

Υιοθέτηση Μοριακών Τεχνικών:

Μια κίνηση στρατηγικού προγραμματισμού για τα εργαστήρια Βιοπαθολογίας

Γεώργιος Μελέτης¹, Δρ. Δανάη Σοφianού²

¹M.Sc. Ιατρικής Ερευνητικής Μεθοδολογίας,

²Διευθύντρια Εργαστηρίου Βιοπαθολογίας, Γ.Ν.Θ. «Ιπποκράτειο»

Το Δημόσιο Σύστημα Υγείας αποβλέπει στην προαγωγή της υγείας των πολιτών, στην πρόληψη της ασθένειας και στην αποκατάσταση της υγείας έχοντας ως αντικειμενικό σκοπό τη διασφάλιση και βελτίωση του επιπέδου υγείας όλου του πληθυσμού¹. Στα πλαίσια αυτά, ο ρόλος του εργαστηρίου Βιοπαθολογίας είναι εξαιρετικά σημαντικός καθώς η διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων αποτελεί σήμερα απαραίτητη προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της εργαστηριακής διάγνωσης, τη λήψη κλινικών αποφάσεων, τη διασφάλιση της εγκυρότητας της θεραπευτικής διαδικασίας, την παρακολούθηση της πορείας των ασθενών, την εφαρμογή προληπτικής ιατρικής και την αντιμετώπιση των λοιμώξεων.

Στόχοι εργαστηρίου Βιοπαθολογίας

Τα εργαστήρια Βιοπαθολογίας κρίνονται καθημερινά για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων τους και για το είδος και τον αριθμό των εξετάσεων που διενεργούν λειτουργώντας παράλληλα υπό διαρκή πίεση για τον περιορισμό των δαπανών τους. Ένα εργαστήριο όμως οφείλει να είναι πρώτα και πάνω απ' όλα αξιόπιστο. Λανθασμένα αποτελέσματα ή έστω αποτελέσματα που δεν συμφωνούν με την κλινική εικόνα του ασθενούς αποτελούν σημαντικό πρόβλημα με ποικίλες προεκτάσεις, από τις οποίες οι σπουδαιότερες είναι οι πολυάριθμες επαναλήψεις ή η διενέργεια πολλών διαφορετικών εξετάσεων στην προσπάθεια να βρεθεί αιτιολογικός παράγοντας για την ασθένεια. Και οι δύο αυτές πρακτικές – τις περισσότερες φορές ανεξάρτητα από την αξιοπιστία των εργαστηρίων – είναι συνηθισμένες στα ελληνικά νοσοκομεία τα τελευταία χρόνια και εκτινάσσουν το κόστος λειτουργίας τους σε δυ-

σθεώρητα ύψη.

Επιπλέον, στη σημερινή εποχή και χωρίς αυτό να αποβαίνει εις βάρος της αξιοπιστίας, απαιτείται ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων. Η έγκαιρη πραγματοποίηση των εξετάσεων επιταχύνει τη θεραπευτική διαδικασία στο σύνολό της και αποφέρει πολλαπλά οφέλη όπως τη μείωση του κόστους νοσηλείας και την αποφυγή της διενέργειας λανθασμένων θεραπευτικών πρακτικών.

Η στενότητα των πόρων που διατίθενται για την Υγεία σε συνδυασμό με τη συνεχή αύξηση του κόστους των υπηρεσιών υγείας δημιουργεί την ανάγκη του περιορισμού των δαπανών και της ορθολογιστικής χρήσης των αντιδραστηρίων και των αναλωσίμων των εργαστηρίων. Παράλληλα, η λογική του περιορισμού των εξόδων αποτελεί συχνά και το βασικό κριτήριο επιλογής κατά τη διαδικασία αγοράς αυτόματων αναλυτών για τη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων. Στις περιπτώσεις αυτές όμως χρειάζεται να λαμβάνεται υπ' όψιν όχι μόνο η αρχική τιμή ενός μηχανήματος αλλά και πολλά ακόμη χαρακτηριστικά όπως το κόστος λειτουργίας του σε χρήματα και εργατοώρες, το κόστος συντήρησης καθώς και η αξιοπιστία και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του που θα ελαχιστοποιήσουν τις επαναληπτικές εξετάσεις περιορίζοντας τη συνολική δαπάνη.

