

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δ002. Η Μοριακή Παρασιτολογία είναι ο τομέας που χρησιμοποιεί δεδομένα τεχνικών της Μοριακής Βιολογίας για την μελέτη των παρασιτικών οργανισμών. Αν και ο όρος "Μοριακή" αναφέρεται σε όλα τα βιολογικά μόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες), τα τελευταία χρόνια έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ και υπάρχει και μεγάλη ανάπτυξη στις τεχνικές που αναλύουν τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), οπότε και σε αυτόν τον χώρο θα περιοριστεί το παρόν.

Κεντρικό ρόλο στις μελέτες αυτού του είδους, έχει η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR), και για αυτό συνίσταται μια στοιχειώδης εξοικείωση με την αρχή της μεθόδου. Περαιτέρω τεχνικές όπως ανάγνωση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας (sequencing) είναι πλέον κοινός τόπος, και επίσης μικροσυτοιχίες (microarrays) και ανάγνωση του γονιδιώματος (genome sequencing), απαντώνται όλο και συχνότερα, καθώς το κόστος εφαρμογής προχωρημένων μοριακών τεχνικών έχει μειωθεί σημαντικά. Αν και η διείσδυση των πιο μοντέρνων μεθόδων, είναι πλέον σημαντική, αυτές οι τεχνικές θα αναφερθούν ακροθιγώς, καθώς η Ελληνική πραγματικότητα δεν επιτρέπει την εφαρμογή τους σε παρασιτικές ασθένειες, λόγω της μικρής συχνότητας των παρασιτικών νόσων στην χώρα μας. Επιπλέον αν και οι δυνατότητες είναι σημαντικά μεγαλύτερες, η λογική της ανάλυσης τέτοιων δεδομένων είναι παρόμοια με τις μεθόδους οι οποίες θα αναφερθούν.

Δ003. Ο όρος "παράσιτο" στην Βιολογία αναφέρεται σε όλους τους οργανισμούς που ζούν σε βάρος άλλων. Στην κατηγορία αυτή μπορεί να ανήκουν οργανισμοί από σχεδόν όλες τις κατηγορίες οργανισμών. πχ ιοί, βακτήρια, πρωτόζωα, μετάρζωα, ακόμη και φυτά όπως κάποιες ορχιδέες. Στην ιατρική όμως σαν παράσιτα χαρακτηρίζονται οι ευκαρυωτικοί παρασιτικοί οργανισμοί που ανήκουν στα **πρώτιστα και μετάρζωα**. Συνεπώς μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Στους μονοκύτταρους ανήκουν τα παρασιτικά πρώτιστα, όπως τα λεγόμενα πρωτόζωα. Στα παρασιτικά μετάρζωα ανήκει ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, από τους έλμινθες (σκώληκες) μέχρι και έντομα.

Το δε μέγεθος βέβαια ποικίλει σε μεγάλο βαθμό, αφού τα πρώτιστα έχουν μέγεθος της τάξης των μερικών μικρομέτρων, ενώ η Ασκαρίδα (*Ascaris lumbricoides*) που ζει στον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων φτάνει και τα 35 εκατοστά. Οι δε ανεπτυγμένες ταινίες (*Taeniae*) μπορεί να μετρώνται σε μέτρα.

Δ004. Ποια είναι η ιδιαιτερότητα των παρασίτων, που προκάλεσε την ιδιαίτερη εξέταση τους; Το κυριότερο είναι ο **περίπλοκος κύκλος ζωής**, που μπορεί να περιλαμβάνει ενδιάμεσους ξενιστές, άλλους οργανισμούς στους οποίους πραγματοποιείται η αμφιγονική αναπαραγωγή και άλλους στους οποίους πραγματοποιείται η μονογονική αναπαραγωγή. Αυτή η πολυπλοκότητα επιβάλλει την συνολική εξέταση του κύκλου ζωής, ώστε να διαπιστωθούν οι πηγές μόλυνσης και να γίνει δυνατή η εφαρμογή αποτελεσματικών μέτρων για την αντιμετώπιση τους.

Δ005. Αφού πρόκειται για ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αυτό σημαίνει ότι σε κάθε κύτταρο υπάρχει σχηματισμένος **πυρήνας** που περιβάλλει το γενετικό υλικό και διάφορα ενδοκυτταρικά οργανίδια, όπως τα **μιτοχόνδρια** που επίσης φέρουν μικρή ποσότητα γενετικού υλικού. Σε σχέση με την τυπική δομή του ευκαρυωτικού κυττάρου, πιο κοντά είναι τα κύτταρα των μετάρζωων, ενώ τα πρώτιστα σαν οι πλέον πρωτόγονοι ευκαρυώτες έχουν αρκετές αποκλίσεις στην κυτταρική δομή από το τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο. Ενδεικτικό της σύγχυσης που προκαλούν στους ταξινομητές είναι οι συχνές αλλαγές της συστηματικής κατάταξης τα τελευταία χρόνια, συνέπεια της εφαρμογής μοριακών μεθόδων, που είναι αντικειμενικότερες. Σαν παράδειγμα αναφέρονται τα Κρυπτοσπορίδια (γένος *Cryptosporidium*), τα οποία πρόσφατα άλλαξαν την κλάση στην οποία ανήκουν. Στα πρώτιστα απαντώνται και κάποια **ιδιαίτερα οργανίδια**, που δεν απαντώνται στα τυπικά ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως κινετοπλάστης, απικοπλάστης, μιτοσώματα, υδρογενοσώματα κλπ, κάποια εκ των οποίων φέρουν και το δικό τους γενετικό υλικό.

Δ006. Σαν παράδειγμα δεικνύονται τα πρώτιστα της διαφάνειας, όπου φαίνονται διάφορα οργανίδια που είναι απόντα στα τυπικά ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως τα συσταλά κενοτόπια, το κυτταρόστομα και η κυτταροπυγή, καθώς και το χρωματοειδές σωματίο σε μία ανώριμη κύστη αμοιβάδας (*Entamoeba histolytica*).

Δ007. Το **μέγεθος του γονιδιώματος** των παρασίτων ποικίλει, με τα μικρότερα γονιδιώματα να είναι της τάξης των 10 Mbps, και το μέγεθος να αυξάνεται στους πολυκύτταρους οργανισμούς και εν γένει στους πιο εξελιγμένους. Για σύγκριση το γονιδίωμα της *E. coli* είναι περίπου 4,6 Mbps ενώ το απλοειδές γονιδίωμα του ανθρώπου περίπου 3.000 Mbps. Σήμερα έχει αναγνωσθεί το γονιδίωμα πολλών παρασίτων (ακόμη και πολλών στελεχών παρασίτων) με αποτέλεσμα να είναι γνωστά όχι μόνο το μέγεθος αλλά και ο αριθμός των γονιδίων, καθώς και συγκριτικές πληροφορίες για τα γονιδιώματα αρκετών παρασιτικών ειδών. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς με τις πληροφορίες αυτές δίνεται η δυνατότητα **σχεδίασης μεθόδων ανάλυσης** με μοριακές μεθόδους, που είναι χρήσιμες στην παρασιτολογία.

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

Δ008. Στα έντομα το γονιδίωμα ποικίλει επίσης πολύ από 90 έως 7.700 Mbps, άρα σε ορισμένα έντομα είναι αρκετά μεγαλύτερο και από του ανθρώπου. Ο *Anopheles gambiae* που είναι ο κυριότερος φορέας της ελονοσίας στην Αφρική, έχει γονιδίωμα περίπου 280 Mbps. Δηλαδή είναι λίγο μικρότερο από το 1/10 του ανθρώπινου διπλοειδούς γονιδιώματος.

Το ενδιαφέρον στα **δεδομένα του γονιδιώματος** μας ενδιαφέρουν καθώς η δομή του κυττάρου και η συνακόλουθη ποσότητα και κατανομή της γενετικής πληροφορίας, παίζουν ρόλο στις εφαρμογές που θα συζητηθούν πιο κάτω. Άλλωστε για αυτούς τους λόγους διαφέρει ο τρόπος που εφαρμόζονται κοινές τεχνικές στις διαφορετικές κατηγορίες οργανισμών. Στα βακτήρια για παράδειγμα μπορεί να εφαρμοστεί Pulse Field Gel Electrophoresis μετά από RFLP, λόγω του μεγέθους του γονιδιώματος. Αυτό όμως δεν είναι εφικτό στα περισσότερα παράσιτα.

Δ009. Οι κύριοι τομείς στους οποίους θα επικεντρωθεί η παρουσίαση είναι: Διάγνωση, Ανίχνευση στο περιβάλλον, Γονοτύπηση, Ταξινόμηση, Μοριακή Επιδημιολογία, και Δομή πληθυσμών.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι ουσιαστικά **όλα τα θέματα άπτονται** της "Μοριακής Επιδημιολογίας", που επισημαίνεται με ιδιαίτερο χρώμα στην διαφάνεια. Ακόμη και η απλούστερη εφαρμογή που είναι η διάγνωση (αν είναι καλύτερη από τις κλασσικές μεθόδους), έχει επιπτώσεις στην επιδημιολογία, αφού μεταβάλλει τα επιδημιολογικά δεδομένα. Όπως θα διαπιστώσετε, σήμερα οι επιδημιολογικές έρευνες ωφελούνται σε σημαντικό βαθμό από την προσθήκη δεδομένων που προέρχονται από την εφαρμογή μοριακών τεχνικών.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Δ010. Η διάγνωση των ασθενειών στον άνθρωπο καθορίζεται από ένα σύνολο δεδομένων, μέρος των οποίων συνιστούν τα αποτελέσματα του εργαστηρίου και τυπικά, είναι έργο του κλινικού ιατρού. Στις παρασιτώσεις όμως η **διάγνωση τίθεται** στις περισσότερες των περιπτώσεων (αν όχι σε όλες) από το εργαστήριο. Στην ελονοσία για παράδειγμα, από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας αναφέρεται ρητώς, ότι η επιβεβαίωση της λοίμωξης πρέπει να πραγματοποιείται στο εργαστήριο.

Στην ανάλυση και τα παραδείγματα θα αναφερθούμε στην μοριακή διάγνωση ανθρώπινων παρασιτώσεων, αλλά παρόμοια ισχύουν αντίστοιχα και για την διάγνωση σε άλλους οργανισμούς, όπως ζώα συντροφιάς, παραγωγικά ζώα κλπ. Τονίζεται όμως ότι **δεν είναι κοινός** ο τρόπος διάγνωσης. Στον άνθρωπο για παράδειγμα η εχينوκοκκίαση ελέγχεται ορολογικά, ενώ στον σκύλο **είναι** παρασιτολογική εξέταση κοπράνων.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η εφαρμογή μοριακών μεθόδων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τα συμπεράσματα κάποιας **οικονομοτεχνικής ανάλυσης**, ή το γενικότερο οικονομικό επίπεδο της κοινωνίας, αφού ακόμη και σήμερα κάτω από κάποιες προϋποθέσεις, το κόστος του εξοπλισμού και των αναλωσίμων, συνήθως υπερβαίνει σημαντικά αυτό της κλασσικής μικροσκοπικής εξέτασης.

