



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθύντρια: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευθυμία Πετεινάκη

Διδακτορική Διατριβή

"ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ
ΠΟΛΥΠΟΔΩΝ ΤΗΣ ΜΥΤΗΣ"

υπό

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Γ.ΙΩΑΝΝΙΔΗ

Χειρουργού Ωτορινολαρυγγολόγου

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2015

© 2015 Δημήτριος Ιωαννίδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

- 1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)** Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 2^{ος} Εξεταστής** Δρ. Χαράλαμπος Σκουλάκης
Επίκουρος Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 3^{ος} Εξεταστής** Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης
Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 4^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης Μπιζάκης
Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας
- 5^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ιωάννης Χατζηϊωάννου
Επικύριος Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 6^{ος} Εξεταστής** Δρ. Αναστάσιος Γερμενής.
Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** Δρ. Ματθαίος Σπελέτας.
Αναπληρωτής Καθηγητής Ανοσολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην εκπόνηση αυτής της διατριβής υπήρξαν σημαντικοί άνθρωποι που προσέφεραν τη βοήθειά τους. Η αναφορά σε αυτούς αποτελεί ένα ελάχιστο δείγμα σεβασμού και ευγνωμοσύνης. Ένα μεγάλο ευχαριστώ:

Στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Ευθυμία Πετεινάκη, Χαράλαμπο Σκουλάκη και Κωσταντίνο Γουργουλιάνη για την αμέριστη υποστήριξη, καθοδήγηση και συμπαράστασή τους σε όλα τα στάδια αυτού του πονήματος και ιδιαίτερα την κα Ευθυμία Πετεινάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το έργο αυτό και τον κ Χαράλαμπο Σκουλάκη, που αποτέλεσε ακούραστο συμπαραστάτη, πρότυπο μίμησης και πηγή έμπνευσης για όλο αυτό το διάστημα.

Τους κκ Τιμολέων Τερζή και Βασίλη Λαχανά για την αμέριστη βοήθεια, ηθική και έμπρακτη στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφεραν συμβάλλοντας καθοριστικά στην υλοποίηση του αυτού πονήματος.

Τους κκ Ζωή Φλώρου, Παρασκευή Τσιρέβελου, Χαράλαμπο Πατραλέξη, Δήμητρα Κλάψα, Χάρη Νεοκλέους, Σοφία Καυκή, Παναγιώτη Παναγιωτουνάκο, Ελισάβετ Τσανεκλίδου, Ανδρέα Τσιτσικά, Γεώργιο Κρεμλή, Ιωάννη Σταυράκη, Ελένη Κακούρη, Γεώργιο Βελεγράκη, Εμμανουήλ Προκοπάκη, Αλέξανδρο Καρατζάκη, Στεριανή Τσιουβάκα και Σταυροπούλου Μαρία για την ανιδιοτελή βοήθειά τους.

Τους γονείς μου, Στυλιανή και Γεώργιο, τα αδέρφια μου Παναγιώτα και Χρήστο και τη σύντροφό μου Σταυρούλα για την αμέριστη ηθική συμπαράσταση.

Δημήτριος Γ.Ιωαννίδης

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Ο Δημήτριος Ιωαννίδης, του Γεωργίου και της Στυλιανής, γεννήθηκε και μεγάλωσε στο Βόλο, όπου ολοκλήρωσε τις δευτεροβάθμιες σπουδές. Το 1997 εισήχθη στη Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από όπου αποφοίτησε το 2003 με βαθμό πτυχίου "Άριστα".

Υπηρέτησε την υπηρεσία υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Τρικεριού κατά το έτος 2004 μετά από τρίμηνη εκπαίδευση στο Αχιλλοπούλειο Νοσοκομείο Βόλου.

Κατά το 2005 υπηρέτησε τη στρατιωτική του θητεία ως Ιατρός Μονάδος στο 147 Τάγμα Εθνοφυλακής στη Χίο.

Ειδικεύτηκε στη Γενική Χειρουργική Κλινική του Αχιλλοπούλειου Νοσοκομείου Βόλου κατά το 2006. Συνέχισε την ειδίκευση του στην Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Νοσοκομείου Βόλου κατά το 2007 και ακολούθως στην Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Λαϊκό» κατά τα έτη 2008-2011. Στο διάστημα αυτό αποσπάστηκε και παρακολούθησε το εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Κλινικής Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής και της Νευροχειρουργικής Κλινικής του Γενικού Κρατικού Νοσοκομείου Αθηνών «Γεώργιος Γεννηματάς» για δύο διαδοχικά εξάμηνα.

Το 2011 έλαβε τον τίτλο της ειδικότητας της Ωτορινολαρυγγολογίας Χειρουργικής Κεφαλής και Τραχήλου μετά από εξετάσεις στην Α' Πανεπιστημιακή Ωτορινολαρυγγολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μετά την κτήση του τίτλου ειδικότητας εντάχθηκε στο δυναμικό της Ριнологικής Ομάδας Αθηνών, όπου παρέμεινε έως τον Απρίλιο του 2013. Κατά την ίδια περίοδο διετέλεσε συνεργάτης ιατρός του Ευγενιδείου Θεραπευτηρίου Αθηνών, των Νοσοκομείων

‘Μητέρα’, ‘Mediterraneo’, ‘Ιατρικό Ψυχικού’, Αθηναϊκή Κλινική, της Εταιρείας ‘Accurate Health Auditing & Consulting’ και της Δευτεροβάθμιας Υγειονομικής Επιτροπής του Υπουργείου Μεταφορών και Συγκοινωνιών της Περιφέρειας Αττικής.

Από τον Απρίλιο του 2013 και έως τον Απρίλιο του 2014 υπηρέτησε ως Επικουρικός Επιμελητής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου ‘ΠΑΓΝΗ’.

Στη συνέχεια διετέλεσε Επιστημονικός Συνεργάτης του Εργαστήριου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έως το Δεκέμβριο του 2014, όπου ολοκλήρωσε την παρούσα Διδακτορική διατριβή.

Από το Δεκέμβριο του 2014 έως τον Ιούλιο του 2015 εργάστηκε ως Specialist Registrar στο Royal Berkshire Hospital στο Reading, UK για να συνεχίσει στη συνέχεια στο Hampshire Hospitals Foundation Trust στο Winchester, UK ως Clinical Fellow in Rhinology & Facial Plastics.

**" ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ
ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΟΔΩΝ ΤΗΣ ΜΥΤΗΣ"**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας- **(Επιβλέπουσα)**,
2. **Δρ. Χαράλαμπος Σκουλάκης**, Επίκουρος Καθηγητής Ωτορινολαρυγγολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης**, Καθηγητής Πνευμονολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της παρουσίας γενετικού υλικού διαφόρων μικροβιακών παραγόντων όπως ερπητοιών (HHV: HSV1, HSV2, VZV, CMV, EBV, HHV6), διαφόρων υποτύπων του ιού του ανθρώπινου θηλώματος HPV (high risk - υποτύποι 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) και low risk - υποτύποι 6, 11, *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydothyla pneumoniae* σε δείγματα ιστών από ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες καθώς και σε υγιείς μάρτυρες, με

σκοπό να εκτιμηθεί ο πιθανός ρόλος των εν λόγω παθογόνων στην παθογένεια της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες. Χρησιμοποιήθηκε η υψηλής ευαισθησίας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time PCR). Τα αποτελέσματα της μελέτης συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι EBV και HHV6 DNA ανιχνεύεται σε δείγματα ασθενών με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από ότι στην ομάδα ελέγχου από άτομα χωρίς χρόνια ρινοκολπίτιδα. Επιπλέον καταδεικνύεται η απουσία HR-HPV and LR-HPV DNA τόσο στην ομάδα της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες, όσο και στην ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει την πλήρη απουσία γενετικού υλικού *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* σε υλικό βιοψίας από ασθενείς με CRwNP καθώς και σε υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την απουσία εμπλοκής των ατύπων αυτών βακτηριδίων στην παθογένεση της CRwNP. Παρόλα αυτά, ενώ δεν φαίνεται πιθανό τα άτυπα αυτά βακτηρίδια να αποτελούν χρόνιο ερεθιστικό παράγοντα που επάγει την φλεγμονώδη διεργασία, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα οι μικροοργανισμοί αυτοί να παίζουν ένα ρόλο στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως άλλωστε έχει καταδειχτεί στη περίπτωση της αλλεργίας και του άσθματος, ή να λειτουργούν ως παράγοντας τροποποίησης της νόσου. Πιθανή κατεύθυνση για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να αποτελέσει μια προοπτική μακροπρόθεσμη μελέτη, που θα αξιολογούσε την επίπτωση CRwNP σε ασθενείς με διαγνωσμένη λοίμωξη από άτυπα βακτηρίδια σε σχέση με υγιείς εθελοντές.

Πίνακας Περιεχομένων

Γενικό μέρος

Πρόλογος

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή. Χρόνια Ρινοκολπίτιδα - Ρινοκοί Πολύποδες.

- 1.1. Ορισμός – Επιδημιολογία.
- 1.2. Χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP).
- 1.3. Ιοί και χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες.

Κεφάλαιο 2. Ιστοπαθολογία των ρινικών πολυπόδων.

- 2.1. Ιστολογία του ρινικού βλεννογόνου.
 - 2.1.1. Δομικά συστατικά.
 - 2.1.2. Μη δομικά συστατικά.
- 2.2. Ιστοπαθολογία των ρινικών πολυπόδων -Χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP).
 - 2.2.1. Μακροσκοπική Παθολογία.
 - 2.2.2. Μικροσκοπική Παθολογία.
- 2.3. Ιστοπαθολογία της βλέννας, συμπεριλαμβανομένης της ηωσινοφιλικής βλέννης.
- 2.4. Χοανοπολύποδες.
- 2.5. Μη φλεγμονώδεις πολυποειδείς βλάβες.
- 2.6. Συμπεράσματα.

Κεφάλαιο 3. Μοριακές τεχνικές -Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

- 3.1. Γενικά.
- 3.2. Στάδια της PCR.
- 3.3. Πλεονεκτήματα της PCR.
- 3.4. Μειονεκτήματα της PCR.
- 3.5. Ποσοτική quantitative / Real-time PCR (qPCR).
- 3.6. Πλεονεκτήματα της ποσοτικής PCR.

Κεφάλαιο 4. Ερπητοϊοί

- 4.1. Ιϊκή δομή.
- 4.2. Κύκλος ζωής των Ερπητοϊών.
- 4.3. Ταξινόμηση.
- 4.4. cmvIL-10
- 4.5. Αναστολή της έκφρασης MHC.

Κεφάλαιο 5. Ιοί του ανθρώπινου θηλώματος - Human Papilloma Virus (HPV).

- 5.1. HPV γονότυποι.
- 5.2. Κύκλος της ζωής του HPV.
- 5.3. Φυσική ιστορία του HPV.
- 5.4. Η ανοσολογική απόκριση στην HPV λοίμωξη.

Κεφάλαιο 6. *Mycoplasma pneumoniae*.

- 6.1. Μικροβιολογία.
- 6.2. Παθογένεση.
- 6.3. Επιδημιολογία.
- 6.4. *Mycoplasma pneumoniae* και άτυπη πνευμονία.
- 6.5. *Mycoplasma pneumoniae* και άσθμα.
- 6.6. Κλινικά χαρακτηριστικά.
 - 6.6.1. Συμπτώματα από την αναπνευστική οδό.
 - 6.6.2. Εξωπνευμονικές εκδηλώσεις.
- 6.7. Εργαστηριακά ευρήματα.

Κεφάλαιο 7. *Chlamydia pneumoniae*.

- 7.1. Παθογενετικοί μηχανισμοί.
- 7.2. Επιδημιολογία.
- 7.3. Κλινικές εκδηλώσεις.

Ειδικό μέρος

Κεφάλαιο 8. Σκοπός

Κεφάλαιο 9. Υλικά και Μέθοδοι

- 9.1. Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης
- 9.2. Λήψη και επεξεργασία του κλινικού δείγματος
 - 9.2.1. Πειραματική διαδικασία
 - 9.2.2. Βήματα εκχύλισης του DNA στο αυτόματο σύστημα Magtraction 12GC

Κεφάλαιο 10. Αποτελέσματα

- 10.1. Αποτελέσματα συμβατικής καλλιέργειας
- 10.2. Αποτελέσματα μοριακής ανίχνευσης

Κεφάλαιο 11. Συζήτηση.

11.1 Ιοί

11.2 Mycoplasma pneumoniae και Chlamydia pneumoniae.

Κεφάλαιο 12. Συμπεράσματα.

Βιβλιογραφία

Παράρτημα

1. Παρουσιάσεις σε Συνέδρια.

1.1. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας Χειρουργικής Κεφαλής & Τραχήλου (Athens 2011).

1.2. 5th World Congress for Endoscopic Surgery (Vienna 2012).

1.3. 22ο Μετεκπαιδευτικό ΩΡΛ Σεμινάριο (Thessaloniki 2014).

2. Δημοσιεύσεις.

2.1. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (Sep 2015).

2.2. Journal of Laryngology & Otology (Jul 2015).

Πρόλογος.

Η χρόνια ρινοκολπίτιδα (CRS) χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του βλεννογόνου ρινός – παραρρινίων, η οποία εμμένει για περισσότερες από 12 εβδομάδες παρά την φαρμακευτική αγωγή. Πρόκειται για μια από τις συχνότερες παθήσεις, που προσβάλλει περίπου το 10,9% του Ευρωπαϊκού πληθυσμού. Η CRS διακρίνεται σε δύο κλινικά και φαινοτυπικά διακριτές υποκατηγορίες: α) τη χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP) και β) τη χρόνια ρινοκολπίτιδα χωρίς ρινικούς πολύποδες (CRsNP).

Η αιτιοπαθογένεση της οφείλεται κυρίως σε διαταραχή της αλληλεπίδρασης περιβάλλοντος – οργανισμού. Παρόλο που η αναζήτηση των εξωγενών παραγόντων, που προάγουν τη δευτερογενή φλεγμονώδη διεργασία, έχει αποτελέσει πεδίο εκτεταμένης έρευνας, η πιθανότητα συμμετοχής λανθανουσών λοιμώξεων από ιούς και άτυπα βακτήρια έχει ελάχιστα μελετηθεί.

Οι ερπητοϊοί, Herpes Simple Virus-1 (HSV-1), Herpes Simple Virus-2 (HSV-2), Varicella-Zoster Virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr Virus (EBV), and Human Herpes Virus-6 (HHV-6) όπως και ο ιός του ανθρώπινου θηλώματος -Human Papilloma Viruses (HPV), είναι ιοί DNA με την ικανότητα να ενσωματώνονται στο DNA του ξενιστή, να εγκαθιστούν χρόνιες (δια βίου) λοιμώξεις στο βλεννογόνο του ανώτερου αναπνευστικού και να επανενεργοποιούνται σε συνθήκες ανοσοκαταστολής.

Ελάχιστες μελέτες έχουν ερευνήσει τον πιθανό ρόλο των παραπάνω ιών στην παθογένεση των ρινικών πολυπόδων (CRwNP) και τα αποτελέσματά τους είναι

αντικρουόμενα. Επιπρόσθετα, η υψηλής ευαισθησίας quantitative (ποσοτική) real-time PCR τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ιϊκού DNA σε δείγματα από ασθενείς με CRwNP σε δύο μόνο μελέτες.

Παράλληλα, είναι γνωστό ότι άτυπα βακτήρια όπως *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) και *Chlamydophila pneumoniae* (Cp) ευθύνονται για την πρόκληση λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού, όπως πνευμονία της κοινότητας, οξεία βρογχίτιδα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD). Λαμβάνοντας υπόψη τη θεωρία του ενιαίου αεραγωγού, η οποία συνδέει την αλλεργική ρινίτιδα, τη ρινοκολπίτιδα και τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια ως εκδηλώσεις της ίδιας φλεγμονώδους διεργασίας σε έναν ενιαίο αεραγωγό, είναι πιθανό τα άτυπα αυτά βακτήρια να εμπλέκονται στην πρόκληση επίμονης φλεγμονώδους αντίδρασης στο βλεννογόνο της ρινός και των παραρρινίων σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP).

Μέχρι σήμερα ελάχιστες μελέτες έχουν διερευνήσει τον πιθανό ρόλο του *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydophila pneumoniae* σε ασθενείς με CRwNP, και τα αποτελέσματά τους είναι αντικρουόμενα.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η παρουσία γενετικού υλικού διαφόρων μικροβιακών παραγόντων όπως Human Herpes viruses (HHV: HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6), διαφόρων υποτύπων του ιού του ανθρώπινου θηλώματος HPV, {high-risk types (HR-HPV - υποτύποι 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) και low-risk HPV types (LR-HPV - υποτύποι 6, 11) }, *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydophila pneumoniae* σε δείγματα ιστών από ασθενείς με CRwNP καθώς και σε υγιείς μάρτυρες, με σκοπό να εκτιμηθεί ο πιθανός ρόλος των εν λόγω παθογόνων στην παθογένεια της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εισαγωγή.

Κεφάλαιο 1 Χρόνια Ρινοκολπίτιδα - Ρινοκοί Πολύποδες.

1.1 Ορισμός – Επιδημιολογία.

Με βάση τα κριτήρια του European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS) 2012 [1] η χρόνια ρινοκολπίτιδα ορίζεται ως εξής:

Ως χρόνια ρινοκολπίτιδα (CRS) ορίστηκε η παρουσία τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω συμπτώματα:

- Ρινική απόφραξη/ συμφόρηση
- Ρινική καταρροή (πρόσθια/ οπίσθια ρινική καταρροή)
- Πίεση στο πρόσωπο/ Προσωπαλγία
- Υποσμία ή ανοσμία

ένα από τα οποία πρέπει να είναι ρινική απόφραξη ή καταρροή με διάρκεια συμπτωμάτων > 12 εβδομάδες.

Η χρόνια ρινοκολπίτιδα, με (CRwNP) και χωρίς ρινοκοί πολύποδες (CRsNP), αποτελεί μία από τις συχνότερες νοσολογικές καταστάσεις. Μελετες με βάση τα συμπτώματα στις Ηνωμένες Πολιτείες αναφέρουν ότι προσβάλει το 15,5% του πληθυσμού [2] και είναι δεύτερη σε συχνότητα μεταξύ όλων των χρόνιων παθήσεων.

Με δεδομένα ότι η επιβεβαίωση της τελικής διάγνωσης της χρόνιας ρινοκολπίτιδας (CRS) απαιτεί ενδοσκόπηση της μύτης [3] ή CT [4] και το γεγονός ότι η πλειονότητα των

πρωτοβάθμιων ιατρών δεν έχει την εκπαίδευση ή τον εξοπλισμό με αποτέλεσμα υποχρεωτικά να στηρίζεται στα συμπτώματα για τη διάγνωση, είναι δυνατό η υψηλή της συχνότητα να συνδέεται σε ένα βαθμό με υπερδιάγνωση [5]. Ο επιπολασμός της νόσου είναι σημαντικά υψηλότερος στις γυναίκες με αναλογία γυναικών/ανδρών του 3/2 [2]. Επιπρόσθετα αυξάνεται με την ηλικία, με μέση τιμή 2,7% και 6,6% στις ηλικιακές ομάδες 20-29 και 50 - 59 έτη, αντίστοιχα. Μετά την ηλικία των 60 ετών, ο επιπολασμός της χρόνιας ρινοκολπίτιδας σταθεροποιείται στο 4,7% [6].

Το δίκτυο Global Allergy and Asthma Network of Excellence (GA2LEN) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η συνολική επίπτωση της νόσου με βάση τα κριτήρια EP3OS ήταν 10,9%, με εύρος 6.9-27.1 [7].

1.2 Χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP).

Οι μεγάλοι ρινικοί πολύποδες είναι ορατοί με πρόσθια ρινοσκόπηση, ενώ για τη διάγνωση μικρότερων ρινικών πολυπόδων απαιτείται ρινική ενδοσκόπηση. Επομένως η ρινική ενδοσκόπηση είναι αποτελεί προϋπόθεση για μια ακριβή εκτίμηση της επίπτωσης των ρινικών πολυπόδων [8]. Διάκριση πρέπει να γίνει μεταξύ κλινικά ασυμπτωματικών και συμπτωματικών ρινικών πολυπόδων. Οι ασυμπτωματικοί πολύποδες μπορεί να ανακαλυφθούν ως τυχαίο εύρημα κατά την κλινική εξέταση. Και οι συμπτωματικοί πολύποδες μπορεί να παραμένουν αδιάγνωστοι, είτε επειδή δεν είναι ορατοί κατά τη πρόσθια ρινοσκόπηση ή/και επειδή οι ασθενείς δεν προσέρχονται στο γιατρό τους για το πρόβλημα αυτό. Οι ασθενείς που προσέρχονται στο γιατρό είναι εκείνοι με την πιο εκτεταμένη ρινική πολυποδίαση, τη μεγαλύτερη μείωση της μέγιστης εισπνευστικής ροής και τη μεγαλύτερη μείωση της αίσθησης της όσφρησης [9].

Σε πληθυσμιακές μελέτες σε διάφορες χώρες ο επιπολασμός της ρινικής πολυποδίασης ποικίλει. Σε μελέτη από τους Johansson et al [8] στη Σουηδία με χρήση της ρινικής ενδοσκόπησης για τη διάγνωση των ρινικών πολυπόδων, περιγράφεται επιπολασμός των ρινικών πολυπόδων στο 2,7% του συνολικού πληθυσμού με μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες (2,2 προς 1), τους ηλικιωμένους (5% σε 60 ετών και άνω) και τους ασθενείς με άσθμα. Αντίθετα σε μελέτη από την Κορέα, ο συνολικός επιπολασμός των πολυπόδων, με χρήση ρινικής ενδοσκόπησης για τη διάγνωση, ο επιπολασμός ήταν 0,5% του συνολικού πληθυσμού [10]. Μελέτες με τη χρήση ερωτηματολογίου σε Φινλανδία, Hedman et al [11] και στη Γαλλία, Klossek et al [12] ανέδειξαν επιπολασμό στο 4,3% και στο 2,1% του ενήλικου πληθυσμού αντίστοιχα. Μελέτες αυτοψίας σε νεκροτομικό υλικό, με χρήση πρόσθιας ρινοσκόπησης, αναφέρουν μια συχνότητα παρουσίας ρινικών πολυπόδων της τάξης του 2% [13], ενώ νεκροτομικές μελέτες στη Δανία, με αφαίρεση ολόκληρης της ρινο-ηθμοειδούς μονάδας, ανέδειξαν ρινικούς πολύποδες σε 5 από 19 πτωματικά παρασκευάσματα [14] και - συνδυάζοντας ενδοσκόπηση ρινός με ενδοσκοπική ρινοχειρουργική των κόλπων [15]- στο 42% 31 αυτοψιών. Από τις μελέτες αυτές, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με ρινικούς πολύποδες δεν αισθάνονται την ανάγκη να αναζητήσουν ιατρική βοήθεια ή ότι η διάγνωση των ρινικών πολυπόδων συχνά διαφεύγει από τον ιατρικό έλεγχο.

Σε μια προοπτική μελέτη για την επίπτωση της συμπτωματικής ρινικής πολυποδίασης, οι Larsen και Tos [16] βρήκαν ότι αυτή είναι 0,86 και 0,39 ανά χίλιους ασθενείς, ανά έτος για άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα. Η επίπτωση της νόσου αυξάνεται με ηλικία, φθάνοντας στο μέγιστο του 1,68 και 0,82 ανά χίλιους ασθενείς, ανά έτος για άνδρες και γυναίκες, αντίστοιχα στην ηλικιακή ομάδα των 50-59 ετών.

Γενικά η ρινική πολυποδίαση εμφανίζεται σε όλες τις φυλές, γίνεται συχνότερη με την ηλικία και έχει μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με άσθμα [1]. Η μέση ηλικία έναρξης είναι περίπου 42 χρόνια, η οποία είναι 7 χρόνια μεγαλύτερη από τον μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης του άσθματος. Είναι ασυνήθιστη κάτω από την ηλικία των 20 ετών και είναι πιο συχνότερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες [1,12, 16, 17].

