



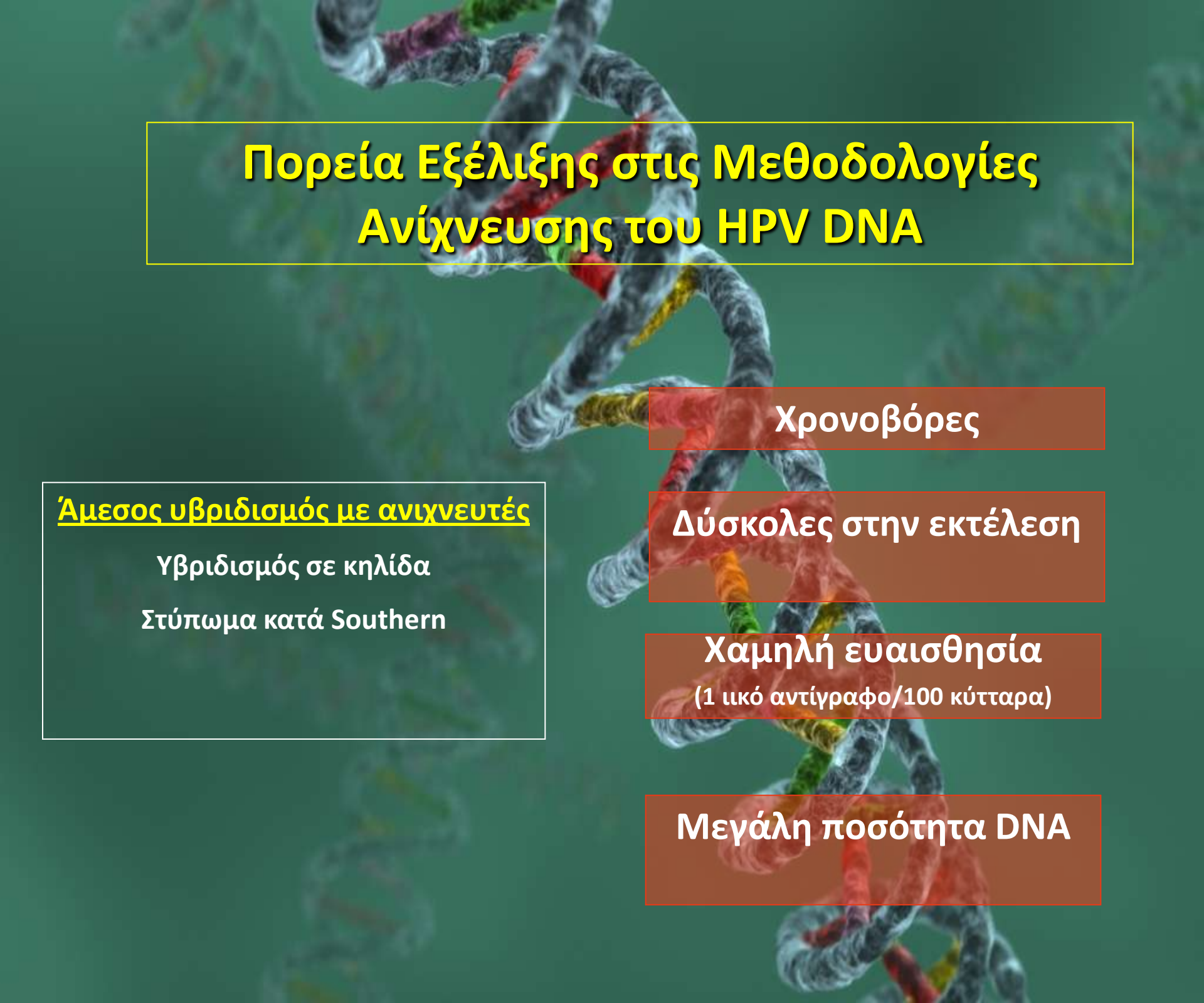
Η Εφαρμογή της Τεχνικής PCR στην Ανίχνευση της HPV Λοίμωξης

Αθανάσιος Κοτσίνας, Λέκτορας
Κατερίνα Τσιμαράτου, Μοριακή Βιολόγος, PhD
Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης
Εργ. Ιστολογίας και Εμβρυολογίας
ΕΚΠΑ