Μοριακές Μέθοδοι

Η σύγχρονη διαγνωστική είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την επαναστατική εξέλιξη της Μοριακής Βιολογίας. Με την εφαρμογή των τεχνικών της, που πριν από λίγες δεκαετίες αποτελούσαν αποκλειστικό προνόμιο καλά οργανωμέ-

ων εργαστηρίων βασικής έρευνας, κάθε ιατρική ειδικότητα έχει διευρύνει και εμβαθύνει το γνωστικό της αντικείμενο. Η διάγνωση, η πρόγνωση και η θεραπεία λοιμώξεων² και νεοπλασιών³ έχουν επηρεαστεί σε μεγάλο βαθμό από την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα των τεχνικών της Μοριακής Ανάλυσης. Η συνεχής εξέλιξη των τεχνικών σε συνδυασμό με τη δημιουργία ειδικών λογισμικών προγραμμάτων², επιτρέπουν σήμερα στις Μοριακές Μεθόδους να γίνουν προσίτες σε ένα μεγάλο μέρος κλινικών εργαστηρίων δημιουργώντας νέα δεδομένα στους τομείς της περιθάλψης και της έρευνας.

Η πιο σημαντική από τις Μοριακές Τεχνικές είναι η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) η οποία επιτρέπει την ανίχνευση στο αίμα, τον ορό και τα λοιπά βιολογικά υγρά συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού μικροοργανισμών και ανθρωπίνων κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ακριβής διάγνωση νοσημάτων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα σε αντιδιαστολή με κλασικές μεθόδους όπως οι καλλιέργειες που χρειάζονται συνήθως πολλά εικοσιτετράωρα για την ανίχνευση και τυποποίηση των παθογόνων.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επομένως, είναι μια σύγχρονη μέθοδος για τη δημιουργία αντιγράφων συγκεκριμένων τμημάτων DNA, σε αριθμό ώστε αυτά να είναι ανιχνεύσιμα. Για να γίνει εφικτή η δημιουργία αντιγράφων, χρησιμοποιείται το ένζυμο Taq πολυμεράση και οι κατάλληλοι κατά περίπτωση εκκινητές της αντίδρασης που είναι ολιγονουκλεοτίδια με αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς αυτήν του DNA-στόχου. Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα που περιέχει το υπό εξέταση δείγμα, την Taq πολυμεράση, νουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου και τους εκκινητές. Ακολουθεί ενίσχυση του DNA-στόχου σε ειδική συσκευή που ονομάζεται κυκλοποιητής και η οποία ακολουθεί τα εξής στάδια: Στο πρώτο στάδιο, ενεργοποιείται η Taq πολυμεράση με αύξηση της θερμοκρασίας στους 94-96°C για 1-9 λεπτά, και αρχίζουν οι κύκλοι της PCR, αρχικά με το πρώτο στάδιο της αποδιάταξης (denaturation) της διπλής έλικας του DNA (94-98°C για 20-40 δευτερόλεπτα). Κατά το δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-65°C για 20-40 δευτερόλεπτα, και πραγματοποιείται η υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στις μονές πλέον αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία υβριδοποι-

ησης (annealing temperature, Ta) είναι κατά 5°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, Tm) των εκκινητών. Κατά το τρίτο στάδιο της επιμήκυνσης (elongation, 70-75°C για 0,5-3 λεπτά), η Taq πολυμεράση συνθέτει συμπληρωματικές αλυσίδες, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις μονές αλυσίδες του DNA που προέκυψαν κατά το στάδιο της αποδιάταξης, και ξεκινώντας από τους εκκινητές που υβριδίστηκαν στο αμέσως προηγούμενο στάδιο. Τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης συνιστούν έναν κύκλο της αντίδρασης. Μετά από n παρόμοιους κύκλους προκύπτουν 2^n αντίγραφα του προς ανίχνευση τμήματος του DNA-στόχου. Το τελικό στάδιο πραγματοποιείται στους 70-74°C για 5-15 λεπτά και αποσκοπεί στην πλήρη επιμήκυνση όλων των υπολειπόμενων μονών αλυσίδων. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε γέλη αгарόζης με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος γίνεται σε θάλαμο ακτινών UV όπου οι ταινίες που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση, καθίστανται ορατές χάρη στην παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου.

Εξέλιξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αποτελεί η τεχνική της PCR Πραγματικού Χρόνου (real time PCR) η οποία διαφέρει από την κλασική PCR στον τρόπο ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος που στη συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται κατά τη διάρκεια της παραγωγής του σε πραγματικό χρόνο. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση ειδικών φθοριωμένων ανιχνευτών, την πρόοδο της τεχνολογίας των κυκλοποιητών και την ανάπτυξη του κατάλληλου λογισμικού. Η ανακάλυψη της PCR Πραγματικού Χρόνου έχει βελτιώσει τόσο τον χρόνο απόδοσης των αποτελεσμάτων όσο και τη δυνατότητα αξιοποίησης της τεχνικής από μεγαλύτερο αριθμό εργαστηρίων καθώς μειώνει σημαντικά τις ανάγκες σε εξοπλισμό (ηλεκτροφόρηση, θάλαμο ακτινών UV), χώρο, μέτρα ασφαλείας (το βρωμιούχο αιθίδιο είναι καρκινογόνο) και προσωπικό.

Προσδοκώμενα οφέλη από την υιοθέτηση των Μοριακών Τεχνικών

Η διάγνωση των λοιμώξεων στηρίζεται κυρίως στις καλλιέργειες μικροβίων και ιών που είναι μία αδιαμφισβήτητη χρονοβόρα διαδικασία καθώς και στις ανοσοενζυμικές μεθόδους Elisa οι οποίες ανιχνεύουν συνήθως ειδικά αντισώμα-

τα έναντι ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Οι καλλιέργειες των ιών είναι ιδιαίτερα απαιτητικές και πραγματοποιούνται μόνο σε ειδικά κέντρα ενώ τα συνήθη υλικά για τις καλλιέργειες των μικροβίων δεν καλύπτουν όλο το φάσμα των παθογόνων μικροοργανισμών. Υπάρχουν δηλαδή κλινικά σημαντικοί μικροοργανισμοί που πρακτικά δεν καλλιεργούνται. Οι μέθοδοι Elisa, εξάλλου, έχουν λανθάνοντα χρόνο ανίχνευσης που αντιστοιχεί στον χρόνο παραγωγής των αντισωμάτων και δεν είναι αξιόπιστες σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Συγκριτικά, οι Μοριακές Μέθοδοι που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι κατά πολύ ταχύτερες των καλλιεργειών και παρουσιάζουν ευαισθησία ανίχνευσης πολύ υψηλότερη από τις ανοσοενζυμικές μεθόδους⁵. Στις Μοριακές Τεχνικές αρκεί ένα και μόνο αντίγραφο του παθογόνου αιτίου για να προκύψει θετικό αποτέλεσμα⁶. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγονται σε μεγαλύτερο βαθμό τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε σχέση με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές.

Η PCR στηρίζεται στην ανίχνευση του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού κατευθείαν στο προς εξέταση δείγμα⁷. Έτσι, αφενός δεν παρουσιάζει λανθάνοντα χρόνο ανίχνευσης και αφετέρου δεν επηρεάζεται από την ανοσολογική κατάσταση του ασθενούς. Επομένως, είναι, για παράδειγμα, δυνατή η ανίχνευση του κυτταρομεγαλοϊού ή του ιού του απλού έρπητα την τρίτη μόλις ημέρα μετά τη μόλυνση, χωρίς να απαιτείται η παρέλευση χρόνου επώασης της νόσου για ανάπτυξη αντισωμάτων κατά του ιού (20- 60 ημέρες), όπως γίνεται με τις μεθόδους Elisa.

Επιπλέον, αδιαμφισβήτητα θα είναι τα οφέλη από την εφαρμογή των Μοριακών Τεχνικών στην ανίχνευση, τυποποίηση και προγνωστική αξιολόγηση των νεοπλασιών λόγω υψηλής ευαισθησίας, ταχύτητας και μη επεμβατικότητας. Η PCR άλλωστε χρησιμοποιείται ήδη στην τυποποίηση λευχαιμιών και την ανίχνευση πρωτεύουσας και υπολειπόμενης νόσου⁸. Εκτός αυτών, υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησής της στο μέλλον για τον έλεγχο (screening) ατόμων υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη νεοπλασιών και άλλων νόσων με σκοπό την έγκαιρη καταπολέμησή τους⁹. Είναι σαφές ότι η ανάπτυξη και πραγματοποίηση τέτοιου είδους προγραμμάτων θα είναι επαναστατική στον τομέα της υγείας και θα αποφέρει ανε-

κτίμητης αξίας αποτελέσματα σε οικονομικό επίπεδο καθώς και στην προσπάθεια διασφάλισης και διατήρησης του επιπέδου υγείας του πληθυσμού.