Η μελέτη της φυσική ιστορίας του άσθματος και της χρόνιας ρινοκολπίτιδας σε 16 κλινικά κέντρα σε 10 ευρωπαϊκές χώρες από τους Szczeklik et al. [18] ανέδειξε ως πρώτο σύμπτωμα της νόσου τη ρινίτιδα η οποία εμφανίζεται κατά μέσο όρο σε ηλικία 30 ετών. Αυτή ήταν ολοετής, ανθεκτική σ τη θεραπεία και προκαλεί απώλεια της όσφρησης σε 55% των ασθενών. Σε μια τυπική περίπτωση ασθενή, 2 χρόνια μετά την έναρξη της ρινίτιδας εμφανίζοταν τα πρώτα συμπτώματα άσθματος, ενώ 4 έτη αργότερα εμφανίζοταν δυσανεξία στην ασπιρίνη ή/και σε άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη – ΜΣΑΦ/ NSAIDS. Ρινικοί πολύποδες διαγιγνώσκονται περίπου την ίδια περίοδο στο 60% των ασθενών. Συνεπώς υπάρχει μια στενή γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μέσης ηλικίας και της έναρξης της ρινίτιδας, του άσθματος, της δυσανεξίας στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ) και τους ρινικούς πολύποδες [18].

Τα τελευταία έτη υπάρχει ενεργή έρευνα για τη συσχέτιση φλεγμονωδών μηχανισμών με την παθογένεση της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες (CRwNP). Παράγοντες που έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας είναι:

-
- Βακτήρια
 - Μύκητες
 - Αλλεργιογόνα
 - Περιβαλλοντικές τοξίνες
 - Ιοί
-

1.3 Ιοί και χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες.

Η άμυνα κατά των αναπνευστικών ιών περιλαμβάνει την έμφυτη, και την επίκτητη ανοσία [19]. Αυτοί οι προστατευτικοί μηχανισμοί προκαλούν φλεγμονώδεις αλλοιώσεις των παραρρινίων κόλπων, οι οποίες είναι ορατές σε αξονική τομογραφία, αλλά θεωρούνται παροδικές [20]. Παρά τη συχνότητα των ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού (URTIs), η πιθανή συσχέτιση των ιών με τη χρόνια ρινοκολπίτιδα (CRS) έχει περιορισμένα μελετηθεί.

Σε ότι αφορά την συσχέτιση των ιών με την αιτιοπαθογένεση της χρόνιας ρινοκολπίτιδας, αυτή θα πρέπει να εξεταστεί μέσα από 3 υποθέσεις:

1. Αποτελούν οι ιοί μια χρόνια πηγή φλεγμονής του βλεννογόνου?
2. Προκαλούν οι ιοί την αρχική προσβολή που προδιαθέτει σε χρόνια ρινοκολπίτιδα?
3. Μπορούν οι ιοί να προκαλέσουν οξείες παροξύνσεις της χρόνιας ρινοκολπίτιδας [21].

Επί του παρόντος οι αποδείξεις ότι οι ιοί μπορούν να αποτελούν μια πηγή χρόνιας φλεγμονώδους ενεργοποίησης της ρινός και των παραρρινίων στη χρόνια ρινοκολπίτιδα είναι πενιχρές.

Οι ιοί έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στο DNA του ξενιστή και θεωρητικά και να προκαλούν λανθάνουσα προσβολή του ανώτερου αναπνευστικού βλεννογόνου. Σε αυτό το πλαίσιο πρόσφατη μελέτη έδειξε παρουσία ρινοϊού σε 21% των δειγμάτων επιθηλιακών κυττάρων κάτω ρινικής κόγχης ασθενών με χρόνια ρινοκολπίτιδα σε αντιδιαστολή με 0% στην ομάδα έλεγχου [22]. Το εύρημα αυτό όμως δεν επιβεβαιώθηκε σε άλλη μελέτη με έλεγχο ενός ευρέος φάσματος ιών του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος [21].

Επιπρόσθετα δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα που να υποστηρίζουν το ρόλο των ιών ως το αρχικό γεγονός που προδιαθέτει στην ανάπτυξη χρόνιας ρινοκολπίτιδας. Αν και αυτή η υπόθεση δεν έχει ερευνηθεί στη χρόνια ρινοκολπίτιδα, έχει αναδειχθεί ότι ιογενείς λοιμώξεις στην πρώιμη παιδική ηλικία συνδέονται με ανάπτυξη άσθματος χρόνια αργότερα [23]. Ο μηχανισμός αυτός παραμένει ασαφής, αλλά μπορεί να σχετίζονται με επιγενετικές αλλαγές επαγόμενες από τους ιούς στους ιστούς του ξενιστή, οι οποίες εκδηλώνονται ως ασθένεια αργότερα στη ζωή [24].

Σε ότι αφορά την πρόκληση εξάρσεων της νόσου, οι ιογενείς λοιμώξεις έχει τεκμηριωθεί ότι εμπλέκονται σαφώς στις παροξύνσεις του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ/COPD) [25-28]. Επιπλέον οι ιογενείς λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού (URTIs) προηγούνται των επεισοδίων της οξείας βακτηριακής ρινοκολπίτιδας, αλλά σε ότι αφορά τις εξάρσεις της χρόνιας ρινοκολπίτιδας, δεν υπάρχουν *in vivo* δεδομένα. Παρόλα αυτά έχει προταθεί ότι ιϊκή προσβολή σε συνδυασμό με κάπνισμα μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων συμβάλλοντας σε οξείες εξάρσεις της χρόνιας ρινοκολπίτιδας [29]. Οι παραπάνω μελέτες έγιναν *in vitro* με τη χρήση δίκλωνου ιϊκού RNA και καπνού τσιγάρου και προκάλεσαν την αύξηση της έκφρασης RANTES σε ρινικά επιθηλιακά κύτταρα, η οποία θα μπορούσε να επάγει μια ηωσινοφιλική αντίδραση *in vivo*.

Συνοπτικά, παρόλο που η πιθανή συσχέτιση μεταξύ ιϊκής λοίμωξης και χρόνιας ρινοκολπίτιδας είναι σχετικά ανεξερεύνητη είναι σαφές ότι είναι δυνατόν αυτή να παίζει ένα ρόλο στην αιτιοπαθογένεση της χρόνιας ρινοκολπίτιδας, καθώς είναι τεκμηριωμένη η ικανότητα των ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού να διασπούν το επιθηλιακό φράγμα του ανώτερου αεραγωγού [30].

Κεφάλαιο 2

Ιστοπαθολογία των ρινικών πολυπόδων.

Ο όρος πολύποδας αναφέρεται στην μακροσκοπική εμφάνιση ογκόμορφης βλάβης που εκπορεύεται από την επιφάνεια του βλεννογόνου και προεξέχει μέσα σε ένα αυλό ή κοιλότητα. Η ιστοπαθολογία των ογκόμορφων βλαβών στη ρινική κοιλότητα και τους παραρρινίους κόλπους είναι ποικίλη και κυμαίνεται από φλεγμονώδεις ρινικούς πολύποδες έως καλοήγη και κακοήγη επιθηλιακά, μεσεγχυματικά, και λεμφαγγειακά νεοπλάσματα [31].

Στο πλαίσιο της χρόνιας ρινοκολπίτιδας (CRS), ο όρος «πολύποδας» αναφέρεται σε μια προβολή καλοήγη, μη κοκκιωματώδη φλεγμονώδη ιστού, με επιθηλιακή επένδυση εντός της ρινός και των παραρρινίων κοιλοτήτων. Επιπλέον, οι ρινικοί πολύποδες έχουν κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά που τους διακρίνουν από το γύρω μη πολυποειδή βλεννογόνο.

2.1 Ιστολογία του ρινικού βλεννογόνου.

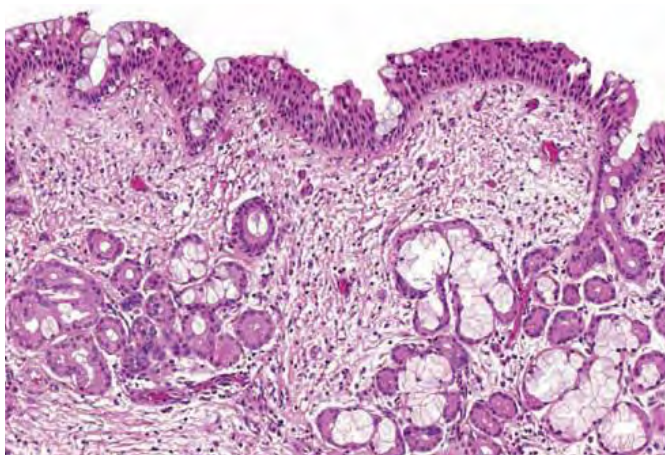
Η τυπική ιστολογία της ρινός και των παραρρινίων χαρακτηρίζεται από δομικά στοιχεία (το επιθήλιο, τη βασική μεμβράνη και τον υποβλεννογόνο ιστό) και μη δομικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των επιχώριων και μη κυττάρων της λεμφοειδούς και μυελοειδούς σειράς.

2.1.1 Δομικά συστατικά.

Επιθήλιο και βασική μεμβράνη: τα πρόσθια 2 εκ της ρινικής κοιλότητας είναι επενδυμένα με δέρμα, που αποτελείται από επιδερμίδα, κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο, χόριο,

και εξαρτηματικούς αδένες. Το υπόλοιπο της ρινικής κοιλότητας είναι επενδυμένο με βλεννογόνο αναπνευστικού τύπου, που προέρχεται από εκτόδερμα (γνωστό επίσης ως μεμβράνη του Schneider).

Ο φυσιολογικός βλεννογόνος ρινός, παραρρινίων απεικονίζεται παρακάτω (Εικ 1)[31]:



Το αναπνευστικό επιθήλιο συνίσταται από τέσσερις βασικούς τύπους κυττάρων: κροσσωτό κυλινδρικό ή κυβοειδές διάσπαρτο με κυπελλοειδή κύτταρα (goblet cells), μη κροσσωτά κυλινδρικά κύτταρα με μικρολάχνες και βασικά κύτταρα.

Η αναλογία κυλινδρικών/κυπελλοειδών (goblet) κυττάρων είναι περίπου 5:1 αλλά ποικίλει ανάλογα με τη θέση [32]. Το φυσιολογικό αναπνευστικού τύπου επιθήλιο εμφανίζει συχνά διάσπαρτες περιοχές μεταπλαστικού πλακώδους επιθηλίου ή κυβοειδούς επιθηλίου και αυτό παρατηρείται κυρίως στις κάτω ρινικές κόγχες [33]. Τα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με συνδέσεις τύπου στενής σύνδεσης (tight junction) και επικάθονται σε μια βασική μεμβράνη, που αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου (τύποι I, III, IV, V, VI, και VII) και άλλα συστατικά που περιλαμβάνουν θεϊκή πρωτεογλυκάνη, λαμινίνη, και εντακτίνη [34]. Η βασική μεμβράνη είναι γενικά λεπτή. Ωστόσο, μπορεί να είναι παχιά στην κάτω ρινική κόγχη.

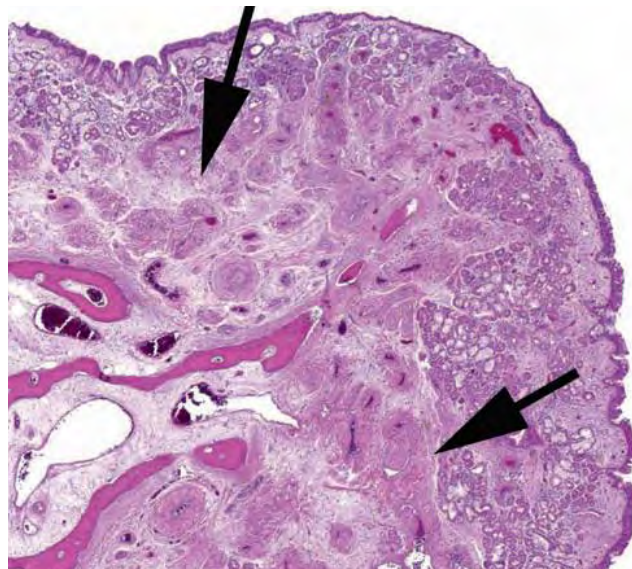
Σε σύγκριση με τη ρινική κοιλότητα, οι παραρρινίοι κόλποι έχουν λεπτότερο επιθήλιο, με λιγότερο εξειδικευμένη επιφάνεια επιθηλίου και lamina propria [35]. Αυτές οι διαφορές στη δομή διάρθρωσης και το κυτταρικό υπόστρωμα μεταξύ του βλεννογόνου των παραρρινίων κόλπων και του βλεννογόνου της ρινικής κοιλότητας ενδέχεται να αντανακλούν τη διαφορετική εμβρυολογική τους προέλευση και λειτουργικές διαφορές [36,37].

Η ανώτερη ρινική κόγχη, η ανώτερη περιοχή του ρινικού διαφράγματος, η οροφή της ρινικής κοιλότητας και άνω και μέσο τμήμα της μέσης ρινικής κόγχης είναι επενδεδυμένα με οσφρητικό επιθήλιο, γνωστό επίσης ως νευροεπιθήλιο [38]. Αυτό είναι επίσης ένα ψευδοπολύστοιβο, κροσσωτό κυλινδρικό επιθήλιο, το οποίο αποτελείται από βασικά κύτταρα, δίπολα κροσσωτά οσφρητικά κύτταρα, κύτταρα με μικρολάχνες, και στηρικτικά κύτταρα. Οι κεντρικοί νευράξονες των οσφρητικών κυττάρων περνούν διαμέσου του τετρημένου πετάλου των ηθμοειδών και συνάπτονται με νευρώνες εντός των οσφρητικών βολβών. Με την πάροδο της ηλικίας, και τους συνοδούς τραυματισμούς και λοιμώξεις, το οσφρητικό επιθήλιο εμφανίζει νησίδες εκφύλισης και επακόλουθης αντικατάστασής από αναπνευστικό επιθήλιο.

Η επιθηλιακή επιφάνεια καλύπτεται από βλέννα που παράγεται από τα κυπελλοειδή (goblet) κύτταρα, υποβλεννογόνιους αδένες, και τα τριχωτά κύτταρα. Η βλέννα προωθείται ενεργά από τους κροσσούς προς τα ανοίγματα των παραρρινίων κόλπων, επιτρέποντας την παροχέτευσή τους μέσα στην ρινική κοιλότητα.

Κάτω από τη βασική μεμβράνη, η υποβλέννιος στοιβάδα που υπέρκειται του χόνδρου και του οστικού τοιχώματος των παραρρινίων κόλπων περιέχει χαλαρό συνδετικό ινοαγγειακό ιστό, στρωματικά κύτταρα, πολλούς οροβλεννώδεις μικρούς σιελογόνους αδένες, αιμοφόρα αγγεία, νεύρα, και μυελοειδή και λεμφοειδή κύτταρα. Πολλαπλοί

οροβλεννώδεις αδένες είναι παρόντες σε επιφανειακά και εν τω βάθει στρώματα και διαχωρίζονται από μεγάλα φλεβικά κολποειδή[31]. Οι λοβώδεις μονάδες των αδένων περιέχουν ορώδη (~ 10%) και βλεννώδη (~ 90%) κοκκία που εκκρίνουν βλεννίνες, ανοσοσφαιρίνες και τα ένζυμα, τα οποία αποχετεύονται διαδοχικά στα εκκριτικά σωληνάκια, τους απεκκριτικούς και τελικά οι τους κύριους εκφορητικούς πόρους, οι οποίοι επικοινωνούν με την επιθηλιακή επιφάνεια. Σε ηλικία πάνω από 60 ετών, οι οροβλεννώδεις αδένες μπορεί να εμφανίσουν εκφυλιστικές αλλαγές, που περιλαμβάνουν την ανώμαλη συσσώρευση μιτοχονδρίων στο κυτταρόπλασμα και του προσδίδουν μια πυκνά κοκκώδη ηωσινοφιλική εμφάνιση κάτω από το μικροσκόπιο. Το υποκείμενο αγγειακό σύστημα αποτελείται από υποεπιθηλιακά τριχοειδή, περιαδενικά μικροαγγεία και πολλαπλές αρτηριοφλεβώδεις αναστομώσεις. Τα τριχοειδή αγγεία έχουν εξειδικευμένες θυρίδες που διευκολύνουν τη διακίνηση ύδατος και συστατικών υψηλού μοριακού βάρους. Αυτά τα δίκτυα επικοινωνούν με φλεβικά κολπωειδή με ακανόνιστο σχήμα που διαμορφώνεται από πολλαπλά λεία μυϊκά στρώματα και είναι πιο εμφανή στον υποβλεννογόνο χιτώνα των ρινικών κογχών (Εικ 2)[31].



Στην περιοχή αυτή, η προβολή και ετερογένεια αυτών των φλεβωδών κολπωειδών μπορεί να δημιουργήσει την εντύπωση μιας αρτηριοφλεβώδους δυσπλασίας ή συραγγώδους αιμαγγειώματος σε όσους δεν είναι εξοικειωμένοι με την τοπική ιστολογία. Οι αδένες είναι συνήθως πιο άφθονοι στην φυσιολογική μέση ρινική κόγχη, ενώ οι φλέβες είναι περισσότερο κυρίαρχες στη φυσιολογική κάτω ρινική κόγχη [39].

2.1.2 Μη δομικά συστατικά.

Το λεμφικό στοιχείο στο βλεννογόνο των παραρρινίων αποτελείται από μεμονωμένα λεμφοκύτταρα. διάσπαρτα ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα και τη βασική μεμβράνη, και το ρινικό λεμφοειδή ιστό (nasal-associated lymphoid tissue/NALT) [40]. Ο ρινικός λεμφοειδής ιστός (NALT) είναι διακριτές μη περιβεβλημένες από κάψα αθροίσεις λεμφοκυττάρων, παρόμοιες με εκείνες στο βλεννογόνο του φάρυγγα (MALT), του εντέρου (Peyer's patches) κ.λ.π. Ωστόσο, ο ρινικός λεμφοειδής ιστός (NALT) δεν είναι τόσο καλά οργανωμένος στο βλεννογόνο της ρινός και των παραρρινίων, αλλά η παρουσία του μπορεί να γίνει πιο έντονη σε χρόνια φλεγμονή. Ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων αποτελείται από κύτταρα T, κύτταρα B και πλασματοκύτταρα, natural killer κύτταρα (NK), T natural killer κύτταρα (NKT) και τα μυελοειδή κύτταρα - μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, κοκκιοκύτταρα (ουδετερόφιλα και ηωσινόφιλα) και σιτευτικά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα αποτελούν αναπόσπαστο συστατικό της εγγενούς και της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης του ρινικού βλεννογόνου [31].

2.2 Ιστοπαθολογία των ρινικών πολυπόδων

Περίπου το 20% των ασθενών με χρόνια ρινοκολπίτιδα έχουν ρινικούς πολύποδες [41]. Η παρουσία πολυπόδων μπορεί να σημαίνει ένα διακριτό τύπο χρόνιας ρινοκολπίτιδας (CRwNP) με εμμένουσα νόσο.

Με την παρουσία ρινικών πολυπόδων σχετίζονται συχνά και άλλες κλινικές οντότητες, που περιλαμβάνουν το άσθμα, το άσθμα σε συνδυασμό με υπερευαισθησία στην ασπιρίνη (τριάδα του Samter), η ηωσινοφιλική χρόνια ρινοκολπίτιδα (συμπεριλαμβανομένης και της αλλεργικής μυκητισιακής ρινοκολπίτιδας), η κυστική ίνωση, η νόσος Churg-Strauss, το σύνδρομο Kartagener και το σύνδρομο Young.

Ιστολογικά, οι πολύποδες έχουν ταξινομηθεί σε διάφορες ομάδες, με βάση την προτεινόμενη αιτιολογία, την κυρίαρχη διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα και την εμφάνιση του στρώματος. Η κατάταξη αυτή έχει αμιγώς περιγραφικό χαρακτήρα και δε σχετίζεται με μια συγκεκριμένη υποκείμενη διαταραχή ή παθολογία.

2.2.1 Μακροσκοπική Παθολογία.

Μακροσκοπικά, οι περισσότεροι πολύποδες έχουν οιδηματώδη, λεία και γυαλιστερή εμφάνιση με μια μαλακή σύσταση σε σύγκριση με τον περιβάλλοντα μη πολυποειδή βλεννογόνο. Οι πολύποδες είναι γενικά κινητοί και συνδέονται συχνά μέσω ενός μίσχου με τον υποκείμενο βλεννογόνο. Ο γύρω βλεννογόνος με χαρακτηριστικά χρόνιας ρινοκολπίτιδας, όπως και εκείνος της μέσης ρινικής κόγχης είναι γενικά περισσότερο ερυθματώδης και γενικά σταθερός στην ψηλάφηση. Ο βλεννογόνος στη χρόνια ρινοκολπίτιδα, ανάλογα με το βαθμό του οιδήματος, μπορεί να εμφανιστεί πολυποειδής, αλλά δεν παρουσιάζει διακριτό μίσχο [31].

Οι πολύποδες συνήθως προβάλλουν από το μέσο ρινικό πόρο και το σφηνοημοειδές κόλπωμα και είναι συχνά αμφοτερόπλευροι. Ωστόσο, οι μονόπλευροι πολύποδες δεν είναι ασυνήθιστοι. Οι πολύποδες ποικίλουν σε μέγεθος, και σε σοβαρές περιπτώσεις, μπορούν να γεμίσουν πλήρως την ρινική κοιλότητα. Σε μακροχρόνια

πολύποδιαση, τα υποκείμενα οστά μπορεί να υποστούν αναδιαμόρφωση (remodeling) και αυτή να αποτελέσει αιτία διεύρυνσης της ράχης της ρινός [31].

Ο βλεννογόνος της μέσης ρινικής κόγχης, η κάτω ρινική κόγχη, το ηθμοειδές άγκιστρο και το διάφραγμα μπορεί επίσης να παρουσιάζουν πολυποειδή διαμόρφωση με ευρεία βάση. Ένας μεγάλος πολύποδας που προέρχεται από την κάτω ρινική κόγχη είναι ασυνήθιστος [42]. Η παρουσία πολυποειδούς βλεννογόνου στο οπίσθιο τμήμα της κάτω ρινικής κόγχης δεν είναι ασυνήθιστη, αναφέρεται ως μοροειδώς εκφυλισμένη κόγχη [43], και συνήθως δεν συνδέεται με χρόνια ρινοκολπίτιδα. Αντίθετα με τις μέσες και ανώ κόγχες, το πρόσθιο τμήμα της κατώ ρινικής κόγχης σπάνια είναι πολυποειδές και αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία του πλακώδους επιθηλίου και την αεροδυναμική της περιοχής. Ο πολύποδας που προέρχεται από το γναθιαίο κόλπο και προβάλλει στη ρινική κοιλότητα χαρακτηρίζεται ως αντροχοανοπολύποδας και είναι γενικά μονόπλευρος [43].

Οι ρινικοί πολύποδες που σχετίζονται με χρόνια ρινοκολπίτιδα δεν παρουσιάζουν συνήθως μακροσκοπικά εξελκώσεις, και η παρουσία εξελκώσεων μπορεί να υποδεικνύει άλλη παθολογία. Μια πιο λοβιοειδής – «τσαμπί από σταφύλια» εικόνα μπορεί να σηματοδοτεί άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως ένα θήλωμα ρινός και των παραρρινίων. Ωστόσο, η υποκείμενη παθολογία δεν είναι πάντα δυνατόν να προσδιοριστεί με βάση την εμφάνιση της και μόνο. Ως εκ τούτου, όλοι οι πολύποδες, ειδικά οι μονόπλευροι, χρειάζονται ιστοπαθολογική εξέταση.

Ένα ποσοστό της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες παρουσιάζει επίσης χαρακτηριστική, παχιά, σκούρα, και επίμονη βλέννα, που ονομάζεται ηωσινοφιλική βλέννα. Αυτή η βλέννα παρατηρείται συνήθως στην αλλεργική μυκητιασική ρινοκολπίτιδα, αλλά είναι επίσης παρόν σε ασθενείς με σοβαρή εμμένουσα χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες, συμπεριλαμβανομένης της κυστικής ίνωσης, της τριάδας του Sampter, καθώς

και στους πνεύμονες ασθενών με αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση. Σε πολλές περιπτώσεις, η διάγνωση της αλλεργικής μηκυττιακής ρινικολπίτιδας μπορεί να χαθεί, αν η βλέννα δεν εξεταστεί για παρουσία μυκήτων.