Πλεονεκτήματα της PCR στην Ανίχνευση των Ιών HPV

- Επίμονες μολύνσεις με ογκογόνους τύπους HPV, συνήθως προηγούνται των υψηλού βαθμού ενδοεπιθηλιακών βλαβών (HSIL) ή κακοηθειών → HPV DNA δείκτης για ήδη υπάρχουσες ή υπό ανάπτυξη «εν δυνάμει» νεοπλασματικές αλλοιώσεις
- Ο πιο ακριβής τρόπος για να καθοριστεί η αγωγή σε περιπτώσεις που το ΠΑΠ-τέστ οριακά υποδεικνύει ASCUS (atypical squamous cells of undetermined significance) ή κυτταρικές αλλοιώσεις συμβατές με HPV λοίμωξη (κοιλοκυττάρωση, ατυπία)
- 10% περιπτώσεων εμφανίζουν HPV μόλυνση σε αποδρομή, ύστερα απο αγωγή (κρυοχειρουργική, laser, LEEP). Η παρουσία HPV DNA έχει υψηλότερη ευαισθησία έναντι του follow-up ΠΑΠ-τεστ.
- Τυποποίηση με PCR → Εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια [Cervarix (HPV-16, -18), Gardasil (HPV-16, -18, -6/11)].

Συνδιασμός ΠΑΠ-τέστ με HPV-PCR



Πορεία Εξέλιξης στις Μεθοδολογίες Ανίχνευσης του HPV DNA

Άμεσος υβριδισμός με ανιχνευτές

Υβριδισμός σε κηλίδα
Στύπωμα κατά Southern

Χρονοβόρες

Δύσκολες στην εκτέλεση

Χαμηλή ευαισθησία

(1 ιικό αντίγραφο/100 κύτταρα)

Μεγάλη ποσότητα DNA

Πορεία Εξέλιξης στις Μεθοδολογίες Ανίχνευσης του HPV DNA

Εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία

(1 μικρό αντίγραφο/ 10^3 κύτταρα, παράγει 1 τρις αντίγραφα από κάθε δίκλωνο μόριο DNA σε 30 κύκλους)

Ενίσχυση του γονιδίου στόχου

**PCR (Polymerase Chain
Reaction)**

Hybrid Capture by Digene

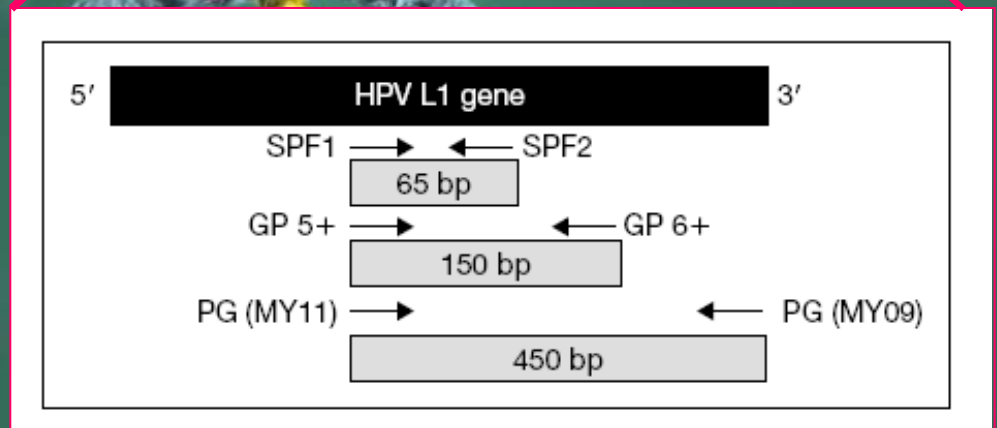
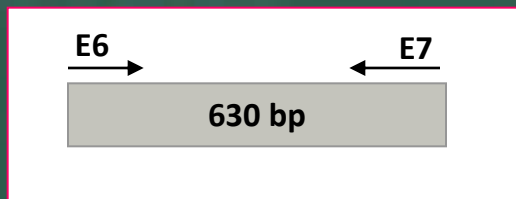
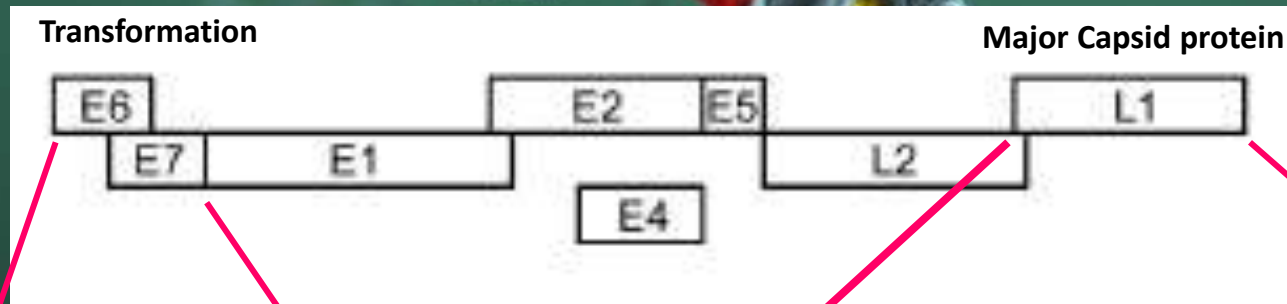
Απόλυτη ειδικότητα

