

**Συστοιχίες και πολυπληκτική αλυσιδωτή
αντίδραση πολυμεράσης
Επαναστατικές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας
με εφαρμογές στη βιοϊατρική πράξη**

Από την πληθώρα μεθόδων Μοριακής Βιολογίας, η πολυπληκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και οι μικροσυστοιχίες παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον. Και οι δύο αυτές μέθοδοι αποτελούν, σε διαφορετικούς βαθμούς, θεαματικές βελτιώσεις υπάρχουσών τεχνικών, επιφέροντας σε αυτές εξελικτική πρόοδο. Και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκε, κατά τάξεις μεγέθους, πολλαπλασιασμός της αποτελεσματικότητας των αρχικών μεθόδων, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη μιας σειράς συναφών πεδίων για ανάλυση, επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Ειδικά οι συστοιχίες επέτρεψαν τη δημιουργία νέων υποκλάδων στις Βιοεπιστήμες, καθώς προσφέρουν στο μέγιστο βαθμό την ικανότητα που έγινε γνωστή ως «παράλληλη επεξεργασία υψηλού ρυθμού διεκπεραίωσης». Με τον τρόπο αυτόν εμφανίστηκαν η Γονιδιωματική, η Φαρμακογονιδιωματική, η Πρωτεϊνωματική, η Μεταβολισμική, η Τοξικογενετική/Τοξικογονιδιωματική, η Γενετική Οικοτοξικολογία και η Βιοπληροφορική. Παρά τις τεράστιες απαιτήσεις επαλήθευσης, σχεδιασμού, υποδομής, τεχνογνωσίας και εξειδικευμένης ανάπτυξης, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, υποστηριζόμενος από σύγχρονες τεχνικές δημιουργίας, ανίχνευσης, αξιολόγησης και ανάλυσης σήματος, επιτρέπει δυσθεώρητα επίπεδα αναλυτικής εξέτασης μικρού όγκου δειγμάτων, με εξαιρετικές εφαρμογές στην εργαστηριακή διάγνωση. Όμως, οι εφαρμογές στο χώρο της διάγνωσης φέρουν έντονα τα σημάδια άηλων κλάδων, όπως της Γενετικής, που είχαν στραφεί νωρίτερα σε αυτές τις τεχνικές και απ' όπου μετασκευάστηκαν για να χρησιμοποιηθούν στον έλεγχο κλινικών δειγμάτων. Παρόλα αυτά και παρά τα προβλήματα που προέρχονται από τις μη βελτιστοποιημένες συστοιχίες (σχεδιασμένες για την πολυανίχνευση κατηγοριών βιομακρομορίων μικρού αριθμού οργανισμών), είναι δεδομένο ότι η νέα, συζευγμένη μεθοδολογία δυναμικά μπορεί να προσφέρει την εξαιρετική διακριτική ικανότητα που απαιτείται για την ικνηλάτηση όλο και περισσότερων παθογόνων παραγόντων (θιομογόνων ή όχι). Μεσοπρόθεσμα, φαίνεται πως η νέα μεθοδολογία αποτελεί μονόδρομο στην αυξανόμενη πολυπλοκότητα των διαγνωστικών προκλήσεων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Από τα μέσα της δεκαετίας του '90 έχει δρομολογηθεί μια μεθοδολογική επανάσταση στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας, της οποίας τα αποτελέσματα μόλις πρόσφατα αρχίζουν να γίνονται αισθητά. Μερικές από τις νέες μεθοδολογίες υπόσχονται εξετάσεις και αναλύσεις κλίμακας, ταχύτητας, ενδελέχειας και ειδικότητας, που προ ολίγων ετών ήταν δύσκολο να συλλάβει κά-

ποιος. Η υποσχόμενη αξιοποίησή τους στην ιατρική πράξη εστιάζεται μεν στη διαγνωστική αλλά δεν εξαντλείται εκεί, αφού οι εφαρμογές είναι όντως πολυδιάστατες.

Οι τεχνικές αυτής της νέας εποχής είναι πάρα πολλές και αυξάνονται, στην κυριολεξία, καθημερινά. Καθώς η εφεύρεση, καταξίωση και νομική κατοχύρωση μιας αποτελεσματικής μεθοδολογίας συνεπάγεται τεράστια εμπορικά οφέλη, είναι αλήθεια ότι, αντί της απλής πληθώρας, παρατηρείται ένας πληθωρισμός νεοεμφανιζόμενων,

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2003, 20(4):425-445
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2003, 20(4):425-445

**A. Βελλεγράκη,¹
M.E. Καμπούρης²**

¹Κέντρο Αναφοράς Μυκητιάσεων (ΚΕΕΛ),
Εργαστήριο Μικροβιολογίας,
Ιατρικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Αθηνών
²The Cancer Institute of N. Jersey,
Department of Molecular Genetics,
Microbiology and Immunology,
Robert Wood Johnson Medical School,
New Brunswick, NJ, USA

**Arrays and multiplex PCR:
Revolutionary molecular biological
methods with applications
in biomedical practice**

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Διαγνωστική μεθοδολογία
Πολυπλεκτική PCR
Συστοιχίες

*Υποβλήθηκε 26.11.2002
Εγκρίθηκε 5.12.2002*

συχνά δε ιδιαίτερα περίπλοκων και μαθηματικοποιημένων τεχνικών. Πολλές από αυτές είναι σαφώς ανάξιος λόγου, ως σύλληψη, ως εφαρμογή ή ως ευρύτητα δυνατοτήτων. Αυτό ακριβώς το φαινόμενο έχει προκαλέσει μια απολύτως δικαιολογημένη δυσπιστία στους τελικούς αποδέκτες τέτοιων επιρροών, δηλαδή τη Βιομηχανία και (κυρίως) τους οργανισμούς προσφοράς υπηρεσιών υγείας. Πρακτικά, έχει ανακύψει, διεθνώς, μια νέα διαίρεση στις Βιοϊατρικές Επιστήμες (φαινόμενο με προηγούμενο στη Χημεία) μεταξύ μεθοδολόγων/τεχνολόγων και χρηστών αυτών των μεθόδων και τεχνικών για βασική, εφαρμοσμένη και βιομηχανική έρευνα.

Αν και σαφώς ελάχιστες από τις καθημερινά δημοσιευόμενες μεθοδολογίες θα επιβιώσουν, για μια πληθώρα λόγων, ήδη μερικές έχουν πλέον ωριμάσει επαρκώς και σηματοδοτούν την προαναφερθείσα νέα εποχή. Οι δύο βασικότερες (αν και οπωσδήποτε όχι μόνες) είναι η τεχνολογία συστοιχιών (array technology) και η πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης/Π-ΑΑΠ (multiplex PCR).

Οι μέθοδοι αυτές είναι απόλυτα διαφορετικές μεταξύ τους, τόσο στην πρωτοτυπία και στους στόχους τους, όσο και στην εξελικτική οδό προέλευσης και τις απαιτήσεις για επιτυχή χρήση τους. Κατόπιν αυτού, είναι σαφές ότι ασφαλώς συνελήφθησαν σε διαφορετικούς χρόνους για διαφορετικούς λόγους και προκειμένου η μια να δρα ανεξαρτήτως της άλλης και (κατά προτίμηση) με εφικτή τη σύζευξή τους με όσο το δυνατό περισσότερες υπάρχουσες ή αναπτυσσόμενες τεχνικές και μεθόδους. Παρόλα αυτά, η μέγιστη αποτελεσματικότητά τους προέρχεται από τη συνδυασμένη χρήση τους, τα αποτελέσματα της οποίας μπορούν να χαρακτηριστούν επαναστατικά, σε αντίθεση με τη μεμονωμένη χρήση, που απλώς επέφερε θεαματικές βελτιώσεις.

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η σημασία τους συνδυαστικά, κρίνεται απαραίτητη μια τελείως περιληπτική εξέταση των αρχών, με βάση τις οποίες λειτουργούν.

2. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ

2.1. Στοιχειώδης περιγραφή της μεθοδολογίας συστοιχιών

Η τεχνολογία συστοιχιών ουσιαστικά είναι νέα εξέλιξη. Κάποιος θα μπορούσε ίσως να ικνυλατήσει μια προγονική της μορφή στις μεθόδους πολλαπλών μεμονωμένων ελέγχων (kits), όπως η ανοσοενzymική μέθοδος (ELISA), η ραδιοανοσολογική (RIA) κ.λπ., αφού και εκεί υπάρχει η ιδέα ενός προτυποποιημένου και προπαρασκευασμένου υποστρώματος σε πολλαπλή διεύθυνση,

που επιτρέπει εφάπαξ μεγάλο αριθμό ελέγχων. Επίσης, κοινό σημείο αποτελούν μερικοί από τους τρόπους ανάγνωσης των αποτελεσμάτων των συστοιχιών. Όμως, στην πράξη πρόκειται για ένα άλμα –και όχι βήμα– πέραν των προαναφερθεισών τεχνικών. Συγκρινόμενη με τις ELISA και RIA, η τεχνολογία των συστοιχιών βασίζεται σε ένα πολύ ευρύτερο φάσμα βιολογικών και βιοχημικών φαινομένων και αντιδράσεων, στο μοριακό κατά βάση επίπεδο. Έτσι, στην αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος τώρα προστίθεται η αλληλεπίδραση υποδοχέα-υποκαταστάτη, ενζύμου-υποστρώματος και συμπληρωματικών βάσεων νουκλεϊνικών οξέων, ενώ άλλες αλληλεπιδράσεις (π.χ. ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτοταγών ή ανώτερων δομών νουκλεϊνικών οξέων με πρωτεΐνες ή λοιπούς παράγοντες και πρωτεϊνών με μη πρωτεϊνικά μόρια και μακρομόρια) αναμένονται λίαν συντόμως. Αξίζει να τονιστεί ότι στην περίπτωση συστοιχιών δεσοξυουλιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιείται ευρύτητα ο όρος “DNA chips”.¹ Αν και η ιδέα δεν φαίνεται τόσο επαναστατική, τουλάχιστον στη βιολογική της διάσταση, ο τρόπος της εφαρμογής της αναμφίβολα είναι. Σε αυτό συντελεί μια τεράστια σειρά από μη βιολογικές προόδους, που ενσωματώνεται και καθιστά υλοποιήσιμη την εν λόγω μεθοδολογία. Πρόοδοι στην ηλεκτρονική, τη μηχανική (ιδίως τη μικροτεχνολογία) και την οργανική χημεία επιτρέπουν την ποιοτική υλοποίηση των θεωρητικώς παρατηρουμένων αλληλεπιδράσεων στην κατασκευή των συστοιχιών, ενώ η ποσοτική παράμετρος είναι εξίσου σημαντική: Πρόοδοι στους προαναφερθέντες τομείς και, επιπλέον, σε τεχνολογίες ανίχνευσης/ανάγνωσης/εμφάνισης αποτελεσμάτων (χρωμογόνα, LASER, κυτταρομετρία ροής κ.λπ.) επιτρέπουν τη ρεαλιστική χρήση μικροαναλύσεων. Σήμερα, επί μιας αντικειμενοφόρου πλάκας μπορούν να διεξαχθούν μερικές χιλιάδες αντιδράσεις δοκιμίου* για μια ποικιλία αναλύσεων και προσδιορισμών, σε σχέση με τις 96 μιας συνηθισμένης πλάκας, που χρησιμοποιείται για ELISA ή για μερικές νεότερες ΑΑΠ. Οι εφαρμογές των τελευταίων περιλαμβάνουν την ανίχνευση ιών σε κυτταρολογικά δείγματα,² βακτηρίων³ ή αλλεργιογόνων παραγόντων σε τρόφιμα.⁴ Η απόδοση διαφέρει, λοιπόν, κατά τάξεις μεγέθους και σαφώς σε αυτόν τον τομέα το όριο των νέων μεθόδων δεν έχει εξαντληθεί. Από την άλλη μεριά, ο περιορισμός του όγκου, του βάρους και των διαστάσεων αποτελούν μια λιγότερο διαφημισμένη αλλά εξίσου σημαντική διάσταση. Τα προβλήματα αγοράς, μεταφοράς και αποθήκευσης των απαιτούμενων υλικών μειώνονται εκθετικά, καθώς πολύ μικρότερες ποσότητες αντιδραστηρίων απαι-

* Το αντικείμενο, υλικό (φρεάτιο πλάκας μικροπιλοποίησης) ή μη υλικό (μέθοδος), διά του οποίου πραγματοποιείται μια εξέταση

τούνται ανά εξέταση και σαφώς μικρότερων διαστάσεων υάλινες ή πλαστικές επιφάνειες διεξαγωγής των αναλύσεων. Τα ανωτέρω, φυσικά, διευκολύνουν πολύ την απόκτηση υλικού και μηχανημάτων προς επεξεργασία. Ενώ μια πλάκα μικροπιλοποίησης ELISA φυγοκεντρείται πολύ δύσκολα, καθαρά λόγω διαστάσεων, για τη φυγοκέντρηση αντικειμενοφόρων (και δη σε σημαντικούς αριθμούς) εναλλακτικές κεφαλές είναι ήδη σε χρήση για λογικού μεγέθους επιτραπέζιες φυγοκέντρους. Με τον τρόπο αυτόν επιτρέπεται πολύ μεγαλύτερη μεθοδολογική ευκαμψία στις τεχνικές που χρησιμοποιούν αντικειμενοφόρους, αφού μπορούν να φυγοκεντρηθούν σε ειδικά προσαρμοσμένες φυγοκέντρους και γενικά είναι δεκτικές μιας σειράς επεξεργασιών, που κυμαίνονται από δυσχερείς έως αδύνατες για ογκωδέστερα υπόβαθρα* δοκιμίων.

Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι το πολύ μικρότερο μέγεθος δεν είναι το μόνο ούτε το πλέον σημαντικό πλεονέκτημα, από τεχνικής και επιστημονικής πλευράς. Το μικρό μέγεθος, αργότερα ή νωρίτερα, λόγω των τεράστιων πλεονεκτημάτων κόστους, θα επικρατούσε για αναλύσεις πολλαπλής επεξεργασίας, όπως ακριβώς εμφανίστηκαν οι ενιαίες πλάκες μικροπιλοποίησης πολλαπλών δειγμάτων για ELISA και οι σύγχρονες RIA προς αντικατάσταση προηγούμενων μεθοδολογιών (όπως οι παλαιότερες RIA, που χρησιμοποιούσαν ατομικά φιαλίδια ή μικροσωληνάρια).

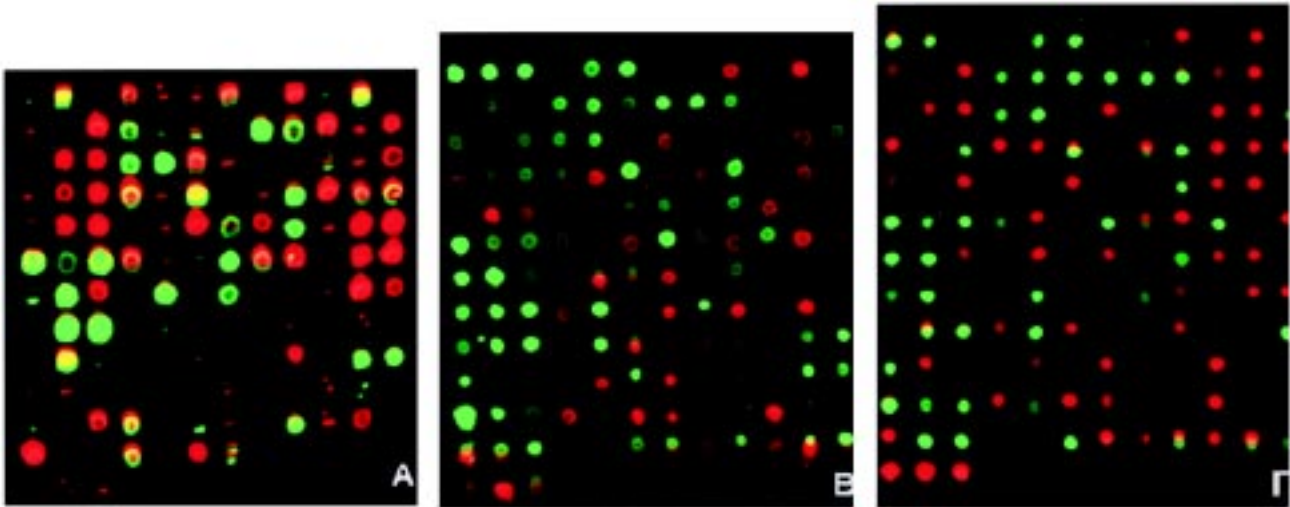
Το βασικό στοιχείο της επανάστασης των συστοιχιών είναι η διαφορετικότητα στην ταυτότητα των προσδεδεμένων μακρομορίων επί μίας μόνο επιφάνειας, εξ ου και το όνομα. Σε κάθε υπομονάδα της επιφάνειας διεξαγωγής εξέτασης, είτε αυτή είναι δισδιάστατη επιφάνεια (στην περίπτωση των αντικειμενοφόρων και των μεμβρανών) είτε φρεάτιο (σε πλάκα πολυαντιδράσεων), υπάρχει προσδεδεμένος διαφορετικός, πλήρως ομοιογενής, πληθυσμός μορίων-υποδοχέων. Η πρωτοφανής πυκνότητα αυτής της διαφορετικότητας καθιστά εφικτή τη λεγόμενη «παράλληλη επεξεργασία», όπου επί μίας επιφάνειας, στην οποία διεξάγεται η δοκιμή, προσδιορίζεται μια μεγάλη σειρά ιδιοτήτων ενός δείγματος, με αποτέλεσμα τη λεπτομερέστατη ανάλυσή του με τεράστια οικονομία χρόνου. Παλαιότερα, τέτοιες «παράλληλες» τεχνολογίες –σε πρωτόγονη καταφανώς μορφή μερικών δεκάδων αντιδράσεων ανά επιφάνεια διεξαγωγής εξετάσεων– χρησιμο-

ποιούνταν βασικά για προσδιορισμό μεταβολικής ταυτότητας μικροοργανισμών στα πλαίσια ταξινομικής μελέτης ή ακριβούς ταυτοποίησης απομονωθέντων παθογόνων μικροοργανισμών και για τους ελέγχους ευαισθησίας αυτών σε φαρμακευτικά σκευάσματα. Παράδειγμα τέτοιου ελέγχου είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας των φαρμάκων με τη μέθοδο των μικροαραιώσεων.