Σε παρόμοια πλαίσια εντάσσεται η ανίχνευση και ο προγεννητικός έλεγχος κληρονομικών ασθενειών (μεσογειακή αναιμία, κυστική ίνωση) με σκοπό την πρόληψη και την παρεμπόδιση της εξάπλωσής τους.

Η μεγάλη ειδικότητα, τέλος, των Μοριακών Τεχνικών τις καθιστά ιδανικές ακόμη και για ιατροδικαστικές τυποποιήσεις και διαπίστωση πατρότητας. Πράγματι, με την PCR είναι δυνατό να καθοριστεί η πατρότητα με βεβαιότητα που φθάνει το ποσοστό του 99,99% ενώ η τεχνική είναι εφαρμόσιμη ακόμη και με λίγο ή κακοδιατηρημένο γενετικό υλικό από τρίχες, κηλίδες αποξηραμένου αίματος ή άλλων βιολογικών υγρών.

Άμεσα εφαρμόσιμες διαγνωστικές εξετάσεις με τη χρήση Μοριακών Τεχνικών

Στις μέρες μας είναι διαθέσιμος ένας ικανός αριθμός kits που παράγονται από τις εταιρείες που δραστηριοποιούνται στον τομέα των Μοριακών Τεχνικών και αφορούν τον τομέα της μικροβιολογίας. Τα kits αυτά καλύπτουν ένα διόλου ευκαταφρόνητο διαγνωστικό εύρος παθογόνων μικροοργανισμών και ιών, αρκετοί εκ των οποίων παρουσιάζουν δυσκολίες στον προσδιορισμό τους με άλλες μεθόδους. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν kits για την ανίχνευση των *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella*, *Bordetella pertussis*, Group B *Streptococcus*, *M. tuberculosis*, ενώ όσον αφορά τους ιούς είναι εφικτή η μοριακή ανίχνευση των Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, Human Respiratory Syncytial Virus, Influenza A/B Virus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, Enterovirus, Herpes Simplex Virus 1/2, Human Papillomavirus, Cytomegalovirus, Varicella Zoster Virus, Epstein-Barr virus, Parvovirus B19 και Norovirus.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να καταστεί σαφές ότι οι εφαρμογές των Μοριακών Τεχνικών δεν περιορίζονται μόνο στα προαναφερθέντα παθογόνα. Αρκεί η σχεδίαση των κατάλληλων εκκινητών ώστε να ανιχνευθεί οποιοδήποτε τμήμα γενετικού υλικού μικροοργανισμού ή ανθρώπου. Οι εφαρμογές στη Μικροβιολογία και την Αιματολογία είναι πραγματικά απεριόριστες και εναπόκειται στις α-

νάγκες και τις δυνατότητες του νοσοκομείου, τη συχνότητα των ασθενειών στον πληθυσμό και τον προγραμματισμό του εργαστηρίου για το ποιες από αυτές θα υιοθετηθούν στην πράξη.

Οικονομικά δεδομένα

Η real time PCR είναι μία εξέταση με υψηλό κόστος. Τα ακριβή όμως οικονομικά δεδομένα εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες και κυρίως από την κρίσιμη στρατηγική απόφαση της προμήθειας του απαραίτητου εξοπλισμού. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει ο φόρτος εργασίας του Βιοπαθολογικού εργαστηρίου στο σύνολό του και πόσες από τις εξετάσεις που διενεργούνται σε αυτό δύναται να πραγματοποιηθούν με Μοριακές Τεχνικές.