Ποσοτικοποίηση

(υψηλό ιικό φορτίο έχει σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του τραχήλου της μήτρας)

Τυποποίηση (εμβόλιο, διάκριση μεταξύ υψηλού/χαμηλού κινδύνου και ανάδειξη δυνητικά ογκογόνων τύπων, συνύπαρξη πολλαπλών τύπων → αυξημένο κίνδυνο CIN1)

Τεχνικές PCR



Συντηρημένες-συναινετικές αλληλουχίες (consensus primers), πολυμορφικές περιοχές

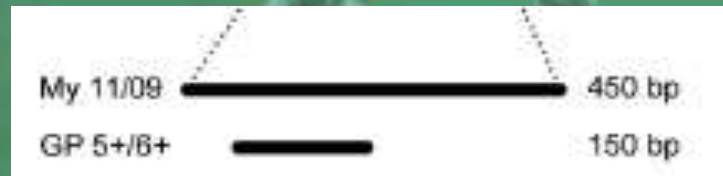
Η Ευαισθησία και η Ειδικότητα των PCR Τεχνικών (1):

- **Ανατομική θέση** και τον **τύπο** του κλινικού δείγματος
- Μέθοδος **απομόνωσης** DNA
- **Μεταφορά** και **φύλαξη** δείγματος
- **Γονίδιο-στόχο** και **μέγεθος** του PCR προϊόντος
- **Ζευγάρια υποκινητών**
 - Διαφορετική ευαισθησία ανάμεσα στους διαφόρους τύπους
 - Συμμολύνσεις από πολλούς τύπους, (11/120, 9.2%), mod. MY09/11 (81.8%)
- **Συνθήκες** της PCR αντίδρασης
(συγκέντρωση και τύπος πολυμεράσης, χρονική διάρκεια επιμέρους σταδίων)
- Αριθμός αρχικών **αντιγράφων** (1-10αντίγραφα/αντίδραση)

Η Ευαισθησία και η Ειδικότητα των PCR Τεχνικών (2):

- **Απλή αντίδραση PCR**

- **Ενίσχυση του σήματος** → Ενισχυμένη PCR (nested PCR)



zur Hausen et al. 1992

- **Real-time PCR** . Taq-man LNA probes, ποσοτικοποιεί, τυποποιεί περιορισμένο αριθμό ιών HPV



- **Εμπορικά προτυπωμένες μεθοδολογίες** . Roche Diagnostics, ανιχνεύει ~ 70 από τους >100 τύπους

Αναστολή PCR αντίδρασης από εξωτερικούς παράγοντες (αποικοδόμηση του DNA π.χ. κατά την μονιμοποίηση των ιστών) συν-πολλαπλασιάζουμε εσωτερικούς μάρτυρες π.χ. β-σφαιρίνη (1 αντίγραφο/κύτταρο)

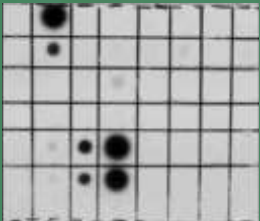
Τυποποίηση

- Ανάλυση ενισχυμένης με PCR αλληλουχίας-**sequencing** (χαρακτηρισμός νέων τύπων, εύρεση νέων μεταλλάξεων σε ήδη γνωστούς τύπους, **χρονοβόρο**)

- **Restriction-Fragment-Length-Polymorphism** (Περιοριστικά ένζυμα *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fl, και *Pst*I) **Ανεπαρκής τεχνική σε συμμολύνσεις**

- Υβριδισμός με **ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές** ειδικούς για κάθε τύπο:

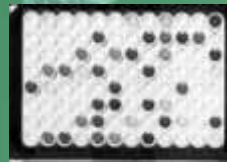
Dot-blotting



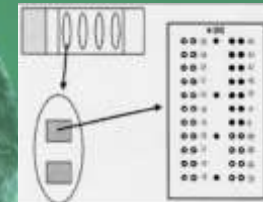
Στύπωμα κατά
Southern



ELISA



Microchip
format assay



- Πολλαπλή ενισχυμένη (multiplex-nested PCR) → ταυτοποίηση του συνόλου των ιικών τύπων και ανάδειξη νέων!

- Συστήματα μικροσυστοιχιών (**microarrays**)



Ευχαριστώ