2.2.2 Μικροσκοπική Παθολογία.

Τα κύρια ιστολογικά χαρακτηριστικά των ρινικών πολυπόδων [31] και του βλεννογόνου στη χρόνια ρινοκολπίτιδα, σε σύγκριση με το φυσιολογικό βλεννογόνο περιλαμβάνουν:

- 1) δομικές αλλαγές που αφορούν το επιθήλιο, τον υποβλεννογόνο χιτώνα και μερικές φορές το υποκείμενο οστό.
- 2) τη φύση και το βαθμός της διήθησης από φλεγμονώδη κύτταρα.

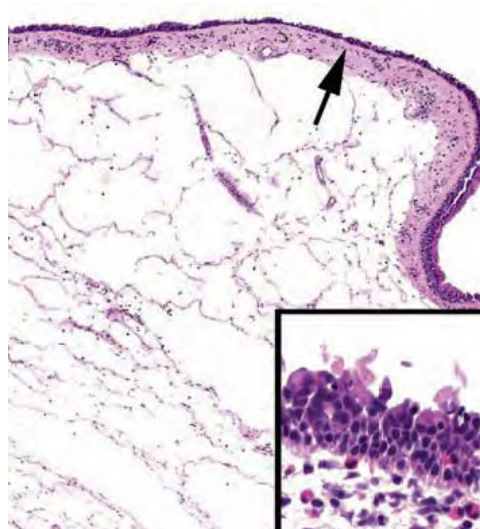
Οι ρινικοί πολύποδες τυπικά επενδύονται από αναπνευστικό επιθήλιο και έχουν βασική μεμβράνη με πάχος που ποικίλει και ένα υποκείμενο στρώμα με μια σειρά από δομικές αλλαγές και φλεγμονώδη κύτταρα.

Ιστορικά ταξινομούνται με βάση τις ιστολογική δομική τους εμφάνιση και τη φύση των κυρίαρχων φλεγμονώδων κυττάρων σε α) οιδηματώδεις, ηωσινοφιλικούς, ή «αλλεργικούς» πολύποδες, β) χρόνιους φλεγμονώδεις πολύποδες, και γ) οροβλεννώδεις, αδενικούς πολύποδες [31].

Μια άλλη διάκριση που επίσης χρησιμοποιείται συχνά στην βιβλιογραφία είναι ηωσινοφιλικό – μη ηωσινοφιλικό πολύποδες. Αυτή η ταξινόμηση όμως δεν είναι ειδική, ούτε συνδεδεμένη με κάποια υποκείμενη παθολογία.

Οι οιδηματώδεις και ηωσινοφιλικό πολύποδες είναι ο πιο κοινός τύπος και είναι επίσης γνωστοί ως "αλλεργικοί" ρινικοί πολύποδες. Ωστόσο, μόνο σε ένα μικρό ποσοστό

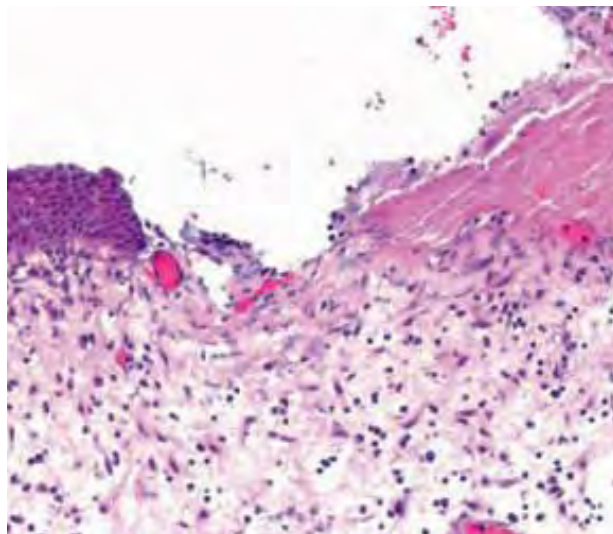
της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες συνυπάρχει αλλεργία. Αυτοί οι πολύποδες επενδεύονται με αναπνευστικό επιθήλιο και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βλεννογόνικών αλλαγών που περιλαμβάνουν εξέλκωση, κοκκιώδη ιστο, οξεία βλεννογονίτιδα, υπερπλασία επιθηλιακών και κυπελλοειδών (Goblet) κυττάρων, και πλακώδη μεταπλασία. Η βασική μεμβράνη είναι συχνά πεπαχυσμένη και υπάρχει άφθονο υποβλεννογόνιο οίδημα (Εικ 3)[31].



Οι κύστες εκ κατακράτησης είναι συχνές, όπως και διάφορες μικτές κυτταρικές διηθήσεις φλεγμονώδων κυττάρων αποτελούμενες ως επί το πλείστον από ηωσινόφιλα, πλασματοκύτταρα και διάσπαρτα λεμφοκύτταρα. Οι οροβλεννώδεις αδένες συχνά ενσωματώνονται εντός του οιδηματώδους πολύποδα. Οι οιδηματώδεις και ηωσινοφιλικοί πολύποδες παρατηρούνται σε όλο το φάσμα των συναφών διαταραχών, όπως χρόνια ηωσινοφιλική ρινοκολπίτιδα, αλλεργική μυκητιασική ρινοκολπίτιδα, τριάδα Sampter, κυστική ίνωση και σύνδρομο Churg-Strauss.

Οι ρινικοί πολύποδες που σχετίζονται με κυστική ίνωση έχουν λεπτή αντί για πάχια βασική μεμβράνη, λιγότερη στρωματική ηωσινοφιλία, και μεγαλύτερη αναλογία ουδετεροφίλων και ως εκ τούτου ονομάζονται ουδετερόφιλοί πολύποδες. Επίσης χαρακτηριστική είναι η παρουσία πυκνής, πηχτής, βαθιά ηωσινοφιλικής εκκρίσης.

Οι χρόνια φλεγμονώδεις πολύποδες, επίσης γνωστοί ως ινώδεις πολύποδες, είναι λιγότερο συχνοί και αποτελούν λιγότερο από το 10% των φλεγμονωδών ρινικών πολυπόδων [45]. Αυτοί μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα φάσμα οιδηματώδων πολυπόδων, όπου ένας περιστασιακός τραυματισμός μπορεί να επάγει πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστικών κυττάρων στο στρώμα και να προκαλέσει δευτεροπαθείς αλλοιώσεις που μπορούν να μιμούνται ένα νεόπλασμα. Τα κύρια ιστολογικά χαρακτηριστικά είναι η παρουσία υποβλεννογόνιας ίνωσης και συχνά ένα μικτό φλεγμονώδες διήθημα με υπεροχή λεμφοκυττάρων και συχνά βλαστικά κέντρα. Ανάλογα με άλλους ρινικούς πολύποδες, οροβλεννώδεις αδένες εξακολουθούν να υπάρχουν εντός του πολύποδα, σε αντίθεση με αληθείς μεσεγγυματικές βλάβες που τείνουν να εκτοπίσουν τους οροβλεννώδεις αδένες. Το επιφανειακό επιθήλιο είναι πιθανόν να παρουσιάσει πλακώδη μεταπλασία ως δείκτη της χρονιότητας (Εικ 4)[31].



Αλλοιώσεις μπορεί να παρατηρηθούν και στο υποκείμενο οστό, που μπορεί να εμφανίσει αναδιαμόρφωση ιδιαίτερα σε ινώδεις πολύποδες.

2.3 Ιστοπαθολογία της βλέννας, συμπεριλαμβανομένης της ηωσινοφιλικής βλέννης.

Οι ρινικές εκκρίσεις σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ή χωρίς ρινικούς πολύποδες παρουσιάζουν ποικίλη σύσταση και πλήθος φλεγμονωδών κυττάρων ανάλογα με τη διήθηση του βλεννογόνου και των πολυπόδων [31].

Οι εκκρίσεις σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με πολύποδες γενικά περιέχουν περισσότερα ηωσινόφιλα από εκείνες σε ασθενείς που δεν έχουν πολύποδες, ανεξάρτητα από τη σύσταση της βλέννας.

Στη χρόνια ρινοκολπίτιδα με ηωσινοφιλική βλέννη (EMCRS) οι εκκρίσεις είναι συνήθως πολύ πηκτές.

Σε παρασκευασματα με χρώση φορμαλίνης H & E τμήματα αυτής της βλέννας τυπικά παρατηρούνται συστάδες ηωσινόφιλων, προϊόντα διάσπασης ηωσινόφιλων (κρύσταλλοι Charcot-Leyden), και άλλα φλεγμονώδη και επιθηλιακά κύτταρα (Εικ 5)[31].



Μύκητες μπορεί να ανιχνευθούν σε έως 100% αυτών των δειγμάτων, (χρώσεις αργύρου). Αυτή η βλέννα, που ονομάζεται ηωσινοφιλική βλέννα, είναι το διαγνωστικό κριτήριο για τη χρόνια ρινοκολπίτιδα με ηωσινοφιλική βλέννη (EMCRS) και την αλλεργική μυκητιασική ρινοκολπίτιδα.

2.4 Χοανοπολύποδες.

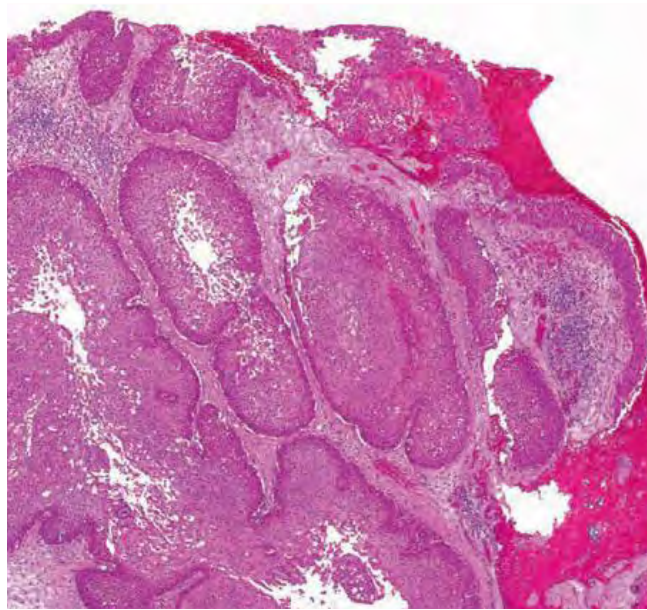
Η συχνότερη προέλευση του χοανοπολύποδα είναι το ιγμόρειο άντρο. Άλλες πιθανές θέσεις μπορεί να είναι οι σφηνοειδείς, ημθοειδείς κόλποι και σπάνια το διάφραγμα και η κάτω ρινική κόγχη. Η ιστολογική δομή είναι παρόμοια. Οι αντροχοανοπολύποδες αντιπροσωπεύουν το 4-6% του συνόλου των πολυπόδων, ενώ στον παιδιατρικό πληθυσμό, μέχρι και 33% (REF). Όπως προκύπτει από την ονομασία τους εκπορεύονται από το άντρο και προπίπτουν στη χοάνη. Εκπορεύονται συνήθως από το οπίσθιο τοίχωμα του γναθιαίου κόλπου και διερχόμενοι με ένα λεπτό "μίσχο" από το στόμιό του, προπίπτουν εντός της ρινικής θαλάμης [46]. Είναι συνήθως μονόπλευροι και μόνο σπάνια αμφοτερόπλευροι. Μακροσκοπικά μπορεί να εμφανίζονται ερυθρεμάτωδεις ή κυστικοί, συνήθως στο τμήμα που βρίσκεται εντός του γναθιαίου κόλπου.

Μικροσκοπικά, αυτοί οι πολύποδες επενδύονται με κροσσωτό ψευδοπολύστοιβο επιθήλιο, συνήθως άθικτο, και μια λεπτή βασική μεμβράνη. Το στρώμα μπορεί να παρουσιάζει μυξοειδή διαμόρφωση και στρωματικά γιγαντοκύτταρα, αλλά συνήθως στερείται σημαντικής φλεγμονώδους παρουσίας. Σπάνια, εκφυλιστικές αλλοιώσεις, όπως χοληστερινικά κοκκιώματα και αγγειοματώδεις αλλοιώσεις μπορεί να παρατηρηθούν [39,47].

2.5 Μη φλεγμονώδεις πολυποειδείς βλάβες.

Οι πολύποδες μπορεί μερικές φορές να μοιάζουν με νεοπλάσματα, επιθηλιακά και μεσεγχυματογενή. Σε ότι αφορά τα επιθηλιακά, η διαφορική διάγνωση πρέπει να αποκλείσει τα ανάστροφα θηλώματα. Αυτά διακρίνονται σε εξωφυτικά, ανεστραμμένα, και

ογκοκυτταρικά (σπάνια). Και οι ρινοί πολύποδες όμως, με εκτεταμένη πλακώδη μεταπλασία ή βασική κυτταρική υπερπλασία, μπορούν να μιμηθούν ανάστροφα θηλώματα, τα οποία όμως είναι αδιαφανή. Τα εξωφυτικά ανάστροφα θηλώματα από το ρινικό διάφραγμα είναι λιγότερο επιθετικά τοπικά και εμφανίζουν σπανιότερα κακοήθη εξαλλαγή από εκείνα που προέρχονται από το πλευρικό ρινικό τοίχωμα. Ιστολογικά τα ανάστροφα θηλώματα προέρχονται από ένα πιο έντονο πολλαπλασιασμό του επιθηλίου, με τον ανεστραμμένο τύπο να εμφανίζει ενδοφυτική ανάπτυξη επιθηλιακών φωλιών (Εικ 6)[31].



Τα εξωφυτικά και τα ανάστροφα θηλώματα επενδύονται από ένα μίγμα πλακώδους, αναπνευστικού και "μεταβατικού" επιθηλίου που εμφανίζει πολλαπλές στρώσεις. Σε αντίθεση με τους ρινοειδείς πολύποδες, η βασική μεμβράνη στα ανάστροφα θηλώματα είναι χαρακτηριστικά λεπτή. Το επιθήλιο παρουσιάζει διάσπαρτα βλεννώδη κύτταρα και ουδετερόφιλα. Τα ογκοκυτταρικά θηλώματα επενδύονται από ογκοκύτταρικό κυλινδρικό επιθήλιο με πολλαπλά επιθηλιακά μικροαποστήματα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τόσο οι ρινοειδείς πολύποδες όσο και τα ανάστροφα θηλώματα συχνά συνυπάρχουν στους ίδιους ασθενείς. Ως εκ τούτου, η εξοικείωση με το διακριτά τους χαρακτηριστικά είναι σημαντική [48].

Οι ρινικοί πολύποδες μπορεί να μιμούνται επίσης μεσεγγυματικά νεοπλάσματα όταν παρατηρείται έντονη ίνωση ή αγγείωση του πολύποδα. Τα μεσεγγυματικά νεόπλασμα της ρινός και των παραρρινίων άλλωστε εμφανίζουν εικόνα ρινικών πολυπόδων. Ειδικότερα τα αιμαγγειώματα μπορεί να μιμούνται εικόνα ρινικού πολύποδα με έντονη αγγείωση. Αυτά είναι συνηθέστερα στο πρόσθιο τμήμα του ρινικού διαφράγματος και των ρινικών κογχών, διακρίνονται σε τριχοειδή και σπηλαιώδη τύπο και διακρίνονται από τους ρινικούς πολύποδες με έντονη αγγείωση από τη λοβιώδη τους διαμόρφωση. Άλλες βλάβες, όπως μονήρης ινώδης όγκος, ρινοφαρυγγικό αγγειοϊνωμα και φλεγμονώδεις μυοϊνοβλαστικοί όγκοι μπορεί να μιμούνται ινώδεις ρινικούς πολυπόδες. Τα ρινοφαρυγγικά αγγειοϊνώματα τυπικά προέρχονται από τον ρινοφάρυγγα και συνήθως αφορούν νεαρούς άρρενες εφήβους και επιπλέον αυτά εμφανίζουν θετικούς ανδρογόνικούς υποδοχείς και πυρηνική αντιδραστικότητα στη βήτα κατενίνη [49,50]. Οι μονήρεις ινώδεις όγκοι και οι φλεγμονώδεις μυοϊνοβλαστικοί όγκοι παρουσιάζουν μια χαρακτηριστική μορφολογία και ανοσοφαινότυπο [38,51].

Και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει ένας προεξάρχων πολλαπλασιασμός των στρωματικών κύτταρων. Σε αντίθεση, η παρουσία ινώδους υποστρώματος στους ρινικούς πολύποδες είναι περιορισμένη και εντοπισμένη τοπικά. Τέλος πολύ σπάνια έκτοπος νευρογλοιακός ιστός μπορεί να εμφανίσει εικόνα ρινικού πολύποδα. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ανοσοϊστοχημεία αναδεικνύει την παρουσία συναπτοφυσίνης, νευρονηματίου, ή / και νευρογλοιακής ινδικής όξινης [51].

2.6 Συμπεράσματα.

Συνοψίζοντας, η παθολογοανατομική ανάλυση των ρινικών πολυπόδων είναι εξαιρετικά σημαντική ώστε να διαφοροποιηθούν από άλλες ογκόμορφες βλάβες της ρινός και των

παραρρινίων βλάβες, ειδικά στις περιπτώσεις μονόπλευρων βλαβών, που μπορεί να υποκρύπτουν καλοήθεις όγκους. Η παρουσία βλεννίνης θα πρέπει να σημειώνεται καθώς οι πολύποδες με αυτή ανήκουν στο φάσμα της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ηωσινοφιλική βλέννη (EMCRS) / αλλεργική μυκητιασική ρινοκολπίτιδα - AFS.

Κεφάλαιο 3

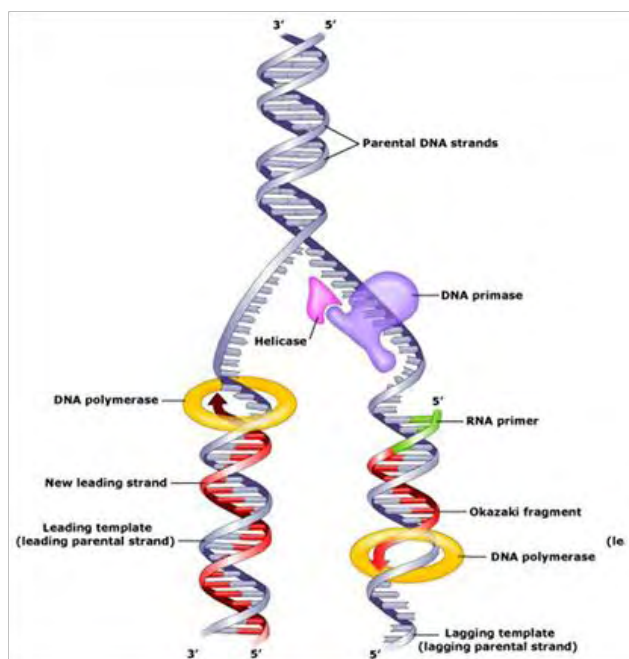
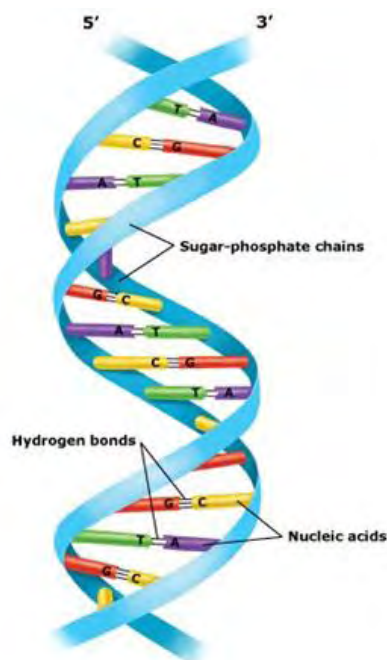
Μοριακές τεχνικές - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

3.1 Γενικά για την PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR) είναι μέθοδος της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ενός μεμονωμένου μορίου DNA εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [53,54]. Αυτό επιτρέπει στη συνέχεια την ανάλυση του επιλεγμένου τμήματος DNA (target DNA) με τη βοήθεια άλλων τεχνικών.

Η μέθοδος είναι σχετικά οικονομική και χρησιμοποιείται σήμερα από τα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια. Τεμάχια DNA, από περίπου 50 ζεύγη βάσεων (bp) έως 10 kilobases (kb) μπορούν να πολλαπλασιαστούν από αρχικές ελάχιστες ποσότητες γονιδιακού DNA [54]. Οι δύο βασικές αρχές πάνω στην οποία στηρίζεται η PCR είναι:

1. Η συμπληρωματικότητα των μορίων DNA να συνδέονται για να σχηματίσουν μια διπλή έλικα (Complementarity-driven binding of DNA to form a duplex).
2. Η ιδιότητα των μορίων DNA πολυμεράσης να επιμηκύνουν το DNA με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων (Template-driven, semi-conservative synthesis of DNA, by DNA polymerases).



Raby B.A., Slavotinek A., Tirnauer J.S. "Principles of molecular Genetics.",
In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Accessed on February 2, 2015.)

Η διαδικασία της PCR.

Δύο τεχνικά στοιχεία ρυθμίζουν την διαδικασία της PCR:

- Η παρουσία θερμοσταθερών DNA πολυμερασών - κεκαθαρμένων ή κλωνοποιημένων - από μικροοργανισμούς που ζουν σε θερμοπηγές.
- Η ιδιότητα άμεσης σύνθεσης ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών primer 20 με 30 βάσεων.

Η όλη αντίδραση γίνεται σε ένα και μοναδικό σωληνάριο αντίδρασης και κάθε αντίδραση προσαρμόζεται να πολλαπλασιάσει μια ειδική γενομική ακολουθία. Η ειδικότητα καθορίζεται από τη συμπληρωματικότητα των ολιγονουκλεοτιδικών primers (short DNA sequences), που έχουν σχεδιαστεί να υβριδοποιούνται με την ακολουθία στόχο [54].

Το κλασσικό μίγμα αντίδρασης PCR αποτελείται από

- περίσσεια ζευγών εκκινητών (primers),
- DNA
- ολιγονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates),
- διάλυμα αντίδρασης (reaction buffer)
- θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση).

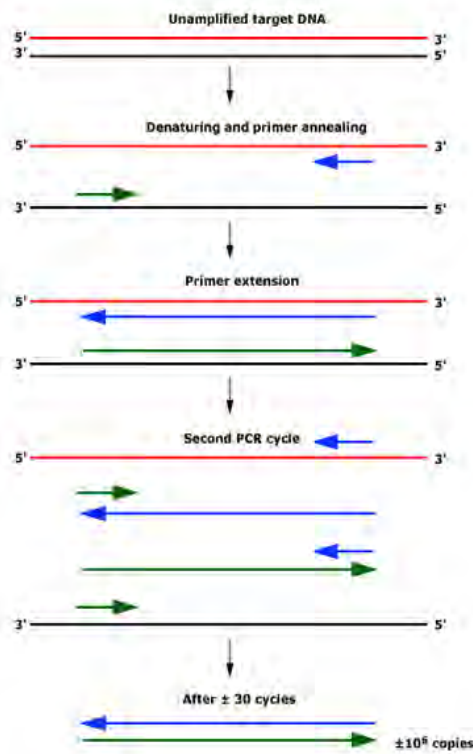
Η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση μπορεί να αντέξει σε θερμοκρασία 95°C με ελάχιστη μείωση δραστηριότητας, ενώ έχει μέγιστη δραστηριότητα στους 70°C [53].

Το ένζυμο που σήμερα χρησιμοποιείται στην πλειονότητα των περιπτώσεων προέρχεται από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq). Η πιθανότητα σφάλματος (ανά νουκλεοτίδιο και ανά κύκλο) για το κλασσικό Taq είναι περίπου 1 στα 10⁵ νουκλεοτίδια. Υψηλής πιστότητας πολυμεράσες με ιδιότητα ελέγχου *in vitro*, όπως αυτή που προέρχεται από το archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* (Pfu), έχουν πιθανότητα σφάλματος 10 φορές μικρότερη από την Taq και χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές που απαιτούν υψηλότερη ειδικότητα στη DNA σύνθεση [55].