Δ011. Οι σημαντικότερες και απλούστερες στατιστικές παράμετροι που αξιολογούν τις εργαστηριακές εξετάσεις, είναι η **ευαισθησία και ειδικότητα**. Η πρώτη (που αναφέρεται και σαν κλινική ευαισθησία) μας δείχνει πόση είναι η πιθανότητα τα θετικά δείγματα να είναι όντως θετικά, ενώ η δεύτερη την πιθανότητα τα αρνητικά να είναι όντως αρνητικά. Στην πράξη για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιείται ένας αριθμός δειγμάτων, εκ των οποίων κάποια είναι θετικά και κάποια αρνητικά. Αφού εξεταστούν με την υπό διερεύνηση μέθοδο, συγκρίνονται τα αποτελέσματα με την πραγματική κατάσταση των δειγμάτων. Το δύσκολο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι να είναι γνωστό το "πραγματικό" αποτέλεσμα. Κατά κανόνα η σύγκριση γίνεται με μία μέθοδο αναφοράς, που όμως στην παρασιτολογία είναι συνήθως η μικροσκοπική εξέταση, για την οποία είναι γνωστά τα προβλήματα. Διάφορα άλλα κριτήρια, όπως η κλινική εικόνα, η ανταπόκριση σε ειδικά χημειοθεραπευτικά κλπ. μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό, για την ακριβέστερη προσέγγιση των "πραγματικά" θετικών και αρνητικών δειγμάτων.

Μία ακόμη κοινή έκφραση της ευαισθησίας (που αναφέρεται και σαν **αναλυτική ευαισθησία**) είναι και ο ελάχιστος αριθμός παρασίτων που μπορούν να ανιχνευτούν. Χρησιμοποιείται συχνά στην παρασιτολογία καθώς αποτελεί μια σημαντική παράμετρο στην διαγνωστική ικανότητα μιας μεθόδου.

Δ012. Οι εργαστηριακές εξετάσεις για την διάγνωση παρασιτικών νόσων είναι ποικίλες και διαφέρουν ανάλογα με το παράσιτο. Ξεκινούν από την πιο κλασσική, κοινή και διαδεδομένη, που είναι η **μικροσκοπική εξέταση** αίματος (*Plasmodium spp*, *Trypanosoma*), κοπράνων (*Entamoeba*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.*, *Schistosoma mansoni* κλπ), ούρων (*Schistosoma haematobium*) ή βιοψιών σπανιότερα (*Trixinella spirallis*, *Dirofilaria spp.*) και η οποία για την πλειονότητα των παρασίτων είναι η μέθοδος αναφοράς. Ο ανοσοφθορισμός χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση κάποιων παρασίτων (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.*). Για κάποιες νόσους (πχ από *Schistosoma haematobium*, *Leishmania infantum*, *Echinococcus spp.*) η διάγνωση μπορεί να γίνει **ορολογικά**, κάποιες φορές σε συνδυασμό και με άλλη μέθοδο. Τελευταία υπάρχουν και δοκιμασίες ανίχνευσης αντιγόνου για κάποια παράσιτα (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp*, *Giardia intestinalis*), που μπορεί να είναι βοηθητικά της μικροσκοπικής εξέτασης.

Ενδοσκοπήσεις και απεικονιστικές εξετάσεις δεν ανήκουν στα κοινά εργαλεία της παρασιτολογικής διάγνωσης, αλλά πραγματοποιούνται κάποιες φορές για διαγνωστικούς λόγους και μπορεί να είναι πολύ βοηθητικές. **Απεικονιστικές** εξετάσεις μπορεί να πραγματοποιηθούν σε παράσιτα που προκαλούν την δημιουργία αρκετά μεγάλων μορφωμάτων στο σώμα. Τέτοια παράσιτα είναι τα *Echinococcus spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Taenia solium*, που μπορεί να προκαλέσουν την δημιουργία κύστεων σε ήπαρ ή εγκέφαλο. **Ενδοσκοπήσεις** μπορεί να πραγματοποιηθούν για την λήψη δείγματος από το εσωτερικό του πεπτικού σωλήνα συνήθως, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που η παρασιτολογική εξέταση των κοπράνων είναι αρνητική, όπως για *Giardia intestinalis*.

Δ013. Η κλασσική διαγνωστική προσέγγιση των παρασιτικών λοιμώξεων, έχει διάφορα προβλήματα.

Δεν είναι πάντοτε εύκολο να ληφθεί το **κατάλληλο δείγμα** για την διάγνωση. Πχ για την μικροσκοπική διάγνωση της σπλαχνικής λεϊσμανίασης, το κατάλληλο δείγμα είναι μυελός των οστών, κάτι που απαιτεί μια μάλλον επίπονη διαδικασία για τον ασθενή. Ας σημειωθεί ότι το ιδανικό δείγμα από την άποψη της μικρότερης ταλαιπωρίας του ασθενή είναι αυτό που προέρχεται από εκκρίματα του οργανισμού, όπως ούρα κόπρανα, σίελος, δάκρυα, βλέννα κλπ. Η λήψη αίματος παρόλο που είναι απλή σαν διαδικασία και ελάχιστα επώδυνη, είναι προβληματική για ένα μέρος ασθενών, όπως τα παιδιά, και όχι μόνο. Παρόλα αυτά θεωρείται "εύκολο δείγμα".

Τα **κόπρανα** από την άλλη, αν και είναι δείγμα που λαμβάνεται εύκολα είναι αρκετά δύσκολο στην αναζήτηση των

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

παρασίτων, γιατί φέρει δομές που μπορεί να διαλάβουν σαν παράσιτα ή να δυσκολέψουν την παρατήρηση των παρασίτων. Τέτοια είναι φυτικά υπολείμματα ή γενικότερα υπολείμματα της τροφής καθώς και οργανισμοί που ανήκουν στην φυσιολογική ή την όχι και τόσο φυσιολογική, χλωρίδα του εντέρου. Είναι χρονοβόρα η εκπαίδευση που απαιτείται ώστε να μπορεί κάποιος να αναγνωρίζει ευχερώς τους παρασιτικούς οργανισμούς στα κόπρανα. Σε αυτό μπορεί να προστεθεί και ο μικρός αριθμός των παρασίτων που μπορεί να φέρει το δείγμα, οπότε η εξέταση του απαιτεί σημαντικό χρόνο ώστε να υπάρχει βεβαιότητα για το αρνητικό αποτέλεσμα.

Τέλος στα παράσιτα, όπως και σε άλλους παθογόνους οργανισμούς, είναι κοινό το πρόβλημα της διάγνωσης **ενεργού λοιμώξεως** με τις ορολογικές εξετάσεις.

Δ014. Γενικότερα η μικροσκοπική διάγνωση των παρασιτώσεων, που έχει ιστορία πού μεγαλύτερη των 100 ετών, έχει σαν **σημαντικά μειονεκτήματα** ότι απαιτεί κόπο και χρόνο, ο μικροσκοπιστής πρέπει να έχει πολύ καλή εκπαίδευση και εμπειρία και τέλος δεν έχει μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα.

Δ015. Και η μοριακή διάγνωση ποια από τα προαναφερθέντα παράσιτα αφορά;

Κατά κανόνα όχι τα έντομα, αφού τα έντομα είναι **αρκετά μεγάλα** ώστε να είναι ορατά σχεδόν με γυμνό οφθαλμό και βέβαια είναι πολύ εύκολη η αναγνώριση τους με στερεοσκόπιο ή μικροσκόπιο. Βέβαια οι μοριακές μέθοδοι χρησιμεύουν σε άλλες διαδικασίες, που όμως δεν αφορούν το παρόν τμήμα.

Αφορά σίγουρα τα παράσιτα του αίματος, των κοπράνων ή των ούρων, που μπορεί η συγκέντρωσή τους να είναι **μικρή**, ή να είναι εύκολο να **μπερδευτούν** με άλλα στοιχεία του δείγματος.

Επίσης μπορεί να αφορά έλμινθες, που αποβάλλουν ωά ή προνυμφικές μορφές στα κόπρανα, τα οποία επίσης μπορεί να αποβάλλονται σε **μικρούς αριθμούς, ή ακανόνιστα**.

Για τους λόγους αυτούς άλλωστε η τυπική διαδικασία μικροσκοπικής εξέτασης των κοπράνων απαιτεί τρία δείγματα που λαμβάνονται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ώστε να τεκμηριωθεί το αρνητικό αποτέλεσμα.

Δ016. Σήμερα ο όρος μοριακή διάγνωση είναι συνώνυμος της PCR αν και τελευταίως έχουν αναπτυχθεί και εναλλακτικές τεχνικές που όμως δεν έχουν τύχει ακόμη ευρύτερης εφαρμογής. Η PCR συνίσταται στον **ειδικό πολλαπλασιασμό** ενός μικρού τμήματος του γενετικού υλικού, ώστε να είναι ανιχνεύσιμο και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε περαιτέρω αναλύσεις όπως ανάγνωση της ακολουθίας του. Η κλασική διαδικασία της μεθόδου ανίχνευσης με PCR αποτελείται από τρία διάκριτα στάδια: Την απομόνωση του DNA, την PCR αυτή καθ'αυτή και την ηλεκτροφόρηση κατά την οποία ανιχνεύεται και ταυτοποιείται το προϊόν της αντίδρασης.

Δ017. Σημαντικές έννοιες στην PCR είναι:

Οι **εκκινητές** (primers), που είναι μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια από τα οποία εκκινεί η σύνθεση νέων τμημάτων DNA και είναι σημαντικότερα για τον εφαρμογή μιας επιτυχούς μοριακής μεθόδου, καθώς από την σχεδίαση τους εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό η ευαισθησία και ειδικότητα της ανίχνευσης.

Η **ακολουθία-στόχος** είναι το τμήμα του γενετικού υλικού που πολλαπλασιάζεται κατά την αντίδραση. Η επιλογή της είναι σημαντική διότι από τα χαρακτηριστικά της εξαρτάται ο αποτελεσματικός σχεδιασμός της μεθόδου, αλλά και η δυνατότητα εκτός της ανίχνευσης να αντληθούν και περισσότερες πληροφορίες για το παράσιτο, χρήσιμες στην επιδημιολογική διερεύνηση.

Δ018. Η πλέον χρησιμοποιηθείσα περιοχή για τον σχεδιασμό μοριακών τεχνικών διάγνωσης στα παράσιτα είναι η περιοχή που κωδικοποιεί τα **γονίδια του ριβοσωμικού RNA**, που αναφέρεται και σαν ριβοσωμική μονάδα [rDNA unit]. Αποτελείται από μία μη μεταγραφόμενη περιοχή που περιέχει διάφορα ρυθμιστικά στοιχεία, όπως υποκινητές, και την μεταγραφόμενη περιοχή που αποτελείται από τα γονίδια του 18S, 5,8S και 28S rRNA. Μεταξύ των γονιδίων υπάρχουν οι περιοχές ITS1 και ITS2 που αν και μεταγράφονται δεν χρησιμεύουν και αποκόπτονται κατά την ωρίμανση του πρόδρομου μορίου RNA. Χαρακτηριστικό είναι επίσης ότι στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα κάθε ριβοσωμική μονάδα **επαναλαμβάνεται αρκετές φορές**, πολλές φορές σε σειρά. Σε κάποια πρώιστα υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην δομή και τον αριθμό των επαναλήψεων της ριβοσωμικής μονάδας.