Βελτιωμένη εφαρμογή των παλαιότερων πρακτικών παράλληλης επεξεργασίας αποτελούν σήμερα τα αυτοματοποιημένα συστήματα ταυτοποίησης προκαρυωτικών μικροοργανισμών, ζυμομυκήτων και νηματοειδών μυκήτων (Biolog), τα οποία σε μια πλάκα μικροπιλοποίησης ελέγχουν 96 φαινοτυπικές ιδιότητες αυτών και αποκαλούνται φαινοτυπικές συστοιχίες. Θα ήταν παράλειψη, βέβαια, να μην αναφερθεί ότι φαινοτυπικές συστοιχίες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως, τόσο για την ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση προκαρυωτικών μικροοργανισμών, όσο και για τις δοκιμασίες ελέγχου λειτουργικότητας γονιδίων. Αυτού του τύπου οι συστοιχίες ονομάζονται φαινοτυπικές (μικρο)συστοιχίες (βλ. παράγραφο 2.3) και σήμερα μπορούν να αναγνωρίζουν μεταλλαγές στο παθογόνο Gram-αρνητικό βακτήριο *Escherichia coli*, που συνδέονται με αντοχή στα αντιβιοτικά.⁵ Συγκεκριμένα, σε 24 ώρες, 700 διαφορετικοί φαινοτυπικοί χαρακτήρες ανά στέλεχος *E. coli* μπορούν να ελεγχθούν ταυτόχρονα για μεταλλάξεις ενοφθαλμίζοντας μόλις 10 μL εναιωρήματος του μικροοργανισμού σε καθένα από τα φρεάτια, συνολικά επτά πλακών μικροπιλοποίησης.

Εξαιρετικό προσόν της δραματικής σμίκρυνσης (χαρακτηριστικό της νέας τεχνολογίας) είναι το γεγονός ότι το μέγεθος του απαιτούμενου προς εξέταση δείγματος για διαφορετικές δοκιμασίες παραμένει μικρό (εικ. 1). Γενικά, δεν ξεπερνά το μέγεθος του δείγματος που απαιτείται για μια μοναδική δοκιμασία στο παρελθόν. Αυτό φυσικά σημαίνει ότι, στα παρασκήνια των συστοιχιών, μια άλλη τεχνολογία αναπτύχθηκε θεαματικά και κατέστησε δυνατή την ύπαρξή τους: η τεχνολογία βιοχημικής παραγωγής/ενίσχυσης σήματος, που πλέον επιδεικνύει τεράστια αποτελεσματικότητα, ευαισθησία και χαμηλότατο ποσοστό αυτοπαρεμβολής/αλληλεπίδρασης. Συνεπώς, εντός ενιαίου και περιορισμένου όγκου δείγματος εκατοντάδες ή χιλιάδες αντιδράσεις παραγωγής σήματος διεξάγονται αξιόπιστα, ταυτόχρονα, ταχύτατα και με εκπληκτική ειδικότητα. Γι' αυτόν το λόγο, η ανάγνωση των αποτελεσμάτων απαιτεί αντίστοιχα λογισμικά και εξειδίκευση των χρηστών.⁶ Η εισαγωγή περίπλοκων λογισμικών πακέτων για την επεξεργασία μαθημα-

* Το υλικό (η αντικειμενοφόρος ή η μεμβράνη επί της οποίας θα τυπωθούν οι συστοιχίες ή η πλάκα μικροπιλοποίησης, στα φρεάτια της οποίας είναι ενσωματωμένο το μονόκλωνο αντίσωμα) επί του οποίου διεξάγονται τα δοκίμια. Δηλαδή, ο υλικός φορέας των δοκιμίων



Εικόνα 1. Παράδειγμα μικροσυστοιχίας διαστάσεων 12×13, που περιλαμβάνει 148 ολιγοδεοξυριβονουκλεοτιδικούς τόπους-κλίδεις. Οι αποστάσεις μεταξύ των τόπων είναι 250 μm. Κάθε τόπος διεκρινίζει ένα διμορφισμό σημειακής μετάλλαξης αντικατάστασης εντός του αυτού ανθρώπινου δείγματος. Η διεκρίνιση γίνεται μετά από ενίσχυση των 148 τόπων του δείγματος (10 ng DNA) με πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση (Π-ΑΑΠ) και σήμανση του ειδικού ανά τόπο ικνηθέτη με τη μέθοδο της «επιμήκυνσης κατά ένα νουκλεοτίδιο» (single nucleotide extension). Τα χρησιμοποιούμενα σε αυτή τη μέθοδο νουκλεοτίδια δεν επιτρέπουν περαιτέρω επιμήκυνση (διδεοξυνουκλεοτίδια) και είναι σημασμένα με κυανίνη-5 ή κυανίνη-3. Η επιλογή των διμορφισμών είναι τέτοια, ώστε τα δύο πιθανά νουκλεοτίδια, που αντιστοιχούν στα δύο αλληλία του κάθε τόπου, να διαφέρουν κατά τη χρωστική. Τα αμιγή χρώματα δείχνουν ομοζυγωτία για το συγκεκριμένο τόπο στο συγκεκριμένο άτομο, ενώ οι δίχρωμοι τόποι τεκμηριώνουν ετεροζυγωτία. (α) Είναι εμφανή τα πολυποίκιλα προβλήματα που ανακύπτουν στην πράξη από τις μικροσυστοιχίες: ανομοιογενής εντύπωση, μεγάλες διαφορές στην παραγωγή σήματος, ανομοιογενής διασπορά του εδραίου ολιγονουκλεοτιδίου εντός της εντυπωμένης κηλίδας. (β) Συστοιχία βελτιωμένης μεθοδολογίας εντύπωσης, όπου το μέγεθος, η ατομικότητα και το σχήμα των κηλίδων είναι σαφώς περισσότερο ομοιόμορφα. Οι διαφορές στην ένταση σήματος συνεχίζουν υφιστάμενες, καθώς εξαρτώνται από άλλους παράγοντες (Π-ΑΑΠ, σήμανση ικνηθέτη, λεπτομέρειες υβριδισμού) άσχετους με τη μεθοδολογία εντύπωσης. (γ) Συστοιχία εντυπωμένη υπό βέλτιστες συνθήκες. Ο υβριδισμός επιτεύχθηκε με δίωρο πρωτόκολλο εντός του αυτόματου συστήματος επεξεργασίας εντυπωμένων συστοιχιών επί αντικειμενοφόρων Lucidea Slidepro της Amersham. Είναι εντυπωσιακή η ομοιογένεια σήματος και σχήματος των τόπων, η πλήρης απουσία τεχνουργημάτων και η απουσία ειδικού θορύβου υποβάθρου των τόπων που δεν παρουσιάζουν ειδικό σήμα (Από αδημοσίευτα αποτελέσματα των συγγραφέων).

τικοποιημένων γενετικών δεδομένων είναι έκδηλη σε κάθε μεγάλης κλίμακας μελέτη, όπως αυτή του γονιδιώματος του ανθρώπου,⁷ καθώς και στη Φαρμακογονιδιωματική,⁸ η οποία εξετάζει το γίνεσθαι των νόσων και τους μηχανισμούς ανταπόκρισης στη θεραπεία με εξειδικευμένου στόχου φαρμακευτικά σκευάσματα.

Αυτή η θεωρητικά απλή αρχή των συστοιχιών είχε τεράστιες επιπτώσεις στην ερευνητική και στην εμπορική πράξη.

2.2. Οι συστοιχίες διευρύνουν τις γνωστικές περιοχές των βασικών επιστημών (Γονιδιωματική, Πρωτεϊνωματική, Μεταβολισμική, Τοξικογονιδιωματική, Γενετική Οικοτοξικολογία)

Διεθνώς πλέον αναφέρονται νέοι κλάδοι/γνωστικές περιοχές της Βιολογίας, βασισμένες στις δυνατότητες ανάλυσης, έρευνας και σύγκρισης που παρέχουν οι συστοιχίες. Η ονομασία γίνεται ανάλογα με το είδος των προσδεδεμένων ή των υπό μελέτη μακρομορίων (κάθε

συστοιχία φέρει διαφορετικής ταυτότητας, πλην ίδιου είδους μακρομόρια, όπως σάκκαρα, πολυπεπίδια, αντισώματα ή ένα είδος πολυνουκλεοτιδίων, είτε δεσοξυριβονουκλεοτίδια είτε ριβονουκλεοτίδια). Έτσι, στην περίπτωση της χρήσης συστοιχιών ολιγονουκλεοτιδίων ή πολυνουκλεοτιδίων αναφερόμαστε πλέον στη «Γονιδιωματική» (Genomics), η οποία εξετάζει το ακριβές περιεχόμενο της γενετικής πληροφορίας και, κατ' επέκταση, την πλήρη φύση και δομή επιλεγμένων κάθε φορά κατηγοριών ή τόπων νουκλεϊνικών οξέων. Κατ' αυτόν τον τρόπο διεξάγεται η μελέτη του ανθρώπινου γονιδιώματος⁹ και της γενετικής βάσης ασθενειών¹⁰ και η επαναξιολόγηση των πρόδρομων δεδομένων που είχαν προκύψει από τη μελέτη του γονιδιώματος των παθογόνων μυκήτων, όπως των ζυμομυκήτων, των νηματοειδών μυκήτων, των δίμορφων μυκήτων *Histoplasma capsulatum*, της *Pneumocystis carinii*, καθώς και του γονιδιώματος του βασιδιομύκητα *Cryptococcus neoformans* (πίν. 1).

Σε αντίθεση προς τη Γονιδιωματική, η Γενετική εξετάζει τη διάδοση κληρονομούμενων ιδιοτήτων, δηλαδή βα-

Πίνακας 1. Διευθύνσεις διαδικτύου, όπου καταγράφονται οι πληροφορίες για το γονιδίωμα παθογόνων μυκήτων.

Μύκητας	Διεύθυνση
<i>Candida albicans</i> (2 × 16 Mb)*	http://www-sequence.stanford.edu/group/candida — http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB
<i>Aspergillus fumigatus</i> (32 Mb)*	http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1 — http://www.sanger.ac.uk/Projects/A_fumigatus
<i>Cryptococcus neoformans</i> (23–25 Mb)*	http://www-sequence.stanford.edu/group/C.neoformans — http://cneo.genetics.duke.edu
<i>Pneumocystis carinii</i> (8 Mb)*	http://pneumocystis.uk.edu
<i>Histoplasma capsulatum</i> (23–25 Mb)*	http://www.genome.wustl.edu/projects/hcapsulatum
<i>Candida tropicalis</i> **	http://cbl.libri.u-bordeaux.fr/Genolevures/genolevures.php3
Διεθνής Πρωτοβουλία για τη Μελέτη του Γονιδιώματος των Μυκήτων	http://www-genome.wi.mit.edu/seq/fgi

* Μέγεθος γονιδιώματος (κατά προσέγγιση)

** Το μέγεθος του γονιδιώματος δεν έχει ακόμη υπολογιστεί

σικά ένα φαινομενολογικό αποτέλεσμα, που όχι μόνο εξαρτάτο μερικώς από εξωγονιδιωμικούς παράγοντες, αλλά, εκτός αυτού, αποτελούσε το έμμεσο –ή άμεσο– αντικείμενο μικρού μόνο μέρους του γονιδιώματος. Βασικότερη διαφορά είναι το ότι, στη Γενετική, μονάδα μελέτης είναι ουσιαστικά το άτομο (μονοκύτταρος ή πολυκύτταρος οργανισμός). Αντίθετα, στη Γονιδιωμική το αντικείμενο είναι ο φορέας της πληροφορίας, ο οποίος εξετάζεται και αναλύεται χρησιμοποιώντας μεθοδολογία, τεχνογνωσία και αρχές Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας, αλλά χωρίς την ενασχόληση με τα αντικείμενα των δύο προαναφερθέντων Κλάδων. Οι τελευταίοι πλέον θεωρείται ότι εξαντλούνται στη φύση και στο γίνεσθαι των ενεχόμενων αλληλεπιδράσεων της Γενετικής και της Γονιδιωμικής και στα φαινόμενα που τις διέπουν. Αντίθετα, η Γονιδιωμική, χωρίς να ασχολείται με το «γιατί και πώς» των αλληλεπιδράσεων, τις χρησιμοποιεί προς εξιχνίαση της σύνθεσης μέρους ή του συνόλου του γονιδιώματος ενός οργανισμού.^{11,12}

Αντίστοιχη κατηγορία της Γονιδιωμικής, και με βραχυπρόθεσμα εκρηκτικότερη διάδοση και εμπορικότερες εφαρμογές, είναι η επικεντρωμένη στις πρωτεΐνες «Πρωτεϊνωματική»* (proteomics). Ανεξάρτητα με το πώς μελλοντικά θα αποδοθεί στα ελληνικά ο όρος «proteomics» (κάτι καθόλου δευτερεύον), το αντικείμενο του κλάδου είναι, κατ' αντιστοιχία της Γονιδιωμικής, η ταχύτατη και ενδεδειγμένη μελέτη μέρους ή όλου του πρωτεϊνικού περιεχομένου μιας βιολογικής οντότητας, όσον

αφορά τη σύνθεση, τη δομική και λειτουργική συγγένεια και τις εξελικτικές σχέσεις.

Οι εφαρμογές αυτής της μεθοδολογίας περιλαμβάνουν την ταυτοποίηση στόχων για τη θεραπεία πρωτοπαθών δυσλειτουργιών του μεταβολισμού, επιτυγχάνοντας τη διαφορική ανάλυση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης σε υγιή και παθολογικά κύτταρα.¹³ Οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης, που εντοπίζονται από τις συστοιχίες, είναι δυνατό να υποδείξουν πρωτεϊνικούς τύπους που είτε ευθύνονται για μια νόσο είτε εμπλέκονται σε βιοχημικές οδούς σχετιζόμενες με αυτή. Συνεπώς, το φαρμακευτικό σκεύασμα, κατευθυνόμενο επί ειδικών στόχων, μπορεί να δράσει και να καταστείλει τα παθολογικά φαινόμενα. Η έρευνα σε αυτό το επίπεδο έχει συμβάλει στον προκαταρκτικό σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων που στοχεύουν στον έλεγχο και στην αδρανοποίηση των μηχανισμών που προκαλούν ισχαιμία του μυοκαρδίου,¹⁴ καθώς και στον έλεγχο της γήρανσης των ιστών.¹⁵

Στη «μεταγονιδιωμική» εποχή, που διανύουμε, δεν θα ήταν δυνατό να μη μελετηθούν με τον ίδιο ενδεδειχμένο τρόπο τα μεταβολικά προϊόντα σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Δεδομένου ότι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων (εικ. 2) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επιφέρουν, σε μερικές περιπτώσεις, αλλαγές στο μεταβολισμό, θεωρητικά είναι εφικτό, ανιχνεύοντας τις δεύτερες, να εξάγονται συμπεράσματα ανάδρομα για τις πρώτες ή, αντίθετα, ανιχνεύοντας τις πρώτες, να προγινώσκονται οι δεύτερες. Τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι ενώ το γονιδίωμα χρησιμοποιείται για μακροπρόθεσμη αποθήκευση πληροφοριών, το «πρωτεϊνωμα» εκ των πραγμάτων λειτουργεί ως φορέας βραχυπρόθεσμης αποθήκευσης πληροφοριών, ενώ η ελεγχόμενη από παράγοντες μεταγραφής ανάκτηση πληροφοριών επηρεάζεται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Συνεπώς, οι κυτταρικές λειτουργίες μπορεί να θεωρηθεί ότι

*Η πλέον δόκιμη ελληνική απόδοση θα ήταν «Πρωτεϊνωματική», με την παρατήρηση ότι το σύνολο των πρωτεϊνών μιας βιοοντότητας σπανίως αποκαλείται στα ελληνικά «πρωτεϊνωμα». Εναλλακτικά, σε παλαιότερες ορολογίες, περιγραφικά παρόμοιος όρος υπήρχε και χρησιμοποιείτο εντατικά: ο όρος «λεύκωμα» περιγράφει ακριβώς μια τέτοια συλλογική οντότητα και, χρησιμοποιούμενος ως βάση, θα έδινε την –πρωτότυπη– ελληνική εκδοχή «λεύκωματική»



Εικόνα 2. Βασικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας. Η αποθήκευση, επεξεργασία και εκτέλεση εντολών για την ολοκλήρωση των κυτταρικών λειτουργιών εθεωρείτο ότι συνιστούσαν διακριτά επίπεδα οργάνωσης. Αποδεικνύεται πλέον ότι οι ανθρώπινοι όροι και συνθήκες οργάνωσης δεν τυχάνουν εκτίμησης από τη φύση.