3.2 Σταδια της PCR

Η αντίδραση της PCR αποτελείται από 3 στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται σε 30 με 40 κύκλους. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει [54]:

- Αποδιάταξη (Denaturation): Το μίγμα θερμαίνεται στους 95° με αποτέλεσμα το διαχωρισμό της διπλής έλικας του DNA σε μονές έλικες.
- Προσκόλληση (Annealing): Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία μόλις κάτω από την θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών – primers, με αποτέλεσμα την τη σύνδεση των εκκινητών στο υπόστρωμα των μονών DNA ελίκων, η οποία ακολουθείται από τη σύνδεση της DNA πολυμεράσης στο 3' άκρο των εκκινητών.
- Επιμήκυνση (Elongation): Η θερμοκρασία τότε αυξάνεται στη θερμοκρασία ενεργοποίησης της πολυμεράσης (~70 to 72°C), με αποτέλεσμα την έναρξη της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA. Η πολυμεράση καταλύει την προσθήκη ελεύθερων νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών – primers. Οι βάσεις προστίθενται συμπληρωματικά με την ακολουθία της απέναντι αλυσίδας (Α απέναντι από Τ και C απέναντι από το G). Η επιμήκυνση συνεχίζεται για περίπου ένα λεπτό και τερματίζεται με την επιστροφή στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης (θέρμανση σε θερμοκρασία 95°C και αποδιάταξη των ελίκων).



Στην PCR, το DNA στόχος - target DNA (κόκκινη και μαύρη γραμμή) διαχωρίζονται με θέρμανση. Στη συνέχεια οι εκκινητές-primers (πράσινο και μπλε βέλη) προσκολλούνται στη συμπληρωματική ακολουθία και απέναντι έλικα και επιμηκύνουν τη συμπληρωματική ακολουθία (μεγαλύτερα πράσινα και μπλε βέλη). Στη συνέχεια ακολουθούν νέοι κύκλοι διαχωρισμού (denaturing), υβριδισμού των εκκινητών - primer hybridization (annealing), και επιμήκυνσης των ακολουθιών στόχων - strand synthesis (extension). Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται ο πολλαπλασιασμός της ακολουθίας στόχου, χρησιμοποιώντας τις ακολουθίες του προηγούμενου κύκλου ως ακολουθίες υπόβαθρο για τον επόμενο κύκλο. Το τελικό προϊόν της PCR αποτελείται από περίπου 10^6 αντίγραφα μετά από 30 κύκλους [54].

Ο αριθμός των δυνητικών στόχων για προσκόλληση των εκκινητών/primers έχει διπλασιαστεί μετά από ένα κύκλο PCR, καθώς τόσο η αρχική διπλή έλικα DNA, όσο και η νεοσυντεθείσα έλικα είναι διαθέσιμες για σύνδεση με τους εκκινητές.

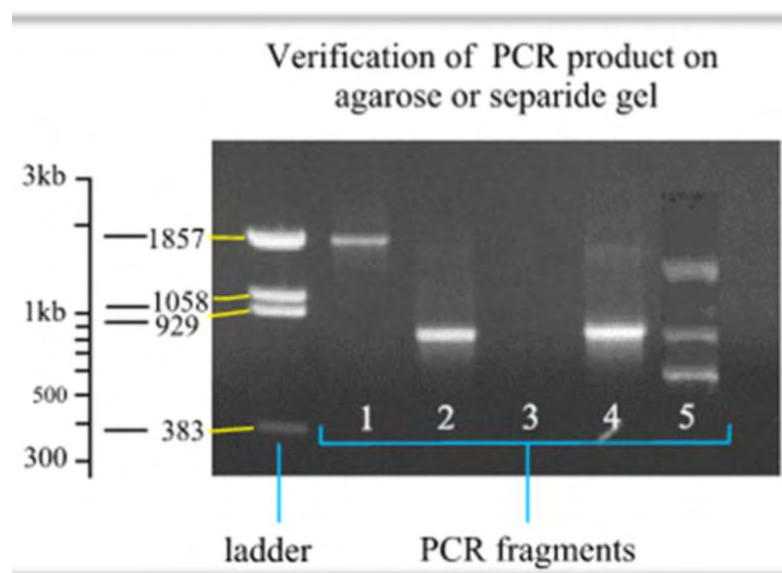
Με κάθε επόμενο κύκλο, ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων στόχων (καθοριζόμενων και στα δύο άκρα από τους εκκινητές της αντίδρασης) διπλασιάζεται, οδηγώντας σε εκθετική αύξηση της ακολουθίας στόχου.

Είναι δυνατό να ξεκινήσει με ένα μόνο αντίγραφο DNA μόριο και να παράγει δεκάδες εκατομμύρια αντίγραφα. Αν η αντίδραση ξεκινά με δύο αντίγραφα, τότε N κύκλοι θεωρητικά θα παράγουν 2^N αντίγραφα.

Για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός της ακολουθίας στόχου, εκκινητές μονής αλύσου (οι οποίοι συνήθως αποτελούνται από 20 νουκλεοτίδια) πρέπει να σχεδιαστούν και να συντεθούν προσεκτικά. Υψηλής ειδικότητας πολλαπλασιασμός μπορεί να επιτευχθεί αν

ο συνδυασμός της ακολουθίας του ζεύγους των εκκινητών εμφανίζεται μία μόνο φορά στο γονιδίωμα. Ο σχεδιασμός των εκκινητών και ο υπολογισμός των θερμοκρασιών αποδιάταξης μπορεί να γίνει με υπολογιστικά προγράμματα ελεύθερα διαθέσιμα στο διαδίκτυο [56].

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το προϊόν πολλαπλασιασμού (amplicon) μπορεί να γίνει αντιληπτό οπτικά με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης (gel electrophoresis), κατά την οποία τα αρνητικά φορτισμένα τεμάχια DNA προωθούνται προς ένα θετικό ηλεκτρόδιο διαμέσου της γέλης. Η γέλη αгарόζης λειτουργεί ως ηθμός που οι πόροι του εξαρτώνται από την περιεκτικότητα σε αгарόζη. Συνακόλουθα η ταχύτητα προώθησης των μορίων DNA διαμέσου της γέλης εξαρτάται από το μέγεθός τους καθώς και από το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης και την προσθήκη χρώσης βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide stain), η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με τα νουκλεϊκά οξέα, η έκθεση της γέλης σε υπεριώδη ακτινοβολία αναδεικνύει τα πολλαπλασιαζόμενα τεμάχια ως μονές φθορίζουσες δέσμες. Η γέλη μπορεί να φωτογραφηθεί και να χρησιμοποιηθεί ως αρχείο της αντίδρασης πολλαπλασιασμού.



Vierstraete A. Ghent University, "Principle of the PCR".1999.

3.3 Τα Πλεονεκτήματα της PCR:

- Ταχύτητα: η αντίδραση πολλαπλασιασμού διαρκεί περίπου 3 ώρες. Επιλέον χρόνος (μερικές ώρες) χρειάζεται για την εξαγωγή του DNA από τα κύτταρα και την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης του πολλαπλασιαζόμενου DNA μετά το τέλος της PCR.
- Πολύ υψηλή ευαισθησία: η PCR μπορεί να πολλαπλασιάσει το DNA από ένα μοναδικό κύτταρο.
- Απλή και οικονομική.

3.4 Τα Μειονεκτήματα της PCR:

- Εξαιτίας της πολύ υψηλής ευαισθησίας, η ενδεχόμενη επιμόλυνση του δείγματος με πολύ μικρές ποσότητες εξωγενούς DNA μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά ευρήματα. Για τον περιορισμό αυτού του κινδύνου πολλά εργαστήρια διαθέτουν ξεχωριστούς χώρους για τις διαδικασίες προ και μετά την αντίδραση πολλαπλασιασμού.

3.5 Ποσοτική quantitative / Real-time PCR (qPCR).

Σήμερα εφαρμόζονται διάφορες παραλλαγές της αρχικής αντίδρασης της PCR. Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR / Real-time quantitative PCR (qPCR) είναι μια υψηλής ευαισθησίας μέθοδος ποσοτικοποίησης της απόλυτης και σχετικής ποσότητας μιας ειδικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, κατά την οποία η συγκέντρωση προϊόντων PCR στην πορεία του χρόνου μετράται άμεσα, χωρίς πρόσθετες τεχνικές μετά το τέλος της PCR [54].

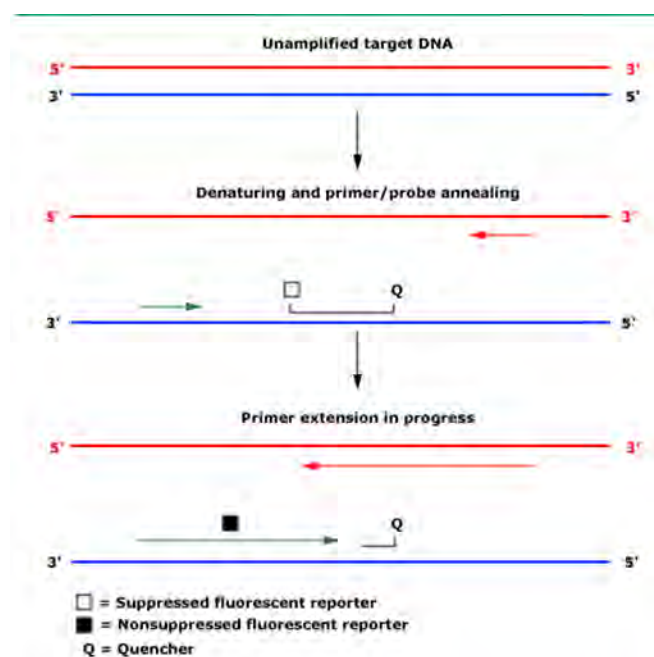
Κοινές εφαρμογές της qPCR αποτελούν το gene expression profiling, η ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου και το genotyping των παραλλαγών των αντιγράφων (copy number variation genotyping). Η qPCR πραγματοποιείται για την ποσοτική μέτρηση του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο της [54].

Επιπλέον των δύο εκκινητών που είναι απαραίτητοι για την PCR αντίδραση η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα φθορίζον, μη επιμηκύνσιμο ανιχνευτή που υβριδοποιείται

με την αλληλουχία στόχο ανάμεσα στο ζεύγος των εκκινητών. Ο ανιχνευτής αυτός περιλαμβάνει μια φθορίζουσα χρωστική (fluorogenic reporter dye) στο 5' άκρο και έναν αποσβεστή (quencher) στο 3' άκρο. Ο αποσβεστής μπλοκάρει τον φθορισμό όσο είναι κοντά στη φθορίζουσα χρωστική. Καθώς ο εκκινητής, όμως, προχωρά, κατά την επιμήκυνση της αλύσου, κατά τον πολλαπλασιασμό, η δραστικότητα εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον υβριδοποιημένο ανιχνευτή και απομακρύνει τον αποσβεστήρα, επάγοντας μια αύξηση του φθορίζοντος σήματος [54].

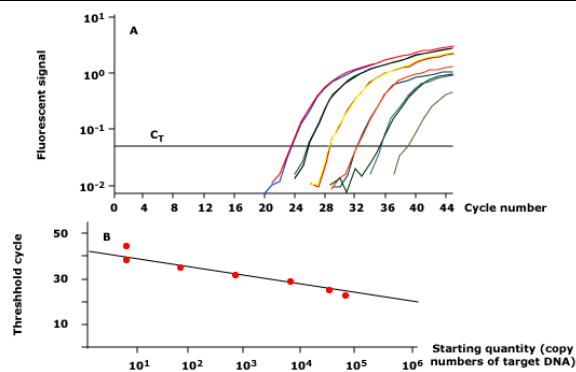
Εξαιτίας της εκθετικής φύσης της αντίδρασης στην PCR, το φθορίζον σήμα αυξάνεται ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος, μέχρι την εμφάνιση οροφής (plateau).

Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων στον οποίο το δείγμα του ασθενή φθάνει ένα προκαθορισμένο επίπεδο φθορισμού με μια



Raby B.A., Slavotinek A., Tirnauer J.S. " Polymerase chain reaction.", In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Updated February 1 2013 Accessed on February 2, 2015.)

προκαθορισμένη καμπύλη ενός δείγματος αναφοράς (control sample), προσδιορίζοντας με τον τρόπο αυτό τον αριθμό των αντιγράφων στην αρχή της αντίδρασης [54].



Η PCR μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στην εκθετική της φάση.

Α) αν υπάρχουν πολλοί στόχοι (καμπύλες στα αριστερά) στο αρχικό δείγμα το παραγόμενο φθορίζον σήμα θα ξεπεράσει την προκαθορισμένη τιμή κατωφλίου (C_T) νωρίς κατά τη διεργασία επαναλαμβανόμενων κύκλων της PCR.

Αν υπάρχουν λίγοι στόχοι καμπύλες στα δεξιά) το φθορίζον σήμα θα αυξηθεί πιο αργά και θα ξεπεράσει την τιμή κατωφλίου σε μεταγενέστερο κύκλο.

Β) Όταν η τιμή κατωφλίου σχεδιαστεί σε αντιπαράθεση με την αρχική ποσότητα του DNA στόχου, η σχέση είναι γραμμική για περισσότερους από 8 λογαρίθμους. Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των αλληλουχιών στόχων στο δείγμα, αυτό που χρειάζεται είναι ο καθορισμός του κύκλου στον οποίο ξεπεράστηκε η τιμή κατωφλίου και να χρησιμοποιηθεί η προκαθορισμένη καμπύλη για να προσδιοριστεί ο αριθμός των στόχων που υπήρχαν στο αρχικό δείγμα [54].

3.6 Πλεονεκτήματα της ποσοτικής PCR.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι:

- Εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία και ευρύ δυναμικό εύρος.
- Εξοικονόμηση χρόνου (δεν απαιτεί επεξεργασία των δειγμάτων μετά την PCR).
- Ευρεία διαθεσιμότητα αυτοματοποιημένων συσκευών (όπως το 7500 Real Time PCR System της Applied Biosystems και το Rotor Gene – 6000 της Rcorbett, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη) με κατάλληλο ερμηνευτικό λειτουργικό σύστημα.
- Προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Gene expression profiles): Συγκεκριμένα γονιδιακά αντίγραφα μπορεί να μετρηθούν με qPCR από δείγματα RNA, αφού μετατραπούν πρώτα σε cDNA με αντίστροφη μεταγραφή.
- Μέτρηση ιικού RNA ή DNA σε κλινικές συνθήκες: πχ η PCR για RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιικού φορτίου από δείγμα αίματος σε ασθενείς με HIV [57,58], ενώ έχει χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου και άλλων RNA ιών, όπως της ηπατίτιδας C [59,60]. Επίσης σημειώνεται η

ευρεία χρήση της qPCR στην ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου του ιού Epstein-Barr (EBV) στη διάγνωση και παρακολούθηση της λεμφοϋπερπλαστικής νόσου μετά από μεταμόσχευση [61].

Κεφάλαιο 4

Ερπητοϊοί (Herpesviridae)

Οι Ερπητοϊοί αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια DNA ιών, νοσογόνων για τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά [62,63,64]. Το όνομα της οικογένειας προέρχεται από την Ελληνική λέξη 'έρπειν', που αναφέρεται στις λανθάνουσες, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις που είναι τυπικές για την ομάδα αυτών των ιών. Οι ερπητοϊοί μπορούν να προκαλούν λυτικές ή λανθάνουσες λοιμώξεις.

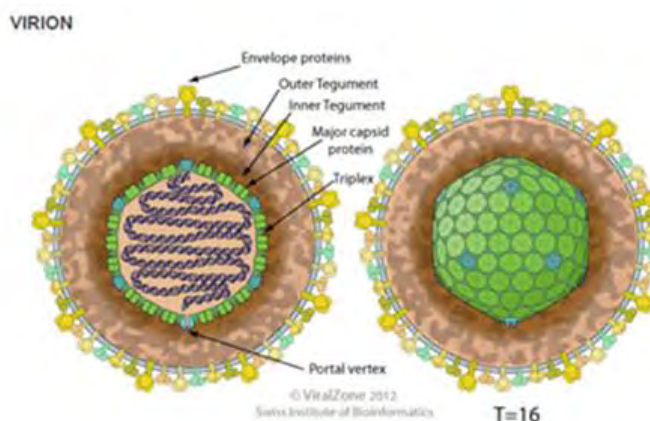
Τουλάχιστον 5 είδη Ερπητοϊών, οι HSV1 και HSV2 (που προκαλούν τον χειλικό έρπη και τον έρπητα των γενετικών οργάνων αντίστοιχα), Varicella Zoster Virus -VZV (που προκαλεί ανεμευλογιά και έρπητα ζωστήρα), Epstein-Barr virus - EBV (Λοιμώδης Μονοπυρήνωση) και Cytomegalovirus - CMV είναι εξαιρετικά συχνοί στους ανθρώπους. Περίπου 90% των ενηλίκων έχει προσβληθεί από τουλάχιστον έναν από τους ιούς αυτούς και μια λανθάνουσα μορφή του ιού παραμένει στους περισσότερους ανθρώπους [65,66].

Συνολικά υπάρχουν 8 τύποι ερπητοϊών που προσβάλλουν τους ανθρώπους: Herpes Simplex Viruses 1 και 2, Varicella-Zoster Virus, EBV (Epstein-Barr Virus), Human Cytomegalovirus, Human Herpesvirus 6, Human Herpesvirus 7 και Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus.

4.1 Ίική δομή.

Οι ερπητοϊοί παρουσιάζουν μια κοινή δομή. Αποτελούνται από

- ένα ευμεγέθες, γραμμικό, *δίκλωνο DNA* που κωδικοποιεί 100-200 γονίδια και
 - ένα εικασαεδρικού πρωτεϊνικό κλουβί, που ονομάζεται *καψίδιο* και περικλείει το DNA.
 - Το καψίδιο περιβάλλεται επίσης από ένα *καλυπτήριο περίβλημα*, το οποίο περιλαμβάνει τις ιϊκές πρωτεΐνες και το ιϊκό mRNAs και
 - μια *λιπιδική δύστοιθη μεμβράνη* που λέγεται *φάκελος*.
- Το σωματίδιο αυτό στο σύνολό του καλείται 'virion'.



Viralzone. Swiss Institute of Bioinformatics (2012).

4.2. Κύκλος ζωής των Ερπητοϊών.

Όλοι οι ερπητοϊοί πολλαπλασιάζονται εντός του κυτταρικού πυρήνα (το ιϊκό DNA μεταγράφεται σε mRNA εντός του πυρήνα του προσβεβλημένου κυττάρου).

Η λοίμωξη ξεκινά όταν το ιϊκό σωματίδιο έρχεται σε επαφή με ειδικά μόρια υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια. Μετά την προσκόλληση των γλυκοπρωτεϊνών του ιϊκού φακέλου στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, το ιϊκό σωματίδιο (virion) εισέρχεται στο κύτταρο και αποσυναρμολογείται, επιτρέποντας στο ιϊκό DNA να μεταναστεύσει στον κυτταρικό πυρήνα. Στον κυτταρικό πυρήνα γίνεται ο πολλαπλασιασμός του ιϊκού DNA και η μεταγραφή του ιϊκών γονιδίων.

Κατά τη συμπτωματική λοίμωξη, τα προσβεβλημένα κύτταρα μεταγράφουν λυτικά ιϊκά γονίδια. Σε μερικά κύτταρα του ξενιστή ένας αριθμός ιϊκών γονιδίων που καλούνται

latency associated transcript (LAT) μεταγράφονται αντί για τα λυτικά γονίδια. Με τον μηχανισμό αυτό το ιός μπορεί να παραμείνει στο κύτταρο και συνεπώς στον οργανισμό επ' αόριστον. Ενώ η πρωτογενής λοίμωξη συνοδεύεται συχνά από μια περίοδο αυτοπεριοριζόμενης κλινικής νόσησης, η χρόνια λανθάνουσα λοίμωξη είναι ασυμπτωματική.

Η επανενεργοποίηση των σε λανθάνουσα κατάσταση ιών έχει συσχετιστεί με μια σειρά από νόσους όπως ο έρπης ζωστήρας και η ροδόχρους πιτυρίαση. Την ενεργοποίηση ακολουθεί η η μετάπτωση της μεταγραφής των ιϊκών γονιδίων από τα LAT γονίδια σε πολλαπλά λυτικά γονίδια, τα οποία επάγουν την ιϊκή αντιγραφή και πολλαπλασιασμό. Συχνά η ενεργοποίηση των λυτικών γονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο.

Κλινικά μπορεί να συνοδεύεται από μη ειδικά συμπτώματα, όπως ο χαμηλός πυρετός, πονόλαιμος, κεφαλαλγία, κακουχία και εξάνθημα, αλλά και κλινικά σημεία όπως λεμφαδενοπάθεια και ανοσολογικά ευρήματα, όπως ελαττωμένα επίπεδα Natural Killer Cells.

4.3 Ταξινόμηση.

Ο ιός του Έρπητα πρωτοανακαλύφθηκε το 1960 από τον κτηνίατρο Walter Plowright [67]. Το Γένος *Herpesvirus* ανακοινώθηκε το 1971 στη πρώτη ταξινόμηση της International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Αποτελούταν από 23 ιούς και 4 ομάδες. Στη δεύτερη ταξινόμηση το 1976 το Γένος ανάχθηκε στην Οικογένεια *Herpetoviridae*, το οποίο τροποποιήθηκε σε *Herpesviridae* στην Τρίτη ταξινόμηση το 1979. Το 2009 η Οικογένεια *Herpetoviridae* ανάχθηκε στην Τάξη *Herpesvirales*, η οποία περιλαμβάνει 3 οικογένειες, 3 υποοικογένειες, μια μη ταξινομημένη, 17 γένη, 90 είδη, και 48 ακόμη μη ταξινομημένους ιούς [68].

Νόσο στον άνθρωπο είναι γνωστό ότι προκαλούν 8 διαφορετικοί ιοί της Οικογένειας [69,70,71].

Όνομα	Συνώνυμο	Υποοικογένεια	Οδός μετάδοσης
HHV-1	Herpes simplex virus-1 (HSV-1)	α (Alpha)	Close contact (oral or sexually transmitted infection)
HHV-2	Herpes simplex virus-2 (HSV-2)	α	Close contact (oral or sexually transmitted disease)
HHV-3	Varicella zoster virus (VZV)	α	Respiratory and close contact (including sexually transmitted disease)
HHV-4	Epstein-Barr virus (EBV)	γ (Gamma)	Close contact, transfusions, tissue transplant, and congenital
HHV-5	Cytomegalovirus (CMV)	β (Beta)	Saliva, urine, breast milk
HHV-6A and 6B	Roseolovirus, Herpes lymphotropic virus	β	Respiratory and close contact?
HHV-7		β	?
HHV-8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)	γ	Close contact (sexual), saliva?
Όνομα	Στόχος πρωτογενούς προσβολής	Παθοφυσιολογία	Περιοχή λανθάνουσας προσβολής
HHV-1	βλεννογόνοι	Οροβλεννογόνιος και/ ή γεννητικός Έρπητας (κυρίως στοματικός – οροβλεννογόνιος Έρπητας)	Νευρώνες
HHV-2	βλεννογόνοι	Οροβλεννογόνιος και/ ή γεννητικός Έρπητας (κυρίως Έρπητα γεννητικών οργάνων)	Νευρώνες
HHV-3	βλεννογόνοι	Ανεμειλογιά και Έρπητα Ζωστήρας	Νευρώνες
HHV-4	B κύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα	Λοιμώδης Μονοπυρήνωση, Λέμφωμα Burkitt's, Λέμφωμα CNS σε ασθενείς με AIDS, post-transplant lymphoproliferative syndrome (PTLD), ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, HIV-associated hairy leukoplakia	B κύτταρα
HHV-5	Μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα	Σύνδρομο προσομοιάζον Λοιμώδη Μονοπυρήνωση, αμφιβληστροειδοπάθεια	Μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα και ?
HHV-6A and 6B	T κύτταρα και ?	Sixth disease (Παιδική ροδόχρους πυτιρίαση ή αιφνίδιο εξάνθημα)	T κύτταρα και ?
HHV-7	T κύτταρα και ?	Παιδική ροδόχρους πυτιρίαση ή αιφνίδιο εξάνθημα	T κύτταρα και ?
HHV-8	Λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα	Σάρκωμα Kaposi, Διάχυτο πρωτοπαθές λέμφωμα, τύποι πολυκεντρικής νόσου	B κύτταρα

Οι Ερπητοϊοί είναι γνωστό ότι έχουν την ικανότητα να εγκαθιστούν μακροχρόνιες ή και δια βίου λοιμώξεις. Ένας από τους μηχανισμούς που τους βοηθά να το επιτύχουν αυτό είναι η ανοσολογική διαφυγή. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί μέσω της σύνθεσης μιας πρωτεΐνης που μιμείται την ανθρώπινη Ιντερλευκίνη 10 (hIL-10), αλλά και μέσω της αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του Major Histocompatibility Complex II (MHC II) σε προσβεβλημένα κύτταρα.