Δ019. Κάποιοι από τους λόγους για τους οποίους η ριβοσωμική μονάδα έχει χρησιμοποιηθεί τόσο εκτενώς σαν στόχος για την ανίχνευση των παρασίτων είναι:

Οι πολλές επαναλήψεις της ριβοσωμικής μονάδας (σε ορισμένους οργανισμούς έως και εκατοντάδες) έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη **ευαισθησία** των μοριακών δοκιμασιών.

Τα διάφορα τμήματα εξελίσσονται με **διαφορετικό ρυθμό** λόγω της διαφορετικής τους λειτουργικής σημασίας, οπότε στην ριβοσωμική μονάδα υπάρχουν πολύ συντηρημένα τμήματα, όπως το 18S γονίδιο, λιγότερο συντηρημένα όπως το 28S

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

γονίδιο και μετρίως συντηρημένα όπως τα ITS, που λόγω του ότι δεν έχουν κάποιο λειτουργικό ρόλο μεταλλάσσονται συχνότερα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι εύκολος ο **σχεδιασμός** μοριακών μεθόδων. Τέλος επειδή η περιοχή έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε μεγάλο αριθμό οργανισμών, υπάρχουν **πολλά δεδομένα** διαθέσιμα που καθιστούν ευκολότερη την μελέτη αυτών των γονιδίων και σε νέους οργανισμούς.

Δ020. Παρόλα αυτά σε διάφορους οργανισμούς έχουν επιλεγεί και άλλες ακολουθίες-στόχοι, καθώς κάποιες ιδιαιτερότητες τους προσδίδουν πλεονεκτήματα.

Έτσι για παράδειγμα στην *Giardia intestinalis* χρησιμοποιείται και το γονίδιο της β-giardin. Η οικογένεια των γονιδίων της giardin απαντάται αποκλειστικά στο γένος Giardia και για τον λόγο αυτό μπορεί να προσδώσει **υψηλή ειδικότητα**.

Στην *Leishmania spp.* χρησιμοποιείται σαν στόχος και το γενετικό υλικό του κινετοπλάστη (kDNA), καθώς βρίσκεται σε περισσότερα αντίγραφα από το ριβοσωμικό RNA, οπότε μπορεί να προσφέρει **υψηλότερη ευαισθησία**.

Για παρόμοιο λόγο χρησιμοποιείται σαν στόχος και το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) για την ανίχνευση των *Plasmodium spp.*.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Δ021. Πλεονέκτημα των μοριακών μεθόδων σε σχέση με τις κλασσικές είναι η αυξημένη ευαισθησία και ειδικότητα. Προφανώς αυτό δεν σημαίνει ότι κάθε μοριακή μέθοδος είναι καλύτερη από τις κλασσικές, αφού η σχεδίαση και βελτιστοποίηση παίζουν σημαντικό ρόλο στην επίτευξη αυτών των χαρακτηριστικών.

Ένα παράδειγμα της σημασίας της αυξημένης ευαισθησίας είναι η διάγνωση της σπλαχνικής λείσμανιάσης. Η μικροσκοπική διάγνωση της λοίμωξης από *Leishmania infantum* πραγματοποιείται σε δείγμα μυελού των οστών, στο οποίο είναι μεγάλη η πιθανότητα να βρεθούν παρασιτούμενα λευκά αιμοσφαίρια. Η λήψη του δείγματος βέβαια είναι επώδυνη καθώς απαιτεί τρύπημα οστού. Κατάλληλο είναι και δείγμα σπληνός, που όμως έχει μεγαλύτερη πιθανότητα πρόκλησης προβλημάτων. Σε ασθενείς με AIDS διαπιστώθηκε ότι βρίσκονται παρασιτούμενα κύτταρα και σε περιφερικό αίμα. Η περαιτέρω μελέτη έδειξε ότι και σε μη ανοσοκατεσταλμένους υπάρχουν παράσιτα σε κύτταρα του περιφερικού αίματος αλλά είναι σε πολύ μικρούς αριθμούς ώστε να είναι ευχερής η παρατήρησή τους. Ο σχεδιασμός ευαίσθητων μοριακών μεθόδων έδωσε την δυνατότητα της διάγνωσης σε **δείγμα περιφερικού αίματος**, κάτι που είναι σημαντικό καθώς καθιστά ευκολότερη την διαγνωστική διαδικασία.

Δ022. Η αντικειμενικότητα είναι ένα άλλο χρήσιμο χαρακτηριστικό των μοριακών μεθόδων. Η μικροσκοπική ανίχνευση των παρασίτων απαιτεί την παρατήρηση δειγμάτων πολλές φορές για μεγάλο χρονικό διάστημα, ώστε να ανευρεθεί το παράσιτο. Είναι προφανές ότι η εμπειρία του μικροσκοπιστή, αλλά και η προσοχή που επιδεικνύει, είναι σημαντικοί παράμετροι για την επιτυχή διάγνωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναζήτηση *Plasmodium spp.* σε δείγμα αίματος. Υπάρχουν 4 (ή και 5) είδη πλασμοδίων, που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Από αυτά η συντριπτική πλειονότητα των περιστατικών αφορούν τα είδη *P. vivax* και *P. falciparum*. Η διευκρίνιση του **είδους** είναι σημαντική για την **θεραπεία**, καθώς κάποια είδη χρειάζονται επιπλέον σκεύασμα για την αντιμετώπιση των υποζωϊτών που προκαλούν υποτροπές. Για τον καθορισμό του είδους, απαιτείται η εύρεση χαρακτηριστικών για το κάθε είδος μορφών του παρασίτου στα ερυθρά αιμοσφαίρια του ασθενούς. Σε περιπτώσεις χαμηλής παρασιταϊμίας, οπότε και τα παρασιτούμενα ερυθρά είναι λίγα, μπορεί να διαλάβει ο μικροσκοπιστής και να διαγνώσει διαφορετικό είδος. Βάσει της βιβλιογραφίας αυτό είναι έχει συμβεί εξ' αιτίας του γεγονότος ότι κάποια είδη ήταν μη αναμενόμενα, οπότε λειτούργησε ο υποκειμενικός παράγοντας. Για τους ανωτέρω λόγους δεν διαγνώθηκε άμεσα η λοίμωξη από *P. knowlesi*. Στην περίπτωση της PCR που μπορεί να διακρίνει τα διαφορετικά είδη, αυτό ο κίνδυνος δεν υφίσταται. Στην διαφάνεια εικονίζεται μία μέθοδος πολυπλεκτικής (multiplex) PCR που χρησιμοποιεί 3 εκκινητές. Η μέθοδος ανιχνεύει μόνο τα *P. vivax* και *P. falciparum*, και παράγει διαφορετικό μέγεθος προϊόντος, ανάλογα με το είδος του πλασμοδίου.

Δ023. Η PCR σχεδόν σε όλες τις συγκρίσεις με την μικροσκοπική εξέταση, έδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα, με λίγες βιβλιογραφικές αναφορές να αναφέρουν στην χειρότερη περίπτωση ισοδύναμη διαγνωστική δυνατότητα και σε ελάχιστες αναφορές χειρότερη. Ένα ιδιαίτερο παράσιτο είναι ο *Strongyloides stercoralis*, που ανήκει στους νηματέλμινθες και η ανίχνευση του δείχνει το συγκριτικό πλεονέκτημα των μοριακών μεθόδων. Έχει έναν ιδιαίτερα περίπλοκο κύκλο και η τελική θέση του στον οργανισμό είναι στο λεπτό έντερο. Εκεί τα θηλυκά άτομα γεννούν ωά, από τα οποία εκκολάπτονται ραβδιτοειδείς προνύμφες, μεγέθους <0,4 mm. Οι προνύμφες είναι λίγες τον αριθμό, οπότε και η παρατήρησή τους σε δείγματα κοπράνων είναι δύσκολη και απαιτεί περισσότερα από ένα δείγματα για την ανεύρεση του παρασίτου. Με την PCR ανιχνεύτηκε ο νηματώδης **από το πρώτο δείγμα**, στο 83% των περιστατικών, ενώ απαιτήθηκε μικρότερος αριθμός δειγμάτων για το θετικό αποτέλεσμα.

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

Δ024. Και για να γίνει αντιληπτό ότι το πρόβλημα της ορθής διάγνωσης δεν συμβαίνει απλά περιστασιακά, αναφέρεται μια δημοσίευση από την Κολομβία, στην οποία ο έλεγχος των δειγμάτων με μοριακή μέθοδο έδειξε μια αυξημένη συχνότητα στο είδος *P. malariae* και επίσης σημαντικό ποσοστό διπλών και τριπλών μολύνσεων, που δεν ήταν παρατηρήσιμες μικροσκοπικά. Τονίζεται ότι ειδικά στην Κολομβία, που είναι ενδημική χώρα, οι μικροσκοπιστές είναι αρκετά έμπειροι.

Δ025. Τα παράσιτα του γένους *Entamoeba* που απαντώνται στον άνθρωπο ανήκουν κυρίως σε δύο είδη την *E. histolytica* και την *E. dispar*. Τα δύο αυτά είδη μπορεί να προκαλέσουν μια τελείως **διαφορετική κλινική εικόνα**. Η *E. histolytica* μπορεί να προκαλέσει αιματηρή διάρροια, ή και να εισβάλλει στο εσωτερικό του οργανισμού και να προκαλέσει τον σχηματισμό κύστεων στο ήπαρ ή τον εγκέφαλο με σημαντικές συνέπειες. Σε αντίθεση η *E. dispar* θεωρείται μη παθογόνος οργανισμός. Τα δύο αυτά είδη δεν δύνανται να διαφοροποιηθούν μικροσκοπικά, με εξαίρεση την μάλλον σπάνια περίπτωση κατά την οποία παρατηρούνται σε τροφοζώιτες της αμοιβάδας φαγοκυτταρωμένα ερυθροκύτταρα, οπότε και τεκμηριώνεται ότι το παράσιτο ανήκει στο είδος *E. histolytica*. Με PCR που είναι εμφωλιασμένη (nested) και πολυπλεκτική παράγεται διαφορετικό μέγεθος προϊόντος ανάλογα με το είδος της αμοιβάδας. Έτσι μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα το είδος και να αποφευχθεί η άνευ λόγου χορήγηση θεραπείας.

Δ026. Για την αποφυγή επώδυνης δειγματοληψίας, η διάγνωση της λείσμανιάσης πραγματοποιείται σε κάποιες περιπτώσεις με ορολογικές μεθόδους, που είναι έμμεσες αφού ανιχνεύουν την ύπαρξη αντισωμάτων έναντι του παθογόνου παράγοντα. Οι ορολογικές μέθοδοι παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία, αλλά το θετικό αποτέλεσμα δεν προδικάζει σε όλες τις περιπτώσεις την ύπαρξη ενεργού λοίμωξης, αφού τα παραχθέντα αντισώματα μπορεί να βρίσκονται στην κυκλοφορία πολλούς μήνες ή και χρόνια μετά την λοίμωξη. Οι μοριακές μέθοδοι αφού ανιχνεύουν το γενετικό υλικό των παρασίτων, ανήκει στις μεθόδους **άμεσης ανίχνευσης**, που σημαίνει ότι το θετικό αποτέλεσμα δεικνύει την παρουσία του παρασίτου στο δείγμα. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν περιπτώσεις που η θετική PCR έχει βρεθεί να επιμένει για χρόνια μετά την αποθεραπεία χωρίς ο ασθενής να έχει συμπτώματα. Έχει αναφερθεί κάτι τέτοιο στην μοριακή ανίχνευση της *Brucella*. Κάποια σαφής εξήγηση δεν έχει δοθεί για το φαινόμενο.