επηρεάζονται από ομάδες ετερογενών συνιστωσών ή επιπέδων οργάνωσης, που αλληλεπιδρούν εντός ενός ολοκληρωμένου συστήματος και, επομένως, είναι ανιχνεύσιμες σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης, συμπεριλαμβανομένου και του μεταβολισμικού.

Επιπλέον, η υπό ανάπτυξη «μεταβολομική» τεχνολογία (metabolome technology/metabolomics) δεν προϋποθέτει την πλήρη ανάλυση του γονιδιώματος ενός οργανισμού προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολίτες του. Ανιχνεύονται δε ευκολότερα, εφόσον τα εκκρινόμενα μεταβολικά προϊόντα ενός οργανισμού είναι σημαντικά λιγότερα (περίπου 1000 ανά οργανισμό) από τα γονίδια (αρκετές χιλιάδες στο μικρότερο γνωστό βακτηριακό γονιδίωμα και δεκάδες χιλιάδες στους πολυκυττάριους οργανισμούς) ή από τις πρωτεΐνες. Προς το παρόν, η τεχνολογία των συστοιχιών στη Μεταβολομική περιορίζεται στην ανίχνευση μεταβολικών προϊόντων φυτών οικονομικής σημασίας. Είναι όμως ορατό το ενδεχόμενο εφαρμογών στην ανίχνευση πολλαπλών μεταβολικών ποικιλίας παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα κλινικό δείγμα.¹⁶

Φυσικά, οι ραγδαίες εξελίξεις σε όλους τους τομείς της Μοριακής Βιολογίας δεν θα ήταν δυνατό να μην επηρεάσουν τις μεθοδολογίες ελέγχου αλληλεπιδράσεων των βιολογικών οντοτήτων μεταξύ τους και με το περιβάλλον, στο οποίο διαβιούν. Αυτό οδήγησε στη δημιουργία μιας νέας γνωστικής περιοχής της Τοξικολογίας, που ονομάστηκε Τοξικογονιδιωματική (Toxicogenomics), και μιας νέας γνωστικής περιοχής της Οικοτοξικολογίας, αναφερόμενη ως Γενετική Οικοτοξικολογία (Genetic Ecotoxicology). Ως Τοξικογονιδιωματική ορίζεται «η μελέτη της σχέσης μεταξύ δομής και λειτουργίας του γονιδιώματος και των βλαβών που αυτό υφίσταται, όπως μεταλλαξογένεση, που προκαλείται στο γονιδίωμα του ανθρώπου από εξωγενείς παράγοντες (φαρμακευτικοί, βαρέα μέταλλα όπως το κάδμιο ή ο ψευδάργυρος, χρωστικές, χημικά λιπάσματα, παρασιτοκτόνα και εντομοκτόνα και οργανικοί διαλύτες), που μολύνουν το περιβάλλον.^{17,18} Η Γενετική Οικοτοξικολογία καλύπτει τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών με-

ταλλαξογένεσης και τερατογονίας σε όλα τα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης ατόμων ή πληθυσμών (πίν. 2).¹⁹⁻²¹

2.3. Αποτελέσματα της τεχνολογίας των συστοιχιών (λοιμώξεις και γενικότερη βιοϊατρική πράξη)

Αφέθηκε τελευταίο το καθόλα επαναστατικό στοιχείο που προκύπτει από την τεχνολογία συστοιχιών. Αναφέρθηκε πρωτύτερα η έννοια της παράλληλης επεξεργασίας και ανάλυσης. Πρακτικά, αυτό σημαίνει μια τεράστια βελτίωση ικανοτήτων. Μια επιφάνεια διεξαγωγής πολλαπλών αναλύσεων εξετάζει πλέον ένα και μόνο δείγμα κατά τρόπο ενδεδειγμένο, απλό και ταχύ, αντικαθιστώντας τις ευάριθμες ξεχωριστές αντιδράσεις για κάθε δοκιμασία παρελθουσών πρακτικών. Όλες οι δοκιμασίες γίνονται ταυτόχρονα, στον ίδιο χώρο και χρόνο, και αναγιγνώσκονται με ενιαίο τρόπο και εφάπαξ, με αποτέλεσμα εξοικονόμηση όχι μόνο χρόνου και εργασιών, αλλά και εξοπλισμού/υποδομής ανάγνωσης και υποστήριξης. Τέτοιες συλλήψεις δεν είναι καινοφανείς. Οι αναλυτές που χρησιμοποιούνται σε μικροβιολογικά και βιοχημικά εργαστήρια και τα εμπορικά συστήματα πολλαπλών δοκιμασιών ταυτοποίησης μικροοργανισμών αποτελούν εφαρμογή αυτής της αρχής. Το ίδιο ισχύει, κατά μείζονα λόγο, για τους πλέον σύγχρονους αναλυτές υψηλής τεχνολογίας που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών, όπως οι προαναφερθείσες φαινοτυπικές συστοιχίες.⁵ Όμως, η τεράστια ποικιλία και αναλυτική ικανότητα των συστοιχιών, το μικρό μέγεθος, η καθιέρωση της ενιαίας επιφάνειας διεξαγωγής αντίδρασης ή εξέτασης, ο πολλαπλασιασμός της διακριτικής ικανότητας της μεθόδου με την παράλληλη δυνατότητα διεξαγωγής εκατοντάδων ή χιλιάδων αντιδράσεων και η πλήρης τυποποίηση προς χρήση ρομποτικών μεθόδων σε όλη τη διαδικασία αποτελούν από κοινού τη χαρακτηριστική μίξη ιδιοτήτων της τεχνολογίας που αναφέρεται ως (μικρο)συστοιχίες (εικ. 1). Τυπικό παράδειγμα της συμβολής των μικροσυστοιχιών στη μικροβιολογία των λοιμώξεων και στη γενικότερη ιατρική πράξη είναι η ταχεία αναγνώριση γονιδίων των μικροβιακών τοξινών, συγχρόνως με την ανίχνευση γονι-

Πίνακας 2. Εφαρμογές συστοικιών ή και πολυπλεκτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Π-ΑΑΠ) στη βιοϊατρική πράξη

Γνωστικό αντικείμενο	Συχνότερες εφαρμογές	Αντιπροσωπευτικές βιβλιογραφικές αναφορές
Γενετική	Κληρονομικά νοσήματα, γενετική βάση του καρκίνου, πληθυσμιακή γενετική, προσδιορισμός μεταλλάξεων, Πρωτεϊνωματική, Μεταβολισμική, σχεδιασμός χημειοθεραπευτικών και αντιβιοτικών παραγόντων (Φαρμακογονιδιωματική) προς δράση επί ειδικών στόχων	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 27, 30, 50, 54, 55
Βακτηριολογία/ Μυκοβακτηριολογία	Διαφορική διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων, ανίχνευση/ταυτοποίηση μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά, προσδιορισμός μεταλλάξεων και λοιμογόνων παραγόντων, Φαρμακογονιδιωματική, διαφορική διάγνωση <i>Staphylococcus spp</i> ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σε κλινικά δείγματα, ταυτόχρονη διαφορική διάγνωση λοιμογόνων και μη λοιμογόνων <i>Bacillus anthracis</i> και <i>B. cereus</i>	22, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 59, 60, 61
Ιολογία	Ταυτόχρονη ανίχνευση/διαφοροποίηση εντεροϊών (Poliovirus, Coxsackie, Echovirus) και ηπατίτιδας Α, προσδιορισμός ηκού φορτίου κυτταρομεγαλοϊού (CMV), ταυτόχρονη διαφορική διάγνωση CMV, Epstein-Barr (EBV), varicella-zoster (VZV), herpes simplex (HSV) σε κλινικά δείγματα, παράλληλη ανίχνευση HIV-RNA τύπου I, RNA ιού ηπατίτιδας C και DNA ιού ηπατίτιδας B	8, 6, 37, 38, 58
Τοξικολογία	Τοξικογονιδιωματική (μοριακοί μηχανισμοί τοξικής δράσης οργανικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό, προσδιορισμός ανεπιθύμητων ενεργειών φαρμάκων, τοξικολογική αξιολόγηση χημικών προϊόντων), ταυτόχρονη διαφοροποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν μυκοτοξίνες <i>A. flavus</i> και <i>A. parasiticus</i> , διαφοροποίηση αφατοξινοπαραγωγών και μη αφατοξινοπαραγωγών <i>A. flavus</i>	17, 18, 19, 20, 22, 34, 39, 62, 63
Γενετική Οικοτοξικολογία	Έλεγχος των συνεπειών ξενοβιοτικών ουσιών (τοξινών πρωτεϊνικής ή μη πρωτεϊνικής φύσης), των οργανικών και ανόργανων αποβλήτων επί της δομής και λειτουργίας του DNA, ώστε να προσδιοριστεί η σχέση αιτίου-αιτιατού στη μεταλλαξιογένεση, στην τερατογονία ή στη μικροεξέλιξη σε όλα τα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, ατόμων ή πληθυσμών, μελέτη της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων επί της γενετικής πληθυσμών, προσδιορισμός σε επίπεδο γονιδίων πολλαπλών βλαβών, που προκαλεί το κάδμιο και το τριχλωροαιθυλένιο εφόσον εισέλθουν στη διατροφική αλυσίδα	19, 21, 22
Μικροβιολογία Τροφίμων/ Μικροβιολογία Περιβάλλοντος/ Δημόσια Υγεία	Διαφορική διάγνωση μικροοργανισμών που μεταδίδονται με τα τρόφιμα διά της σύγχρονης ανίχνευσης έξι γονιδίων (<i>eaeA</i> , <i>slt-I</i> , <i>slt-II</i> , <i>fliC</i> , <i>rfbE</i> και <i>ipaH</i>) των <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>E. coli</i> , ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση <i>Clostridium botulinum</i> τύπων A, B, E και F, <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Salmonella spp</i> , διαφορική ταυτοποίηση <i>Escherichia coli</i> O157:H7 σε χόμα και νερό	19, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 35
Παρασιτολογία	Φαρμακογονιδιωματική (σχεδιασμός ανθελνοσοσιακών φαρμάκων), γονιδιωματική και πρωτεϊνωματική για την ανάλυση μηχανισμών αντοχής του <i>Plasmodium falciparum</i> στα ανθελνοσοσιακά φάρμακα, έλεγχος μεγάλου αριθμού δειγμάτων αίματος πληθυσμών υψηλού κινδύνου για ελονοσία, ταυτόχρονη διαφορική διάγνωση <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>P. malariae</i> σε κλινικά δείγματα, ταυτοποίηση των σταδίων κύκλου ζωής του <i>Toxoplasma gondii</i> , διαφορική διάγνωση ειδών <i>Trichinella</i> , ταυτόχρονη διαφορική διάγνωση νηματελμίνθων κτηνιατρικής και οικονομικής σημασίας, διαφορική διάγνωση κύστεων <i>Entamoeba histolytica</i> και <i>E. dispar</i> σε κόπρανα, διαφορική διάγνωση ωοκύστεων <i>Cryptosporidium parvum</i> και <i>Cryptosporidium spp</i> σε κόπρανα, ταυτόχρονη διαφορική διάγνωση λεμφώματος κεντρικού νευρικού συστήματος και τοξοπλάσμωσης σε ασθενείς με AIDS	42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 56, 64, 65, 66, 67, 68
Εντομολογία	Γονιδιωματική και πρωτεϊνωματική μελέτη <i>Anopheles gambiae</i> (κύριος διαβιαστής του <i>Plasmodium falciparum</i> , που προκαλεί πάνω από 1 εκατομμύριο θανάτους/έτος), συγκριτική γονιδιωματική <i>A. gambiae</i> και <i>A. funestus</i> , γονιδιωματική μελέτη για τον προσδιορισμό των μηχανισμών αντοχής των Ανωφελών στα εντομοκτόνα, ταυτοποίηση των επτά ειδών Ανωφελών του συμπλέγματος <i>Anopheles dirus</i> , διαβιαστών ελονοσίας στη ΝΑ Ασία	69, 70, 71, 72
Μυκτολογία	Γονιδιωματική, πρωτεϊνωματική, μεταβολισμική, τοξικογονιδιωματική μελέτη μηχανισμών αντοχής στα αντιμυκητιακά φάρμακα, παράλληλη διαφορική ταυτοποίηση μυκήτων από καθαρά καλλιεργήματα, ιστούς και από φιάλες αιμοκαλλιέργειών, προσδιορισμός νέων στόχων για τα αντιμυκητιακά φάρμακα	11, 23, 39, 40, 41, 49, 54, 73, 74

δίων που ευθύνονται για την αντοχή σε αντιβακτηριακά ή αντιμυκητιακά φάρμακα, καθώς και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό γονότυπου γνωστών πολυμορφικών τόπων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μια ποικιλία χρονοβόρων και

υψηλού κόστους εργαστηριακών δοκιμών υποκαθίστανται από μια ταχεία και μεσοπρόθεσμα οικονομικότερη εξέταση.^{22,23} Στο παρελθόν, η παράλληλη επεξεργασία (με εξαίρεση περιπτώσεις όπως τα εμπορικά συστήματα

για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών με βάση τις βιοχημικές τους ιδιότητες ή τις μετρήσεις ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας) αφορούσε ομοιοειδή επεξεργασία διαφορετικών δειγμάτων σε μια σειρά ομοειδών υποστρωμάτων. Το αποτέλεσμα ήταν χρονικοί περιορισμοί (όπως η αναμονή συγκέντρωσης επαρκούς αριθμού δειγμάτων για διεξαγωγή δοκιμασίας ELISA για τον προσδιορισμό τίτλου αντισωμάτων ή αντιγόνου). Με τις μικροσυτοιχίες, ένα και μόνο δείγμα επαρκεί για να ορίσει τη διεξαγωγή μιας πολυανάλυσης, χωρίς φυσικά να απαιτείται, σε ορισμένες περιπτώσεις, η χρήση όλων των προσφερομένων δυνατοτήτων. Μπορούν, δηλαδή, να διεξαχθούν μερικές μόνο από τις διαθέσιμες αντιδράσεις για προσδιορισμό συγκεκριμένων και αυστηρά επιλεγμένων παραμέτρων, χωρίς αύξηση του κόστους ανά εξέταση. Αναλυτικότερη περιγραφή των αρχών αυτών ακολουθεί κατωτέρω.

Οι συτοιχίες απαντούν το ερώτημα «υπάρχει αυτή η οντότητα σε έναν πληθυσμό;» και την απαντούν για πάρα πολλές οντότητες διά μιας (εικ. 1). Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών, με τις οποίες υποκαθίστανται άλλες μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας, είναι η διευκρίνιση ύπαρξης συγκεκριμένων ογκογονιδίων σε άτομα ή πληθυσμούς, η ανίχνευση μιας σημειακής μετάλλαξης σε συγκεκριμένες θέσεις ανθρώπινου γονιδίου με πιθανές επιπτώσεις στην ευαισθησία έναντι συγκεκριμένων παθήσεων όπως του καρκίνου του εντέρου,²² η παρουσία συγκεκριμένων αλληλόμορφων γονιδίων, που ορίζουν τη γεωγραφική προέλευση κάποιου εξεταζόμενου μύκητα ένεκα είτε μεμονωμένων και γεωγραφικά οριοθετημένων εξελικτικών μηχανισμών, είτε γενετικών φαινομένων, όπως αυτών της ανευπλοειδίας, διπλοειδίας ή πολυπλοειδίας,²⁴ και, φυσικά, η ανίχνευση παρουσίας γονιδίων αντοχής σε συγκεκριμένες ομάδες αντιβιοτικών ή αντιμυκητιακών φαρμάκων.²⁵

Αντίθετα, οι συτοιχίες, από μόνες τους, δεν μπορούν να επεξεργαστούν το ερώτημα «τι υπάρχει σε αυτόν τον πληθυσμό;» και, ακόμη λιγότερο, να εντοπίσουν και να ταυτοποιήσουν άγνωστες οντότητες εντός ή εκτός ενός ομοειδούς και ομοιογενούς πληθυσμού. Απαιτούν λεπτομερή γνώση και σχεδιασμό. Γνώση του τι αναμένεται να υπάρχει και του πώς αυτό μπορεί να εντοπιστεί και σχεδιασμό για το πώς θα επιτευχθεί αυτός ο εντοπισμός μαζί με πολλούς άλλους ομοιοειδείς. Επιγραμματικά, πρέπει να είναι γνωστό το «τι μπορεί να υπάρχει», για να απαντήσουν στο ερώτημα «τι όντως υπάρχει» και αυτό φυσικά μόνο αν το δεύτερο σύνολο αποτελεί, με την αυστηρή μαθηματική έννοια, γνήσιο υποσύνολο του πρώτου.