4.4 CMV IL-10

Η έρευνα πάνω στο Cytomegalovirus (CMV) έδειξε ότι η ιϊκή ομόλογη πρωτεΐνη του human IL-10, cmvIL-10 είναι σημαντική για την αναστολή της σύνθεσης προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Η πρωτεΐνη cmvIL-10 έχει 27% ομοιότητα με την hIL-10 και μόνο ένα από τα 9 αμινοξέα που σχηματίζουν το λειτουργικό τμήμα αναστολής σύνθεσης κυτταροκινών της hIL-10. Παρόλα αυτά η λειτουργικότητα των hIL-10 και cmvIL-10 είναι παρόμοια. Και οι δύο αναστέλλουν τη σύνθεση IFN- γ , IL-1 α , GM-CSF, IL-6 και TNF- α , που είναι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Επιπλέον αναστέλλουν τη σύνθεση MHC I και MHC II και προάγουν τη σύνθεση HLA-G (μη κλασσικό MHC I). Με τον μηχανισμό αυτό επιτυγχάνεται η ανοσολογική διαφυγή, καθώς καταστέλλεται η κύτταρική ανοσολογική απάντηση και η ανοσολογική απόκριση των Natural Killer κυττάρων αντίστοιχα.

Οι ομοιότητες ανάμεσα στις hIL-10 και cmvIL-10 μπορεί αν εξηγηθούν από το γεγονός ότι χρησιμοποιούν τον ίδιο κυτταρικό υποδοχέα, τον υποδοχέα της hIL-10. Διαφέρουν στο ότι η hIL-10 μπορεί να επάγει τόσο αύξηση, όσο και μείωση του πολλαπλασιασμού των περιφερικών μονοκυττάρων Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), ενώ η cmvIL-10 προκαλεί μόνο μείωση του πολλαπλασιασμού των PBMC [72].

4.4 Αναστολή της έκφρασης MHC.

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι Ερπητοϊοί αποφεύγουν τους ανοσολογικούς μηχανισμούς είναι η μείωση της έκφρασης MHC I και MHC II, που παρατηρείται σε όλους τους ανθρώπινους Ερπητοϊούς. Η μείωση της έκφρασης MHC I και MHC II γίνεται με διάφορους μηχανισμούς που οδηγούν σε έλλειψη του MHC στην κυτταρική επιφάνεια.

Ένας από αυτούς είναι μέσω ιϊκής χημοκίνης, ομολόγου της IL-10.

Άλλος μηχανισμός είναι ο εγκλωβισμός του νεοσχηματιζόμενου MHC στο ενδοπλασματικό δίκτυο από ιϊκές πρωτεΐνες. Το MHC δεν φθάνει στην κυτταρική επιφάνεια και κατά συνέπεια δεν μπορεί να ενεργοποιήσει την T κυτταρική αντίδραση. Τα MHC μόρια επίσης είναι δυνατό να στοχοποιούνται για καταστροφή στα κυτταρικά πρωτεοσώματα ή λυσοσώματα. Η πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου TAP μπορεί επίσης να προάγει τη μείωση του MHC. Ιϊκές πρωτεΐνες αναστέλουν την TAP που εμποδίζει το MHC να συνδεθεί με ένα ιϊκό αντιγόνο. Αυτό εμποδίζει την ορθή αναδίπλωση του MHC μορίου, με αποτέλεσμα αυτό να μη φθάνει στην επιφάνεια του κυττάρου [73].

Κεφάλαιο 5

Ιοί του ανθρώπινου θηλώματος - Human Papilloma Virus (HPV)

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος (Human papillomaviruses - HPV) είναι ιδιαίτερα συχνοί DNA ιοί που προσβάλλουν επιθηλιακά κύτταρα [74,75]. Εμφανίζουν ειδικότητα ως προς το είδος και τον ιστό που προσβάλλεται και μπορεί να προκαλέσουν επίμονες ιϊκές λοιμώξεις με τους καρκινογόνους γονότυπους να ευθύνονται για την συντριπτική πλειονότητα των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας [76,77,78], αλλά και κακοήθειες του κόλπου, του αιδοίου, του ορθού, του πέους, καθώς και το ένα τρίτο των καρκίνων του στοματοφάρυγγα [79,80,81].

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι ο τρίτος συχνότερος καρκίνος παγκόσμια [77,82] παρά το γεγονός ότι η χρήση του κυτταρολογικού ελέγχου/ Παπ τεστ έχει μειώσει τη συχνότητά του κατά 70%, όπου εφαρμόστηκε αποτελεσματικά.

5.1. HPV γονότυποι.

Περισσότεροι από 40 βλεννογονικοί γονότυποι προσβάλλουν το γυναικείο γεννητικό σύστημα. Περίπου 15 έχουν συσχετιστεί με με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και είναι γνωστοί ως καρκινογόνοι, υψηλού κινδύνου - high-risk (cancer-associated HPV types [77]. Οι καρκινογόνοι τύποι HPV16 και HPV18 είναι υπεύθυνοι για το 70% περίπου των καρκίνων αυτών σε παγκόσμιο επίπεδο [83].

Οι ενεργές ιϊκές λοιμώξεις προκαλούν ανωμαλίες του επιθηλίου του τραχήλου που κατατάσσονται ανάλογα με τη βαρύτητα σε ήπιες, μέτριες και σοβαρές. Οι ήπιες μορφολογικές αλλοιώσεις που παράγονται από την HPV λοίμωξη κατάσσονται ως Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion [LSIL] ή Histologic Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 1 [CIN1], ενώ προκαρκινωματώδεις αλλοιώσεις κατατάσσονται ως High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion [HSIL] ή Histologic CIN2 or CIN3 [CIN2/3].

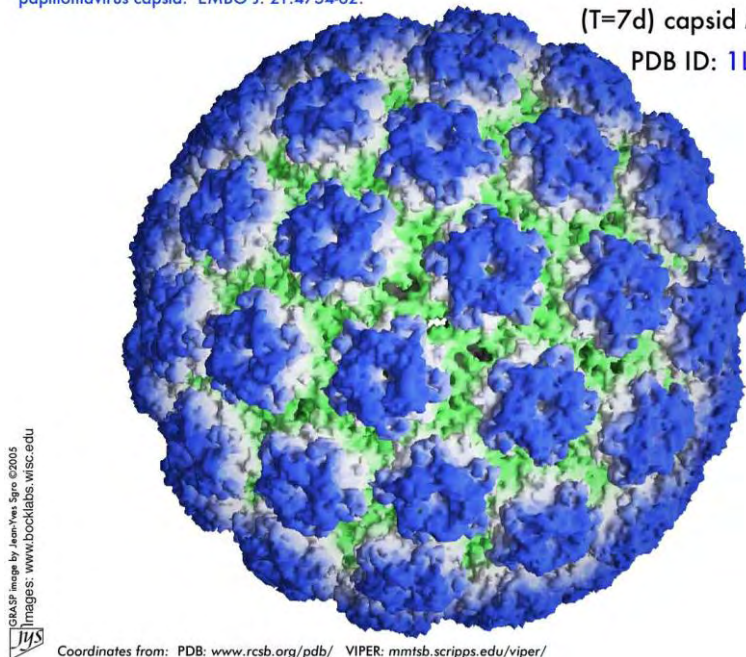
Οι γενότυποι HPV6 και HPV11 προκαλούν περίπου το 90% των γεννητικών κονδυλωμάτων και των οξυτενών κονδυλωμάτων.

5.2. Κύκλος της ζωής του HPV.

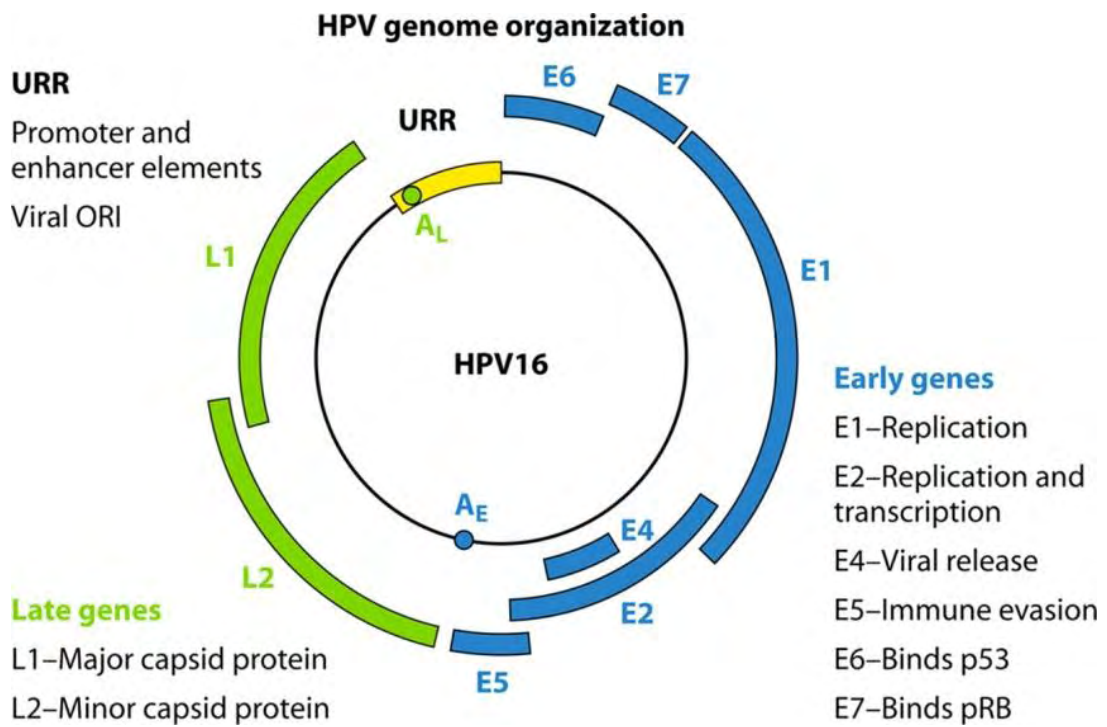
Οι ιοί HPV είναι μικροί ιοί, που δεν περιβάλλονται από φάκελο, αλλά καψίδιο.

Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. EMBO J. 21:4754-62.

Human Papillomavirus 16 L1
(T=7d) capsid Model
PDB ID: 1LOT



Περιέχουν ένα κυκλικό γονιδίωμα 8 κιλοβάσεων, το οποίο κωδικοποιεί 8 γονίδια, συμπεραλαμβανομένων των δύο δομικών πρωτεϊνών που περιβάλλουν τον ιό, τις L1 και L2 [84].

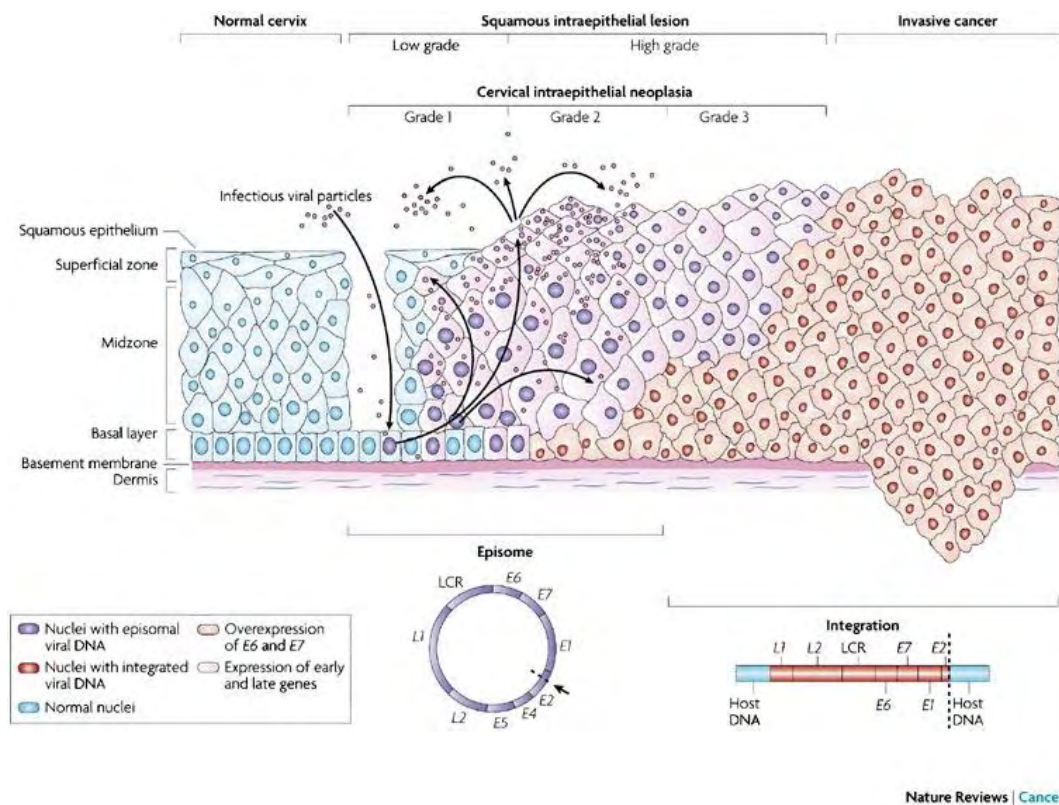


Stanley MA.CMR 2012;25:215-20

Η L1 πρωτεΐνη μπορεί να αυτόσυναρμολογηθεί σε απουσία ιϊκού γονιδιώματος σε περιβάλλον κυτταροκαλλιέργειας, σχηματίζοντας ένα προσομοιάζον τον ιό σωματίδιο - Virus-Like Particle (VLP), το οποίο χρησιμοποιείται ως αντιγόνο στα εμβόλια κατά του HPV. Η L2 είναι μια μικρή καψιδιακή πρωτεΐνη, η οποία μαζί με την L1 καθορίζει τη μολυσματικότητα του HPV [84,85].

Ο κύκλος της ζωής του ιού είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την διαφοροποίηση του επιθηλίου και την ωρίμανση του κερατινοκυττάρου. Η αρχική προσβολή του βασικού κυττάρου προκαλείται μετά από μικρορήξεις της συνέχειας του επιθηλίου [73,85]. Τα ιϊκά σωματίδια συνδέονται στα βασικά αρχέγονα κύτταρα με τη μεσολάβηση ειδικής ως προς τον ιστό πρωτεογλυκάνης της θειικής ηπαράνης [87,88,89].

Ειδικά γονιδιακά προϊόντα μεταγράφονται σε κάθε στάδιο της διαφοροποίησης του πλακώδους κερατινοκυττάρου [74]. Στην επιφανειακότερη στοιβάδα τα γονίδια για τις L1, L2, και E4 μεταγράφονται, με αποτέλεσμα τη συναρμολόγηση του ιϊκού καψιδίου μέσα στο οποίο περικλείεται το γονιδίωμα του HPV. Κατά την απολέπιση αυτών των βραχύβιων κυττάρων, λοιμογόνα HPV σωματίδια απελευθερώνονται για τον επόμενο γύρω λοίμωξης.



Woodman CBJ. Nat Rev 2007;25:11-12

5.3. Φυσική ιστορία του HPV.

Η φυσική ιστορία της καρκινογένεσης από τον HPV περιλαμβάνει 4 στάδια:

- Προσβολή από HPV.
- Εμμένουσα λοίμωξη (έναντι ιϊκής κάθαρσης).
- Μετάπτωση από εμμένουσα λοίμωξη σε προκαρκινωματώδη βλάβη.
- Τοπική διήθηση.

Η HPV λοίμωξη είναι η συχνότερα σεξουαλικά μεταδιδόμενη λοίμωξη παγκόσμια. Η προσβολή από HPV κορυφώνεται στις ηλικίες από 15 έως 25 ετών στις Δυτικές χώρες, ενώ μια δεύτερη ανεξήγητη (νέα λοίμωξη ή επανενεργοποίηση) κορύφωση παρατηρείται κατά την εμμηνόπαυση [77,90]. Αντίθετα στην Κίνα η επίπτωση της HPV λοίμωξης είναι ομοιόμορφα υψηλή σε όλες τις ηλικιακές ομάδες [91].

Υπολογίζεται ότι 50% των σεξουαλικά ενεργών γυναικών και ανδρών εκτίθενται στον HPV τουλάχιστον μια φορά στη ζωή τους [92], ενώ μερίδα ειδικών υποστηρίζει ότι όλοι οι σεξουαλικά ενεργοί ενήλικες προσβάλλονται από τον HPV, καθώς α) οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι παροδικές [75,93] και β) υπάρχουν περισσότεροι από 40 ορότυποι HPV που

προσβάλλουν ολόκληρο το κατώτερο γεννητικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου του κόλπου [86,87,94,95].

Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζεται η επίπτωση του HPV στις Ηνωμένες Πολιτείες σε γυναίκες 14-59 ετών (περιλαμβάνονται 20 low risk και 23 high risk ορότυποι) [95].

Ηλικία (έτη)	Επίπτωση (%)
14 – 19	24.5%
20 – 24	44.8%
25 – 29	27.4%
30 – 39	27.5%
40 – 49	25.2%
50 – 59	19.6%
14 – 59	26.8%

Οι περισσότερες HPV λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων στελεχών, τυπικά υποχωρούν σε 6 με 12 μήνες [93,97]. Οι γυναίκες όμως με εμμένουσες λοιμώξεις από καρκινογόνα στελέχη είναι σε κίνδυνο να αναπτύξουν προκαρκινωματώδεις βλάβες [98].

5.4 Η ανοσολογική απόκριση στην HPV λοίμωξη.

Η λοίμωξη HPV αποφεύγει την ανοσολογική αντίδραση μέσα από διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι αποτελούν αντικείμενο έρευνας [77].

Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν [99]:

- Την προσβολή μόνο κυττάρων της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου.
- Την περιορισμένη έκφραση ιϊκών πρωτεϊνών μέχρι τα τελευταία στάδια ωρίμανσης του επιθηλίου.
- Την επαγόμενη από τον ιό καταστολή προφλεγμονωδών πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία βοηθούν στην εξόντωση των προσβεβλημένων κυττάρων.

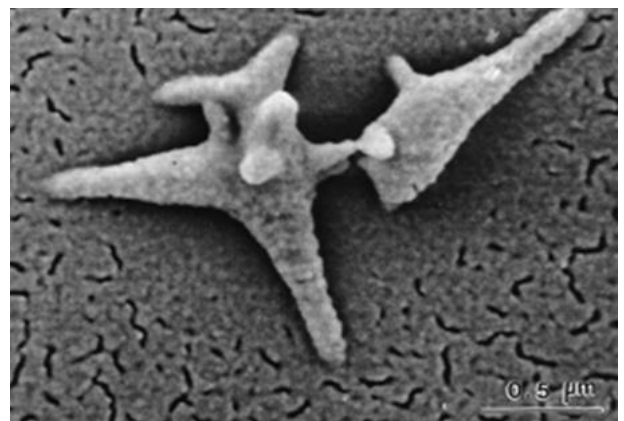
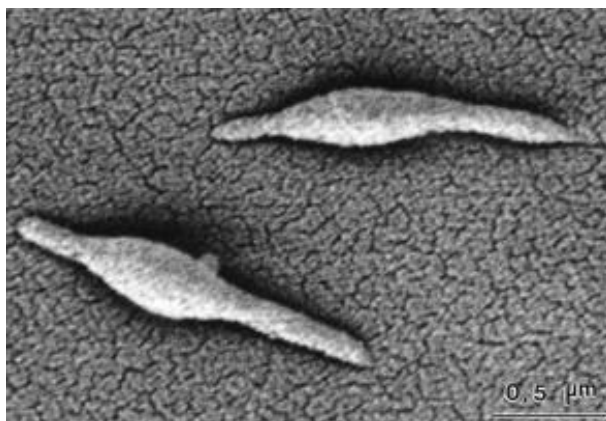
Παρόλο που στις περισσότερες γυναίκες η λοίμωξη αποδράμει σε μερικούς μήνες, στις γυναίκες που η λοίμωξη εμμένει, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για την ανάπτυξη προκαρκινωδών και καρκινικών βλαβών. Ο ίδιος ο ιός προάγει την ανοσολογική ανοχή, διευκολύνοντας την εγκατάσταση εμμένουσας λοίμωξης.

Στις γυναίκες που εντοπίζεται ενεργός HPV λοίμωξη και CIN παρατηρείται μείωση του αριθμού και μεταβολή της φαινοτυπικής κατανομής των αντιγονοπαρουσιαστικών (Langerhans) κυττάρων. Επίσης παρατηρείται περιορισμένη δραστηριότητα/ αντίδραση CD4 βοηθητικών και CD8 κυτταροτοξικών Τ λεμφοκυττάρων κατά HPV αντιγόνων [100].

Κεφάλαιο 6.

Μυκόπλασμα πνευμονίας – *Mycoplasma pneumoniae*.

Το *Mycoplasma pneumoniae* είναι ένα από τα τρία είδη Μυκοπλάσματος που συχνά προσβάλλουν τον άνθρωπο. Τα Μυκοπλάσματα είναι πανταχού παρόντα και είναι οι μικρότεροι οργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν αυτόνομα στη φύση. Το *Mycoplasma pneumoniae* συχνότερα προκαλεί λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, αλλά μπορεί να προκαλέσει και πνευμονία, ενώ και έχει περιγραφεί και πλήθος εξωπνευμονικών εκδηλώσεων [101].



Μυκόπλασμα Πνευμονίας κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Romero-Arroyo CE. J. Bacteriol.1999;181(4):1079-87

6.1. Μικροβιολογία.

Ο όρος "Mycoplasma" χρησιμοποιείται ευρύτατα για να όλους τους οργανισμούς της Τάξης Mollicutes, η οποία αποτελείται από 5 Γένη (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm*, and *Asteroloplasma*). Υπάρχουν πάνω από 120 είδη Μυκοπλάσματος και στον άνθρωπο έχουν απομονωθεί 13 είδη Μυκοπλάσματος, 2 είδη *Acholeplasma* και ένα είδος *Ureaplasma*. Παρόλα αυτά μόνο 4 είδη είναι ξεκάθαρα παθογόνα για τον άνθρωπο [101,102]: τα *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* και *Ureaplasma urealyticum*.

Τα Μυκοπλάσματα είναι οι μικρότεροι αυτόνομοι οργανισμοί στη φύση. Το *Mycoplasma pneumoniae* έχει σχήμα κοντής ράβδου, αλλά λόγω της απουσίας κυτταρικού τοιχώματος δεν είναι ορατό στη Gram χρώση [103]. Αναπτύσσεται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και μπορεί να απομονωθεί σε ειδικά μέσα σε συμπλήρωμα ορού. Παρόλα αυτά η απομόνωση αυτού του μικροοργανισμού είναι ιδιαίτερα απαιτητική και δεν γίνεται στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια.

6.2. Παθογένεση.

Τα μυκοπλάσματα διαθέτουν εξειδικευμένα οργανίδια στο άκρο τους, που επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα ξενιστές [104,105]. Η επιβίωσή τους επιτυγχάνεται με προσκόλληση και παρασιτισμό στην επιφάνεια των κυττάρων ξενιστών, με την απομύζηση των απαραίτητων πρόδρομων ουσιών, και σε μερικές περιπτώσεις την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή και την ενδοκυττάρια επιβίωση [101,106].