Δ027. Πολύ μεγάλη είναι η σημασία των μοριακών μεθόδων στην ανίχνευση του *Toxoplasma gondii*. Το παράσιτο συνήθως μολύνει ασυμπτωματικά τους υγιείς, αν και έχουν αναφερθεί συμπτωματικά περιστατικά. Σε **ανοσοκατεσταλμένα** άτομα όμως (όπως ασθενείς με AIDS ή μεταμοσχευμένους) μπορεί να προκαλέσει σοβαρή νόσο. Στους ασθενείς αυτούς οι ορολογικές μέθοδοι είναι ελάχιστα πληροφοριακές. Σύμφωνα με μία Γαλλική δημοσίευση ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς που είχαν τακτική παρακολούθηση με PCR για τοξόπλασμα είχαν μεγαλύτερη επιβίωση. Παρόμοια σημαντική είναι η μοριακή ανίχνευση σε περιστατικά **συγγενούς τοξοπλάσμωσης**. Αν η εγκυμονούσα είχε μολυνθεί από τοξόπλασμα πριν την σύλληψη του παιδιού, οπότε και έχουν παραχθεί αντισώματα, δεν υπάρχει κίνδυνος για το έμβryo, εκτός αν παρουσιάσει κατά την εγκυμοσύνη κάποια ανοσοκαταστολή που θα οδηγήσει σε λοίμωξη και πιθανή προσβολή του εμβρύου. Σε περίπτωση επίσης που μολύνεται κατά την εγκυμοσύνη, υπάρχει πιθανότητα και πάλι να προσβληθεί το έμβryo. Η κατάσταση της μητέρας ελέγχεται συνήθως ορολογικά, αν και χρησιμοποιείται ανάλογα με την περίπτωση και η PCR. Για τον έλεγχο όμως του εμβρύου, χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά PCR σε δείγμα αμνιακού υγρού.

Δ028. Εκτός των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων, που είναι σημαντικά σε επίπεδο διάγνωσης, υπάρχουν και αρκετά άλλα πλεονεκτήματα, που άπτονται της πρακτικής και οικονομοτεχνικής πλευράς. Έτσι είναι δυνατόν σήμερα να γίνει σε **αυτόματες συσκευές** το μεγαλύτερο μέρος των διαδικασιών που σχετίζονται με την μοριακή διάγνωση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένη πιθανότητα του ανθρώπινου σφάλματος, και την ταχύτερη και ακριβέστερη διάγνωση. Η μοριακή διάγνωση επιπλέον δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, πέραν της διεξαγωγής μοριακών δοκιμασιών, που είναι κοινές για όλα τα παράσιτα, αλλά και πολλούς άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε αντίθεση ο μικροσκοπιστής πρέπει να εκπαιδευτεί σε ετερογενή είδη δειγμάτων και παρασίτων. Όλα αυτά και το κόστος βέβαια, εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από τον **φόρτο εργασίας** του εργαστηρίου. Οι μοριακές μέθοδοι δεν είναι συμφέρουσες οικονομικά για ένα μικρό αριθμό δειγμάτων, καθώς απαιτεί μια σημαντική οικονομική επένδυση και μεγαλύτερο κόστος αναλωσίμων ανά εξέταση. Αντίθετα η αυτοματοποίηση και η εφαρμογή της PCR συμφέρει οικονομικά, αλλά και από την άποψη του χρόνου, όταν ο αριθμός των δειγμάτων είναι μεγάλος. Για σύγκριση ένα δείγμα για ελονοσία απαιτεί 20 λεπτά παρατήρηση στο μικροσκόπιο, οπότε για περίπου 100 δείγματα χρειάζεται το ελάχιστο 3 εργάσιμες ημέρες. Σε ένα αυτοματοποιημένο εργαστήριο, τα 100 περίπου δείγματα μπορούν να εξεταστούν μοριακά σε λιγότερο από 1 εργάσιμη ημέρα. (Η οικονομοτεχνική ανάλυση βέβαια, που περιλαμβάνει και άλλες παραμέτρους όπως το κόστος των εργατικών, δεν περιορίζεται στα προαναφερθέντα, αλλά οι αριθμοί είναι ενδεικτικοί).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Δ029. Λόγω της άμεσης ανίχνευσης του παρασίτου των μοριακών μεθόδων, η διάγνωση απαιτεί δείγμα που να περιέχει το παράσιτο ή γενετικό υλικό αυτού. Αυτό περιορίζει την εφαρμογή της μοριακής διάγνωσης σε παθογόνα παράσιτα τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα ή σε εκκρίματα (ούρα, κόπρανα) κλπ. Τέτοια παράσιτα είναι τα *Trypanosoma spp.*, *Plasmodium spp.*, και διάφορα παράσιτα του πεπτικού, όπως *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.* κλπ. Παρόμοια ισχύουν και για παράσιτα που αν και βρίσκονται σε εσωτερικά σημεία του σώματος, παράγουν ωά που αποβάλλονται μέσω εκκρινμάτων, όπως *Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma spp.*, *Taenia saginata*.

Αντίθετα παράσιτα που έχουν **συγκεκριμένη εντόπιση** στο σώμα, που καθιστά δυσχερή την δειγματοληψία, συνήθως διαγιγνώσκονται με ορολογικές μεθόδους. Τέτοια παράσιτα είναι η *Toxocara canis*. Το παράσιτο είναι έλμινθας που στον άνθρωπο δεν μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο του (αδιέξοδος ξενιστής). Σε περίπτωση κατάποσης του ωού, εκκολάπτεται η προνύμφη και κυκλοφορεί στο σώμα. Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις η λοίμωξη είναι ασυμπτωματική, στην περίπτωση οφθαλμικής εντόπισης, μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα όρασης. Άλλα παρόμοια παραδείγματα είναι η *Trichinella spirallis*, ο κυστίκερκος (*Taenia solium*) και ο *Ecchinococcus spp.* που σχηματίζουν κύστεις. Εννοείται ότι αν ληφθεί δείγμα από τις κύστεις (συνήθως χειρουργικά), μπορεί να εφαρμοστεί μοριακή μέθοδος για την ταυτοποίηση του παρασίτου.

Δ030. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μικροσκοπησης είναι ότι η **οπτική επισκόπηση** του δείγματος μπορεί να διαπιστώσει ποιο είναι το αίτιο των συμπτωμάτων. Αντίθετα στην PCR, στην κλασσική της τουλάχιστον εφαρμογή, πρέπει να είναι γνωστό ποιο είναι το πιθανό υπεύθυνο παράσιτο, ώστε να ελεγχθεί. Όταν δεν υπάρχουν πιθανότερα υποψήφια παράσιτα, τότε πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετές διαφορετικές αντιδράσεις ώστε να εντοπιστεί το αίτιο, κάτι που δεν είναι βολικό και συμφέρον. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί με δείγμα ασθενούς που παρουσιάζει γαστρεντερικά προβλήματα. Αυτά μπορεί να οφείλονται σε αρκετά παράσιτα, κάποια εκ των οποίων είναι αρκετά σπάνια στην Ελλάδα. Ένα από τα πιο σπάνια σε ασθενείς είναι το *Balantidium coli*. Είναι γενικά δύσκολο να κατευθυνθεί η διάγνωση σε αυτό το παράσιτο, εκτός αν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο στοιχείο από το ιστορικό του ασθενούς. Λόγω ακριβώς της σπανιότητας, η διάγνωση κατευθύνεται προς τα πλέον συχνά, οπότε και μπορεί να καθυστερήσει σημαντικά. Με την μικροσκοπηση αντίθετα, είναι εύκολο να παρατηρηθεί το μεγάλου μεγέθους βλεφαριδοφόρο και να τεθεί άμεσα η διάγνωση.

Δ031. Οι μοριακές μέθοδοι σε κάποιες περιπτώσεις, λόγω της υψηλής ευαισθησίας, προκαλούν διαγνωστικά προβλήματα. Αυτό συμβαίνει εκτός άλλων και στην διάγνωση της λείσμανιάσης, όταν χρησιμοποιείται μια πολύ ευαίσθητη μοριακή μέθοδος. Διαπιστώθηκε ότι ασυμπτωματικά άτομα μπορεί να έχουν θετική PCR, που σημαίνει ότι φέρουν το παράσιτο, χωρίς όμως να έχουν λείσμανίαση. Προφανώς σε κάποιες (σπάνιες) περιπτώσεις πυρετού αγνώστου αιτιολογίας, θα μπορούσε λανθασμένα να διαγνωστεί λοίμωξη από λείσμανία. Έτσι η PCR λόγω της πολύ υψηλής ευαισθησίας μπορεί να έχει **ψευδώς θετικό** αποτέλεσμα.

Δ032. Εκτός από την προαναφερθείσα, υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις που προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στην PCR. Οι αιτίες μπορεί να είναι διάφορες. Μία πολύ συχνή αιτία είναι οι **επιμολύνσεις** του χώρου ιδιαίτερα κατά την συχνή εφαρμογή nested - PCR. Άλλη αιτία μπορεί να είναι ο **μη ειδικός πολλαπλασιασμός**, που όμως είναι αρκετά σπάνιος σε κλινικά τουλάχιστον δείγματα, αφού οι μέθοδοι πριν εφαρμοστούν έχουν ελεγχθεί σε ένα αριθμό δειγμάτων, ώστε να εξασφαλιστεί κάποια στοιχειώδης αξιοπιστία της μεθόδου.

Κάτι πιο ιδιαίτερο αφορά το θετικό αποτέλεσμα στην PCR μερικές ημέρες μετά την επιτυχή θεραπεία. Προφανώς οφείλεται στην κυκλοφορία γενετικού υλικού του παρασίτου που δεν έχει ακόμη απομακρυνθεί.

Πρόβλημα συνιστούν επίσης και τα ψευδώς-αρνητικά αποτελέσματα, τα οποία όμως συνήθως οφείλονται σε **αναστολή του ενζύμου** της PCR από το δείγμα. Αυτό συνιστά ένα σημαντικό διαγνωστικό πρόβλημα, γι'αυτό και συνίσταται να ελέγχονται τουλάχιστον τα αρνητικά δείγματα για αναστολή.

Δ033. Και κάποια γενικότερα μειονεκτήματα της PCR είναι ότι πραγματοποιείται μόνο σε οργανωμένα εργαστήρια με αρκετά ακριβό εξοπλισμό, αδιάλειπτη παροχή ηλεκτρισμού, καταψύξεις κλπ.