Υπάρχει και η άποψη ότι μπορούν να δώσουν –εκτός από ποιοτικές– και ποσοτικές απαντήσεις και μάλιστα σε λίγο ως πολύ απόλυτες και ενδεικτικές τιμές.^{13,26} Φυσικά, επ' αυτού υπάρχει πάντα η αμφισβήτηση όσων θεωρούν την ποσοτικοποίηση βιοαντιδράσεων και βιοφαινομένων *in vitro* («εν δοκιμίου») επισφαλής διαδικασία και επιστημονικά μεμπτή, τουλάχιστον μέχρι την έλευση δυνατοτήτων πλήρους μελέτης και ποσοτικού προσδιορισμού του πλήθους των παραγόντων που τα διέπουν.²⁷

3. ΠΟΛΥΠΛΕΚΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

3.1. Στοιχειώδης περιγραφή της μεθόδου

Από την εμφάνισή της μέχρι σήμερα, η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (ΑΑΠ) έχει εξελιχθεί σε όντως υπερβολικό βαθμό. Νέες παραλλαγές εμφανίζονται με ενοχλητική συχνότητα, συνήθως έχοντας μάλλον λίγα να προσφέρουν με την πιθανή διεύρυνση της εφαρμογής τους (πλην μερικών δημοσιεύσεων από την ομάδα που την επινόησε). Γενικώς, όμως, κάποιος μπορεί να θεωρήσει ότι αυτή η διάχυτη δραστηριότητα τροποποίησης και εξέλιξης της αρχικής ιδέας οδήγησε στην εξάντληση των πιθανών (ή και απίθανων) χρήσιμων μετατροπών της βασικής ιδέας. Ενδεικτικά, αναφέρονται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στερεής φάσης που συνδυάζεται με ολιγονουκλεοτιδικές συτοιχίες, η ισοθερμική κυλιόμενου κύκλου, η σειριακή διεισδυτικού σήματος και η πολυπλεκτική πραγματικού χρόνου ανάγνωσης.²⁵⁻²⁹

Τα προβλήματα που ανακύπτουν με τη χρήση της ΑΑΠ είναι πολλά και εξαρτώνται κυρίως από το φάσμα χρήσης της. Η μέθοδος έχει συγκεκριμένες αδυναμίες, αλλά το ποιος από αυτές ταλανίζουν ένα συγκεκριμένο χρήστη εξαρτάται περισσότερο από τις εφαρμογές, στις οποίες αυτός εμπλέκει τη μέθοδο. Μια αδυναμία, όχι μειονέκτημα, της μεθόδου, σε όλες τις αρχικές και εξελιγμένες παραλλαγές της, υπήρξε η δυνατότητα εξέτασης μίας μόνο μοριακής παραμέτρου σε ένα δείγμα ανά αντίδραση. Σήμερα, αυτού του είδους οι αντιδράσεις, όπου εξετάζεται μια αλληλουχία-στόχος (άσχετα με τις τροποποιήσεις που μπορούν να επέλθουν στην ακριβή διαδικασία), ονομάζονται «Μονοπλεκτικές» (simplex) Μ-ΑΑΠ, καθώς το προϊόν προκύπτει από την «πλοκή» αντιγραφής αλληλουχιών-στόχων, που περιβάλλουν ένα μοριακό τόπο-στόχο σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα. Η επανάσταση δεν επήλθε από την τροποποίηση της βασικής ιδέας επί της διακριτικής ικανότητας έναντι ενός (πιθανώς πολλαπλού, όπως προαναφέρθηκε) στόχου εντός

ενός δείγματος ανά αντίδραση. Επήλθε από τις τροποποιήσεις προς την ταυτόχρονη ενίσχυση περισσότερων του ενός μοριακών τόπων (πιθανώς πολλαπλών αντιγράφων, ένα στο εξεταζόμενο DNA). Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε «Πολυπλεκτική ΑΑΠ» (multiplex PCR) και επέτρεπε δραστικές βελτιώσεις έναντι μεθοδολογιών που χρησιμοποιούσαν τις βασικά μονοπλεκτικές τεχνικές.³⁰ Η πολυπλεκτική μέθοδος αρχικά επέτρεπε την ευχερέστερη διεκρίνιση ενός δείγματος με λιγότερες αντιδράσεις. Αυτό, ενώ άργησε να εκτιμηθεί στη διαγνωστική των λοιμώξεων, τελικά εφαρμόστηκε στη διαφορική διάγνωση απειλητικών για τη δημόσια υγεία μικροοργανισμών, όπως *Bacillus anthracis*,³¹ *E. coli* O159:H7,³² *Listeria monocytogenes* και ειδών του γένους *Salmonella*,³³ *Clostridium botulinum*,³⁴ *Mycobacterium tuberculosis*,³⁵ μικροοργανισμών που ευθύνονται για νοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως των ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλοκόκκων,³⁶ καθώς και ανίχνευσης εντεροϊών συγχρόνως με αυτή του ιού της ηπατίτιδας Α και ανίχνευση πέντε τύπων ερπητοϊών (HV) σε εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με HIV-λοίωξη.^{37,38} Η πολυπλεκτική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα στη Διαγνωστική Παρασιτολογία και Μυκητολογία. Η κυριότερη και ιδιαίτερα σημαντική συμβολή της Π-ΑΑΠ στη δημόσια υγεία είναι η ανίχνευση γονιδίων μυκοτοξινών σε επιβεβαιωμένες επιμολύνσεις τροφίμων από *Aspergillus parasiticus*.³⁹ Οι παλαιότερες τεχνικές ανίχνευσης ήταν χρονοβόρες ως προς την επεξεργασία του υπό έλεγχο δείγματος και απαιτούσαν χρήση υψηλής πιστότητας υγροχρωματογραφίας (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Γενικά, η εφαρμογή της πολυπλεκτικής τεχνικής στον τομέα της Μυκητολογίας υστερεί έναντι των πολλαπλών εφαρμογών που ισχύουν στη Βακτηριολογία, εξαιτίας της βραδείας προόδου στην ανάγνωση του γονιδιώματος των μυκήτων. Επιπλέον, το γονιδίωμα των μυκήτων, λόγω των ποικίλων και ιδιότυπων φαινομένων ανασυνδυασμού, έχει μεταβλητό χαρακτήρα, στοιχείο που δυσχεραίνει το σχεδιασμό και περιορίζει την πιστότητα των εναρκτών για την Π-ΑΑΠ. Οι δυσκολίες αυτές αναδεικνύονται μέσω των αποτελεσμάτων Π-ΑΑΠ για τη διαφοροποίηση ειδών *Candida*, *Cryptococcus* και *Aspergillus* από καθαρά καλλιεργήματα και από φιάλες θετικών αιμοκαλλιιεργειών, παρά την έκδηλη ευφορία ως προς την ταυτοποιητική αξιοπιστία της μεθόδου, που διαφαίνεται μέσω των σχολίων των συγγραφέων.^{40,41} Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συνεισφορά της Π-ΑΑΠ στην έγκαιρη αναγνώριση ελονοσίας και στην ταυτόχρονη ταυτοποίηση ειδών Πλασμοδίου σε δείγματα ολικού αίματος (*Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. malariae*),⁴² στην αναγνώριση και διαφοροποίηση τροφοζωϊτών

Entamoeba histolytica από αυτούς της *E. dispar*,⁴³ παρά τα υψηλά όρια ανίχνευσης (20 τροφοζώιτες *E. dispar* ή 1000 τροφοζώιτες *E. histolytica*) έναντι της υψηλότερης ευαισθησίας των 5 και 10 κύστεων *E. histolytica* και *E. dispar* με Μ-ΑΑΠ και της πρόσφατα αναπτυχθείσας Π-ΑΑΠ για ταυτόχρονη ανίχνευση κύστεων σε κλινικά δείγματα, με ειδικότητα 1,00 και ευαισθησία 0,94⁴⁴⁻⁴⁶ στη διαφοροποίηση όλων των ειδών *Trichinella*⁴⁷ και ειδών *Cryptosporidium*⁴⁸ (πίν. 2).

Αντίθετα, οι γενετιστές, που εξ αντικειμένου χειρίζονται τεράστιους αριθμούς δειγμάτων και τόπων, έσπευσαν να υιοθετήσουν την Π-ΑΑΠ από πολύ νωρίς. Σε διαγνωστική βάση, η νέα μέθοδος επέτρεπε θεωρητικά τη διεκρίνιση ενός δείγματος για ποικιλία παθογόνων σε μία μόνο αντίδραση. Αυτό, τυπικά, ενείχε άμεση οικονομία αναλώσιμων και αντιδραστηρίων, κάτι που από μόνο του έπρεπε να έχει προσελκύσει ενδιαφέρον. Όμως, το τεράστιο πλεονέκτημα ήταν αλλού: Η πλήρης διεκρίνιση απαιτούσε λιγότερες αντιδράσεις, με αποτέλεσμα επάρκεια μικρότερου όγκου δείγματος. Η ελαχιστοποίηση του απαιτούμενου όγκου δείγματος είναι ευεργετική στο χειρισμό κλινικού υλικού από δειγματοληψία με περιορισμένη απόδοση, όπως η υαλοειδεκτομή, η βιοψία και η λήψη βιολογικών υγρών από νεογνά ή βαρέως πάσχοντες ασθενείς. Επιπλέον, οι απαιτήσεις λήψης, επεξεργασίας και συντήρησης δειγμάτων μειώνονται. Η διεξαγωγή μιας αντίδρασης για περισσότερους τόπους σήμαινε ότι η διεκρίνιση αυτών ήταν πλέον ταυτόχρονη, εντός μιας θέσης μιας κυψέλης (block) ενός θερμικού κυκλοποιητή. Παλαιότερα, κάτι τέτοιο θα απαιτούσε χρήση περισσότερων θέσεων και διαφορετικών κυψελών του θερμικού κυκλοποιητή (αν ήταν διαθέσιμες) ή, εναλλακτικά, διαδοχικές επεξεργασίες του ίδιου δείγματος, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση απαντήσεων και τη μικρότερη απόδοση υλικού και εργασίας.

Η επαναστατικότητα της μεθόδου, όσον αφορά το δυναμικό των αποτελεσμάτων και της αξιοποίησης, δεν συμβάδιζε με κάποιο εξωτικό στοιχείο, όπως συνέβαινε με τις συστοιχίες. Εδώ τα ήδη υπάρχοντα υλικά, αντιδραστήρια, μέθοδοι και όργανα, επαρκούσαν πλήρως για την εφαρμογή, ανάγνωση και αξιοποίηση των νέων δυνατοτήτων. Οι πρώτες Π-ΑΑΠ αναγιγνώσκονταν όπως οι πρόγονοί τους, σε πικτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου, με ή χωρίς περαιτέρω βελτιώσεις προ της ηλεκτροφόρησης (όπως, για παράδειγμα, η εφαρμογή Ανάλυσης Περιοριστικών Πέψεων, ΑΠΠ) ή μετά από αυτή (όπως η πρόσδεση Southern και ο υβριδισμός με -γενικά ραδιενεργό ή χρωμογόνο- ιχνηθέτη). Στην αντίληψη και την τεχνολογία, οι πρώτες Π-ΑΑΠ ήταν συμβα-

τικές (σημειώνεται ότι πολλές εξελιγμένες μορφές Μ-ΑΑΠ ήταν απείρως εξωτικότερες, όπως ο συνδυασμός PCR-ELISA), ενώ υπέφεραν από τα ίδια προβλήματα με τις απλές Μ-ΑΑΠ και μάλιστα πολλαπλασιασμένα.^{2,4} Συγκεκριμένα, τα προβλήματα αλληλεπίδρασης εναρκτών διαφορετικών θερμοκρασιών τήξης και ειδικοτήτων ή συγγενειών πρόσδεσης και, τέλος, η ενίσχυση ανεπιθύμητων εναλλακτικών αλληλουχιών-στόχων (εικ. 3) πολλαπλασιάζονταν σε εκθετικό βαθμό, ως συνάρτηση του αριθμού των τόπων που περιλαμβάνονταν στην πολυπλεκτική αντίδραση. Η δε δυναμικότητά τους ήταν από μερικοί έως λίγες δεκάδες τόποι ανά αντίδραση, απόδοση που ήταν τάξεις μεγέθους ανώτερη από αυτή των Μ-ΑΑΠ.

3.2. Σχεδιασμός εναρκτών και σχόλια για την πολυπλεκτική έναντι της μονοπλεκτικής αντίδρασης πολυμεράσης

Το σημείο-κλειδί στις Π-ΑΑΠ ήταν η σχεδίαση των εναρκτών, που πλέον αποκτούσε εξαιρετική βαρύτητα, αφού έπρεπε να αποφεύγονται οι αλληλεπιδράσεις των εναρκτών πάση θυσία, όχι μόνο εντός αλλά και μεταξύ των διαφορετικών ζευγών. Επιπλέον, έπρεπε, ιδανικά, να μην υπάρχουν πολλαπλά σημεία μη ειδικής πρόσδεσης, ιδίως εντός των αλληλουχιών-στόχων, επειδή θα δημιουργούσαν τεχνουργηματικές ή και άτυπες ζώνες στην ηλεκτροφόρηση. Τελικά, οι απαιτήσεις και οι περιορισμοί ήταν αυτό που περισσότερο από κάθε άλλο δεν επέτρεψε την άμεση καταξίωση της μεθόδου: Ο επακριβής προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων, ακόμη και σε απλές Μ-ΑΑΠ, ουσιαστικά απαιτεί χρήση υπερυπο-

λογιστών. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια, με εναρκτές σχεδιαζόμενους από υπολογιστές μέσω προγραμμάτων, ήταν ημι-εμπειρική στην καλύτερη περίπτωση και επικεντρωνόταν στη θερμοκρασία τήξης (T_m) των αλληλουχιών-στόχων για την επαύξηση της ειδικότητας. Οι εκθετικά περισσότερες αλληλεπιδράσεις των Π-ΑΑΠ απαιτούσαν απείρως μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ. Οι υπολογιστές της εποχής αδυνατούσαν να επεξεργαστούν ακόμη και τα πλέον εμπειρικά ή ημιεμπειρικά δεδομένα αλληλεπιδράσεων σε αποδεκτούς χρόνους.

Τέλος, σε αντίθεση με τους γενετιστές, που δούλευαν με γενικά σταθερότερο και πάντως προτυποποιημένο μοριακό υλικό, στις περιπτώσεις όπου η Μ-ΑΑΠ χρησιμοποιείτο για διαγνωστικούς σκοπούς η σταθερότητα των αλληλουχιών-στόχων ήταν κάτι απίθανο, με αποτέλεσμα ένα απαράδεκτο δίλημμα: (α) τη μείωση της ειδικότητας, για αύξηση του φάσματος ανίχνευσης παθογόνων οργανισμών, με συνέπεια όμως τη δεδομένη αύξηση των παραπροϊόντων, των τεχνουργημάτων, του θορύβου, των μη ειδικών προϊόντων και κατά συνέπεια την πιθανή σκίαση του ειδικού σήματος και την παρατήρηση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, ή (β) τη διατήρηση υψηλής ειδικότητας αλλά με απώλεια σε διαγνωστικό εύρος, αφού πολλοί (ιδίως ευκαιριακώς) παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως οι μύκητες, εμφανίζουν μικρές διαφορές σε αλληλουχίες μεταξύ κοινών αλλά και σπανιότερων παθογόνων ειδών, ακόμη και σε περίπτωση φυλογενετικής συγγένειας. Εδώ κάποιος θα μπορούσε πάλι να προσθέσει τη σαφώς αργότερη πρόοδο στον τομέα των μυκητιάσεων και της μοριακής διάγνωσης αυτών, σε σχέση με άλλες περιοχές της βιοϊατρικής



Εικόνα 3. Ταυτοποίηση γονιδίου *ERG 11* του ζυμομύκητα *C. albicans* ως στόχου παραγώγων των τριαζολών. Οι συστοιχίες είναι εκτυπωμένες με το ρομποτικό σύστημα Virtek SDDC2 16 ακίδων (Telechem SMP3) σε προπαρασκευασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα (Motorola 3D-Link).