Ο υποδοχέας Toll-like receptor 2 είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση του Μυκοπλάσματος και την ενεργοποίηση των φλεγμονωδών μεσολαβητών και κυτταροκινών [107, 108, 109].

Το *Mycoplasma pneumoniae* συχνότερα παρατηρείται στη νηματοειδή μορφή και διαθέτει πρωτεΐνες για την προσκόλλησή του σε επιθηλιακές μεμβράνες. Παρουσιάζει ειδική συγγένεια με το αναπνευστικό επιθήλιο [110,111]. Μετά την προσκόλλησή του το Μυκόπλασμα παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου και υπεροξείδιο, προκαλώντας τραυματισμό των επιθηλιακών κυττάρων και των κροσσών τους. Παρόλα αυτά πολλά από τα παθογενετικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης πιστεύεται ότι συνδέονται με την ανοσολογική απόκριση, παρά με την απευθείας δράση του βακτηριδίου [111,112].

Επιπρόσθετα τα αντισώματα που παράγονται εναντίον των γλυκολιπιδιακών αντιγόνων του Μυκοπλάσματος μπορεί να λειτουργούν ως αυτοαντισώματα, καθώς παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίδραση με ανθρώπινα εγκεφαλικά κύτταρα και ερυθροκύτταρα [113]. Μια ειδική κενοποιητική κυτταροτοξίνη έχει περιγραφεί και μπορεί να παίζει ρόλο στην καταστροφή του αναπνευστικού επιθηλίου [114].

6.3. Επιδημιολογία.

Το *M. pneumoniae* μεταδίδεται από άτομο σε άτομο με μικροσταγονίδια αναπνευστικών εκκρίσεων κατά τη στενή επαφή. Η περίοδος επώασης είναι 2 με 3 εβδομάδες [115]. Η λοίμωξη μπορεί να παρατηρηθεί όλο το χρόνο αλλά η μεγαλύτερη συχνότητα είναι κατά το Φθινόπωρο και το Χειμώνα [113]. Στοιχεία από τις Ηνωμένες Πολιτείες προσδιορίζουν την προσβολή από Μυκόπλασμα στο 1% του πληθυσμού ετησίως [116]. Η αθροιστική προσβολή εντός της ίδιας οικογένειας φθάνει το 90% των μελών και η ανοσία που επιτυγχάνεται μετά τη λοίμωξη δεν είναι μακροχρόνια [116]. Επιδημίες έχουν περιγραφεί σε μονάδες νεοσυλλέκτων [117], μονάδες φροντίδας ατόμων με αναπηρία [118], νοσοκομεία [119] και περιοδικές επιδημίες της κοινότητας κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων ετών [120,121].

Δύο παράγοντες έχουν συσχετιστεί με συμπτωματική λοίμωξη από *M. pneumoniae*:

- Προϋπάρχοντα χαμηλά επίπεδα ανοσοσφαιρίνης IgG.
- Το κάπνισμα.

6.4. *Mycoplasma pneumoniae* και άτυπη πνευμονία.

Το *Mycoplasma pneumoniae* είναι ένα από τα πιο συχνά αίτια άτυπης πνευμονίας. Προσβάλλει όλες τις ηλικίες, αλλά μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρείται σε παιδιά σχολικής ηλικίας, νεοσύλλεκτους και φοιτητές [103].

Η άτυπη πνευμονία (προσβολή από *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, ή *Legionella* spp) αποτελεί το 7-20% της πνευμονίας της κοινότητας στις περιπτώσεις που ανιχνεύεται αίτιο [122,123], αλλά η συχνότητά της μπορεί να είναι μεγαλύτερη σε ήπια νόσο, που δεν απαιτεί νοσηλεία. Επισημαίνεται ότι οι περισσότερες μελέτες, ακόμη και αυτές που χρησιμοποιούν ορολογικές και μοριακές τεχνικές, αποτυγχάνουν να προσδιορίσουν το παθογόνο στο 50% των περιπτώσεων και ότι η

επίπτωση ποικίλει και επηρεάζεται από την τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση, την ηλικία των ασθενών και το αν το δείγμα περιλαμβάνει νοσηλευόμενους, ή μη ασθενείς [101].

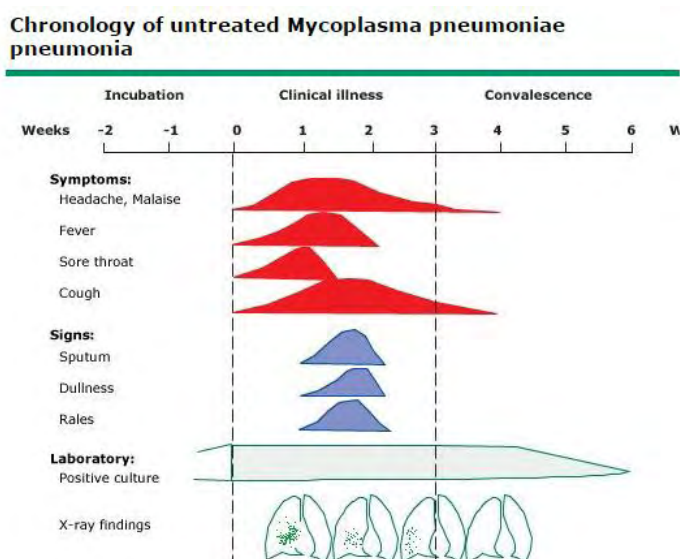
Έτσι μια μελέτη με χρήση ορολογικών τεχνικών σε μη νοσηλευόμενους ασθενείς προσδιόρισε το *Mycoplasma pneumoniae* ως μοναδικό αιτιολογικό παράγοντα στο 23% των περιπτώσεων και σε συνδυασμό με το *Chlamydophila pneumoniae* σε ένα ακόμη 3% [124]. Αντίθετα σε μια προοπτική μελέτη με 1300 ασθενείς που χρειάστηκαν νοσηλεία το *Mycoplasma pneumoniae* ήταν υπεύθυνο για το 5% των περιπτώσεων και το 9% των περιπτώσεων σε ηλικιωμένους ασθενείς. [125].

6.5. *Mycoplasma pneumoniae* και άσθμα.

Η λοίμωξη με *M. pneumoniae* μπορεί να επιδεινώσει τα συμπτώματα του άσθματος, να προκαλέσει αναπνευστικό συριγμό σε μη ασθματικά παιδιά, ενώ υπάρχουν μελέτες που τη συσχετίζουν με την ανάπτυξη του άσθματος.

6.6. Κλινικά χαρακτηριστικά [101].

Πολλές λοιμώξεις με *Mycoplasma pneumoniae* είναι ασυμπτωματικές [101]. Όταν η λοίμωξη είναι συμπτωματική, τα συμπτώματα ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο της νόσου.



Zaleznik D.F., Bartlett J.G., Thonrer A.R. "Pneumonia caused by *Chlamydophila* (*Chlamydia*) *pneumoniae* in adults", In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Updated on June 14, 2012. Accessed on February 2, 2015.

Η έναρξη της ασθένειας είναι προοδευτική και συχνά προηγείται κεφαλαλγία, κακουχία και χαμηλός πυρετός [113, 115, 126]. Οι κρυάδες (φρίκια) είναι συχνές αλλά το ρίγος όχι και τα συμπτώματα που οι ασθενείς αναφέρουν συνήθως υπερέχουν των αντικειμενικών ευρημάτων κατά τη φυσική εξέταση [101].

Τα συμπτώματα και σημεία της λοίμωξης από *M. pneumoniae* μπορεί να χωριστούν σε συμπτώματα του αναπνευστικού δέντρου και εξαναπνευστικά συμπτώματα [115].

6.6.1 Συμπτώματα από την αναπνευστική οδό.

Οι περισσότεροι ασθενείς με αναπνευστική λοίμωξη από *M. pneumoniae* δεν αναπτύσσουν πνευμονία. Στη μελέτη των Mansel *et al* πχ περιγράφεται ότι το 75-100% των προσβεβλημένων ασθενών παρουσίασε έναν επίμονο, μη παραγωγικό βήχα, ενώ μόνο 3-10 % ανέπτυξε πνευμονία [127].

Ο βήχας από *Mycoplasma pneumoniae* είναι αδιάκοπος και μπορεί να είναι ξηρός ή ελάχιστο παραγωγικός, με αποχρωματισμό των πτυέλων, το οποίο εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Δύσπνοια και συριγμός μπορεί να συνυπάρχουν, αλλά δύσπνοια δεν είναι συχνή. Τα φρίκια είναι συχνά ενώ τα ρίγη σπάνια. Επιπλέον αναπνευστικά συμπτώματα περιλαμβάνουν τη φαρυγγίτιδα (6-59%), ρινόρροια (2-40%), ωταλγία (2-35%). Επίσης είναι δυνατό να συνυπάρχει κλινικά σιωπηλή ρινοκολπίτιδα με την πνευμονία [112].

Η ακρόαση των πνευμόνων μπορεί να είναι χωρίς ευρήματα ακόμη και στην περίπτωση πνευμονίας, στα αρχικά στάδια της νόσου. Σε επόμενα στάδια διάσπαρτοι ρόγχοι και συριγμοί ή συνδυασμός τους μπορεί να ανευρεθούν [115]. Αλλα ευρήματα από την αναπνευστική οδό μπορεί να είναι ευαισθησία στους παραρρίνιους κόλπους, ήπιο ερύθημα του φάρυγγα, ερύθημα των τυμπανικών μεμβρανών και ήπια τραχηλική λεμφαδενοπάθεια. Υπεζωκοτική συλλογή, συνήθως ορώδης, παρατηρείται σε ένα 15-20% των ασθενών με πνευμονία. Συχνή είναι η θωρακαλγία λόγω του βήχα.

Οι περισσότερες περιπτώσεις πνευμονίας είναι ήπιες και αυτοπεριοριζόμενες.

6.6.2. Εξωαναπνευστικές εκδηλώσεις.

Αυτές περιλαμβάνουν: αιμόλυση, δερματικό εξάνθημα, προσβολή των αρθρώσεων, προσβολή του γαστρεντερικού, προσβολή του Κεντρικού Νευρικού (ΚΝΣ) και προσβολή της καρδιάς. Καμιά από τις παραπάνω εκδηλώσεις δεν αφορά περισσότερο από 5-10% των ασθενών με *M. pneumoniae* και δεν έχει ξεκαθαριστεί αν η παθογένεση των εκδηλώσεων αυτών οφείλεται σε ανοσολογικούς μηχανισμούς ή απευθείας δράση του μικροοργανισμού [101].

- Αιμόλυση: IgM αντισώματα κατά του I αντιγόνου των ερυθροκυττάρικων μεμβρανών παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης και προκαλούν μια αντίδραση ψυχρής συγγολητίνης στο 60% των ασθενών. Παρά το γεγονός ότι η αιμόλυση μπορεί να είναι σοβαρή, ειδικά σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, συνήθως δεν είναι κλινικά σημαντική [113].
- Δερματικές εκδηλώσεις: Ποικίλουν από ένα ήπιο ερυθρηματώδες κηλιδοβλατιδώδες ή φυσαλιδώδες εξάνθημα μέχρι σύνδρομο Stevens-Johnson [128], ενώ μπορεί να παρατηρηθεί και φαινόμενο Raynaud δευτεροπαθώς λόγω της παραγωγής ψυχρών συγκολλητινών. Τα αντιβιοτικά μπορεί να ενισχύσουν τη δερματικές εκδηλώσεις από το *M. pneumoniae* [129].
- Προσβολή του ΚΝΣ παρατηρείται σε 0,1% των ασθενών και 7% των ασθενών που απαιτούν νοσηλεία [130], συχνότερα στα παιδιά. Η εγκεφαλίτιδα είναι συχνότερη εκδήλωση [131], ενώ έχουν περιγραφεί άσηπτη μηνιγγίτιδα, περιφερική νευροπάθεια, εγκάρσια μυελίτιδα, πάρεση κρανιακών νεύρων και παρεγκεφαλιδική αταξία [132, 133]. Η παθογένεση της προσβολής του ΚΝΣ μπορεί να οφείλεται σε απευθείας λοίμωξη ή σε ανοσολογική αντίδραση και παρόλο που είναι σπάνια σχετίζεται με σοβαρή νοσηρότητα και θνητότητα [130].
- Η προσβολή της καρδιάς περιλαμβάνει διαταραχές του ρυθμού, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, θωρακαλγία και ηλεκτροκαρδιακές αλλοιώσεις και αποτελεί μια από τις συχνότερες εξωαναπνευστικές εκδηλώσεις [112]. Η συχνότητα και βαρύτητα των καρδιακών εκδηλώσεων αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας και η παθοφυσιολογία τους σχετίζεται με το σχηματισμό αντισωμάτων κατά της καρδιολιπίνης [134].

Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν ρευματολογικές εκδηλώσεις, όπως πολυαρθραλγίες και μυαλγίες [135,136], ενώ σπειραματονεφρίτιδα είναι μια σπάνια επιπλοκή, που θεωρείται δευτεροπαθής εξαιτίας της καθίζησης ανοσοσυμπλεγμάτων [137].

Γαστρεντερολογικές εκδηλώσεις είναι συχνά μη ειδικές, αλλά μπορεί να περιλαμβάνουν ηπατίτιδα και σπάνια παγκρεατίτιδα [113,138].

Πρόσθια ραγοειδίτιδα μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε συνδυασμό με πνευμονία ή μηνιγγίτιδα [139,140].

Οξεία μέση ωτίτιδα και φυσαλιδώδης μυριγγίτιδα [141] μπορεί επίσης να συνυπάρχει.

6.7. Εργαστηριακά ευρήματα.

Στους περισσότερους ασθενείς με πνευμονία παρατηρείται υποκλινική αιμολυτική αναιμία, όπως υποδηλώνεται από θετική αντίδραση Coombs και αυξημένα δικτυοερυθροκύτταρα. Στο 50% των ασθενών με λοίμωξη από Μυκόπλασμα υπάρχει αύξηση του τίτλου ψυχρής συγκολλητίνης και στους περισσότερους ασθενείς με πνευμονία ο τίτλος υπερβαίνει το 1:128 [113], ενώ σε έκδηλη αιμόλυση μπορεί να φτάσει το 1:50,000. Αυξημένη τιμή συγκολλητίνης μπορεί όμως να παρατηρηθεί και σε λοιμώδη μονοπυρήνωση από Epstein-Barr ή cytomegalovirus, πνευμονία από αδενοϊό, άλλες ιογενείς λοιμώξεις, ασθενείς με λέμφωμα και νόσο του κολλαγόνου [101].

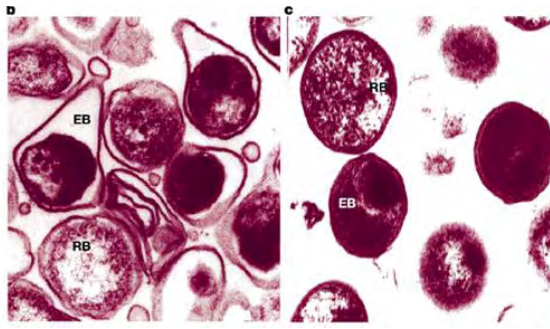
Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι φυσιολογικά στο 75-90% των περιπτώσεων, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί θρομβοκυττάρωση στην οξεία φάση [126].

Σε λοιμώξεις του ΚΝΣ, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) τυπικά εμφανίζει αυξημένα λεμφοκύτταρα, αυξημένη πρωτεΐνη και φυσιολογική γλυκόζη [101].

Κεφάλαιο 7

Χλαμύδια Πνευμονίας - *Chlamydophila pneumoniae*.

Το είδος Χλαμύδια – Χλαμυδόφιλα αποτελείται από υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια [142].



Campbell LA. Nat Rev Microbiol 2004;2: 23-32

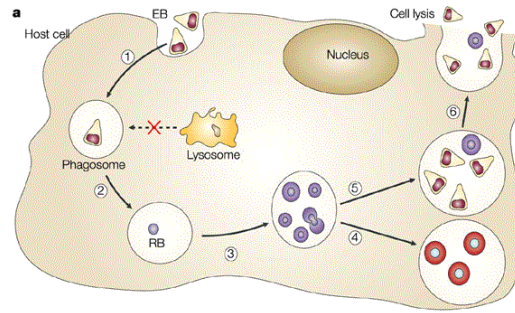
Το *Chlamydia trachomatis* είναι υπεύθυνο για μεγάλο μέρος λοιμώξεων του γεννητικού συστήματος και οφθαλμικών λοιμώξεων σε Παγκόσμιο επίπεδο. Το *Chlamydomphila* (πρώην *Chlamydia*) *pneumoniae* και σπανιότερα το *Chlamydomphila* (πρώην *Chlamydia*) *psittaci* έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία έτη.

Τα *Chlamydomphila* παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια.

- Το γονιδίωμα των οργανισμών αυτών περιλαμβάνει μόνο 660×10^6 daltons και είναι μικρότερο από τους υπόλοιπους προκαρυωτικούς οργανισμούς, με εξαίρεση τα Μυκοπλάσματα.
- Δεν περιέχουν πεπτιδογλυκάνη στο κυτταρικό τους τοίχωμα.
- Ο κύκλος ζωής του μικροβίου είναι διφασικός και αποτελείται από δύο ξεχωριστά στάδια με δύο ξεχωριστές μορφές του μικροβίου:
 - Το στοιχειώδες σώμα /elementary body (EB) και
 - το δικτυωτό σώμα /reticulate bodies (RB) [143]

Η μορφή με την οποία το βακτήριο πολλαπλασιάζεται είναι το δικτυωτό σώμα/ RB, το οποίο είναι ενδοκυττάριο. Ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται εντός μιας εγκόλπωσης που περιβάλλεται από μεμβράνη. Το δικτυωτό σώμα είναι ασταθές και επανέρχεται σε μορφή στοιχειώδους σώματος/ EB εντός της εγκόλπωσης, η οποία στη συνέχεια διαρρινγνύεται απελευθερώνοντας στοιχειώδη σωμάτια/ EB, τη μορφή που μπορεί να επιβιώσει στο εξωκυττάριο περιβάλλον και λειτουργεί ως μολυσματικός παράγοντας.

Τα στοιχειώδη σωμάτια/ EB προσκολλούνται στα επιθηλιακά κύτταρα και εισέρχονται εντός των κυττάρων μέσω ενός φαγοσώματος. Μετά την ενδοκυττάρωση τα στοιχειώδη σωμάτια/ EB αναδιοργανώνονται σε δικτυωτά σωμάτια, τα οποία στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται.



Campbell LA. Nat Rev Microbiol 2004;2: 23-32

Δύο είδη *Chlamydomorphila* προσβάλλουν τον άνθρωπο [143]:

- Το *Chlamydomorphila pneumoniae*, το οποίο έχει μόνο το μονόκλωνο στέλεχος TWAR, που προκαλεί αναπνευστική λοίμωξη [144,145].
- Το *Chlamydomorphila psittaci*, το οποίο σποραδικά μπορεί να προσβάλει τον άνθρωπο.

7.1. Παθογενετικοί μηχανισμοί.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των *Chlamydomorphila* είναι ότι η προσβολή δεν καταλείπει μακρόχρονη ανοσία, με αποτέλεσμα να είναι συχνή η επαναλοίμωξη ή η επιμένουσα λοίμωξη και η συνακόλουθη φλεγμονώδης αντίδραση. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στις οφθαλμικές και γεννητικές λοιμώξεις, στις οποίες η εμμένουσα ανοσολογική αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε ουλοποίηση και τύφλωση ή υπογονιμότητα, αντίστοιχα [146].

Σε ότι αφορά τις αναπνευστικές λοιμώξεις, σημειώνεται συσχέτιση της προσβολής από *Chlamydomorphila* και της οξείας βρογχικής υπεραντιδραστικότητας [147,148].

7.2. Επιδημιολογία.

Η συχνότητα του *Chlamydomorphila pneumoniae* σε ενήλικες με πνευμονία της κοινότητας (community-acquired pneumonia, CAP) ποικίλει στις διάφορες μελέτες από 0 έως 20% [149-153]. Η εγκυρότητα των δεδομένων αυτών όμως αμφισβητείται, καθώς σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται για τη διάγνωση ο ορολογικός έλεγχος, ο οποίος στερείται υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας για *Chlamydomorphila pneumoniae*, ενώ θετικός ορολογικός έλεγχος μπορεί να αντιπροσωπεύει σύγχρονη ή παρελθούσα λοίμωξη.

Ο όρος άτυπη πνευμονία κατά συνθήκη αναφέρεται σε λοίμωξη από *M. pneumoniae*, *Legionella* spp, και *C. pneumoniae*. Σε μια μελέτη με χρήση ορολογικών τεχνικών για τον προσδιορισμό του αιτιολογικού παράγοντα σε ασθενείς με πνευμονία της κοινότητας [154] παρατηρήθηκε η ακόλουθη κατανομή:

<i>M. pneumonia</i>	22.8 %
<i>C. pneumonia</i>	10.7 %
<i>Legionella</i> spp	0.7 %
<i>M. pneumoniae</i> + <i>C. pneumoniae</i>	3.4 %
Μη προσδιορισθέν παθογόνο	48,3 %
Τυπικά βακτήρια	14,1 %

Η *Chlamydophila pneumoniae* είναι το πιο συχνό είδος *Chlamydophila* που προσβάλλει τον άνθρωπο. Η πνευμονία που προκαλείται από *Chlamydophila pneumoniae* είναι συχνότερη σε ηλικιωμένα άτομα [155], σε αντίθεση με το *Mycoplasma pneumoniae*, το οποίο παρατηρείται συχνότερα σε νεότερες ηλικιακές ομάδες. Η μετάδοση του μικροβίου γίνεται από άτομο σε άτομο και έχει ανιχνευθεί σε επιδημίες πνευμονίας σε διαμένοντες σε ιδρύματα και νεοσύλλεκτους στρατιώτες [156,157,158].

7.3 Κλινικές εκδηλώσεις.

Οι λοιμώξεις από *C. pneumoniae* χαρακτηρίζονται από μη ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά, τα οποία μπορεί να συνοδεύουν λοίμωξη από *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp και αναπνευστικούς ιούς. Αυτό αποδεικνύεται από μελέτη που συγκρίνει τα συμπτώματα, τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα της πνευμονίας από *C. pneumoniae* με πνευμονία από άλλα αίτια [159].

Κοινά μη ειδικά χαρακτηριστικά αποτελούν η προοδευτική έναρξη των συμπτωμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν φαρυγγίτιδα, βράγχος και συχνά ρινοκολπίτιδα που συνοδεύει την πνευμονία από *C. pneumoniae* [160].

Συνήθως η λοίμωξη είναι ασυμπτωματική [161] ή ήπια, αλλά υπάρχουν και σοβαρές, απειλητικές για τη ζωή περιπτώσεις. Ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων είναι φυσιολογικός και η απλή ακτινογραφία τυπικά εμφανίζει μια αποσπασματική διήθηση κατά τύπους.

Οι εξωαναπνευστικές εκδηλώσεις της λοίμωξης με *C. pneumoniae* μπορεί να περιλαμβάνουν, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, σύνδρομο Guillain-Barré, αντιδραστική αρθρίτιδα και μυοκαρδίτιδα [162]. Επίσης υπάρχει πιθανή συσχέτιση με στεφανιαία νόσο.

Η πνευμονία από *C. pneumoniae* δεν μπορεί να διακριθεί με σαφήνεια από πνευμοκοκκική πνευμονία με βάση τα κλινικά και ακτινογραφικά ευρήματα, αν και η λοβώδης πνευμονία είναι συχνότερη σε στρεπτοκοκκική πνευμονία [163]. Η επιβεβαίωση διάγνωσης λοίμωξης από *C. pneumoniae* με κλινικά μέσα είναι σπάνια εφικτή και η θεραπεία είναι στις περισσότερες περιπτώσεις εμπειρική. Από την άλλη μεριά, το εργαστήριο έχει περιορισμένες διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση του εν λόγω μικροοργανισμού που συνίστανται αφενός στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό των ασθενών και στην ανίχνευση γενετικού υλικού του μικροοργανισμού σε κλινικά δείγματα με τη μέθοδο της PCR [164].