ΔΕΝ αποτελεί την **μέθοδο αναφοράς** για τα περισσότερα, αν όχι όλα τα παράσιτα. Επίσης ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι κατά κανόνα δεν μπορεί να γίνει μοριακή διάγνωση σε δείγμα με συντηρητικό. Τα γνωστά συντηρητικά όπως η φορμόλη, ενώ είναι πολύ χρήσιμα για την μικροσκοπική εξέταση όταν ένα δείγμα δεν μπορεί να φτάσει γρήγορα στο εργαστήριο, προκαλούν προβλήματα στην εφαρμογή μοριακών μεθόδων.

Εδώ πρέπει να σχολιαστεί και μια σημαντική αντίφαση. Τα παράσιτα συνιστούν κίνδυνο κυρίως για τις χώρες του τρίτου κόσμου και περισσότερο σε περιοχές χωρίς υποδομές, που όμως δεν έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν σε ευρύτερη κλίμακα και επί τόπου τις μοριακές μεθόδους, που αποδεδειγμένα, θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

καταπολέμηση τους.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΛΥΣΕΙΣ-ΒΕΛΤΙΩΣΕΙΣ

Δ034. Η ποσοτική PCR (αλλιώς qPCR ή real-time PCR), είναι μια σημαντική βελτίωση στην διάγνωση των παρασίτων. Προσφέρει υψηλή ευαισθησία, με ευκολία εφαρμογής, αφού δεν είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση. Παράλληλα η ανίχνευση σε κλειστό σύστημα, μειώνει την **πιθανότητα επιμολύνσεων**, αφού το σωληνάριο με το πολλαπλασιασμένο προϊόν της αντίδρασης δεν χρειάζεται να ανοιχθεί και έτσι να επιμολυνθεί ο χώρος του εργαστηρίου. Η χρησιμοποίηση ανιχνευτή (probe) για την ανίχνευση, επίσης αυξάνει την **ειδικότητα** και μειώνει την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Για όλους αυτούς τους λόγους σήμερα η διαγνωστική διαδικασία οφείλει να στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην qPCR. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου συνιστά κυρίως το κόστος, αφού και ο ειδικός θερμοκυκλοποιητής αλλά και τα αντιδραστήρια είναι ακριβότερα. Βέβαια τα ωφέλη και η εξοικονόμηση εργατωρών μπορούν σε κατάλληλες συνθήκες να ισοσταθμίσουν αυτό το κόστος.

Δ035. Πρόσφατες μελέτες σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων αποδεικνύουν τα πλεονεκτήματα της qPCR σε σχέση με τις κλασικές διγνωστικές μεθόδους στην παρασιτολογία. Μάλιστα τα αποτελέσματα μιας μελέτης χρησιμοποιούν σαν δείγμα τα κόπρανα που είναι και ένα "δύσκολο" δείγμα, λόγω των συχνών φαινομένων αναστολής που παρατηρούνται. Η διαφορά της ευαισθησίας της qPCR σε σχέση με την μικροσκόπηση είναι σημαντική.

Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι για την ανίχνευση της *Giardia intestinalis*, αναφέρεται σε κάποιες δημοσιεύσεις ότι η ευαισθησία της PCR δεν είναι καλύτερη της μικροσκόπησης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην χαρακτηριστική μορφολογία του παρασίτου, που καθιστά ευχερέστερη την παρατήρηση του ή σε αδυναμίες των μοριακών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν. Μειωμένη κλινική ευαισθησία αναφέρθηκε και για τον νηματέλμινθα *Trichuris trichura*.

Δ036. Καθώς η qPCR μπορεί να ποσοτικοποιήσει το αποτέλεσμα, είναι χρήσιμη και για την παρακολούθηση της πορείας της ασθένειας καθώς και της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Επιπλέον στην περίπτωση της *Leishmania infantum*, προσφέρει και ένα (όχι απόλυτο) όριο για τον διαχωρισμό της ασυμπτωματικής μόλυνσης και της λοίμωξης, αυξάνοντας την διαγνωστική αξία της δοκιμασίας.

Δ037. Το σημαντικό πρόβλημα της ανίχνευσης μόνο ενός μικροοργανισμού σε κάθε αντίδραση, επιλύει η πολυπλεκτική (multiplex) PCR. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται περισσότεροι από δύο εκκινητές, (συνήθως δύο για κάθε οργανισμό), ώστε να είναι δυνατή η **ανίχνευση πολλών παρασίτων συγχρόνως**. Στην πράξη δεν είναι εύκολο να ανιχνευτεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός παρασίτων σε μία αντίδραση, το σύνθετες είναι περίπου 3 ή 4, καθώς οι περισσότεροι θερμοκυκλοποιητές real time στην πράξη δεν ανιχνεύουν περισσότερες από 5 χρωστικές ταυτόχρονα. Εννοείται ότι σε περίπτωση πολυπλεκτικής κλασικής PCR δεν υπάρχει θεωρητικά όριο στον αριθμό των ανιχνευόμενων παρασίτων, αλλά αυτό είναι περισσότερο θεωρητικό παρά πρακτικό. Συνεπώς η **ευελιξία της μικροσκοπικής** διάγνωσης στον τομέα αυτό δεν μπορεί να ξεπεραστεί. Παρόλα αυτά είναι σημαντική η ευκολία που παρέχουν οι πολυπλεκτικές αντιδράσεις. Στον λεγόμενο Δυτικό κόσμο (και όχι μόνο) τα σημαντικότερα παράσιτα του γαστρεντερικού συστήματος είναι η *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp.* και *Giardia intestinalis*, για τον λόγο αυτό και υπάρχουν στην βιβλιογραφία αρκετές πολυπλεκτικές qPCRs για την ταυτόχρονη ανίχνευση τους. Παράλληλα διατίθενται και αρκετά εμπορικά κιτ, πλήρη με μάρτυρες και έτοιμα διαλύματα, που καθιστούν την ανίχνευση αυτών των τριών παρασίτων εύκολη, ταχεία και αξιόπιστη.

Βέβαια σε άλλες περιοχές του κόσμου, όπου κάποια άλλα είδη είναι ενδημικά και συνιστούν πρόβλημα Δημόσιας Υγείας, τα είδη των ανιχνευόμενων οργανισμών μπορεί να διαφέρουν.

Ένα ενδογενές πρόβλημα της πολυπλεκτικής PCR είναι ότι συνήθως οι τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας είναι μειωμένες σε σχέση με τις απλές PCR. Αυτό οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία πολλών ολιγονουκλεοτιδίων στην αντίδραση. Τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα με την qPCR, το πρόβλημα τείνει να έχει μειωμένη σημασία για αυτό τον λόγο τέτοιες λύσεις είναι αρκετά διαδεδομένες.

Δ038. Για το πρόβλημα του "δύσκολου" στην λήψη δείγματος, όπως στην *Toxocara canis* δεν υπάρχει κάποια μοριακή μέθοδος που να το επιλύει. Όμως έχουν αναφερθεί περιπτώσεις, όπου έχει ανιχνευτεί γενετικό υλικό του παρασίτου σε **δείγμα ορού**, αν και το παράσιτο έχει εντοπισμένη θέση στον οργανισμό. Μία τέτοια εφαρμογή αφορά την ανίχνευση του σχιστοσώματος. Θεωρητικά αναμένεται ότι DNA του παρασίτου θα κυκλοφορεί στο περιφερικό αίμα, καθώς κάποια κύτταρα (ιδιαίτερα από την εξωτερική επιφάνεια ή το πεπτικό σύστημα) πεθαίνουν ή αποικοδομούνται.

Σημαντικό ρόλο παίζει πιθανά και η θέση του παρασίτου. Στην περίπτωση του εχινοκόκκου πχ, που σχηματίζει ηπατικές κύστες αφοριζόμενες από τους περιβάλλοντες ιστούς, δεν έχει αναφερθεί ανίχνευση του παρασίτου από αίμα ή ορό.

ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δ039. Καθώς η PCR απαιτεί όπως αναφέρθηκε κάποιες εγκαταστάσεις και μια σημαντική επένδυση, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων που θα είναι **πιο ευέλικτες** και εφαρμόσιμες με ελάχιστο εξοπλισμό. Από τις διάφορες που έχουν αναφερθεί, περισσότερο ενδιαφέρον φαίνεται ότι έχει η LAMP (loop-mediated isothermal amplification) και μπορεί να αποδοθεί σαν Ισοθερμικός πολλαπλασιασμός μέσω βρόγχου. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτεί θερμοκυκλοποιητή, αλλά ένα απλό υδατόλουτρο, ή ισοδύναμη συσκευή. Βέβαια επειδή χρησιμοποιεί εκκινητές και DNA πολυμεράση, απαιτεί συντήρηση των αντιδραστηρίων σε κατάψυξη και υψηλή ποιότητα αντιδραστηρίων, αλλά εν γένει είναι καταλληλότερη για περιοχές με μικρές δυνατότητες.

Δ040. Η LAMP μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγμα που δεν έχει πραγματοποιηθεί συστηματικά απομόνωση DNA, καθώς η παρουσία διαφόρων μορίων από το δείγμα **δεν αναστέλλει** την αντίδραση, όπως στην PCR. Οι τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας είναι συγκρίσιμες της PCR και σε κάποιες ειδικές περιπτώσεις (περιβαλλοντικά δείγματα, τα οποία θα αναφερθούν πιο κάτω) η ευαισθησία έχει αναφερθεί ότι είναι καλύτερη της PCR.

Δ041. Η LAMP χρησιμοποιεί ένα μεγάλο αριθμό εκκινητών, κάτι που δίνει μεγάλη ειδικότητα στην αντίδραση, αλλά παράλληλα αυξάνει την δυσκολία στην σχεδίαση. Απαιτεί περίπου έξι περιοχές των 15-20 νουκλεοτιδίων εκατέρωθεν της περιοχής που πολλαπλασιάζεται, οι οποίες να φέρουν κοινή ακολουθία νουκλεοτιδίων μεταξύ όλων των οργανισμών που ανιχνεύονται, συνεπώς να είναι πολύ συντηρημένες.

Δ042. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα είναι και η δυνατότητα οπτικής ανάγνωσης του αποτελέσματος, χωρίς την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης ή την χρησιμοποίηση ειδικών οργάνων μέτρησης. Στην διαφάνεια φαίνονται τα αποτελέσματα από μία δημοσίευση για την ανίχνευση του τρυπανοσώματος. Είναι προφανής η ευκολία ανάγνωσης του αποτελέσματος, αλλά συγχρόνως και εδώ είναι ενδεικτική η μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στον σχεδιασμό των εκκινητών για αντιδράσεις LAMP.

Δ043. Παρόμοια και σε αυτή την διαφάνεια και σε σύγκριση με κλασσική PCR. Είναι προφανής η ευκολία και συγχρόνως η ταυτότητα αποτελεσμάτων σε σχέση με την PCR. Στην άνω εικόνα φαίνεται η σύγκριση της ευαισθησίας των δύο μεθόδων, με εφαρμογή διαδοχικών αραιώσεων. Στην κάτω εικόνα σύγκριση των αποτελεσμάτων σε μια σειρά τυχαίων θετικών και αρνητικών δειγμάτων.