έρευνας. Αυτή η καθυστέρηση οφείλεται στην αποσπασματική, ελλιπή και ανακριβή γνώση γονιδιακών δεδομένων, που θα μπορούσαν να επιβληθούν στην αντιμετώπιση των προβλημάτων σχεδίασης εναρκτών (χωρίς πάντως να θεωρείται ότι θα επέφεραν την επίλυση όλων αυτών των προβλημάτων). Τελικά, και άκρως επιγραμματικά, μια σειρά παραγόντων πάσης φύσεως, από το συντηρητισμό ορισμένων ερευνητών ως την τεχνολογική αδυναμία, τη γνωστική ανεπάρκεια και τις οικονομικές προτεραιότητες, είχαν ως αποτέλεσμα την πρακτική αδυναμία διαγνωστικής αξιοποίησης της Π-ΑΑΠ. Καθένας μπορεί να παρατηρήσει ότι η αξιοποίηση αυτή, θεωρητικά, θα μπορούσε να είναι δυνατή, αλλά στην πράξη δεν ήταν και αυτό εξαιτίας των προαναφερθέντων περιορισμών.

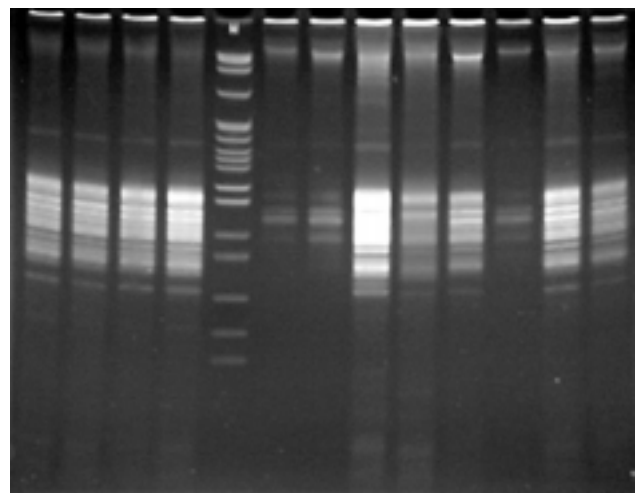
4. ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΕΚΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ: ΜΙΑ ΕΠΙΤΥΧΗΣ ΣΥΖΕΥΞΗ

4.1. Προβλήματα εφαρμογών στη διάγνωση

Από όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω, γίνεται σαφές ότι οι δύο τεχνικές όχι μόνο αναπτύχθηκαν ξεχωριστά και για να λειτουργούν ανεξάρτητα, αλλά επιπλέον είχαν πολύ διαφορετικά αντικείμενα. Ενώ η Π-ΑΑΠ βελτίωνε θεαματικά σε χρόνο και οικονομικές παραμέτρους το παλιό και λεπτό θέμα της διεκρίνσης εξαιρετικά περιορισμένων ποσοτήτων δείγματος, οι συστοιχίες επέτρεπαν την ταυτόχρονη και εξαντλητική διεκρίνση δειγμάτων επαρκούς μεγέθους. Πράγματι, οι συστοιχίες στερούνταν βήματος ενίσχυσης σήματος και, ως εκ τούτου, απαιτούσαν μεγάλους όγκους δείγματος για να επιτελέσουν τις πολλαπλές ανιχνεύσεις. Αν και στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του περιεχομένου (πρωτεϊνικού, mRNA κ.λπ.)^{13,22} ενός κυττάρου ή μονοκύτταρου οργανισμού, στην πραγματικότητα πρόκειται για ασάφεια και λανθασμένη έκφραση. Χρησιμοποιούνται για την ανάλυση περιεχομένου ενός τύπου κυττάρου ή στελέχους μικροοργανισμού, αλλά το δείγμα αποτελείται από μεγάλο αριθμό ατόμων, από μονοκαλλιέργειες, ιστοκαλλιέργειες ή κυτταρικές σειρές. Ως εκ τούτου, οι συστοιχίες φαίνονταν σαφώς ακατάλληλες για τη διάγνωση, όπου είναι απαραίτητη η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων διαφόρων μορίων και, το κυριότερο, εντός σαφώς μεγαλύτερου αριθμού ανθρώπινων μακρομορίων, κυττάρων και λοιπών δομών, ενίοτε (και συνθηθέστατα) δε εντός μεγάλων –σχετικά– όγκων σωματικών υγρών.

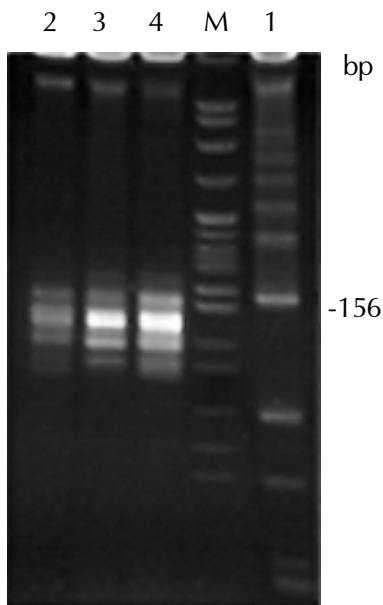
Ενώ η διακριτική ικανότητα των συστοιχιών υπερβαίνει κάθε προηγούμενο, η ειδική ευαισθησία τους δεν

ήταν καθόλου εντυπωσιακή. Αντίθετα, η ειδική ευαισθησία των Π-ΑΑΠ ήταν εξαιρετική, όπως και η διακριτική τους ικανότητα. Η τελευταία όμως περιοριζόταν από την πεπερασμένη δυναμικότητα των μεθόδων ανάγνωσης. Οι πολλαπλές βελτιώσεις επί της τεχνολογίας και μεθοδολογίας των Μ-ΑΑΠ επέφεραν βελτιώσεις της (απόλυτης και ειδικής) ευαισθησίας και της ειδικότητας, αλλά η διακριτική ικανότητα παρέμενε περιορισμένη ανά δοκιμασία.¹³ Οι πλέον εξελιγμένες ηλεκτροφορητικές τεχνικές δεν επέτρεπαν περισσότερες από μερικές δεκάδες ζωνών σε ανάλυση (εικ. 4). Αν και αυτό ήταν ένα σημαντικό επίτευγμα σε σχέση με τις κλασικές ικανότητες των Μ-ΑΑΠ και αποτελούσε ένα εξελικτικό βήμα, σε καμιά περίπτωση δεν ήταν επαναστατικό, υπολειπόμενο παρασάγγας από τις δυνατότητες ανάγνωσης που επιδείκνυαν οι συστοιχίες. Επιπλέον, οι Μ-ΑΑΠ, σε διαγνωστική χρήση, αντιμετώπιζαν προβλήματα ειδικότητας για τους προαναφερθέντες λόγους, με παραγωγή πλεονασματικών ζωνών προϊόντων (ενδεικτικά, βλ. εικ. 4), κάτι που μείωνε την ευαισθησία και δημιουργούσε κινδύνους κορεσμού των μεθόδων ανάγνωσης και ανάλυσης λόγω των πολλαπλών προϊόντων (πρόβλημα που επιτεινόταν σε περίπτωση εφαρμογής Ανάλυσης Περιοριστικών Πέψεων).



Εικόνα 4. Πολυπλεκτικές αντιδράσεις 148 τόπων σε ανθρώπινο DNA. Οι διαδρομές αντιπροσωπεύουν διαφορές ποσοτικής υψής στο μίγμα αντίδρασης. Το πρόγραμμα ενίσχυσης, ο όγκος αντίδρασης, τα 148 ζεύγη εναρκτών, η ποσότητα του ενζύμου και το DNA-στόχος είναι σταθερά. Η εμφάνιση κατά το μάλλον ή ήττον ευκρινών ζωνών είναι παραπαιστική, καθώς τα 140 –περίπου– από τα 148 αναμενόμενα προϊόντα έχουν μέγεθος μεταξύ 89 και 149 ζευγών βάσεων, δηλαδή σχεδόν 3 ζώνες ανά διαβάθμιση μήκους μίας βάσης! (Από αδημοσίευτα αποτελέσματα των συγγραφέων). Στην πέμπτη διαδρομή: Ευδείκτης μοριακών μεγεθών, πλασμίδιο pBR322 × *Msp* I.

Με αυτά τα δεδομένα, ήταν εμφανές ότι οι Π-ΑΑΠ θα δημιουργούσαν τεράστια πρόκληση για τις δυνατότητες ανάγνωσης, ανάλυσης και επεξεργασίας των υπαρχουσών τεχνικών ηλεκτροφόρησης, ακόμη και αν όλα τα άλλα προβλήματα που ενείχαν (όπως περιγράφηκαν πρωτύτερα) επιλύονταν. Ως εκ τούτου, η Π-ΑΑΠ μπορούσε θεωρητικά να έχει αντικείμενο τη διάγνωση, αλλά υπήρχαν πρακτικές δυσκολίες που ανέσειλαν τη χρήση της (εικόνες 4, 5). Από την άλλη μεριά, οι συστοιχίες, ενώ εισήγαγαν ένα σημαντικότατο χαρακτηριστικό, εκ σχεδιασμού δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν λόγω της απαίτησης ευμεγέθους δείγματος (κάτι που σε γενετικές μελέτες δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα). Το ευμέγεθες δείγμα μερικές φορές είναι εφικτό να απο-



Εικόνα 5. Παράδειγμα κακής επιλογής εναρκτών για μονοπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ΑΑΠ) σε τυπικό πύκτωμα πολυακρυλαμίδιου: bis. M: Ευδείκτης μοριακών μεγεθών, πλασμίδιο pBR322 επωασμένο μέχρι πλήρους πέψεως με περιοριστική ενδοουκλεάση *Msp* I. Στη διαδρομή (1) φαίνεται το αποτέλεσμα ενίσχυσης από 1 μόνο ζεύγος εναρκτών επί ολικού ανθρώπινου DNA. Η αναμενόμενη ζώνη υποδεικνύεται (156 ζεύγη βάσεων). Από μια τέτοια εικόνα καθίσταται εμφανές το πρόβλημα κορεσμού μεθοδολογίας ανάγνωσης και σκίασης των ειδικών προϊόντων, που αναμένεται να προκύψει υπό συνθήκες Π-ΑΑΠ. Τονίζεται ότι η εμφάνιση μη ειδικών ζωνών δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις επαναλήψιμη, καθιστώντας παρακινδυνευμένη τη χρήση αλγορίθμων σύγκρισης φωτεινότητας/έντασης/ποσότητας (Από αδημοσίευτα αποτελέσματα των συγγραφέων). Διαδρομές 2, 3, 4: Τυπική εμφάνιση αποτελεσμάτων υψηλού βαθμού πολυπλεκτικότητας (148 ζεύγη εναρκτών). Η ανεπάρκεια της μεθοδολογίας της ηλεκτροφορητικής ανάγνωσης είναι τουλάχιστον εμφανής. Οι διαδρομές αντιπροσωπεύουν διαφορές ποσοτικής υφής στο μίγμα αντίδρασης. Το πρόγραμμα ενίσχυσης, ο όγκος αντίδρασης, τα 148 ζεύγη εναρκτών, η ποσότητα του ενζύμου και το DNA-στόχος είναι σταθερά.

κτηθεί για διαγνωστικούς λόγους (τέτοιο παράδειγμα είναι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες παθολογικών δειγμάτων), αλλά και σε αυτές ακόμη τις περιπτώσεις μεταφράζεται, πολύ συχνά, σε αυξημένο κόστος και χρόνο. Αν για γενετικές και άλλες μελέτες το κόστος και ο χρόνος αποτελούν απλά προβλήματα, για τη διάγνωση αποτελούν μάλιστα, καθώς μια εξέταση ρουτίνας οφείλει να δίνει αξιόπιστες και ταχείες απαντήσεις και να είναι απολύτως οικονομική.

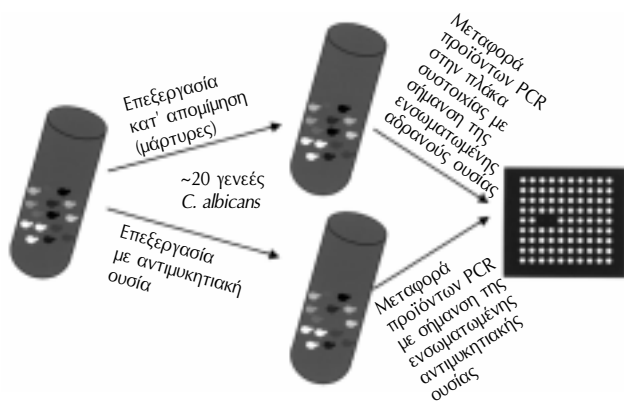
4.2. Η σύζευξη

Η αναπάντεχη επανάσταση προήλθε όταν κάποια στιγμή έγινε αντιληπτή η δυναμικά συμπληρωματική φύση αυτών των δύο τεχνολογιών και η δυνατότητα ολοκλήρωσής τους σε μια νέα μεθοδολογία. Η Π-ΑΑΠ, έχοντας το πλεονέκτημα της μεγάλης ευαισθησίας, μπορούσε να αναλάβει την ενίσχυση ειδικού σήματος σε πολύ περιορισμένα δείγματα ιδιαιτέρως μικρού εμπλουτισμού. Με τον τρόπο αυτόν, τα προς διακρίβωση μόρια πολλαπλασιάζονταν σε τάξεις μεγεθών, όπου γίνονταν πλέον «ορατά» από τις συστοιχίες. Οι συστοιχίες, από την άλλη, έχοντας δυνατότητες πολλαπλής διακρίβωσης (παράλληλη επεξεργασία), εξαιρετικής ειδικότητας και καθοριζόμενης διακριτικής ικανότητας, υποβαθμίζονταν μερικώς σε μέθοδο ανάγνωσης σήματος για την Π-ΑΑΠ, αλλά υπόσχονταν πλήρη ανάδειξη του δυναμικού των Π-ΑΑΠ στις πολλαπλές εξετάσεις και σε μερικές περιπτώσεις καταργούσαν την ανάγκη για επακόλουθες δοκιμασίες διαφοροποίησης, όπως συνέβαινε με τη Μ-ΑΑΠ. Η αλήθεια είναι ότι, με την εισαγωγή των συστοιχιών ως μεθόδου ανάγνωσης, σήμερα το όριο στους ταυτόχρονα διευκρινιζόμενους τύπους έχει εκτοξευθεί στις μερικές εκατοντάδες ή σε μερικές χιλιάδες (εικ. 1). Για παράδειγμα, η σύγχρονη τεχνολογία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάγνωση 25.000 γενετικών τόπων (π.χ. γονίδια) του γονιδιώματος του ζυμομύκητα *C. albicans* και έως 30.000 γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Συνεπώς, ο περιορισμός πλέον εντοπίζεται στο βήμα της Π-ΑΑΠ (που έχει μαθηματικά καθορισμένα περιθώρια ανάπτυξης πριν από την έλευση αναπόφευκτου κορεσμού από αλληλεπιδράσεις) και όχι από τη μέθοδο ανάγνωσης, όπως συνέβαινε με τις ηλεκτροφορήσεις.

Πρακτικά, αυτή η μετατόπιση του περιοριστικού παράγοντα σημαίνει μετριοπαθώς την αύξηση κατά μία τάξη μεγέθους της αποτελεσματικότητας. Από μερικές δεκάδες, που ανέλυναν οι ηλεκτροφορήσεις, τώρα αναλύονται μερικές εκατοντάδες ή χιλιάδες (τονίζεται ότι ενώ το δυναμικό των συστοιχιών είναι υψηλό, είναι αμφίβολο αν η Π-ΑΑΠ έχει παρόμοιο εξελικτικό δυναμικό).

4.3. Επικείμενες εφαρμογές σε διαγνωστικούς τομείς

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η συνδυασμένη μεθοδολογία Π-ΑΑΠ και συστοιχιών θα εισέλθει στο διαγνωστικό χώρο, ιδίως όσο οι σχετικές τεχνολογίες προοδεύουν ταχύτατα και μειώνουν το κόστος και τις δυσκολίες εφαρμογής και αντιμετωπίζουν μία προς μία τις αδυναμίες. Τα βασικά προβλήματα θα είναι (α) η ανάγκη δημιουργίας τεχνογνωσίας και εμπειρίας για ένα τελειώς νέο είδος τεχνικών, άγνωστων μέχρι τώρα στους ασχολούμενους με την εργαστηριακή διάγνωση και (β) η πολυπλοκότητα που αυτές οι τεχνικές ενέχουν. Η πολυπλοκότητα αυτή είναι το τίμημα της επαύξησης της αποδοτικότητας. Αντί του παλιού πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, τώρα χρειάζεται ο σχεδιασμός και η παραγωγή μιας (μικρο)συστοιχίας, η οποία, αν και μπορεί να παρασκευαστεί από ειδικά ιδρύματα βιοτεχνολογίας με άριστες προδιαγραφές ειδικότητας και ευαισθησίας για τους ελεγχόμενους τύπους, περιλαμβάνοντας και κατάλληλους μάρτυρες, απαιτεί εντούτοις αρκετούς ποιοτικούς ελέγχους προκειμένου να επιτευχθεί η επαναληψιμότητα των πειραμάτων/εξετάσεων. Ενδεικτικά αναφέρονται η δοκιμασία καταλληλότητας ενός αντιμυκητιακού φαρμάκου έναντι του ζυμομύκητα *C. albicans* (εικ. 6), η ικνυλάτωση γονιδίου-στόχου για παράγωγα των τριαζολών (εικ. 3) και οι ιδιαίτερα ευαίσθητες δοκιμασίες για τον προσδιορισμό γονιδίων παθογονικότητας των μυκήτων.^{23,49} Αντί της απλής ανάμιξης με βρωμιούχο αιθίδιο, τώρα μια ολόκληρη τεχνική απαιτείται για τη σήμανση των προϊόντων της Π-ΑΑΠ, ώστε να αναγνωστούν από τις συστοιχίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μέθοδος «Επιμήκυνσης Ενός Νουκλεοτιδίου» (ενδεικτική εφαρμογή, εικ. 1), που χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση κληρονομικών νοσημάτων οφειλομένων σε αντικατάσταση ενός νουκλεοτιδίου⁵⁰ ή για την αναγνώριση μεταλλάξεων παθογόνων οργανισμών οι



Εικόνα 6. Δοκιμασία καταλληλότητας αντιμυκητιακού φαρμάκου *in vitro* με τη μέθοδο του ανταγωνιστικού υβριδισμού.

