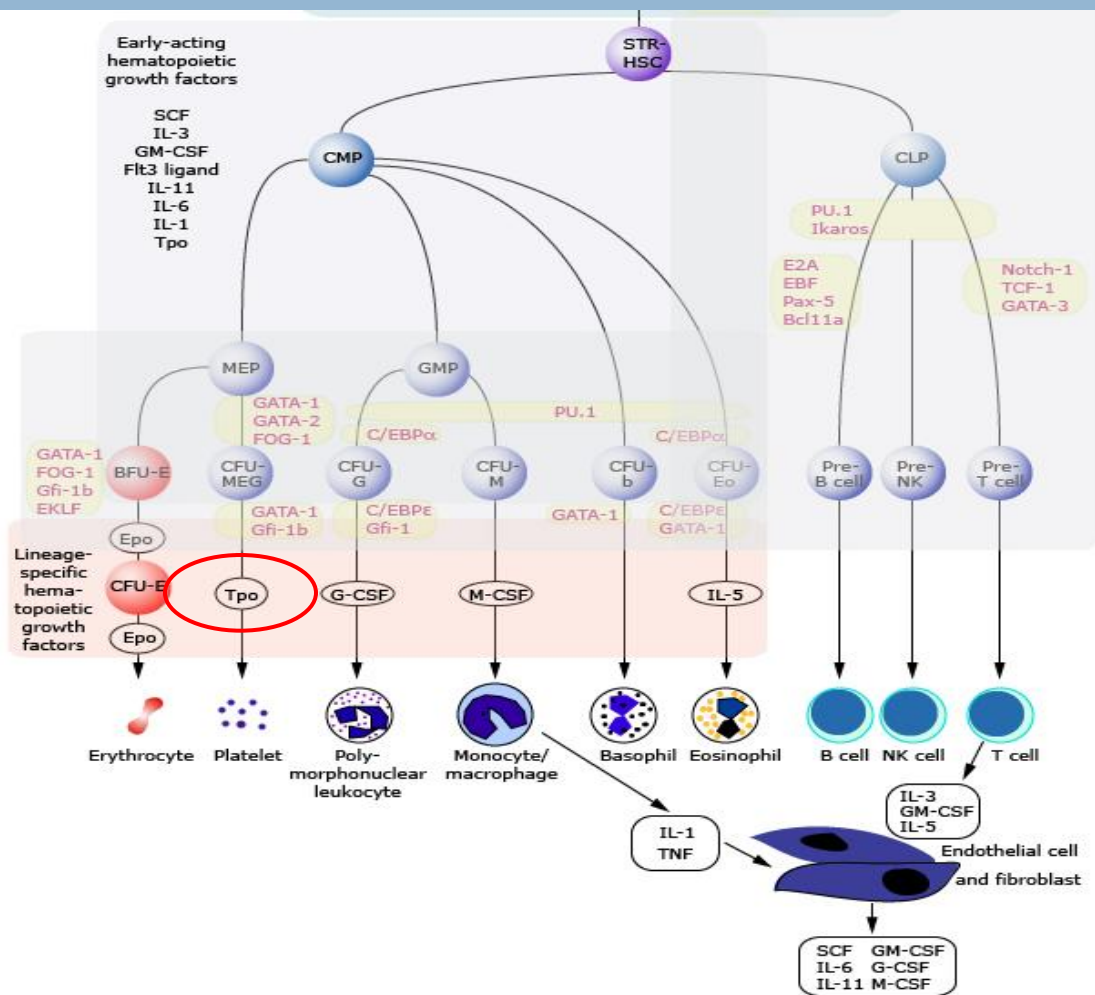
THROMBOPOIETIN RECEPTOR; TPO R

MPL, (ID 4532) 1p34.2, 12 εξώνια

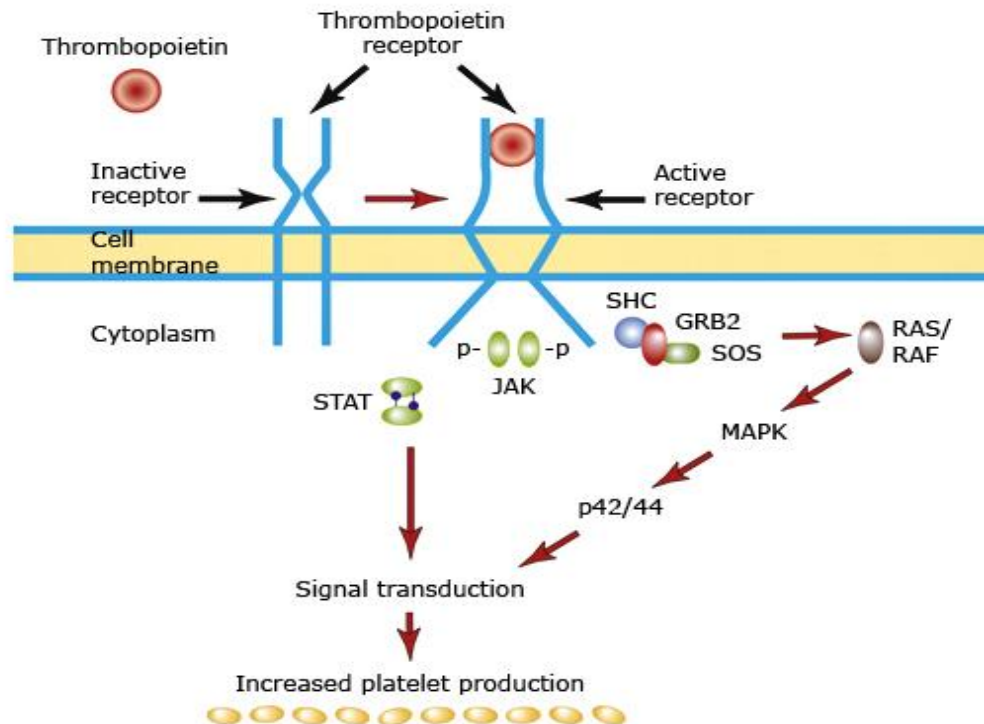
Το γονίδιο *MPL* κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της θρομβοποιητίνης, κύριος ρυθμιστής της μεγακαρυοποίησης και του σχηματισμού αιμοπεταλίων.

Στην ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση το γονίδιο *MPL* φέρει μεταλλάξεις στις θέσεις 505 ή 515.

ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

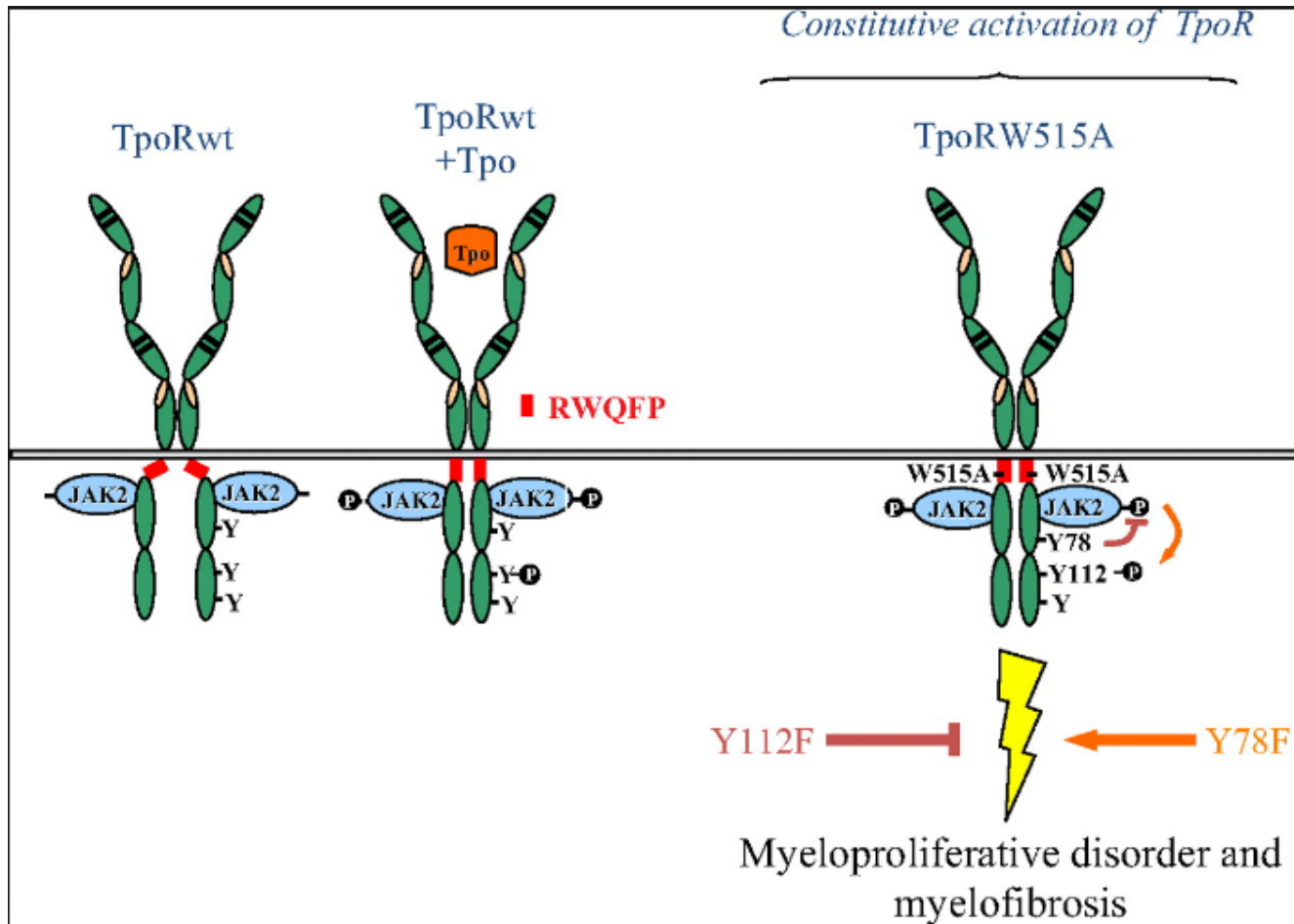


Activation of the TPO receptor



The TPO receptor has been proposed to exist as an inactive preformed dimer (left) with a proximal (HRD-1) and distal (HRD-2) hematopoietic receptor domain (HRD). Upon binding of thrombopoietin to the distal HRD-2, the receptor (right)

MPL



CALRETICULIN; CALR

- **CALR**, 19p13.13
- Calreticulin πρωτεΐνη που δεσμεύει Ca^{+2} και διατηρεί την ομοιόσταση του Ca^{+2} στο ενδοπλασματικό δίκτυο.
- Βρίσκεται και στον πυρήνα και παίζει μεταγραφικό ρόλο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

- Ο μοριακός έλεγχος συμβάλλει ταχύτατα και ειδικότατα στη διάγνωση
- Αρκεί να γίνεται εκτίμηση και αξιολόγηση αποτελεσμάτων από **έγκυρα** και **αξιόπιστα** εργαστήρια
- Παρέμβαση του ιατρού με καθοδήγηση όταν **δεν υπάρχει αμφισβήτηση για το όφελος από την πληροφορία του μοριακού ελέγχου**

ΕΠΟΜΕΝΩΣ

Ο γιατρός ΠΡΕΠΕΙ να είναι ΠΛΗΡΩΣ ενημερωμένος για:

- ▣ τις εξελίξεις της μοριακής διάγνωσης,
- ▣ τις δυνατότητες και
- ▣ τους ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥΣ της

Η διάγνωση ΠΑΡΑΜΕΝΕΙ έργο του ιατρού!



Ευχαριστώ

ΚΑΛΟΤΥΧΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