Δ044. Εκτός της LAMP έχουν αναπτυχθεί και μερικές ακόμη εναλλακτικές μέθοδοι πολλαπλασιασμού τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Το σύνολο των μεθόδων αναφέρεται και σαν NAAT (Nucleic Acid Amplification Tests). Η ανάλυση όλων αυτών είναι εκτός θέματος, αφού οι περισσότερες εφαρμόζονται περιορισμένα και οι δημοσιεύσεις που τις αναφέρουν είναι σχετικά λίγες.

Μία που έχει ευρύτερη εφαρμογή είναι η NASBA. Χρησιμοποιεί RNA που απομονώνεται από το δείγμα, το οποίο με την χρησιμοποίηση 3 ενζύμων, συνθέτει αντίγραφο του, μέσω της ενδιάμεσης σύνθεσης DNA.

Δ045. Μια παραλλαγή, αλλά αρκετά πιο σύνθετη, χρησιμοποιείται από ένα εμπορικό kit για την ανίχνευση της *Trichomonas vaginalis*. Το παράσιτο είναι σεξουαλικά μεταδιδόμενο και απαντάται και σε ασυμπτωματικά άτομα. Καθώς αποικοδομείται στο περιβάλλον με ταχύ ρυθμό, ακόμη και καθυστέρηση δεκαλέπτου στην παρατήρηση του δείγματος έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένη ευαισθησία στην μικροσκόπηση.

Το γενετικό υλικό του παρασίτου όμως παραμένει για μεγαλύτερο χρόνο στο δείγμα. Το εμπορικό kit είναι το μόνο που έχει EU CE και είναι εγκεκριμένο από τον FDA.

Δ046. Η πλατφόρμα LUMINEX είναι μία ιδιαίτερη εφαρμογή που είναι τεχνολογικά προηγμένη, απαιτεί ειδική συσκευή για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων και δίνει την δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών μικροοργανισμών σε διαρροϊκά κόπρανα, που θα μπορούσαν να ευθύνονται για την ασθένεια. Αναφέρεται γιατί είναι από τις ελάχιστες μοριακές μεθόδους που είναι εγκεκριμένες από την FDA.

Δ047. Η τεχνική μπορεί να πραγματοποιηθεί σε λίγες ώρες. Χρησιμοποιεί σφαιρίδια με διαφορετική χρωστική, που φέρουν διαφορετικούς ανιχνευτές DNA ώστε να μπορεί να ξεχωρίσει τον ανιχνευόμενο οργανισμό. Η εφαρμογή στηρίζεται σε μια προσέγγιση πολυπλεκτικής PCR, σε συνδυασμό με υβριδισμό των προϊόντων με κατάλληλους ακινητοποιημένους ανιχνευτές στην επιφάνεια των έγχρωμων σφαιριδίων.

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

Δ048. Ο αριθμός των παθογόνων παραγόντων που μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα είναι μεγάλος. Μεταξύ αυτών βέβαια και οι τρεις κυριότερες παρασιτικές αιτίες γαστρεντερίτιδας: *Cryptosporidium spp*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Δ049. Υπάρχουν ήδη τεχνικές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον και να ξεπεραστούν τα προβλήματα διάγνωσης που απαντώνται σήμερα. Σήμερα ο κλινικός ιατρός στηρίζεται στο ιστορικό του ασθενούς, τα συμπτώματα και τα επιδημιολογικά δεδομένα, ώστε να εστιάσει σε συγκεκριμένους παθογόνους παράγοντες που είναι πιθανόν να προκαλούν τα συμπτώματα. Αυτό σημαίνει ότι κάποια περιστατικά που οφείλονται σε σπάνιους παθογόνους παράγοντες πιθανόν να μην μπορούν να διαγνωστούν ή να διαγνωστούν αργά. Μια όχι και τόσο πρόσφατη εργασία αφορά στην ανάπτυξη μια μικροσυστοιχίας για την ανίχνευση **όλων των παθογόνων μικροβίων** σε ένα δείγμα και είναι ενδεικτική των δυνατοτήτων των μοριακών τεχνικών. Θα μπορούσε να είναι η εφαρμογή του μέλλοντος, αφού χωρίς την κλινική καθοδήγηση μπορεί να ανιχνεύσει οποιοδήποτε μικροβιακό παθογόνο παράγοντα σε δείγμα ασθενούς και να διαγνώσει την ασθένεια, ελλείψει οποιασδήποτε κλινικής πληροφορίας (σχεδόν). Βέβαια ακόμη τέτοιες εφαρμογές έχουν υψηλό κόστος ώστε να εφαρμοστούν καθολικά, όμως η συνεχής μείωση του κόστους που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια μπορεί να οδηγήσει στην ευρεία διάδοσή τους.

Δ050. Μια άλλη θεωρητική προσέγγιση θα μπορούσαν να είναι οι **τεχνικές ανάγνωσης του DNA** που μπορούν να αναγνώσουν πολλές εκατοντάδες εκατομμύρια, έως και δισεκατομμύρια βάσεις σε ένα δείγμα, παράλληλα με την ανάπτυξη εργαλείων βιοπληροφορικής, που επιτρέπουν την σύγκριση και ταυτοποίηση ακολουθιών σε μικρό χρόνο και με μικρό κόστος. Μπορείτε να φανταστείτε, την ανάγνωση όλου του DNA σε ένα δείγμα ασθενούς και την σύγκριση του με γνωστές ακολουθίες οργανισμών. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να ανιχνευτεί οποιοσδήποτε παθογόνος παράγοντας σε δείγμα ασθενούς και να τεθεί η διάγνωση και πάλι χωρίς την παραμικρή κλινική πληροφορία. Το κόστος και σε αυτές τις τεχνικές μειώνεται ραγδαία και ίσως να επιτρέψει μια τέτοιου είδους εφαρμογή στην διαγνωστική ρουτίνα σε κάποια χρόνια.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Δ051. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν προσφέρει σε σημαντικό βαθμό στην διερεύνηση της παρουσίας παρασίτων στο περιβάλλον. Αυτό οφείλεται γιατί σε περιβαλλοντικά δείγματα η συγκέντρωσή τους συνήθως είναι μικρή οπότε και απαιτείται μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση τους.

Η ανίχνευση των παρασίτων σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι σημαντική καθώς με την εξέταση δειγμάτων πόσιμου ύδατος ή τροφών μπορεί βρεθεί η **πηγή** κάποιας επιδημίας, να εκτιμηθεί ο κίνδυνος για την **δημόσια υγεία**, την υγεία των ζώων εκμετάλλευσης κλπ. Με την εξέταση **αστικών λυμάτων** από την άλλη μπορούμε να πάρουμε επιδημιολογικές πληροφορίες με ευκολότερο τρόπο σε σχέση με τις κλασικές επιδημιολογικές μελέτες στον πληθυσμό. Με την εξέταση δειγμάτων εισόδου και εξόδου από εγκαταστάσεις βιολογικών καθαρισμών μπορούμε να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητά, αλλά και τους πιθανούς κινδύνους από την διάθεση των προϊόντων του βιολογικού καθαρισμού στο περιβάλλον.

Δ052. Ποια μπορεί να είναι τα δείγματα περιβάλλοντος; Εκτός από τα καθιερωμένα: νερό, χώμα, λύματα, μπορούμε να περιλάβουμε, (αφού και με αυτά αλληλεπιδρούμε): τις τροφές, τους διαβιβαστές (όπως έντομα), καθώς και άλλα ζώα ήμερα ή άγρια.

Με εξαίρεση τα δείγματα ύδατος και χώματος, δεν υπάρχουν κάποιες **ιδιαίτερες διαδικασίες** που απαιτούνται για την ανίχνευση των παρασίτων στα υπόλοιπα δείγματα του περιβάλλοντος. Ένα στάδιο ομογενοποίησης (αν πρόκειται για ιστούς) και απομόνωση γενετικού υλικού με συνήθεις διαδικασίες, συνήθως αρκεί για την μοριακή ανίχνευση των παρασίτων.

Δ053. Σε σχέση με τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ισχύουν μερικώς όσα συζητήθηκαν στην διάγνωση και έχουν εφαρμογή σε μη κλινικά δείγματα. Έτσι η μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα, η αντικειμενικότητα, η ευκολία, ταχύτητα κλπ ισχύουν. Η **οπτική** όμως με την οποία αντιμετωπίζουμε τα δείγματα του περιβάλλοντος είναι διαφορετική. Σε ένα κλινικό δείγμα η παρουσία ενός παρασίτου είναι ενδεικτική (ή και αποδεικτική κατά κανόνα) της αιτίας της ασθένειας. Σαφώς βέβαια υπάρχουν περιπτώσεις που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, πχ όταν δεν ανταποκρίνεται ο ασθενής στην ειδική θεραπεία για το παράσιτο, αλλά τέτοιες περιπτώσεις αποτελούν την εξαίρεση και όχι τον κανόνα. Σε δείγματα του περιβάλλοντος όμως, η παρουσία ενός παρασίτου δεν είναι απαραίτητο ότι σηματοδοτεί κίνδυνο για την Δημόσια Υγεία. Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι στις μελέτες με περιβαλλοντικά δείγματα, οι περιοριστικοί παράγοντες είναι κυρίως η **συλλογή των δειγμάτων και η κατεργασία** πριν την ανίχνευση των παθογόνων.

Περαιτέρω υπάρχουν κάποιοι ζητήματα που αφορούν ειδικά τα δείγματα του περιβάλλοντος και καθιστούν δυσχερέστερη ή και πιο ιδιαίτερη την ανάλυσή τους.

Δ054. Αυτά είναι:

Η μικρή συγκέντρωση των παρασίτων κυρίως σε δείγματα νερού.

Η αναστολή που μπορεί να προκαλείται, λόγω της παρουσίας διάφορων χημικών ουσιών (εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, χουμικά οξέα κλπ).

Η παρουσία άγνωστων ή ανεπαρκώς χαρακτηρισμένων οργανισμών, που μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην ανίχνευση.

Η βιωσιμότητα των παρασίτων, που είναι μία σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση του κινδύνου στην υγεία ανθρώπων και ζώων.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ-ΥΔΑΤΑ-ΛΥΜΑΤΑ

Δ055. Η προέλευση παθογόνων παρασίτων σε υδάτινα δείγματα, είναι σε πολλές περιπτώσεις από την χέρσο, από όπου παρασύρονται από το τρεχούμενο νερό και καταλήγουν σε υδάτινες συλλογές, με συνέπεια την **μεγάλη αραιώση** τους. Παρόμοια σε δείγματα λυμάτων τα παράσιτα είναι σε μικρή συγκέντρωση, λόγω της **μεγάλης περιεκτικότητας** των λυμάτων σε νερό. Σε αυτά τα δείγματα η αναζήτηση αφορά κυρίως παράσιτα που η μετάδοσή τους γίνεται κοπροστοματικά, αλλά όχι μόνο.

Οι περισσότερες μελέτες αφορούν τα παράσιτα *Cryptosporidium spp.* και *Giardia intestinalis*. Μικρότερης σημασίας είναι η *Entamoeba histolytica*, το *Toxoplasma gondii*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli* και ακόμη μικρότερης η *Blastocystis hominis*, η *Dientamoeba fragilis* και τέλος η *Acanthamoeba spp.*. Από τους έλμινθες σημαντικοί είναι κυρίως οι *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, παρόλο που η μετάδοσή τους συνήθως δεν είναι υδατογενής.