οποίες ευθύνονται για αντοχή –π.χ.– του *P. falciparum* στα αντιπαρασιτικά φάρμακα.^{25,51,52} Αυτό το βήμα ενίοτε υποκαθιστά και ένα βήμα διαφοροποίησης προϊόντων, όπως η ΑΠΠ. Μέχρι στιγμής, η σημαντικότερη εφαρμογή αυτής της τεχνικής στην Ιατρική είναι η ταχεία αναγνώριση της σημειακής μετάλλαξης στο ενισχυμένο τμήμα 422 ζευγών βάσεων του γονιδίου *CYP 21*, που κωδικοποιεί το ένζυμο 21-υδροξυλάση.⁵³ Και, τέλος, υπάρχει ένα θέμα κόστους, το οποίο θα συζητηθεί κατωτέρω.

Είναι απόλυτα σαφές ότι οι πρώτες περιοχές που έσπευσαν να εκμεταλλευτούν τις καινοφανείς δυνατότητες των νέων τεχνολογιών είναι οι ασχολούμενες με τη διάγνωση γενετικών νόσων και με τη διάγνωση καρκίνου/κακοθηγιών, πιθανόν σε πρώιμα στάδια. Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν υπάρχει –στην πράξη– άλλη εναλλακτική οδός, ενώ οι πληροφορίες που παρέχει (ή θα παρέχει σε λίγα χρόνια) η αξιόπιστη διερεύνηση του ανθρώπινου γονιδιώματος θα επιτρέψει σχετικά λεπτομερή σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων για κάθε απαιτούμενη χρήση, όπως εναρκτές για την Π-ΑΑΠ και ικνυθέτες για τη συστοιχία.^{54,55} Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι λεπτομερείς γονιδιωματικές πληροφορίες είναι απαραίτητο στοιχείο για επιτυχή χρήση των νέων τεχνολογιών χωρίς τεχνικό κίνδυνο και εμπειρισμούς. Εκεί όμως όπου η χρήση της νέας μεθοδολογίας μπορεί να φέρει επανάσταση, είναι η διάγνωση μολυσματικών νόσων (πίν. 2). Δυστυχώς, σε αυτή την περιοχή επικρατεί περισσότερος σκεπτικισμός (ενίοτε δικαιολογημένος). Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες εναλλακτικές λύσεις, όπως τα εμπορικά συστήματα Μ-ΑΑΠ και Π-ΑΑΠ, με τροποποιήσεις επαύξησης της ευαισθησίας, διακριτικής ικανότητας και χρονοαποδοτικότητας, καθώς και οι νεότερες ανοσοορολογικές μέθοδοι. Ως εκ τούτου, χωρίς να υπάρχει διάθεση υποβάθμισης των δυνατοτήτων των σημερινών επιτευγμάτων, είναι δυνατή (και πιθανότατη) η υποτίμηση της νέας πρόκλησης με ευλογοφανή επιχειρήματα: (α) κόστος δημιουργίας υποδομής, (β) κόστος και αβεβαιότητα ανάπτυξης εξειδικευμένων εφαρμογών της νέας τεχνολογίας, (γ) διαθεσιμότητα τεχνογνωσίας, (δ) βραχυπρόθεσμες οικονομικές αγκυλώσεις και (ε) απαιτήσεις υπερεξειδικευμένης (επαν)εκπαίδευσης προσωπικού.

Παρεμπιπτόντως, σήμερα στις μολυσματικές νόσους η έρευνα δραστηριοποιείται περισσότερο στη διαρκή ανανέωση του φάσματος των φαρμακευτικών σκευασμάτων και λιγότερο στην ανάπτυξη νέων ή στη βελτίωση ήδη υπάρχουσων διαγνωστικών μεθόδων. Είναι αλήθεια ότι ενώ η αιχμή της διαγνωστικής τεχνολογίας θα μπορούσε, υπό προϋποθέσεις, να θεωρηθεί επαρκής, η εφαρμογή της στην καθημερινή ιατρική πράξη υπολεί-

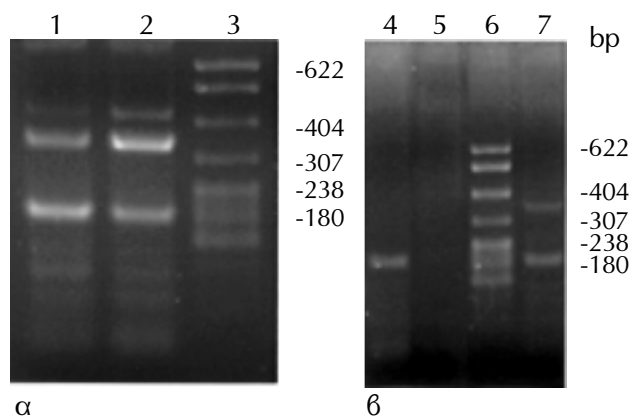
πεται αρκετά και είναι σαφώς ελαττωματική. Το πόσες διαγνωστικές μέθοδοι υπάρχουν και πόσο αποτελεσματικές είναι, αποτελεί αντικείμενο ακαδημαϊκής συζήτησης. Το πόσες από αυτές εφαρμόζονται, σε πόσα ιδρύματα υγείας, πόσο συχνά και πόσο επιτυχώς, είναι ένα οσοβαρό θέμα μεγάλης πρακτικής σημασίας.

Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι, εκτός αυτού, η καθημερινότητα και οι προβλέψεις διαψεύδουν ακόμη και τη θεωρητική αισιοδοξία περί διαγνωστικής επάρκειας. Οι σημερινοί ρυθμοί θα αρκούσαν για (θεωρητική) επίλυση των υπαρχόντων διαγνωστικών προβλημάτων, καθώς και μερικών επιπλέον, που ανακύπτουν από τη φυσική εξέλιξη και εμφάνιση νέων παθογόνων μικροοργανισμών ή νέων, διαφορετικών στελεχών υπαρχόντων παθογόνων μικροοργανισμών. Δυστυχώς, όμως, η τάση είναι προς εμφάνιση όλο και περισσότερων παθογόνων μικροοργανισμών ή, για να είμαστε ακριβείς, στην αναγνώριση δυνητικά παθογόνου δράσης σε όλο και περισσότερους γνωστούς μικροοργανισμούς. Αυτή η διαπίστωση έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, εφόσον οι νέες τεχνολογίες επιτρέπουν τον παράλληλο έλεγχο μεγάλου αριθμού υποψηφίων παθογόνων παραγόντων σε δείγματα για λοιμώξεις προκαλούμενες από παράσιτα αίματος, οι οποίες ευθύνονται για το θάνατο εκατομμυρίων ανθρώπων ανά την υφήλιο.⁵⁶ Οι διαγνωστικές πρόοδοι επιτρέπουν λεπτομερέστερη διασάφηση των ενεχόμενων παραγόντων, με αποτέλεσμα λοιμώξεις που παλαιότερα αποδίδονταν άδικα σε «συνήθεις ύποπτους», να αποδίδονται πλέον ακριβοδίκαια σε λιγότερο γνωστούς αιτιολογικούς παράγοντες που εισβάλλουν στον ιατρικό χώρο.⁵⁷ Επιπλέον όμως της ακριβέστερης διασάφησης, εξέχουσα θέση στην κλίμακα των αιτίων της προαναφερθείσας τάσης κατέχει ο καλπάζων αριθμός ανοσοανεπαρκών ατόμων με αυξημένα προσδόκιμα επιβίωσης, που επιφέρουν οι πρόοδοι σε άλλους τομείς της Ιατρικής. Ένα άλλο αίτιο είναι η κάθετη μείωση της αληθούς ποιότητας ζωής λόγω αθροιστικών, συνεχόμενων και πολλαπλών βημάτων υποβάθμισης του φυσικού μακροπεριβάλλοντος και μικροπεριβάλλοντος.⁵⁶

Άσχετα με τα αίτια, το θέμα επικεντρώνεται στην απαίτηση για τεχνολογία ικανή να εμπνεύσει μεθοδολογίες αποτελεσματικές σήμερα και με περιθώρια ανάπτυξης για το μέλλον, αν η τάση εμφάνισης ή αναγνώρισης νέων, αναδυόμενων παθογόνων συνεχίσει επιταχυνόμενη.

Η διαγνωστική χρήση για παθογόνους μικροοργανισμούς της μεθοδολογίας Π-ΑΑΠ/συστοιχιών έχει να προσφέρει μια τεράστια σειρά πλεονεκτημάτων. Το βασι-

κό σημείο έναρξης είναι ότι, σήμερα, για μεγάλο αριθμό παθογόνων παραγόντων υπάρχουν ειδικοί εναρκτές. Το πρόβλημα που αντιμετωπίζεται γενικά είναι ότι οι εναρκτές καλύπτουν ένα είδος ή μια ευρύτερη ομάδα ειδών (συνήθως Γένος, άλλες φορές άλλες ταξινομικές βαθμίδες, όπως Υπογένος ή Οικογένεια) και αυτό περιπλέκει τριπλά την κατάσταση. Προκειμένου για εναρκτές ειδικούς για είδος (εικ. 7) ή ποικιλία, απαιτούνται διαφορετικά ζεύγη για ικνυλάτηση φυλογενετικής συγγενών μικροοργανισμών, που θα μπορούσαν κάλλιστα να ενοχοποιηθούν για πρόκληση πολύ παρόμοιας νόσου, αλλά χωρίς να ικνυλατούνται από την υπερεξειδικευμένη δοκιμασία. Αντίθετα, αν επιλεγεί ευρύτερο φάσματος ζεύγος εναρκτών, τότε απαιτούνται επιπλέον βήματα ανάλυσης θετικού προϊόντος, προς ταυτοποίηση του ίχνους και του μικροοργανισμού, ενώ το πρόβλημα της ακαταλληλότητας για άλλες (ανώτερες ή ταυτούψεις) ταξινομικές βαθμίδες παραμένει. Τέλος, όταν εξετάζεται δείγμα ασθενούς, η συμπτωματολογία πιθανόν να παραπέμπει σε τελείως διαφορετικές ομάδες παθογόνων ως δυνητι-



Εικόνα 7. Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ενίσχυση γενετικού υλικού από μικτή καλλιέργεια τριών παθογόνων ειδών νηματοειδούς μύκητα (τριπλεκτική διαζευκτική αντίδραση). (α) Ειδικοί εναρκτές σχεδιάστηκαν για καθένα από τρία είδη του ίδιου γένους. Διαδρομές 1 και 2: Ενίσχυση τμημάτων τριών διαφορετικών ειδών νηματοειδούς ασκομύκητα από μικτά καλλιέργηματα. Διακρίνονται πολλαπλές άτυπες ζώνες μικρότερες των 180 ζευγών βάσεων (bp). Διακριτού μεγέθους προϊόντα ενίσχυσης λαμβάνονται για κάθε είδος (*Phoma herbarum* -404 bp, *P. foveata* ~380 bp, *P. exigua* -180 bp). (β) Διαδρομή 4: Ικνυλάτηση γενετικού υλικού παθογόνου νηματοειδούς ασκομύκητα σε παθολογικό δείγμα (180 bp *P. exigua*). Η εκχύλιση του DNA στόχου έγινε από βιοπτικό υλικό πνευμόνων με επιβεβαιωμένη -με καλλιέργεια- μυκητίαση. Επιτυγχάνεται ενίσχυση μόνο ενός τμήματος του γονιδιώματος, που αντιστοιχεί σε είδος *P. exigua* (διαζευκτική αντίδραση). Διαδρομή 5: Αρνητικός μάρτυρας. Διαδρομή 7: Διπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης από μικτό καλλιέργημα δύο ειδών νηματοειδούς ασκομύκητα, *P. foveata* -307 bp, *P. exigua* -180 bp. Διαδρομές 3 και 6: Ενδεικτής μοριακών μεγεθών pBR322/*Msp* I (Αδημοσίευτα αποτελέσματα: Μπαλλής, Βελεγράκη, Φράγκου, Πεφάνης, 2002).

κών αιτίων, για καθεμιά από τις οποίες πρέπει να ακολουθηθούν και να εφαρμοστούν τα παραπάνω διαλεκτικά και πειραματικά/διαγνωστικά βήματα. Και αυτό χωρίς κάποιος να λάβει υπόψη τις άτυπες συμπτωματολογίες, που εμφανίζονται συνηθέστατα και απροειδοποίητα σε ανοσοανεπαρκή άτομα. Το διαγνωστικό πρόβλημα, από μόνο του σοβαρό, καθίσταται ακόμη σοβαρότερο από την ανάγκη χρήσης μεγάλων όγκων κλινικών δειγμάτων, προκειμένου να ικανοποιηθούν τα πολλαπλά ενδεχόμενα που προαναφέρθηκαν. Η λήψη πολλαπλών δειγμάτων είναι συχνά απαίτηση ακόμη και για τα μονοπλεκτικά δοκίμια, όπως για παράδειγμα στην ανίχνευση αλληλουχιών *Candida* και *Aspergillus* σε ολικό αίμα βαρέως πασχόντων ασθενών. Αντίθετα, η απαίτηση μεγάλων όγκων για μια εξέταση ενίοτε παρουσιάζει ανυπερβλήτα προβλήματα, τα οποία περιπλέκονται ακόμη περισσότερο εξαιτίας του χρονοβόρου της σειριακής επεξεργασίας. Αυτό γενικά σημαίνει την ανάγκη για ένα βήμα διαλογής και διαγνωστικών αποφάσεων, όπου θα δοθούν προτεραιότητες στην εξέταση συγκεκριμένων ενδεχομένων, ενώ άλλα ενδεχόμενα θα εξεταστούν αργότερα (αν το πρόβλημα εντοπίζεται στη σειριακή επεξεργασία) ή δεν θα εξεταστούν καθόλου (αν το πρόβλημα εντοπίζεται στην ανεπάρκεια δείγματος). Αυτές οι αποφάσεις εργαστηριακής διαγνωστικής πρακτικής τυπικά υποβοηθούνται από την ανάλυση της συμπτωματολογίας και το ιστορικό των ασθενών, αλλά, όπως αναφέρθηκε, η συμπτωματολογία πολύ συχνά τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται άτυπη, ενώ το καλό ιστορικό και οι απαραίτητες κλινικές πληροφορίες που θα έπρεπε να συνοδεύουν ένα δείγμα στο εργαστήριο, αποτελεί εν γένει, για κοινωνικούς βασικά λόγους, δείγμα υπό εξαφάνιση. Κατόπιν αυτών, και αν ακόμη δεν υπήρχε το πρόβλημα της εμφάνισης με επιταχυνόμενο ρυθμό νέων παθογόνων μικροοργανισμών, η μεταβολή της συμπτωματολογίας υπάρχουσών νόσων θα έπρεπε από μόνη της να ωθήσει σε επαναθεώρηση των διαγνωστικών μεθόδων και των απαιτήσεων και θα οδηγούσε σε έκδοση προδιαγραφών (για τον κατά περίπτωση χειρισμό και επεξεργασία κάθε κλινικού δείγματος) που θα ικανοποιούνταν από την προαναφερθείσα μεθοδολογία και πιθανόν και από κάποιες άλλες.

Πράγματι, χάρη στην Π-ΑΑΠ θα είναι δυνατή η ταυτόχρονη χρήση εναρκτών για συγκεκριμένους (τους πλέον πιθανόν ενδεχόμενους) μικροοργανισμούς σε μια αντίδραση, η οποία θα απαντά στο ερώτημα «ποιος από τους κατωτέρω μικροοργανισμούς εμφανίζεται» και όχι στο ερώτημα «εμφανίζεται ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός;», που αποτελεί το αντικείμενο των διαγνωστικών μοριακών μεθόδων σήμερα (πλην εξαιρέσεων).