Αξίζει να σημειωθεί ότι μελέτες για λοίμωξη από *Chlamydia* πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, καθώς οι περισσότερες στηρίζονται σε ορολογικές μεθόδους και υπάρχει φτωχή συσχέτιση με την PCR [153,165]. Ο τετραπλασιασμός του τίτλου της IgG σε διαδοχικά δείγματα είναι ευαίσθητος δείκτης, αλλά σε περίπτωση πρωτολοίμωξης αντισώματα μπορεί να ανιχνευθούν μετά από 6 με 8 εβδομάδες και κατά συνέπεια δείγματα που λαμβάνονται νωρίτερα μπορεί να μην ανιχνεύουν την αντίδραση του οργανισμού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 8

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εκτίμηση της παρουσίας γενετικού υλικού διαφόρων μικροβιακών παραγόντων όπως ερπητοϊών (HHV: HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6), διαφόρων υποτύπων του ιού του ανθρώπινου θηλώματος HPV (high-risk - υποτύποι 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 και low-risk - υποτύποι 6, 11), *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydia pneumoniae* σε δείγματα ιστών από ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες καθώς και σε υγιείς μάρτυρες, με σκοπό να εκτιμηθεί ο πιθανός ρόλος των εν λόγω παθογόνων στην παθογένεια της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες. Χρησιμοποιήθηκε η υψηλής ευαισθησίας ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real Time PCR). Τα αποτελέσματα της μελέτης συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας.

Κεφάλαιο 9

Υλικά και Μέθοδοι

9.1 Χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης

Τον πληθυσμό της πειραματικής ομάδας αποτέλεσαν 91 ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP) (63 άνδρες; μέση ηλικία 53 έτη; εύρος 19–

77 έτη), οι οποίοι υπεβλήθησαν σε λειτουργική ενδοσκοπική χειρουργική ρινός παραρρινίων (functional endoscopic sinus surgery - FESS). Από αυτούς, 65 υποβλήθηκαν για πρώτη φορά σε επέμβαση, ενώ σε 26 ασθενείς έγινε δεύτερη χειρουργική επέμβαση. Τα άτομα της μελέτης προήλθαν από ασθενείς από το Γενικό Νοσοκομείο Βόλου, από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας, από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών 'Λαϊκό', από τη Ρινολογική Ομάδα Αθηνών και από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 38 ασθενείς (22 άνδρες; μέση ηλικία 43 έτη; εύρος 18–54 έτη), που υποβλήθηκαν σε ρινοδιαφραγματοπλαστική. Ενημερωμένη συγκατάθεση ελήφθη από όλα τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη.

Πίνακας 1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης:

	CRwNP group	Control Group
	Αριθμός	Αριθμός
Σύνολο	91	38
Άνδρες	63	22
Γυναίκες	28	16
Μέση ηλικία	53 έτη	43 έτη
Πρώτη επέμβαση	65	38
Επανεπέμβαση	26	0

Για τη διάγνωση της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες (CRwNP) χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια του European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS) [1]. Η ομάδα ελέγχου αποτελείτο από ασθενείς με σκολίωση ρινικού διαφράγματος χωρίς χρόνια ρινοκολπίτιδα με βάση τα κριτήρια του EPOS.

Ως χρόνια ρινοκολπίτιδα (CRS) ορίστηκε η παρουσία τουλάχιστον δύο από τα παρακάτω συμπτώματα:

- Ρινική απόφραξη/ συμφόρηση
- Ρινική καταρροή (πρόσθια/ οπίσθια ρινική καταρροή)
- Πίεση στο πρόσωπο/ Προσωπαλγία
- Υποσμία ή ανοσμία

ένα από τα οποία πρέπει να είναι ρινική απόφραξη ή καταρροή με διάρκεια συμπτωμάτων > 12 εβδομάδες.

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια αποκλεισμού:

- Παιδιά (< 18 ετών)
 - Ασθενείς με άσθμα
 - Κυστική ίνωση
 - Πρωτοπαθή δυσκινησία των κροσσών
 - Αλλεργική μηκυτιασική ρινοκολπίτιδα
 - Αλλεργική ρινίτιδα
 - Ανάστρωφο θήλωμα
 - Ασθενείς HIV θετικοί
 - Ασθενείς με λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού < 2 βδομάδες προ του χειρουργείου
 - Ασθενείς με λήψη στεροειδών < 1 μήνα προ του χειρουργείου
-

9.2 Λήψη και επεξεργασία του κλινικού δείγματος

Τα δείγματα των ρινικών πολυπόδων ελήφθησαν από τα πρόσθια ηθμοειδή και το μέσο ρινικό πόρο κατά τη διάρκεια της ενδοσκοπικής χειρουργικής ρινός - παραρρινίων, ενώ τα δείγματα της ομάδας ελέγχου ελήφθησαν από το βλεννογόνο της κάτω ρινικής κόγχης κατά τη διάρκεια της διαφραγματοπλαστικής.

Όλα τα χειρουργικά δείγματα τοποθετήθηκαν άμεσα σε στείρα δοχεία Eppendorf και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Με τη χρήση χειρουργικού μαχαιριδίου τα δείγματα τεμαχίστηκαν σε επιμέρους τεμάχια (2 έως 4 mm) και χωρίστηκαν σε 3 επιμέρους ομάδες: α) για συμβατική καλλιέργεια, β) για την εφαρμογή μοριακών τεχνικών (PCR), γ) για φύλαξη σε βαθιά κατάψυξη (-80°C).

Ιστοτεμάχια από κάθε ασθενή ενοφθαλμίστηκαν σε τρυβλία με άγαρ εμπλουτισμένου με 5% αίμα προβάτου τα οποία επωάστηκαν σε ατμόσφαιρα CO₂ για 2 ημέρες ενώ παράλληλα έγινε και ενοφθαλμισμός σε τρυβία με Sabouraud agar τα οποία επωάστηκαν στους 30°C για 10 ημέρες. Παράλληλα με την καλλιέργεια έγινε Gram χρώση από όλα τα ιστοτεμάχια προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία λευκοκυττάρων και να γίνει εκτίμηση της μικροβιακής χλωρίδας. Μετά την ανάγνωση των καλλιιεργειών ακολούθησε ταυτοποίηση των μικροοργανισμών βάσει της Gram χρώσης και του αυτοματοποιημένου συστήματος Vitek 2 (BioMerieux, Les Grottes, France).



Ιστοτεμάχια από κάθε ασθενή υποβλήθηκαν σε εξαγωγή DNA με τη χρήση εμπορικών αντιδραστηρίων (Invitrogen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Σε όλα τα κλινικά δείγματα οι ιστοί υπεβλήθηκαν σε λύση, με τη βοήθεια κατάλληλου λυτικού μέσου και Πρωτεϊνάσης K και επώασης σε υδατόλουτρο για 24 ώρες, και εξαγωγή DNA με τη χρήση αυτόματης συσκευής DNA extraction – Magtration 12GC.

Η πρωτεϊνάση K είναι ένα ένζυμο πέψης, μέλος της οικογένειας των σερινοπρωτεασών, διότι κρίσιμο ρόλο στην κατάλυση παίζει η δραστική σερίνη 195. Η δραστικότητα της αυξάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες έως 65⁰C (Lubert S. 1997).

Ειδικότερα για τη ρευστοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε Πρωτεϊνάση K της εταιρείας Sigma Aldrich (USA) και υδατόλουτρο της BIOline scientific (Greece). Για την επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος Mini Spin, όπως επίσης πιπέτες και ακροφύσια Gilson και δοχεία Eppendorf.

9.2.1. Πειραματική διαδικασία.

Τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν σε ρευστοποίηση με πρωτεϊνάση K και λυτικό μέσο (Genomic Lysis Buffer) και επώαση σε υδατόλουτρο στους 56⁰C για ένα 24 ωρο μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Ανακίνηση του δείγματος με vortex προ και μετά την επώαση βοήθησε επίσης στη ρευστοποίηση.

Δείγμα ιστού	2-4 mm
Λυτικό μέσο	100μl
Πρωτεϊνάση K	25 μl

Στη συνέχεια ακολούθησε η εκχύλιση/extraction του DNA από τα δείγματα, για την οποία χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο σύστημα Magtration System 12GC και MegaZorb DNA Common Kit 200N (η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του DNA που είναι αρνητικά φορτισμένο να προσροφάται σε θετικά φορτισμένες μαγνητικές σφαίρες).

Συγκεκριμένα η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

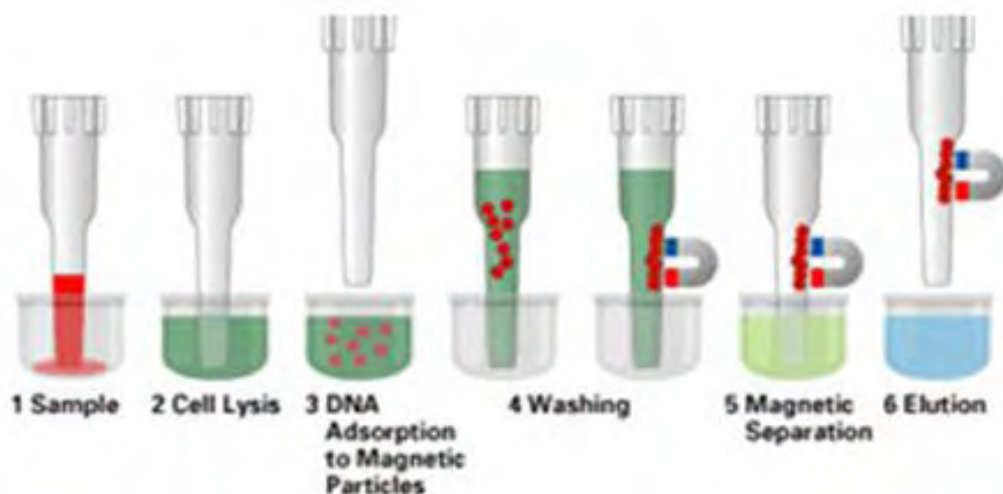
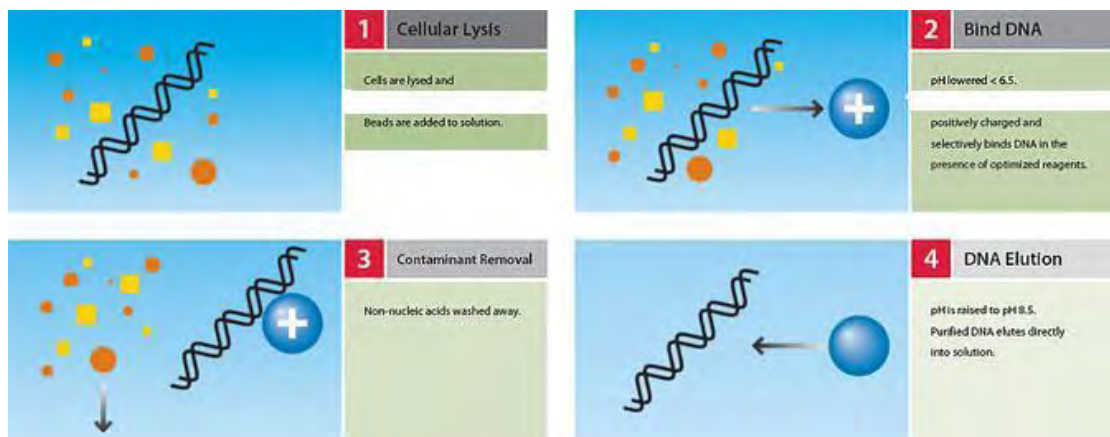
α) Λύση και απελευθέρωση DNA σε διαλυτή μορφή.

β) Προσθήκη μαγνητικών σφαιρών οι οποίες αποτελούνται από θετικά φορτισμένο υλικό και σχηματίζουν ιονικό δεσμό με το αρνητικό φορτίο του DNA.

γ) Πλύσεις με ειδικά διαλύματα για να απομακρυνθούν τα υπόλοιπα μακρομόρια.

δ) Τέλος εκλούεται το DNA σε καθαρό Eppendorf με μείωση του pH μέσω προσθήκης ειδικού αντιδραστηρίου.

9.2.2. Βήματα της εκχύλισης του DNA στο αυτόματο σύστημα Magtraction 12GC.



Automated Nucleic Acid Extraction System.

(<http://www.biotronhealthcare.com/Nucleic-Acid-Extraction-12GC.htm>).

Όλα δείγματα του DNA, που εξήχθησαν, υπεβλήθηκαν σε κλασσική PCR και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 2% – E-Gel της Invitrogen για τη διαπίστωση ανίχνευσης του γονιδίου της β2 σφαιρίνης, ώστε να ελεγχθεί η αποδοτικότητα της διαδικασίας και η απουσία αναστολέων στα δείγματα.

Για την ανίχνευση του γονιδίου της β 2 σφαιρίνης, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι εκκινητές/primers:

beta2globin gene primers	
Forward	5'-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3'
και	
Reverse	5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3'

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR (polymerase chain reaction) οδήγησε στην ενίσχυση του απομονωμένου τμήματος DNA με επαναλαμβανόμενους κύκλους εναλλασσόμενων θερμοκρασιών (40 κύκλοι).

Ο πλήρης κύκλος περιελάμβανε τα ακόλουθα 3 στάδια:

-
- α) Αποδιάταξη του DNA (denaturation).
 - β) Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing).
 - γ) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).
-

Απαραίτητα υλικά της αντίδρασης PCR:

-
- α) απονωμένο DNA
 - β) οι εκκινητές (primers)
 - γ) τα τριφωσφωρικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
 - δ) DNA πολυμεράση και ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).
-

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν δείγμα DNA 5 μ l, Taq DNA πολυμεράση 0,4 μ l, Taq Buffer 5 μ l με $MgCl_2$ 3 μ l της εταιρείας Fermentas, καθώς και water for injection (στείρος, ελεύθερος διαλύτης) της εταιρείας Demos S.A. (Greece).

Διαδικασία:

5 μ l του εκχυλισμένου DNA από κάθε δείγμα προστέθηκε σε 45 μ l master mix, που παρασκευάστηκε σε συσκευή κάθετης νηματικής ροής κλάσης II για να αποφευχθούν οι επιμολύνσεις.

Το master mix αποτελείται από τα αντιδραστήρια που αναλύονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα σε μ l
10X Taq Buffer	5 μ l
$MgCl_2$	3 μ l
Taq DNA polymerase	0,4 μ l
H_2O (WFI)	36,6 μ l
Τελικός όγκος	45 μ l

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν δύο επιπλέον δείγματα – μάρτυρες (controls), αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Στον αρνητικό μάρτυρα τοποθετήθηκαν αντί του DNA 5 μ l water for injection με σκοπό τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της αντίδρασης κατά την προετοιμασία. Στο θετικό μάρτυρα τοποθετήθηκαν 5 μ l DNA συγκεκριμένης περιεκτικότητας για πιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης.

Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρόγραμμα:

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία
Decontamination	50°C	2 min
Initial denaturation	95°C	10 min
45 cycles extension	95°C	15 sec
	60°C	1 min

Στη συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR.

Γενικά ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο κινείται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Τα διάφορα μακρομόρια (νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες κοκ) κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, εξαιτίας του διαφορετικού μεγέθους και ηλεκτρικού φορτίου και κατά συνέπεια μπορεί να διαχωριστούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, διατηρώντας τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Με την τεχνική αυτή μπορεί να διαχωριστούν μίγματα τμημάτων DNA.

Η επιλογή του πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί και τη διακριτική ικανότητα που πρέπει να επιτευχθεί (Watson J et al, 2007).

Κάθε δείγμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί αναμειγνύεται με μικρή ποσότητα (περίπου 7μl) χρωστικής βρωμοφαινόλης (διάλυμα φόρτωσης – loading dye) και τοποθετείται σε πηγαδάκια του πηκτώματος. Η χρωστική αφενός καθιστά ορατά τα δείγματα και αφετέρου τα κάνει βαρύτερα, ώστε να καθιζάνουν ευκολότερα στα πηγαδάκια.

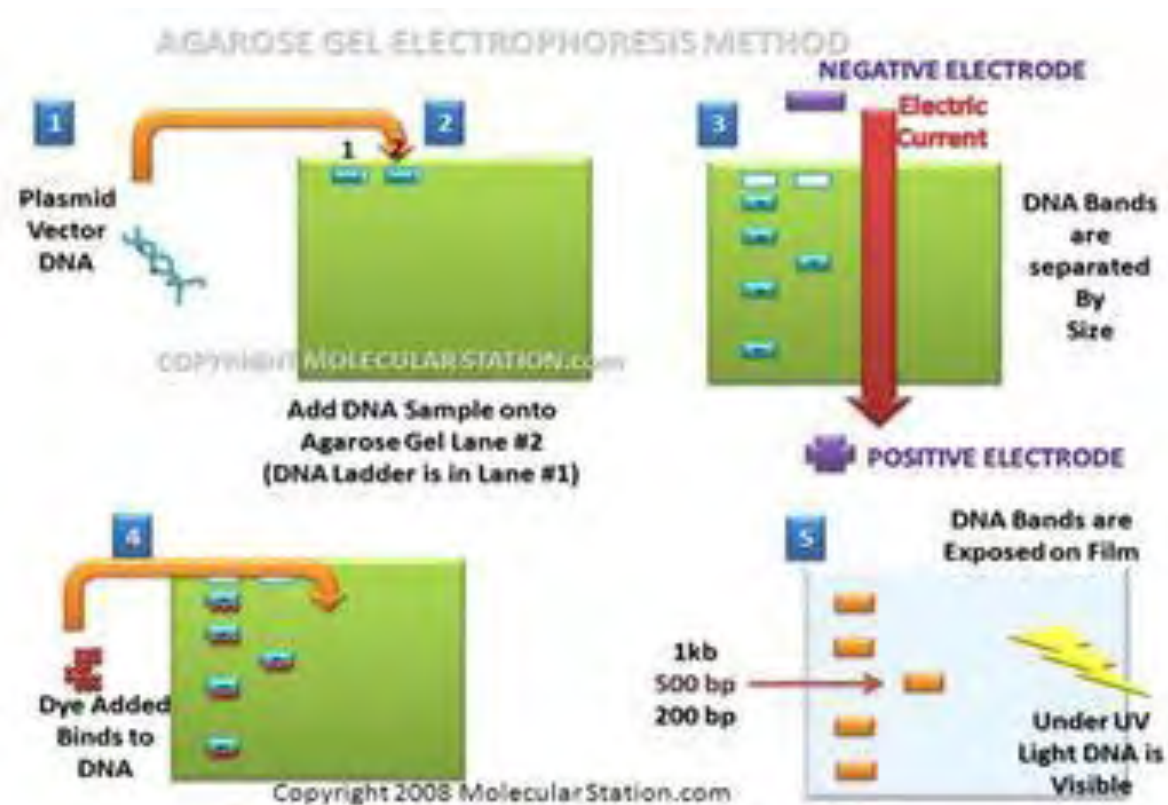
Για την παρασκευή του πηκτώματος αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν TBE Buffer 10X της εταιρίας Ambion, SeaKem LE Agarose της Cambrex και Ethidium bromide soln 10 mg/ml της Research Organics. Το TBE Ambion είναι ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8,3 το οποίο αποτελείται από 10,8 TRIS, 5,5 g/l βορικό οξύ και 0,002M EDTA.

Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν υλικά της εταιρίας Fermentas: 6X DNA Loading Dye Solution (0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης) και GeneRuler 100bp DNA Ladder. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ήταν η EC105-LVD Submarine Gel System Classic από την Thermo Electron Co και το τροφοδοτικό τάσης ήταν το EC105-LVD. Για την απεικόνιση των ζωνών χρησιμοποιήθηκε λάμπα UV MiniBisPro της Bio-Imaging Systems.

(Απαραίτητα υλικά: κωνική φιάλη 250 ml, χτενάκια στερεοποίησης πηκτώματος, πιπέτες, ακροφύσια, παραφίλμ και φούρνος μικροκυμάτων).

Για τη δημιουργία πηκτώματος αγαρόζης 2% ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

-
- α) Διαλύονται 2 gr αγαρόζης και 10 ml διαλύματος TBE 10X σε 90 ml WFI.
 - β) Τήξη της αγαρόζης σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 10 λεπτά για τη διάλυση της αγαρόζης.
 - γ) Ψύξη στον αέρα στους 55⁰C.
 - δ) Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, EtBr σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml, ώστε να να είναι ορατές οι ζώνες σε ακτινοβολία UV.
 - ε) Σε ορθογώνιο δοχείο τοποθετούνται τα χτενάκια για να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια για το φόρτωμα των δειγμάτων.
 - στ) Στο δοχείο τοποθετείται το διάλυμα αγαρόζης το οποίο πήζει σε 30 περίπου λεπτά
 - ζ) Αφαίρεση της χτένας μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης.
 - ι) Εμβάπτιση του πηκτώματος σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1X TBE.
 - ια) Κάθε δείγμα DNA τοποθετείται στα πηγαδάκια του πηκτώματος
 - ιβ) Στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετείται ο μάρτυρας DNA ladder.
 - ιγ) Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 100 V για 15 λεπτά
 - ιδ) Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να γίνουν ορατές οι ζώνες του DNA μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή.
-



AP Edition Biology Book, (<http://www.molecularstation.com/images/agarose-gel-electrophoresis.jpg>)

Μετά την επιβεβαίωση της επαρκούς εξαγωγής DNA, βάσει της θετικής PCR για το γονίδιο της β2-σφαιρίνης, όλα τα εξαγόμενα δείγματα DNA υποβλήθηκαν σε ποσοτική real time PCR με το σύστημα 7500 Fast RealTime PCR System της εταιρίας Applied Biosystems, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια του εμπορίου με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Applied Biosystems 7500 Fast
RealTime PCR System

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των κάτωθι μικροοργανισμών περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Assays	
Nanogen Advanced Diagnostics S.r.L	HSV1 QPCR Alert AmpliMIX,
	HSV2 QPCR Alert AmpliMIX
	VZV QPCR Alert AmpliMIX
	EBV QPCR Alert AmpliMIX
	QCMV Real Time Complete
	HHV6 Alert AmpliMIX
Sacace Biotechnologies	HPV High Risk Screen Real Time PCR
Sacace Biotechnologies	HPV High Risk Screen Real Time PCR
ELITech Molecular Diagnostics	Mycoplasma pneumoniae Q-PCR Alert Kit
	Chlamydomphila pneumoniae Q - PCR Alert Kit

Πειραματική διαδικασία της Real Time PCR (αναλυτική περιγραφή στο φυλλάδιο του κατασκευαστή:

- α) 100 µl AmpliMIX μεταφέρονται στον σωληνίσκο AmpliMaster. Καλή ανάδευση και τοποθέτηση με την πιπέττα όγκου 100 µl 3 φορές στο μείγμα.
- β. 100 µl AmpliPROBE μεταφέρονται στον σωληνίσκο AmpliMaster. Καλή ανάδευση και τοποθέτηση με την πιπέττα όγκου 100 µl 3 φορές στο μείγμα.
- γ. Τοποθέτηση στο vortex σε χαμηλή ταχύτητα για 5 λεπτά, αποφεύγοντας τη δημιουργία αφρού.
- δ. Φυγοκέντρωση των σωληνίσκων για 5 λεπτά για να έρθουν τα περιεχόμενα στον πυθμένα.

- ε. Τοποθέτηση 20 μl από το μείγμα της αντίδρασης στον πυθμένα των πηγαδιών της μικροπλάκας.
- ζ. Τοποθέτηση 5 μl εκχύλισμα DNA στον πυθμένα του αντίστοιχων πηγαδιών της μικροπλάκας. Με αυτόν τον τρόπο αυτό συμπληρώνονται και τα υπόλοιπα πηγαδάκια.
- η. Τοποθέτηση 5 μl στείρου απιονισμένου νερού στον πυθμένα του πηγαδιού της μικροπλάκας με τον αρνητικό μάρτυρα.
- θ. Τοποθέτηση 5 μl Q – PCR Standard (10^2 αντίγραφα) στον πυθμένα του αντίστοιχου πηγαδιού μικροπλάκας. Με αυτόν τον τρόπο τοποθετούνται και τα υπόλοιπα Q – PCR Standard (10^3 , 10^4 , 10^5 αντίγραφα).
- ι. Προσεκτική σφραγίση της μικροπλάκας, χρησιμοποιώντας την ταινία προσκόλλησης.
- ια. Μεταφορά της μικροπλάκας στο θερμικό κυκλοποιητή real time στην περιοχή πολλαπλασιασμού/ανίχνευσης και εκκίνηση του θερμικού πολλαπλασιαστικού κύκλου.