Δ056. Το πρώτο βήμα για την ανίχνευση παρασίτων στο νερό είναι η συγκέντρωσή τους σε **μικρό όγκο**, ώστε να αυξηθεί η

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

πυκνότητα τους. Η περαιτέρω διαδικασία, μετά την συγκέντρωση, είναι κοινή με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης. Επίσημες **τυποποιημένες μέθοδοι** ανίχνευσης υπάρχουν για το *Cryptosporidium spp.* και την *Giardia intestinalis*. Ο λόγος για το ιδιαίτερο ενδιαφέρον για αυτά τα δύο παράσιτα, είναι οι επιδημικές εκρήξεις που μπορούν να προκαλέσουν και να επηρεάσουν πολλές χιλιάδες ανθρώπους (η μεγαλύτερη στο Milwaukee των Ηνωμένων Πολιτειών, 403.00 άτομα). Οι μέθοδοι είναι δοκιμασμένες και αξιόπιστες, (αν και σε κάποιες δημοσιεύσεις αμφισβητείται η απόδοση και επαναληψιμότητα τους), όμως είναι χρονοβόρες και ακριβές. Για τους λόγους αυτούς υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον στην ανάπτυξη πιο προσιτών και λιγότερο χρονοβόρων μεθόδων. Στις προσεγγίσεις που δοκιμάζονται οι μοριακές μέθοδοι έχουν έντονη συμμετοχή λόγω της αυξημένης ευαισθησίας.

Δ057. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την συγκέντρωση των παρασίτων, είναι το φιλτράρισμα, η φυγοκέντρωση και η κροκίδωση (flocculation).

Το **φιλτράρισμα**, που περιλαμβάνεται στις επίσημες μεθόδους, θεωρείται η πλέον αποδοτική τεχνική, αλλά απαιτεί ειδικά φίλτρα και μια ιδιαίτερη διαδικασία έκλουσης που είναι χρονοβόρα και ακριβή. Ο όγκος νερού που φιλτράρεται είναι συνήθως μεγαλύτερος των 10 λίτρων.

Η **φυγοκέντρωση** μπορεί να είναι αποδοτική αλλά ο όγκος του δείγματος είναι συνήθως μικρός για πρακτικούς λόγους.

Η **κροκίδωση** είναι μία μέθοδος εύκολη και φθηνή, αλλά η απόδοση της διαδικασίας μπορεί να ποικίλει. Πρακτικά περιλαμβάνει την προσθήκη κάποιων χημικών ουσιών που μετά από αρκετές ώρες προκαλούν την κατακρήμνιση των αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Μετά από προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, το ίζημα συλλέγεται και συγκεντρώνεται περαιτέρω με φυγοκέντρωση. Το τελικό ίζημα, που έχει πλέον μικρό όγκο χρησιμοποιείται για περαιτέρω καθαρισμό ή άμεσα για απομόνωση γενετικού υλικού.

Δ058. Η περαιτέρω διαδικασία μπορεί να περιλαμβάνει κάποιο στάδιο καθαρισμού ή εμπλουτισμού. Αν και δεν περιλαμβάνεται πάντοτε, είναι χρήσιμο καθώς μειώνεται ο αριθμός των περιεχόμενων σωματιδίων στο δείγμα, ώστε να πραγματοποιηθεί πιο απρόσκοπτα η διαδικασία της ανίχνευσης. Στα αρνητικά θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι μεγαλύτερες οι απώλειες υλικού.

Για τα *Cryptosporidium spp.* και *Giardia intestinalis*, η ενδεδειγμένη τεχνική (περιλαμβάνεται στα επίσημα πρωτόκολλα) είναι ο **ανοσομαγνητικός διαχωρισμός**. Το σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι (θεωρητικά τουλάχιστον), μετά την διαδικασία στο δείγμα παραμένουν μόνο τα παράσιτα που ενδιαφέρουν. Αυτό μειώνει την πιθανότητα ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων. Πέραν όμως αυτών των δύο παρασίτων για τα οποία υπάρχουν έτοιμα κιτ, η διαδικασία γίνεται αρκετά πιο πολύπλοκη και για τον λόγο αυτό δεν χρησιμοποιείται.

Διάφορες **τεχνικές φυγοκέντρωσης** που διαχωρίζουν τα παράσιτα βάσει της πυκνότητας, χρησιμοποιούνται συχνά και είναι αρκετά αποδοτικές. Το σημαντικό μειονέκτημα σε σχέση με τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό είναι ότι εκτός των οργανισμών που ενδιαφέρουν, στο δείγμα παραμένουν και άλλοι μικροοργανισμοί, που μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στην περαιτέρω διαδικασία ανίχνευσης. Από την άλλη αυτό είναι πλεονέκτημα αν σκοπός είναι η ανίχνευση και άλλων παρασιτικών ειδών.

Η συνέχεια της διαδικασίας περιλαμβάνει κατά τα γνωστά απομόνωση DNA (ή RNA) και PCR.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ-ΧΩΜΑΤΑ

Δ059. Η έρευνα για παράσιτα σε δείγματα εδάφους είναι σχετικά **περιορισμένη**. Τα παράσιτα που μπορεί να ανιχνευτούν στο χώμα, είναι όλα όσα μεταδίδονται κοπροστοματικά, καθώς με τα κόπρανα συνήθως μολύνεται πρώτα το έδαφος (εκτός των ανθρώπινων βέβαια, αν και εξαρτάται από την χώρα). Περαιτέρω πολλοί έλμινθες μολύνουν άμεσα μέσω του χώματος, όπως οι *Toxocara canis*, *Ascaris lumbricoides*.

Δ060. Το έδαφος σαν δείγμα για μοριακή ανίχνευση, έχει σαν κύριο πρόβλημα την παρουσία διαφόρων μορίων (με κύρια τα χουμικά οξέα), που **αναστέλλουν την λειτουργία** της DNA πολυμεράσης, με αποτέλεσμα τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Για τον λόγο αυτό υπάρχουν διαθέσιμα διάφορα ειδικά κιτ για την απομόνωση DNA από χώμα και συνίσταται η χρησιμοποίησή τους έναντι των κλασικών εργαστηριακών πρωτοκόλων, καθώς προσφέρουν ευκολία και μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχούς ανίχνευσης. Τονίζεται ότι η χρησιμοποίηση ειδικών μεθόδων δεν εγγυάται την απομάκρυνση των αναστολέων από το δείγμα.

Υπενθυμίζεται ότι σε τέτοιες περιπτώσεις θα ήταν πολύ χρήσιμη η μέθοδος LAMP αφού το πρόβλημα της αναστολής είναι μειωμένο.

Δ061. Μία διαφορετική προσέγγιση, που μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα χωρίς τα προβλήματα της άμεσης

Εισαγωγή στην Μοριακή Παρασιτολογία. ΑΤΕΙ Αθηνών. Μάιος 2017.
Σπανάκος Γρηγόρης, Βιολόγος PhD, ΚΕΕΛΠΝΟ

απομόνωσης DNA από το χρώμα, είναι η **απομόνωση των παρασίτων** από τα δείγματα πριν την εκχύλιση DNA. Μια ευχερής μέθοδος είναι αυτή της επίπλευσης, που χρησιμοποιείται στην μικροσκοπική εξέταση του χρώματος. Σαν παράδειγμα αναφέρεται η ανίχνευση *Toxoplasma gondii* σε δείγματα χρώματος στην Πολωνία. Για το *Toxoplasma gondii* έχουν αναφερθεί υδατογενείς αλλά και εδαφογενείς επιδημίες, δεικνύοντας και το χρώμα σαν πιθανή πηγή μόλυνσης. Στην έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Πολωνία τα θετικά δείγματα αποτελούσαν σημαντικό ποσοστό (18/101), περίπου 20%.

Αξίζει να αναφερθεί ότι με την επίπλευση πραγματοποιείται και μία συγκέντρωση των παρασίτων στο δείγμα, όμως αυξάνεται ο εργαστηριακός φόρτος λόγω της εφαρμογής της τεχνικής. Αυτό είναι ένας γενικός κανόνας και ισχύει σε πολλά είδη δειγμάτων, μεταξύ αυτών και σε κλινικά.

ΣΥΧΝΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΗΝ PCR

Δ062. Η αναστολή της αντίδρασης μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε δείγμα. Παρόλα αυτά το φαινόμενο είναι εξαιρετικά συχνό σε δείγματα περιβάλλοντος. Δεν υπάρχει κάποια λύση που να μπορεί να εφαρμοστεί με σίγουρη επιτυχία σε όλα τα δείγματα.

Δ063. Συνίσταται η προσθήκη Αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum albumin, **BSA**), στην αντίδραση της PCR ή κάποιων εμπορικών ουσιών ειδικών για τον έλεγχο της αναστολής (π.χ. GeneReleaser™, Bioventures Inc. and Maximator®, Connex GmbH), και έλεγχος ιδιαίτερα των αρνητικών δειγμάτων για αναστολή.

Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με την προσθήκη ενός μάρτυρα στην αντίδραση, που φυσιολογικά θα παράγει κάποιο προϊόν που δεν θα εμπλέκεται με την ανίχνευση του παρασίτου, ή με την πραγματοποίηση μιας επιπλέον αντίδρασης που εκτός του δείγματος θα έχει και ένα γνωστό θετικό υπόστρωμα.

Η LAMP πιθανόν να είναι πιο κατάλληλη μέθοδος, σύμφωνα με κάποιες δημοσιεύσεις. Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει αποδειχθεί αν ο αυξημένος αριθμός των θετικών με LAMP οφείλονται σε φαινόμενα αναστολής της PCR ή σε άλλη αιτία.

Δ064. Ένα πρόβλημα που μπορεί να εμφανιστεί συχνά κατά την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, είναι και τα **ψευδώς θετικά αποτελέσματα**. Ο λόγος είναι ότι οι περισσότερες αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των παρασίτων, έχουν σχεδιαστεί και ελεγχθεί σε κλινικά κυρίως δείγματα, στα οποία το εύρος των ειδών που περιέχονται είναι σχετικά περιορισμένο, και αυτό ισχύει ακόμη και στα δείγματα κοπράνων. Στην περίπτωση του ελέγχου σε περιβαλλοντικά δείγματα, η πιθανότητα ύπαρξης ενός οργανισμού που δεν είναι γνωστός και έχει ομοιότητες σε ακολουθίες του γενετικού υλικού με τον οργανισμό που αναζητείται, δεν είναι αμελητέα. Σαν παράδειγμα αναφέρεται η χρησιμοποίηση μεθόδου PCR για την ανίχνευση της *Blastocystis hominis* σε δείγματα νερού. Η μέθοδος ήταν θετική σε τρία δείγματα, όμως η ανάγνωση των προϊόντων έδειξε ότι ήταν άσχετοι μικροοργανισμοί.

Δ065. Για τον λόγο αυτό στα θετικά δείγματα ιδανικά θα πρέπει να γίνεται κάποιου είδους **επιβεβαίωση**, π.χ. με RFLP, SSCP, ή και sequencing.

Το πρόβλημα είναι σαφώς μειωμένο σε εφαρμογές qPCR στις οποίες χρησιμοποιείται κάποιος ανιχνευτής (probe), που εξασφαλίζει σε σημαντικό βαθμό την ειδικότητα του προϊόντος και πιθανόν και σε εφαρμογές LAMP.