Ακόμη και αν δεν υπάρχουν ειδικοί εναρκτές για συγκεκριμένα είδη και ποικιλίες, είναι εφικτή, μέσω περισσότερο εξειδικευμένων τροποποιήσεων της βασικής μεθοδολογίας, η διακρίβωση του «ποιος από τους μικροοργανισμούς, που δίνουν αποτέλεσμα με αυτούς τους εναρκτές, βρίσκεται σε αυτό το δείγμα», χάρη στην εντυπωσιακή δυνατότητα διαχωρισμού και διακρίβωσης των συστοιχίων. Το διαφορετικό προϊόν ενός ζεύγους εναρκτών μπορεί να αναγινώσκει σε περισσότερους από έναν τόπους στη συστοιχία, ανάλογα με το πόσα πιθανά διαγνωστικά αποτελέσματα αναμένονται. Αυτή η μικρή λεπτομέρεια, δηλαδή η δυνατότητα διερεύνησης και διεκρίνισης από μια συστοιχία πολύ περισσότερων αναγνώσιμων τόπων από τα χρησιμοποιούμενα ζεύγη εναρκτών για την ενίσχυση-παραγωγή τους στην Π-ΑΑΠ, δεν έχει προσεχθεί τόσο, ώστε να διερευνηθούν πλήρως τα ενδεχόμενα συνδυασμένης κατ' αυτόν τον τρόπο χρήσης των δύο μεθόδων στη διάγνωση λοιμώξεων.^{36,58} Η επιλογή σχετικά λίγων, αλλά ευρέως φάσματος διαφορετικής ικνυλάτησης ζευγών εναρκτών για ανίχνευση συγκεκριμένων ομάδων προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών σε ελάχιστη ποσότητα κλινικού δείγματος και ο ακόλουθος διαχωρισμός διαφορετικών προϊόντων ενίσχυσης σε γεωμετρικά καθορισμένους εναλλακτικούς τόπους της κατάλληλης συστοιχίας, θα μόρφωνε ένα επιχείρημα υπέρ της δυνατότητας αύξησης της πραγματικής ικανότητας επεξεργασίας/ανάλυσης της Π-ΑΑΠ σε επίπεδα απλώς ανέφικτα για τη σημερινή «συμβατική» της χρήση και ανάπτυξη, που εστιάζεται στην απλή αύξηση του αριθμού των ζευγών εναρκτών. Αυτή η χρήση συλλογικών αντιδράσεων, που μεταθέτει μέρος του προβλήματος της διακρίβωσης από την ειδική ΑΑΠ/ενίσχυση στην ειδική ανάγνωση επιτρέπει αισιοδοξία για επάρκεια της συγκεκριμένης τεχνικής για σεβαστό χρονικό διάστημα –παρά την επαύξηση των εμφανιζόμενων δυνητικών παθογόνων– και αναβολή εμφάνισης κορεσμού αυτής. Φυσικά, σε ορισμένες περιπτώσεις θα μπορούσε να εξακολουθήσει η σημερινή πρακτική, ενός ζεύγους για ένα μικροοργανισμό (είδος ή ποικιλία), ιδίως σε εξαιρετικά ομοιογενή είδη (εικ. 7) ή εξαιρετικά επιθετικές ή ανθεκτικές ποικιλίες. Αλλά γενικότερα, η χρήση συλλογικών αντιδράσεων, όπου το προϊόν ενός ζεύγους απαντά, με στοιχειοθετήσιμες διαφορές (μήκους ή σύστασης αλληλουχίας), σε διάφορους μικροοργανισμούς και ταυτοποιείται από διαζευκτικούς πολλαπλούς τόπους στις συστοιχίες, θα δώσει στην Π-ΑΑΠ πολλαπλάσια διακριτική ικανότητα ταυτοποίησης από αυτή που προβλέπεται από τον απλό προσδιορισμό του αριθμού των ζευγών εναρκτών, που μπορούν να συν-ενισχυθούν χωρίς απαγορευτικές αλληλεπιδράσεις. Κατόπιν τούτου, γίνεται σα-

φές ότι ενώ στην αρχή η νέα μεθοδολογία θα στραφεί προς τη χρήση όσο το δυνατό ειδικότερων εναρκτών πλήρως αξιόπιστων και διακριβωμένων, για συγκεκριμένες απαντήσεις, με τις πλέον διαφοροποιημένες και απλές διαμορφώσεις συστοιχιών (κάτι που αποτελεί επανάληψη της ιστορίας της διαγνωστικής χρήσης των Μ-ΑΑΠ), σε δεύτερο χρόνο σαφώς θα προτιμηθούν επιμελώς μελετημένα ζεύγη εναρκτών γενικής χρήσης, που θα δίνουν διαφορετικά, πλην πλήρως ειδικά προϊόντα με μεγαλύτερη διαφορική ικανότητα αναγνώρισης μικροοργανισμών, ενώ οι τόποι των συστοιχιών θα αναλαμβάνουν το διαχωρισμό των εν λόγω προϊόντων. Αυτή η λύση είναι μονόδρομος για την αύξηση της απόδοσης της Π-ΑΑΠ στα επίπεδα των συστοιχιών και για την πληρέστερη αξιοποίηση των τελευταίων.

Φυσικά, αυτό το βήμα σημαίνει δύο πράγματα: Πρώτον, την ανάγκη για ακριβέστερες γονιδιωματικές πληροφορίες (όχι απαραίτητα εξιχνίαση ολόκληρων γονιδιωμάτων, αν και αυτό θα ήταν ευκαίριο) για το σχεδιασμό των ολιγονουκλεοτιδικών εμφυτευμένων ικνηθетών των συστοιχιών. Δεύτερον, μια εκτεταμένη, οργανωμένη και σοβαρή έρευνα και μελέτη για σχεδίαση «αποτελεσματικών» εναρκτών γενικής χρήσης, που θα ενισχύουν σαφώς διαφοροποιημένες αλληλουχίες –με συντηρημένα όμως άκρα– από μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Εργασίες του πρόσφατου παρελθόντος, που δημιουργούσαν βιβλιοθήκες αποτελεσμάτων συγκεκριμένων εναρκτών γενικής χρήσης επί ποικίλου δείγματος μικροοργανισμών, σαφώς μπορούν να αξιοποιηθούν επί της αρχής και να αποτελέσουν τη βάση για τη δημιουργία του γνωστικού υπόβαθρου για τις νέου τύπου διαγνωστικές συστοιχίες, αν και φυσικά απαιτείται περαιτέρω και εξαντλητική εργασία για τη συστηματική καταγραφή και πλήρη διερεύνηση της πρωτοταγούς δομής των διαφορετικών προϊόντων ενίσχυσης που προκύπτουν από διαφορετικούς οργανισμούς. Πάντως, αυτό το υπάρχον γνωστικό υπόβαθρο αποτελεί μια σαφή επένδυση, καθώς καταργεί το μεγαλύτερο πονοκέφαλο: την εκ νέου (ή εκ του μηδενός) εύρεση γενικής χρήσης συντηρημένων αλληλουχιών-στόχων, που περιβάλλουν λιγότερο συντηρημένες ή σαφώς διαφοροποιημένες περιοχές σε ευρύ φάσμα μικροοργανισμών και χωρίς να απαιτούνται αναλυτικές γονιδιωματικές πληροφορίες, που θα καθιστούσαν –σε αντίθετη περίπτωση– το εγχείρημα εφικτό μόνο με εκτενή χρήση ερευνητικών εργαλείων λογισμικού.

Ένα σημείο που σαφώς δεν πρέπει να λησμονείται είναι το ότι η συντήρηση/διαφοροποίηση των ομοιοειδών αλληλουχιών δεν είναι πάντα γραμμική, καθώς η εξέλιξη ακολουθεί κατευθυντήριες γραμμές δικής της έμπνευσης και δεν απασχολείται με το να παράγει είδη

και οργανισμούς εύκολα ταξινομήσιμους από την ανθρώπινη γνώση του 21ου αιώνα. Αυτό πάντως έχει μικρή σημασία. Όσο διεσπαρμένη και να είναι η ταξινομική και φυλογενετική κατανομή μικροοργανισμών που μοιράζονται ένα ζεύγος αλληλουχιών-στόχων, ένας επιπλέον οργανισμός σημαίνει ένα λιγότερο ζεύγος εναρκτών για τη διαγνωστική Π-ΑΑΠ. Αυτό δεν μπορεί να μεταφραστεί σε λιγότερο πολύπλοκες αντιδράσεις Π-ΑΑΠ, με σχετικώς λίγα ζεύγη, παρά μόνο βραχυπρόθεσμα. Οι απαιτήσεις ανάλυσης στη διάγνωση είναι τόσο μεγάλες και τόσο ταχέως αυξανόμενες, που κάθε τέτοια εξοικονόμηση πρέπει να θεωρείται όχι ως ένα ζεύγος λιγότερο (με πλεονεκτήματα μείωσης θορύβου, αύξηση ειδικότητας και απόδοσης και επίλυση προβλημάτων σχεδιασμού και αλληλεπιδράσεων), αλλά ως ένα ακόμη διαφορετικό ζεύγος εναρκτών, που θα ανιχνεύει έναν ή περισσότερους μικροοργανισμούς επιπλέον. Η τεράστια οικονομία αντιδράσεων, που επιφέρει η χρήση γενικών εναρκτών, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μεσοπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα, παρά για τον επιπλέον εμπλουτισμό του φάσματος ανίχνευσης της μεθόδου στο εγγύς μέλλον, για να αποτελέσει υποθήκη ανάπτυξης για την κάλυψη μελλοντικών διαγνωστικών αναγκών.

4.4. Οικονομικές παράμετροι

Όπως προαναφέρθηκε, το μεγάλο οικονομικό πλεονέκτημα της νέας μεθοδολογίας είναι η πολλαπλή επεξεργασία δειγμάτων (ή, για την ακρίβεια, δείγματος). Ενώ παλαιότερες δοκιμασίες πολλαπλού υπόβαθρου ανέλυαν πολλά ομοιοειδή δείγματα από διαφορετικούς ασθενείς, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες όταν τα προς επεξεργασία δείγματα δεν ήταν αρκετά (κενά φρεάτια επί εντυπωμένης πλάκας, που δεν μπορούσαν πάντα να χρησιμοποιηθούν σε επόμενη εξέταση, κατανάλωση μαρτύρων και πρότυπων δειγμάτων για λιγότερα από το μέγιστο αριθμό κλινικών δειγμάτων), στις συστοιχίες το πράγμα αλλάζει. Μια συστοιχία μπορεί να ελέγξει το δείγμα ενός ασθενούς για μια ποικιλία μικροοργανισμών. Και πάλι όμως υπάρχει ένας παράγοντας σπατάλης: Σε πολλές περιπτώσεις δεν θα είναι ιατρικά σκόπιμο να εξεταστούν από την επιφάνεια, διά της οποίας εκτελείται η δοκιμασία, όλοι οι ανιχνεύσιμοι μικροοργανισμοί, για ποικιλία διαγνωστικών λόγων (ένα πρόβλημα που αντιμετωπίζεται από τα ασφαλιστικά ταμεία στην έγκριση μέρους μόνο των δυνατών μικροβιολογικών εξετάσεων μερικών δειγμάτων). Σε μερικές περιπτώσεις ίσως να φαίνεται ότι η Μ-ΑΑΠ είναι περισσότερο αποδοτική οικονομικά και πλήρως επαρκής λύση από πλευράς διάγνωσης.

Υπάρχουν δύο λόγοι για να υποστηριχθεί ότι, εδώ, αυτό το πρόβλημα σπατάλης είναι σχετικά μικρό: Πρώτον, το μικρό κόστος των αντιδράσεων (επιπλέον αντιδράσεις απαιτούν μόνο επιπλέον εναρκτές και όχι προσθήκη άλλων αντιδραστηρίων σε αυξημένες ποσότητες) και η ανυπαρξία ακριβών και περιορισμένης ποσότητας προτύπων και μαρτύρων για την ανάγνωση μέσω προτύπων καμπυλών. Δεύτερον, η δυναμική ευκαμψία της τεχνικής. Στις ανωτέρω παραγράφους περιγράφηκε η ιδέα της «μέγιστης πυκνότητας» επιφάνειας δοκιμασιών, αλλά αυτό δεν είναι απαραίτητα το βέλτιστο ενδεχόμενο για την εργαστηριακή διάγνωση νόσων ή λοιμώξεων. Πιθανώς, θα πρέπει να δημιουργηθούν ειδικές συστοιχίες, που θα διαχωρίζουν όξι συγγενείς μικροοργανισμούς –κάτι πολύτιμο από επιδημιολογική και ταξινόμική άποψη– αλλά και οργανισμούς που, ενώ θα ομαδοποιούνται από την πρόκληση κοινής συμπτωματολογίας ή νόσων με κοινή κλινική εικόνα, πιθανόν θα διαφέρουν πολύ φυλογενετικά και συνεπώς θα απαιτούν διαφορετικά ζεύγη εναρκτών για την ιχνηλάτησή τους. Η διαφοροποίηση των συστοιχιών δεν σημαίνει απαραίτητα και διαφοροποίηση στο μίγμα εναρκτών Π-ΑΑΠ. Ένα ζεύγος εναρκτών μπορεί να εντοπίζει κάλλιστα ένα μικροοργανισμό που ευθύνεται για πνευμονία και δύο άλλους που ευθύνονται για ηπατικές παθήσεις ή ενδοκαρδίτιδα. Αυτό σημαίνει ότι η δημιουργία ειδικών για την περίπτωση συστοιχιών (μία για διάγνωση παραγόντων που προκαλούν πνευμονία και μια γι' αυτούς που προκαλούν ενδοκαρδίτιδα) δεν θα συμβάλει, καταρχήν, στη μείωση εναρκτών στο μίγμα αντιδράσεων. Η διαφοροποίηση, εν πολλοίς, θα περιορίζεται στον αριθμό ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηθετών επί της συστοιχίας.

Φυσικά, θα υπάρχουν και περιπτώσεις όπου όντως κάποια ζεύγη εναρκτών θα είναι πλεονασματικά για τη διευκρίνιση ενός διαγνωστικού προβλήματος, οπότε θα μπορούν να απαλειφθούν από το μίγμα εναρκτών της Π-ΑΑΠ. Αυτό πάντα διευκολύνει την ειδικότητα και αυξάνει το λόγο σήματος προς θόρυβο και την απόδοση των αντιδράσεων. Το πρακτικό πρόβλημα είναι ότι, προκειμένου για δοκίμια προτυποποιημένα για εκατοντάδες ή χιλιάδες εξετάσεις, θεωρείται απίθανη η μίξη εναρκτών πριν από την εκάστοτε αντίδραση για ειδική, προς το σκοπό αυτό, σύνθεση μίγματος. Πολύ πρακτικότερη φαίνεται η ύπαρξη έτοιμου μίγματος εναρκτών, όπου απλά κάποιοι θα πλεονάζουν σε μια αντίδραση. Από την άλλη μεριά, η ταχεία πρόοδος υπολογιστών, λογισμικών εργαλείων και ρομποτικών μηχανημάτων δεν αποκλείεται να επιτρέψει τέτοιες επεμβάσεις προς πλήρως ειδικά μίγματα, ενώ κάτι τέτοιο, αν και ακόμα δυσχερέστερο, δεν είναι ανέφικτο ούτε για τις συστοιχίες. Είναι

πιθανή η εξέλιξη των συστημάτων εντύπωσης συστοιχιών σε τέτοιο βαθμό, ώστε η συστοιχία να τυπώνεται κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της Π-ΑΑΠ, με τους απαιτούμενους για την περίπτωση τόπους, κάτι που σημαίνει μικρότερο θόρυβο σήματος και μεγάλη οικονομία αντιδραστηρίων. Πάντως, αυτά τα δύο βήματα είναι ακόμη σχετικά μακρινό ενδεχόμενο –αν και πλήρως εφικτό– λόγω του κόστους και των απαιτήσεων υποδομής/χειρισμού των μηχανημάτων εντύπωσης συστοιχιών. Για άμεση-μεσοπρόθεσμη διαγνωστική μαζική χρήση, καθένας μάλλον πρέπει να αναμένει συστοιχίες διαφορετικών συνδυασμών για διαφορετικά διαγνωστικά προβλήματα, παραγγεληθείσες μαζικά σε ειδικές εταιρείες. Φυσικά, κάτι τέτοιο μειώνει, όπως στιδήποτε προκατασκευασμένο, την ευκαμψία διάγνωσης και εκτέλεσης εξετάσεων ή αναλύσεων. Όμως, κάποιος οφείλει να παρατηρήσει ότι η διάγνωση θα μετακινηθεί αναπόφευκτα από την εξέταση των «πιθανών» ενδεχομένων, στα οποία παραπέμπει συγκεκριμένη κλινική εικόνα, στην εξέταση των «δυνατών» ενδεχομένων για την προκείμενη κλινική εικόνα (και αυτό είναι συντηρητική επιλογή, καθώς ένα παραπάνω βήμα είναι η εξέταση και των θεωρούμενων ως «αδύνατων» ενδεχομένων, που δείχνουν συχνά μια τάση αλλαγής κατηγορίας και μετανάστευσης στα «δυνατά»). Αυτό άμεσα πολλαπλασιάζει τα προς εξέταση ενδεχόμενα και καθιστά απολύτως ορθολογική τη χρήση Π-ΑΑΠ/ συστοιχιών για την αντιμετώπιση σχεδόν κάθε διαγνωστικού προβλήματος. Λογικά δε και επιστημονικά, είναι πολύ ορθότερη προσέγγιση από την παλαιότερη εμπειρική ιεράρχηση πιθανοτήτων, που έδινε μεν χροιά ανθρωπιστικής τέχνης στην Ιατρική,⁷⁶ αποτελούσε όμως ουσιαστικά συμβιβασμό ένεκα των διαθέσιμων δυνατοτήτων των διαγνωστικών μεθόδων. Η δε εμπειρική ιεράρχηση πιθανοτήτων, η ανεπάρκεια του εμπειρισμού αυτού καθαυτού και τα περιθώρια σφάλματος, που αυτός ενέχει, ενδέχεται να ευθύνονταν για διαγνωστικές και θεραπευτικές αποτυχίες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στους νέους συνεργάτες του Κέντρου Αναφοράς Μυκητιάσεων, Ιατρούς όλων των ειδικοτήτων, στους επιστήμονες και τους τεχνικούς, που με εξαιρετική οξυδέρκεια και επαγγελματισμό αποδεικνύουν με την έμπρακτη συμμετοχή τους στα εξελικτικά βήματα του εργαστηρίου ότι η διεύρυνση των γνωστικών αντικειμένων κατά την παρούσα μεταγονιδιατική εποχή δεν καταργεί ούτε και απειλεί τις ήδη υπάρχουσες βιοϊατρικές ειδικότητες, αλλά τις ανακαινίζει και τις εκσυγχρονίζει.