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Βιοπαθολογικού εργαστηρίου του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Ιπποκράτειο» κατά το έτος 2008 πραγματοποιήθηκε ο εξής αριθμός από τις προαναφερθείσες ορολογικές εξετάσεις: CMV- 3242, EBV IgM- 2227, HSV1- 1725, HSV2- 1670, Parvo B19- 796, RSV- 95, VZV- 220, ADENOVIRUS- 190, M. pneumoniae- 448, HIV- 18844, HBV- 20583, HCV- 20091, HDV- 281. Είναι, για παράδειγμα, σαφές ότι ένα εργαστήριο με παρόμοιο αριθμό εξετάσεων θα προκαλέσει την υποβολή συμφερούσων προτάσεων από μέρους των εταιρειών παροχής κυκλοποιητών κατά τη διενέργεια ενός σχετικού μειοδοτικού διαγωνισμού.

Επιπλέον, με την υιοθέτηση των Μοριακών Τεχνικών είναι δυνατόν να μειωθεί σημαντικά και ο συνολικός αριθμός των καλλιέργειών που διενεργούνται και που για το 2008 στο ίδιο νοσοκομείο ήταν 36.883.

Οι υπόλοιπες εξετάσεις που αναφέρθηκαν ως άμεσα εφαρμόσιμες με τις Μοριακές Τεχνικές δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν με τον υπάρχοντα εξοπλισμό και υλικά σήμερα στο «Ιπποκράτειο» Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης όπως συμβαίνει άλλωστε και στα περισσότερα ελληνικά νοσοκομεία.

Συμπεράσματα

Είναι σαφές ότι ένα σύγχρονο εργαστήριο Βιοπαθολογίας έχει να αντιμετωπίσει μία πληθώρα προκλήσεων και προβλημάτων που αφορούν τόσο την καθημερινή του λειτουργία όσο και τον μακροπρόθεσμο προγραμματισμό του. Για τον λόγο αυτό, απαιτείται διαρκής επαγρύπνηση και

ενημέρωση των υπεύθυνων ώστε να λαμβάνονται τα μέγιστα δυνατά οφέλη από την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας με γνώμονα πάντοτε πρώτα την αξιοπιστία και στη συνέχεια την ταχύτητα και τον περιορισμό των δαπανών.

Οι Μοριακές Τεχνικές τείνουν παγκοσμίως να αντικαταστήσουν τις κλασικές μεθόδους της Μικροβιολογίας αλλά και να κυριαρχήσουν σε πολυάριθμες ιατρικές ειδικότητες όπως την Αιματολογία. Είναι γεγονός ότι το κόστος αυτών των τεχνικών σήμερα δεν είναι αμελητέο. Η υψηλή τους όμως ευαισθησία και ειδικότητα, η ταχύτητα και το γεγονός ότι πολλές από τις εξετάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν με αυτές δεν διενεργούνται στην πράξη από πολλά εργαστήρια λόγω διαφόρων δυσκολιών, τις καθιστούν πρωτοπόρες στη σύγχρονη διαγνωστική πρακτική. Η υιοθέτηση των μοριακών τεχνικών στα πλαίσια λειτουργίας εργαστηρίου Βιοπαθολογίας είναι μία ρεαλιστική επιλογή που με σωστό σχεδιασμό και συνεχή αξιολόγηση θα συνδράμει ουσιαστικά στην επίτευξη των αντικειμενικών σκοπών του εργαστηρίου και του συστήματος Υγείας στο σύνολό του.

Βιβλιογραφία

1. Δίκαιος, Κ., Κουτούζης, Μ., Πολύζος, Ν., Σιγάλας, Ι. και Χλέτσος, Μ. Βασικές Αρχές Διοίκησης Διαχείρισης (Management) Υπηρεσιών Υγείας. Ελληνικό ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα, 1999, σελ 129.
2. Ince J, McNally A. Development of rapid, automated diagnostics for infectious disease: advances and challenges. *xpert Rev Med Devices*. 2009;6(6):641-651.
3. Lønning PE, Sørlie T, Børresen-Dale AL. Genomics in breast cancer-therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(1):26-33.
4. Huletsky A, Lebel P, Picard FJ, Bernier M, Gagnon M, Boucher N, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. *Clin Infect Dis*. 2005;40(7):976-981.
5. Habib-Bein NF, Beckwith WH, Mayo D, Landry ML. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3597-3601.
6. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, Gagnon F, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):1875-1884.
7. Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM Jr. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5578-5581.
8. Sahay T, Schiffer CA. Monitoring minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia after treatment with tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(2):134-139.
9. Edvardsson L, Olofsson T. Real-time PCR analysis for blood cell lineage specific markers. *Methods Mol Biol*. 2009;496:313-322.