Δ066. Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών στα περιβαλλοντικά δείγματα έχει ένα σημαντικό όφελος, καθώς μπορεί να **προσδιοριστεί το είδος** που για αρκετά παράσιτα είναι μία σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση της σημασίας στην Δημόσια Υγεία. Αναφέρεται σαν παράδειγμα η ανίχνευση *Cryptosporidium spp.* σε δείγματα επιφανειακού ύδατος. Σε πολλές περιπτώσεις η πηγή των παρασίτων είναι από ζώα του περιβάλλοντος με μικρή σημασία για την Δημόσια υγεία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον (όπως θα αναλυθεί πιο κάτω) έχουν κυρίως τα είδη *C. hominis* και *C. parvum*, μια και συνιστούν περισσότερο από 90% των περιστατικών σε ανθρώπους.

Δ067. Μία ενδιαφέρουσα έρευνα, που περιλαμβάνει αρκετά από τα σημεία που αναφέρθηκαν πιο πάνω, πραγματοποιήθηκε σε περιοχή της Πολωνίας, η οποία παρουσιάζει υψηλή ενδημικότητα σε περιστατικά εχينوκοκκίασης από *Echinococcus multilocularis*. Διερευνήθηκε σε δείγματα φρούτων, λαχανικών και μανιταριών, η παρουσία ωών εχينوκόκκου. Διαπιστώθηκε ότι περίπου στο 1/4 των δειγμάτων ανιχνεύτηκε DNA του παρασίτου, δεικνύοντας την πιθανή σημασία των τροφών για τον υψηλό επιπολασμό της νόσου στην περιοχή.

Σημειώτέον ότι τουλάχιστον 100 ωοκύστεις του παρασίτου, ήταν το κατώτερο όριο ανίχνευσης και αυτό παρόλο που χρησιμοποιήθηκε εμφωλιασμένη (nested) PCR, που έχει πολύ υψηλή ευαισθησία. Επιπλέον αφού επρόκειτο για δείγματα του περιβάλλοντος η παρουσία του παρασίτου επιβεβαιώθηκε με ανάγνωση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του προϊόντος

της PCR.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ-ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΖΩΝΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΩΝ

Δ068. Ένα ιδιαίτερης σημασίας θέμα που σχετίζεται με την ανίχνευση σε περιβαλλοντικά δείγματα, είναι η **βιωσιμότητα των ανιχνευομένων παρασίτων**, που είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς δείχνουν τον βαθμό κινδύνου για την Δημόσια Υγεία. Σαν κανόνας θα μπορούσαμε να πούμε ότι ένα θετικό αποτέλεσμα δεν δείχνει ένα απαραίτητα μολυσματικό περιβαλλοντικό δείγμα. Αυτό ισχύει για την κλασική μικροσκοπική ανίχνευση, αλλά και πολύ περισσότερο για την μοριακή. Στην μικροσκοπική ανίχνευση μπορούμε να παρατηρήσουμε την μορφολογική ακεραιότητα των παρασίτων που είναι τουλάχιστον ενδεικτική (αλλά όχι αποδεικτική) ότι το παράσιτο είναι ζωντανό. Εφόσον με τις μοριακές μεθόδους ανιχνεύουμε DNA, το οποίο μπορεί να παραμένει για αρκετό χρόνο μετά τον θάνατο του οργανισμού, δεν είναι βέβαιο ότι υπάρχει ζωντανό παράσιτο που είναι και μολυσματικό. (ισχύει και στην διάγνωση μετά από θεραπεία, όπως προαναφέρθηκε).

Για την επίλυση του ερωτήματος της μολυσματικότητας, χρησιμοποιούνται διάφορες έμμεσες ή άμεσες μέθοδοι, όπως χρησιμοποίηση χρωστικών που βάφουν το γενετικό υλικό, ή χρωστικών που δεν εισέρχονται σε ζωντανά κύτταρα ή ενοφθαλμισμός σε πειραματόζωα. Προβλήματα στις προσεγγίσεις αυτές, είναι ότι η πρώτη δεν είναι ακριβής, ενώ η τελευταία είναι χρονοβόρα και ακριβή.

Δ069. Η μοριακή προσέγγιση είναι η ανίχνευση mRNA του παρασίτου στο δείγμα. Το mRNA γενικότερα **αποικοδομείται ταχύτερα από το DNA**, οπότε η παρουσία του, είναι ενδεικτική της παρουσίας ζώντων οργανισμών. Προφανώς η μέθοδος περιλαμβάνει PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Όπως έδειξαν οι σχετικές δημοσιεύσεις, δεν αρκεί η ανίχνευση ενός οποιουδήποτε mRNA, αφού ορισμένα φαίνεται ότι παραμένουν σε υψηλές συγκεντρώσεις και μετά τον θάνατο του κυττάρου.

Τονίζεται ότι σε πολλές περιπτώσεις στο δείγμα περιλαμβάνονται κυστικές (ανθεκτικές) μορφές των παρασίτων, που παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες στον μεταβολισμό τους.

Δ070. Χρησιμοποιώντας σαν στόχο το mRNA της β-σωληνίνης (β-tubulin) και το αντίστοιχο γονίδιο, στο *Cryptosporidium* έδειξαν ότι το mRNA μπορεί να είναι **δείκτης της βιωσιμότητας**, αφού σε αντίθεση με το DNA, ανιχνεύεται λιγότερο με την πάροδο του χρόνου. Στις 20 ημέρες που το δείγμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, δεν ανιχνεύεται mRNA, ενώ το DNA είναι ακόμη ανιχνεύσιμο. Συγκριτικά παρατίθενται αποτελέσματα από παρόμοια σειρά πειραμάτων, που όμως ανιχνεύουν ριβοσωμικό RNA. Είναι σαφές ότι το rRNA δεν είναι κατάλληλος στόχος για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κρυπτοσποριδίων.

Δ071. Μία πολύ κοινή εφαρμογή για την ανίχνευση ζώντων παρασίτων, εφαρμόστηκε στην *Giardia intestinalis*. Σαν στόχος χρησιμοποιήθηκε το mRNA της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 70 (Heat Shock Protein 70, **HSP 70**). Η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται με την (περιορισμένη) αύξηση της θερμοκρασίας. Έτσι το δείγμα πρώτα θερμαίνεται ελαφρά για 15 λεπτά ώστε να επαχθεί η μεταγραφή του γονιδίου και ακολουθεί η διαδικασία ανίχνευσης του mRNA. Στα νεκρά παράσιτα προφανώς δεν θα επαχθεί η μεταγραφή του HSP 70 γονιδίου.

Δ072. Εν κατακλείδι, το όφελος από την εφαρμογή μοριακών τεχνικών ανίχνευσης παρασίτων σε δείγματα περιβάλλοντος είναι σημαντικό. Γενικότερα όμως θα πρέπει να περιλαμβάνονται μάρτυρες και τα αποτελέσματα να αξιολογούνται προσεκτικά διότι υπάρχουν αρκετά **προβλήματα στην ανάλυση** αυτών των δειγμάτων και δεν υπάρχουν καθιερωμένες και ευρέως αποδεκτές μέθοδοι (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων).

ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ ή ΓΟΝΟΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Δ073. Ανάλογα με το επίπεδο που εξετάζουμε, ή τα εργαλεία που διαθέτουμε, ο ορισμός ποικίλει. Έτσι στην wikipedia είναι "ο εντοπισμός διαφορών στην γενετική πληροφορία", ενώ στο.ncbi είναι "ο προσδιορισμός των αλληλομόρφων που φέρει ένας οργανισμός" [πχ. ένα άτομο έχει για την ομάδα αίματος γονότυπο ΙαΙβ]. Βέβαια σε επίπεδο του γενετικού υλικού τα διαφορετικά αλληλόμορφα είναι διαφορές στην γενετική πληροφορία. Θα μπορούσαμε έτσι να δώσουμε ένα γενικότερο ορισμό, ότι η γονοτύπηση είναι η ανίχνευση και ο **χαρακτηρισμός της γενετικής ποικιλομορφίας** μεταξύ οργανισμών.

Δ074. Για τον τρόπο που χρησιμοποιούμε την γενετική ποικιλομορφία, ένας απλοποιημένος κανόνας είναι: Οι οργανισμοί που έχουν μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους (παρουσιάζουν μικρότερη γενετική ποικιλομορφία), έχουν ένα πιο **πρόσφατο κοινό πρόγονο** σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Για την μέτρηση των ομοιοτήτων ή διαφορών της γενετικής ποικιλομορφίας χρησιμοποιούνται οι **γενετικοί δείκτες**, που είναι συγκεκριμένα τμήματα του γενετικού υλικού που αναλύονται. Σε αυτούς τους δείκτες μπορούμε να διακρίνουμε διαφορετικά χαρακτηριστικά στους μελετούμενους οργανισμούς που αντιστοιχούν σε διαφορετικά αλληλόμορφα. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να είναι μια αριθμητική τιμή ή μια ποιοτική διαφορά.

Δ075. Στην περίπτωση των ανθρώπων ή γενικότερα των ανώτερων οργανισμών, ο γονότυπος για κάποια χαρακτηριστικά τουλάχιστον (όπως χρώμα ματιών, σχήμα των λοβών των αυτιών κλπ), μπορεί να προσδιοριστεί φαινοτυπικά. Στα παράσιτα όμως δεν υπάρχουν (;) γνωστοί φαινοτυπικοί χαρακτήρες, οπότε ο γονότυπος αναλύεται χρησιμοποιώντας δεδομένα που προκύπτουν από μοριακές τεχνικές.

Κάποια παραδείγματα γενετικών δεικτών που χρησιμοποιούνται συχνά στα παράσιτα είναι:

Ακολουθία βάσεων, στην οποία τα διαφορετικά αλληλόμορφα ορίζονται από τις διαφορές στην ακολουθία των βάσεων μεταξύ ομολόγων τμημάτων του γενετικού υλικού. Οι διαφορές μεταξύ των αλληλομόρφων μπορούν απλοποιημένα να ποσοτικοποιηθούν με τον αριθμό των διαφορετικών βάσεων. Στην πράξη, αυτό επιτυγχάνεται με πολλαπλασιασμό του επιθυμητού τμήματος με PCR και ανάγνωση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας.

Με σύγκριση των ηλεκτροφορητικών προτύπων που προκύπτουν μετά από πολλαπλασιασμό με PCR ενός τμήματος DNA και πέψη με περιοριστική (-ές) ενδονουκλεάση (**PCR-RFLP**). Ουσιαστικά με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται μια αδρή σύγκριση μεταξύ των νουκλεοτιδικών ακολουθιών.

Μικροδορυφορικές ακολουθίες, πρόκειται για τμήματα γενετικού υλικού στα οποία επαναλαμβάνεται πολλές φορές σειριακά μία ολιγονουκλεοτιδική ακολουθία. Με PCR πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα DNA που περιέχει την μικροδορυφορική ακολουθία και μετράται το μέγεθος των προϊόντων της αντίδρασης. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα σε αυτήν την περίπτωση εκφράζονται με το διαφορετικό μήκος.