ABSTRACT

**Arrays and multiplex PCR: Revolutionary molecular biological methods
with applications in biomedical practice**

Α. ΒΕΛΕΓΡΑΚΗ,¹ Μ.Ε. ΚΑΜΒΟΥΡΙΣ²

¹*Mycology Reference Laboratory, Department of Microbiology, Medical School, National University of Athens, Greece,* ²*The Cancer Institute of N. Jersey-Department of Molecular Genetics, Microbiology and Immunology, Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, NJ, USA*

Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(4):425-445

Amongst a multitude of emerging molecular methods, multiplex PCR and the microarrays are two methods of extreme importance. Both are evolutionary –rather than revolutionary– spinoffs of existing, well-established techniques which increase by several orders of magnitude the effectiveness of their predecessors. Their expansion stimulated development of supplementary procedures to ensure dependable sample processing, analysis of data and interpretation of the results. The arrays, in particular, have initiated immense progress in numerous fields seemingly unrelated to the Biosciences, ultimately creating new areas within the disciplines of the Biosciences through featuring high throughput processing in parallel. Thus, the sciences of Genomics, Pharmacogenomics, Proteomics, Metabolomics, Toxicogenomics, Pharmacogenomics and Bioinformatics have emerged. The combination of the two techniques offers revolutionary prospects, despite creating the necessity for design, infrastructure, know-how and dependable methodologies for result confirmation and the engineering of related hardware components. Coupling these systems with modern procedures for signal production, detection, evaluation and analysis can lead to extraordinary levels of micro-sample analysis. Such specifications are by definition invaluable to medical diagnostics, but the eventual users so far remain sceptical, preferring more conventional approaches. Moreover, approaches in medical diagnostics are still tentative and clearly a by-product of other related fields, such as Genetics, which embraced the new technology earlier. Thus, diagnostic arrays are usually adapted versions of those already existing in other research fields. Optimization of the combined multiplex PCR/microarray techniques for diagnostic purposes will provide the acute discriminatory power needed for diagnosis of an increasing number of pathogens and may offer the sole solution to increasingly intricate diagnostic challenges.

Key words: Arrays, Diagnostics, Multiplex PCR

Βιβλιογραφία

1. SOUTHERN EM. DNA chips: analyzing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* 1996, 12:110–115
2. HACIA JC. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 1999, 21:42–47
3. VENTUROLI S, CRICCA M, BONVICINI F, GIOSA F, PULVIRENTI F, GALLI C ET AL. Human papillomavirus DNA testing by PCR-ELISA and hybrid capture II from a single cytological specimen: concordance and correlation with cytological results. *J Clin Virol* 2002, 25:177–182
4. KULKARNI SP, LEVER S, LOGAN JM, LAWSON AJ, STANLEY J, SHAFI MS. Detection of *Campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol* 2002, 55:749–753
5. HOLLZHAUSER T, STEPHAN O, VIETHS S. Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avella*) residues in food: A comparative study with DNA PCR-ELISA and protein sandwich ELISA. *J Agric Food Chem* 2002, 9:5808–5815
6. BOCHER BR, GADZINSKI P, PANOMITROS E. Phenotypic microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* 2001, 11:1246–1255
7. RICHMOND CS, GLASNER JD, MAU R, HOGFAN J, BLATTNER R. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 1999, 27:3821–3835
8. HANNU TT, TOIVONEN T, ONKAMO O, VASKO K, OLLIKAINEN V, SEVON P ET AL. Data mining applied to linkage disequilibrium mapping. *Am J Hum Genet* 2000, 67:133–145
9. MCCARTHY JJ, HILFIKER R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol* 2000, 18:505–508
10. COLLINS FS, GUYER MS, CHAKRAVATI A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 1997, 278:1580–1581
11. RISCH N, MERIKANGAS K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996, 273:1516–1517

12. LENDERGEN U, NILSSON M, KWOK PY. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 1998, 8:769–776
13. HACIA JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 1999, 21:42–47
14. PATTERSON S. Selecting targets for therapeutic validation through differential protein expression using chromatography-mass spectrometry. *Bioinformatics* 2002, 18(Suppl 2):181–189
15. VONDRISKA TM, PING P. Functional proteomics to study protection of the ischaemic myocardium. *Expert Opin Ther Targets* 2002, 6:563–570
16. BENVENUTI S, CRAMER R, BRUCE J, WATERFIELD MD. Identification of novel candidates for replicative senescence functional proteomics. *Oncogene* 2002, 21:7609–7613
17. TAYLOR J, KING RD, ALTMAN T, FEHN O. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. *Bioinformatics* 2002, 18(Suppl 2):241–248
18. RICHBURG J, JOHNSON K, SCHOENFELD H, MEISTRICH M, DIX D. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol Lett* 2002, 135:167
19. BARTOSIEWICZ M, PENN S, BUCKPITT A. Application of gene arrays in environmental toxicology: fingerprints of gene regulation associated with cadmium chloride, benzo(a)pyrene and trichloroethylene. *Environ Health Perspect* 2001, 109:71–74
20. ABEL PD. TBT—towards a better way to regulate pollutants (editorial). *Sci Total Environ* 2000, 258:1–4
21. THEODORAKIS CW. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* 2001, 10:245–256
22. STATON JL, SCHIZAS NV, CHANDLER GT, COULL BC, QUATTRO JM. Ecotoxicology and population genetics: The emergence of “Phylogeographic and Evolutionary Ecotoxicology”. *Ecotoxicology* 2001, 10:217–222
23. STRIZHKOV BN, DROBYSHEV AL, MIKHAILOVICH VM, MIRZABEKOV AD. PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: Detection of bacterial toxin and drug resistant genes and their mutations. *Biotechniques* 2000, 29:844–850
24. COWEN LE, NANTEL A, WHITEWAY MS, THOMAS Y, TESSIER DC, KOHN LM ET AL. Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*. *PNAS* 2002, 99:9284–9289
25. VELEGRAKI A, MENOUNOS PG, TOUKAS D, ARSENI G, FRANGOULIS E, BELESSIOTOU E ET AL. Typing Greek clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* by PCR-SSCP. 5th International Conference *Cryptococcus* and cryptococcosis, Adelaide, Australia, 2002
26. HUBER M, LORSET D, HILLER R, HARWANEGG C, MUELLER MW, SCHIDT WM. Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase reaction on oligonucleotide microarrays. *Anal Biochem* 2001, 299:24–30
27. HALL JG, EIS PS, LAW SM, REYNALDO L, PRUDENT JR, MARSHALL DJ ET AL. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *PNAS* 2000, 97:8272–8277
28. MILLER RD, KWOK PY. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine. *Hum Mol Genet* 2001, 20:2195–2198
29. LIZARDI PM, HUANG X, ZHU Z, BRAY-WARD P, THOMAS DC. Mutation detection and single molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* 1998, 19:225–232
30. WITTEWER CT, HERRMANN MG, GUNDRY CN, ELENITOBA-JOHNSON KSJ. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 2001, 25:430–442
31. LIN Z, CUI X, LI H. Multiplex genotype determination at a large number of gene loci. *PNAS* 1996, 93:2582–2587
32. LEE MA, BRIGHTWELL G, LESLIE D, BIRD H, HAMILTON A. Fluorescent detection techniques for real-time multiplex strand specific detection of *Bacillus anthracis* using rapid PCR. *J Appl Microbiol* 1999, 87:218–223
33. CAMPBELL GR, PROSSER J, GLOVER A, KILLHAM K. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *J Appl Microbiol* 2001, 91:1004–1010
34. HSIH HY, TSEN HY. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp in food samples. *J Food Prot* 2001, 64:1744–1750
35. LINDSTROM M, KETO R, MARKKULA A, NEVAS M, HIELM S, KORKEALA H. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in food and fecal material. *Appl Environ Microbiol* 2001, 67:5694–5699
36. YEBOAH-MANU D, YATES MD, WILSON SM. Application of a simple multiplex PCR to aid in routine work of the mycobacterium reference laboratory. *J Clin Microbiol* 2001, 39:4166–4168
37. LOUIE L, GOODFELLOW J, MATHIEU P, GLATT A, LOUIE M, SIMOR AE. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002, 40:2786–2790
38. LI JW, WANG XW, YUAN CQ, ZHENG JL, JIN M, SONG N ET AL. Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World J Gastroenterol* 2002, 8:699–702
39. QUERADA C, CORRAL I, LAGUNA F, VALENCIA ME, TENORIO A, ECHEVERRI JE ET AL. Diagnostic utility of a herpesvirus PCR assay performed with cerebrospinal fluid from human immunodeficiency virus-infected patients with neurological disorders. *J Clin Microbiol* 2000, 38:3061–3067
40. CHEN RS, TSAY JG, HUANG YF, CHIOU RY. Polymerase chain reaction-mediated characterization of molecules belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *Aspergillus parasiticus* in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction. *J Food Prot* 2002, 65:840–844
41. FUJITA SI, SENDA Y, NAKAGUSHI S, HASHIMOTO T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3617–3622
42. CHANG HC, LEAW SN, HUANG AH, WU TL, CHANG TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001, 39:3466–3471
43. RUBIO JM, POST RJ, VAN LEEUWEN WM, HENRY MC, LINDERGARD G, HOMMEL M. Alternative polymerase chain reaction to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002, 96:199–204

44. EVANGELOPOULOS A, SPANAKOS G, PATSOULA E, VAKALIS N, LEGAKIS N. A nested, multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. *Ann Trop Med Parasitol* 2000, 94:233–240
45. WINDELL L, TACHIBANA RH, SILVA-TAHAT AMR, UEMURA H, KANBARA H. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res* 1996, 82:585–589
46. SANUKI JI, ASAI T, OKUZAWA E, KOBAYASHI S, TAKEUCHI T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. *Parasitol Res* 1997, 83:96–98
47. NUNEZ YO, FERNADEZ MA, TORRES-NUNEZ D, SILVA JA, MONTANO I, MAESTE JL ET AL. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from stool samples. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64:293–297
48. ZARLENGA DS, CHUTE MB, MARTIN A, KAPEL CM. A single multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*. *Parasite* 2001, 8:24–26
49. PATEL S, PEDRAZA-DIAZ S, McLAUCHLIN J. The identification of *Cryptosporidium* species and *C. parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. *Int J Parasitol* 1999, 29:1241–1247
50. LORENZ CM. Genomic approaches to fungal pathogenicity. *Curr Opin Microbiol* 2002, 5:372–378
51. HOOGENDOORN B, NORTON N, KIROV G, WILLIAMS N, HAMSHERE ML, SPURLOCK G ET AL. Cheap accurate and rapid allele frequency estimation of single nucleotide polymorphisms by primer extension and DHPLC DNA pools. *Hum Genet* 2000, 107:488–493
52. NAIR S, BROCKMAN A, PAIPHUM L, NOSTEN F, ANDERSON TJ. Rapid genotyping of loci involved in antifolate drug resistance in *Plasmodium falciparum* by primer extension. *Int J Parasitol* 2002, 32:852–858
53. ERDOGEN F, KIRCHNER R, MANN W, ROPERS HH, NUBER UA. Detection of mitochondrial nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res* 2001, 29:E36–E42
54. BARTA HC, RONAI Z, SASVARI-SZEKELY M, GUTTMAN A. Rapid single nucleotide polymorphism analysis by primer extension and capillary electrophoresis using polyvinyl pyrrolidone matrix. *Electrophoresis* 2001, 22:779–782
55. KAMBOURIS M, CUI XF, WANG HY, SEVDALIS E, FRIKKER M, LI H. Toward establishing an SNP scoring system for genome-scale analysis. Annual Retreat on Cancer Research, Princeton, NJ, USA, 2001, Book of Abstracts, PO37:57
56. KAMBOURIS M, LI H. Selection and validation of experimentally suitable SNPs for 150 loci. 4th Annual Research Day, Robert Wood Johnson Medical School, NJ, USA, 2002, Book of Abstracts, 4:42
57. WHO. *Environmental epidemiology*. National Academy Press, Geneva, 2000:219–255
58. VLASSOPOULOS D, KOUPPARI G, ARVANITIS D, PAPAESTATHIOU K, DOUVANIS A, VELEGRAKI A ET AL. *Wangiella dermatitidis* peritonitis in a CAPD patient. *Perit Dial Int* 2001, 21:96–97
59. SANCHEZ JL, STORCH GA. Multiplex quantitative, real-time PCR assay for cytomegalovirus and human DNA. *J Clin Microbiol* 2002, 40:2381–2386
60. KOX LF, JANSEN HM, KUIJPER S, KOLK AH. Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with mycobacterial disease. *J Clin Microbiol* 1997, 35:1492–1498
61. CORMICAN MG, JONES RN. Use of multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1995, 33:22–30
62. RAMISSE V, PATRA G, GARRIGUE H, GUESTON JL, MOCK M. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids; XO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1996, 145:9–16
63. DEFOORT JP, MARTIN M, CASANO B, PRATO S, CAMILLA C, FERT V. Simultaneous detection of multiplex-amplified human immunodeficiency virus type I RNA, hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA using a flow cytometer microsphere-based hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2000, 38:1066–1071
64. TERRA AP, SILVA-VERGARA ML, GOMES RA, PEREIRA CL, SIMPSON AJ, CABELLERO OL. Monitoring AIDS patients for the development of cytomegalovirus (CMV) disease using multiplex PCR. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000, 33:583–589
65. ROBERTS TC, STORCH GA. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997, 35:268–269
66. RATHOD PK, GANESAN K, HAYWARD RE, BOZDECH Z, DeRISI JL. DNA microarrays for malaria. *Trends Parasitol* 2002, 18:39–45
67. PETRIK J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang* 2001, 80:1–11
68. CORTINI C, SERACENI S, MISURATI E, GRILLI A, ROMANI R, CULTERA R. A multiplex PCR assay for molecular recognition of *Toxoplasma gondii* stage-specific genes. *J Eukaryot Microbiol* 2001, (Suppl):191–192
69. ZARLENGA DS, BARRY CM, GASBARRE LC, BOYD PC. A multiplex PCR for differentiating economically important gastrointestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 2001, 97:199–209
70. MANGUIN S, MOUCHET J, COOSEMANS M. Molecular identification of sibling *Anopheles* species: examination of the *Anopheles minimus* and *Anopheles dirus* complexes, major malarial vectors in SE Asia. *Med Trop* 2001, 61:463–469
71. HOLT R, SUBRAMANIAN GM, HALPERN A, SUTTON GG, CHARLBAR, NUSSKERN DR ET AL. The genome sequence of *Anopheles gambiae*. *Science* 2002, 298:129–136
72. SHARAKHOV IV, SERAZIN AC, GRUNSKO OG, DANA A, LOBO N, HILLNEMEYER ET AL. Inversions and gene shuffling in *Anopheles gambiae* and *A. funestus*. *Science* 2002, 298:182–185
73. RANSON H, CLAUDIANOS C, ORTELLI F, ABGRALL C, HEMINGWAY J, SARAKHOVA MV ET AL. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 2002, 298:179–181
74. HERDOLIN PH, PAULIN L, KOUKILA-KAHKOLA P, ANTILA VJ, MALBERG H. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000, 38:4186–4192

75. MURAD AMA, D'ENFERT C, GAILLARDIN C, TOURNU H, TEKALA F, TALIBI D ET AL. Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaT-up1, CaMig1 and CaNrg1. *Mol Microbiol* 2001, 42:981–993

76. *The Genuine works of Hippokrates*. Translated by Francis Adams. Williams and Co, Baltimore, MD, USA, 1999

Corresponding author:

A. Velegaki, 2–4 Vrastovou street, GR-115 24 Athens, Greece