Στάδιο	Χρόνος	Θερμοκρασία
Decontamination	50°C	2 min
Initial denaturation	95°C	10 min
45 cycles extension	95°C	15 sec
	60°C	1 min

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν στο Μικροβιολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας.

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test. Η ανάλυση έγινε με το SPSS 20 λειτουργικό σύστημα (IBM, Chicago, IL, USA). Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Κεφάλαιο 10

Αποτελέσματα

10.1. Αποτελέσματα συμβατικής καλλιέργειας.

Σε 14 από τα 91 δείγματα της πειραματικής ομάδας της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολύποδες και σε 6 από τα 38 δείγματα της ομάδας ελέγχου απομονώθηκαν με τη βοήθεια των καλλιιεργειών τα παρακάτω βακτηριακά στελέχη:

Μικροβιακή χλωρίδα	Πειραματική ομάδα (n=91)	Ομάδα ελέγχου (n=38)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3
Κοαγκουλάση-αρνητικοί σταφυλόκοκκοι (CoNS)	10	5
Πρασινίζοντες στρεπτόκοκκοι	2	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0

Σε κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα δεν απομονώθηκαν μύκητες.

10.2. Αποτελέσματα μοριακής ανίχνευσης.

Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται τα ποσοστά ανίχνευσης του κάθε μικροβιακού παράγοντα στις δύο ομάδες της μελέτης.

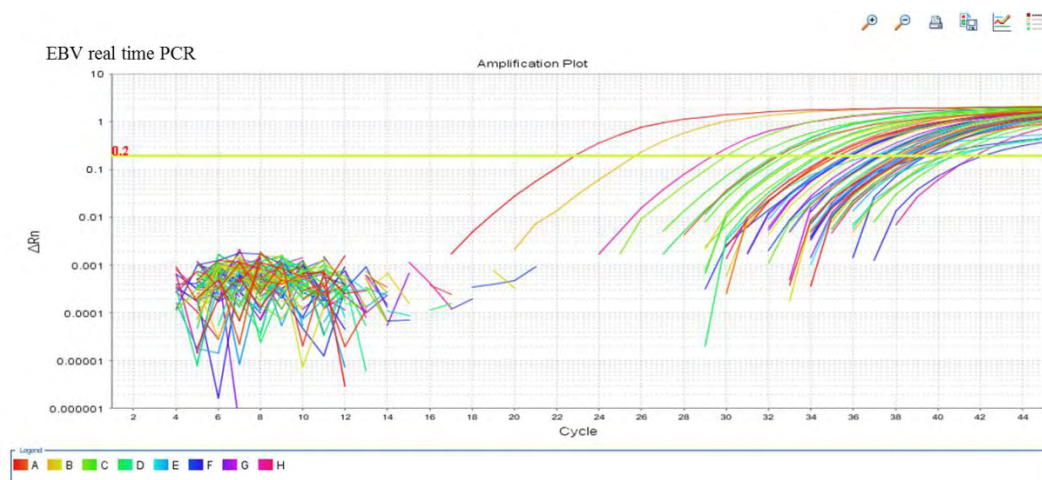
	CRwNP (n=91)	Control (n=38)	Στατιστικά σημαντικό (p<0,05)*
	Positive – n (%)	Positive – n(%)	
HSV1	1 (1.1%)	0	NS
HSV2	0	0	NS
VZV	0	0	NS
EBV	24 (26.4%)	4 (10.5%)	NS
CMV	1 (1.1%)	0	NS
HHV-6	13 (14.29%)	10 (26.32%)	NS
HR-HPV	0	0	NS
LR-HPV	0	0	NS
<i>Mycoplasma</i>	0	0	NS
<i>Chlamydia</i>	0	0	NS

* Fisher's exact test

α) NS: non significant (μη στατιστικά σημαντικό: <0,05)

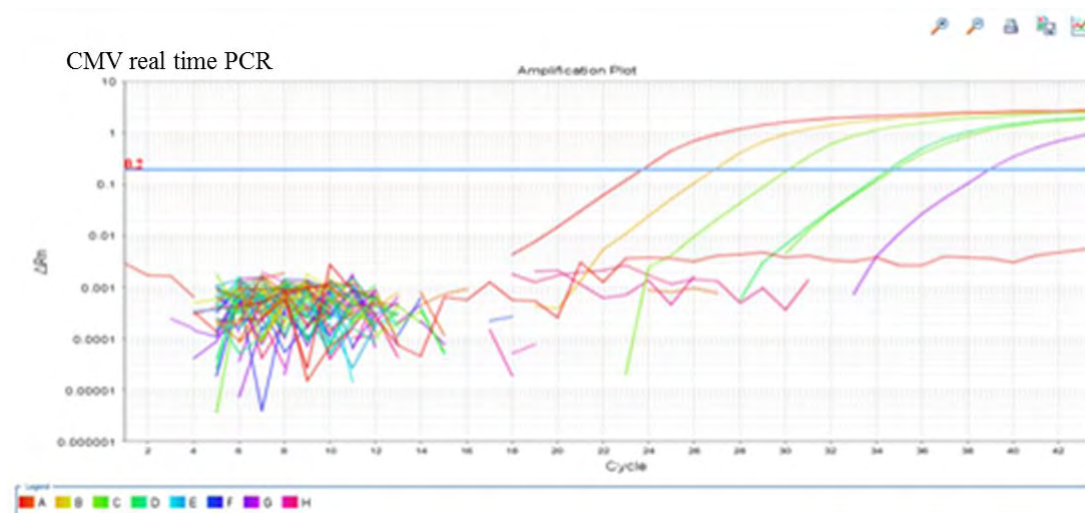
β) Συντομογραφίες: Herpes Simple Virus-1 (HSV-1), Herpes Simple Virus-2 (HSV-2), Varicella Zoster Virus (VZV), Cytomegalovirus (CMV), Epstein–Barr Virus (EBV), Human Herpes Virus-6 (HHV-6), Human Papilloma Viruses (HPV) [high-risk HPV (HR-HPV) και low risk HPV (LR-HPV) types]

Η συχνότητα EBV DNA ήταν υψηλότερη στην ομάδα των ρινικών πολυπόδων από ότι στην ομάδα ελέγχου (CRwNP group: 24/91; 26.4% της ομάδας ελέγχου: 4/38; 10.5%). Η διαφορά αυτή ωστόσο δεν ήταν στατιστικά σημαντική, (p = 0.06).



Η συχνότητα HHV-6 DNA ήταν χαμηλότερη στην ομάδα των ρινικών πολυπόδων από ότι στην ομάδα ελέγχου (CRwNP group: 13/91; 14.29% έναντι της ομάδας ελέγχου: 10/38; 26.32%). Η διαφορά αυτή επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p = 0.13$).

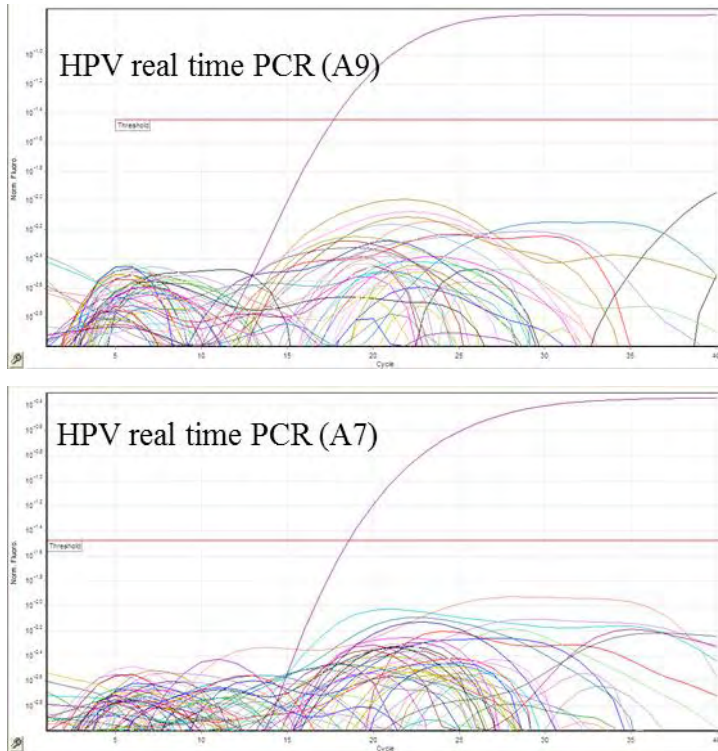
Ένα μόνο δείγμα στη ομάδα των ρινικών πολυπόδων (1/91; 1.1%) ήταν θετικό σε HSV-1 DNA και άλλο ένα σε CMV DNA (1/91; 1.1%), ενώ κανένα από τα δείγματα της ομάδας ελέγχου δεν ήταν θετικό για HSV-1 και CMV DNA. Οι διαφορές αυτές επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Στην ομάδα των ρινικών πολυπόδων, 4 δείγματα βρέθηκαν ταυτόχρονα θετικά για EBV και HHV-6, ενώ 1 δείγμα ήταν ταυτόχρονα θετικό για EBV και CMV DNA. Ταυτόχρονη

θετικότητα για EBV και HHV-6 DNA παρατηρήθηκε επίσης σε 2 δείγματα της ομάδας ελέγχου.

Όλα τα δείγματα της πειραματικής και της ομάδας ελέγχου ήταν αρνητικά για HSV2, VZV, HR-HPV and LR-HPV DNA.



Επιπλέον σε κανένα κλινικό δείγμα, είτε από την ομάδα των ασθενών είτε από την ομάδα ελέγχου δεν ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό *M. pneumoniae* και *C. pneumoniae*.

Κεφάλαιο 11

Συζήτηση.

11.1 Ιοί.

Η πιθανότητα της συμμετοχής του ιού Epstein Barr (EBV) στην αιτιοπαθογένεση της ρινικής πολυποδίασης διερευνήθηκε για πρώτη φορά από τον Kozak *et al* [166]. Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας in situ υβριδισμό (ISH) σε μια πιλοτική μελέτη με 9 ασθενείς

CRwNP και 6 άτομα ως ομάδα ελέγχου ανακοίνωσαν την απουσία EBV DNA και στις δύο ομάδες.

Παρόμοια αποτελέσματα ανακοίνωσαν και οι Sham *et al* [167] το 2012 πάλι με *in situ* υβριδισμό (ISH) σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών με CRwNP (n=30) και ομάδα ελέγχου (n=32).

Αντίθετα, οι Tao *et al* [168] υπήρξαν οι πρώτοι που κατέδειξαν το βλεννογόνο των ρινικών πολυπόδων ως μία από τις θέσεις χρόνιας λανθάνουσας παρουσίας του ιού EBV, αναδεικνύοντας τη θετική παρουσία EBV σε 13 δείγμα ασθενών με CRwNP σε ποσοστό 15%, 69% και 85%, με τη χρήση Southern blot hybridization (SBH), qualitative PCR, και ISH αντίστοιχα. Στη μελέτη τους όμως δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου.

Οι Zaravinos *et al* [169] το 2009 χρησιμοποίησαν qualitative PCR σε δείγματα από 23 ασθενείς με CRwNP και 13 δείγματα από βλεννογόνο κάτω ρινικής κόγχης από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαφραγματοπλαστική, που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Οι ερευνητές ανίχνευαν EBV DNA στο 35% των ασθενών με CRwNP έναντι 0% στην ομάδα ελέγχου, αναδεικνύοντας στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία EBV και το σχηματισμό ρινικών πολυπόδων.

Πρόσφατα, το 2014, οι Costa *et al* [170] χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά ποσοτική PCR σε 35 δείγματα ασθενών με CRwNP, προκειμένου να συγκρίνουν την παρουσία EBV DNA στον ιστό των ρινικών πολυπόδων και τον βλεννογόνο των παρακείμενων μέσων/κάτω ρινικών κογχών. Οι ερευνητές ανέδειξαν υψηλότερη συχνότητα του EBV DNA στα δείγματα των ρινικών πολυπόδων, υποδεικνύοντας μια πιθανή αιτιολογική συσχέτιση ή επίμονη χρόνια φλεγμονώδη παρουσία στο λεμφοειδή ιστό. Η διαφορά όμως αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επιπλέον η απουσία ομάδας υγιών εθελοντών αποτέλεσε τον βασικό περιορισμό της μελέτης. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης συνυποστηρίζουν τα

ευρήματα των Costa *et al* [170], καθώς η συχνότητα του EBV ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των ασθενών με CRwNP, παρά στην ομάδα ελέγχου, αλλά αυτή η διαφορά στη συχνότητα δεν ήταν στατιστικά σημαντική, έστω και οριακά ($p = 0.06$).

Σε ότι αφορά την παρουσία HPV DNA, αντικρουόμενα ευρήματα έχουν ανακοινωθεί στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία. Οι Bradnsma *et al* [171] και Gaffey *et al* [172], χρησιμοποιώντας SBH και ISH αντίστοιχα, ανακοίνωσαν μηδενική παρουσία HPV DNA σε ασθενείς με CRwNP. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Becker *et al* [173] και Sham *et al* [167], χρησιμοποιώντας ποιοτική PCR, καθώς δεν ανίχνευσαν HPV DNA στην ομάδα των ασθενών με CRwNP και την ομάδα ελέγχου.

Οι Hoffman *et al* [174] το 2000 ανακοίνωσαν ένα μοναδικό ύποπτο δείγμα για παρουσία HPV DNA σε μια ομάδα 33 δειγμάτων από ασθενείς με CRwNP, χρησιμοποιώντας SBH και ποιοτική PCR, ενώ οι Zaravinos *et al* [169] με ποιοτική PCR (GP5+/6+ non-type-specific primers) ανακοίνωσαν μη στατιστικά σημαντική παρουσία HPV DNA σε δείγματα ασθενών με CRwNP (3/23, 13%) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου μελετώντας δείγματα από την κάτω ρινική κόγχη (0/13).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες οι Fei Pei *et al* [175], σε μια μεγάλη μελέτη σε Κινέζικο πληθυσμό, χρησιμοποιώντας ποιοτική PCR and flow through hybridization and gene chip technology για την ανίχνευση του HPV, και των υποτύπων του [low risk-HPV (LR-HPV) και high risk HPV (HR-HPV)], σε 204 ασθενείς με CRwNP και 36 υγιείς εθελοντές (δείγμα βλεννογόνου μέσης ρινικής κόγχης), ανακοίνωσαν παρουσία HPV DNA στο 40,2% των ασθενών με CRwNP, έναντι 0% στην ομάδα ελέγχου. Στη μελέτη τους στα δείγματα των ρινικών πολυπόδων ανιχνεύθηκαν 13 γονότυποι του HPV (low risk-HPV υποτύποι: 11, 6, 34, 70 and 44; και HR-HPVs υποτύποι: 58, 52, 18, 16, 68, 53, 31 and 33), με τον LR-HPV-11 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα (45.28%).

Πρόσφατα (2014) οι Rizzo *et al* [176] ανακοίνωσαν τη χρήση ποσοτικής real time PCR για την ανίχνευση HR-HPV (υποτύποι: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,52, 53, 56, 58, 59, 66, and 70) και LR-HPV (υποτύποι: 6,11) σε ένα Καυκάσιο πληθυσμό από 20 ασθενείς με CRwNP και 10 υγιείς εθελοντές που αποτέλεσαν ομάδα ελέγχου. Κανένα από τα δείγματά τους δεν αναδείχτηκε θετικό για HR-HPV. Σε ότι αφορά όμως το LR- HPV, ανακοίνωσαν δείγματα θετικά για HPV-11 σε ποσοστό 50% στην υποομάδα των 10 ασθενών με CRwNP χωρίς αλλεργική νόσο, ενώ κανένα από τα δείγματα από ασθενείς με CRwNP με αλλεργική νόσο ή την ομάδα ελέγχου δεν προέκυψε θετικό.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα οι ερευνητές υποστήριξαν ότι κλινικές παράμετροι, όπως η παρουσία αλλεργίας, μπορεί να επηρεάσουν την παρουσία HPV. Προχωρώντας ένα βήμα παραπέρα, υποστήριξαν ότι η παρουσία HPV-11 μπορεί να αποτελεί προγνωστικό δείκτη για την παρακολούθηση των ασθενών με CRwNP, χωρίς αλλεργική νόσο, καθώς παρατήρησαν ότι και οι 5 θετικοί για παρουσία HPV-11 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα των ασθενών με υποτροπιάζουσα νόσο [176].

Τα παραπάνω δεδομένα από τη βιβλιογραφία συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Author	Viruses tested	CRwNP	Controls	Technique	Significance
Herpesviruses					
Kozak <i>et al</i> ⁷	EBV	0/9 (0%)	0/6	ISH	NS
Sham <i>et al</i> ⁸	EBV	0/30	0/32	ISH	NS
Tao <i>et al</i> ⁹	EBV	2/13 (15%)	no	SBH	
		9/13 (69%)	no	PCR	
		11/13 (85%)	no	ISH	
Zaravinos <i>et al</i> ¹⁰	EBV	8/23 (35%)	0/13	PCR	p= 0.0159
	HSV1	2/23	0/13		NS
	CMV	1/23	0/13		NS
	HSV2, VZV,	0/23	0/13		NS
	HHV6	0/23	0/13		NS
Costa <i>et al</i> ¹¹	EBV	8/35 (22,9%)	no	Quantitative PCR	
	HSV1	2/35	no		
	CMV	1/35	no		
	HSV2, VZV	0/35 (0%)	no		
	HHV6	8%	no		

Author	Viruses tested	CRwNP	Controls	Technique	Significance
HPV					
Bradnsma <i>et al</i> ¹²	HPV	0/5 (0%)	0/1	SBH	NS
Gaffey <i>et al</i> ¹³	HPV	0/4 (0%)	no	ISH	
Becker <i>et al</i> ¹⁴	HPV (10 with aspirin intolerance -and 10 without)	0/20 (0%) – 10 WAI, 10 WoAI	0/10	PCR	NS
Sham <i>et al</i> ⁸	HPV	0/48 (0%)	0/85	PCR	NS
Hoffman <i>et al</i> 2000 ¹⁵	HPV	1/33		SBH,PCR	
Zaravinos <i>et al</i> ¹⁰	HPV	3/23 (13%)	0/13	PCR	NS
Fei Pei <i>et al</i> ¹⁶	HPV	204 – (40,2% +)	0/36	PCR	p< 0.00001
Rizzo <i>et al</i> ¹⁷	HPV (With Allergic Disease - Without Allergic Disease)	5/10 wAD, 0/10 woAD	0/10	Quantitative PCR	p=0.0098

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας την υψηλής ευαισθησίας ποσοτική real time PCR σε ένα μεγάλο πληθυσμό 91 ασθενών με CRwNP και 38 ασθενείς χωρίς CRS ως ομάδα ελέγχου, δεν επιβεβαιώσαμε τα αποτελέσματα των Fei Pei *et al* [175], καθώς δεν ανιχνεύσαμε παρουσία HPV DNA (LR-HPV και HR-HPV) σε κανένα από τα δείγματα της πειραματικής ομάδας ή της ομάδας ελέγχου.

Τα διαφορετικά ευρήματα θα μπορούσαν να αποδοθούν σε διαφορές στους δύο διαφορετικούς πληθυσμούς που μελετήθηκαν (Ελληνικός έναντι Ασιατικού) ή τη διαφορετική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της παρουσίας HPV DNA (ποιοτική έναντι ποσοτικής PCR).

Επιπρόσθετα τα ευρήματά μας υποστηρίζουν εκείνα των Rizzo *et al* [176] σε ότι αφορά την απουσία HR-HPV στους ασθενείς με ρινικούς πολύποδες και στην ομάδα ελέγχου, αλλά έρχονται σε αντίθεση με την υψηλή επίπτωση LR-HPV-11 στους ασθενείς με ρινικούς πολύποδες χωρίς αλλεργική νόσο. Σημειώνεται ότι στη παρούσα μελέτη δε βρέθηκε κανένα δείγμα θετικό για LR-HPV, παρόλο που οι αλλεργικοί ασθενείς είχαν αποκλεισθεί και 26 από αυτούς ήταν ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο. Οι διαφορές ανάμεσα στις μελέτες μπορεί να αποδοθούν στη διαφορά στο μέγεθος του πληθυσμού.

Ως αναφορά του ιού HHV-6 οι Zaravinos *et al* [169] ήταν οι πρώτοι που διερεύνησαν την παρουσία HHV-6 σε ιστό ρινικών πολυπόδων. Χρησιμοποιώντας ποιοτική PCR, βρήκαν απουσία HHV-6 DNA στους ασθενείς με ρινικούς πολύποδες και στην ομάδα ελέγχου (δείγματα βλεννογόνου κάτω ρινικής κόγχης).

Αντίθετα οι Costa *et al* [170], χρησιμοποιώντας ποσοτική PCR σε δείγματα ρινικών πολυπόδων και βλεννογόνου μέσης/κάτω ρινικής κόγχης από 35 ασθενείς με CRwNP, βρήκαν θετική παρουσία HHV-6 DNA στο 8% των δειγμάτων των ρινικών πολυπόδων και στο 35% στον παρακείμενο ρινικό βλεννογόνο της μέσης/ κάτω ρινικής κόγχης. Αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ δεν υπήρχε ομάδα υγιών μαρτύρων στη μελέτη.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν τα ευρήματα των Costa *et al* [170], καθώς η συχνότητα του HHV-6 DNA ήταν μικρότερη στην ομάδα των ρινικών πολυπόδων από ότι στην ομάδα ελέγχου από δείγματα βλεννογόνου κάτω ρινικής κόγχης

από άτομα χωρίς CRS (14.29% έναντι 26.32% αντίστοιχα), ενώ η διαφορά στη συχνότητα ήταν και στην περίπτωση αυτή μη στατιστικά σημαντική.

Πιθανότητα η διαφορά στα αποτελέσματα από τη μελέτη των Zaravinos *et al* [169] μπορεί να οφείλεται στην υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα της ποσοτικής έναντι της ποιοτικής PCR [170].

Η παρουσία of HSV-1, HSV-2, VZV και CMV DNA στον ιστό των ρινικών πολυπόδων διερευνήθηκε από τους Zaravinos *et al* [169] με ποιοτική PCR και από τους Costa *et al* [170] με ποσοτική PCR. Και οι δύο ομάδες ερευνητών ανακοίνωσαν παρόμοια ευρήματα (2 θετικά για HSV-1 και 1 θετικό για CMV δείγμα η καθεμιά, ενώ δεν αναδείχτηκε καμιά παρουσία HSV-2 ή VZV, όπως και στην παρούσα μελέτη.

Η βασική αδυναμία της παρούσας μελέτης είναι η διαφορά στο μέγεθος του πληθυσμού της πειραματικής ομάδας των ασθενών με CRwNP (n = 91) και της ομάδας ελέγχου (n = 38). Αυτή η διαφορά προέκυψε γιατί, κατά τη διάρκεια της μελέτης, μόνο 38 από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαφραγματοπλαστική δέχτηκαν να συμμετέχουν στη μελέτη.

Αυτή η διαφορά στο μέγεθος του δείγματος ενδέχεται να επηρέασε τα αποτελέσματά μας και μπορεί να εξηγεί τις διαφορές με τα αποτελέσματα που έχουν ανακοινωθεί στη βιβλιογραφία.

Επιπρόσθετα, όπως σημειώθηκε παραπάνω, οι διαφορές ανάμεσα στις μελέτες μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην ανίχνευση του ιϊκού DNA (ISH έναντι SBH έναντι qualitative PCR έναντι quantitative PCR).

Σημειώνεται ότι, εκτός από την παρούσα μελέτη, μόνοι οι Costa *et al* [170] χρησιμοποίησαν την υψηλής ευαισθησίας ποσοτική PCR. Αυτό είναι και το βασικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης, καθώς η ποσοτική PCR χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα.

11.2 *Mycoplasma pneumoniae* και *Chlamydophyla pneumoniae*.

Οι Gurr *et al* [177] ήταν οι πρώτοι ερευνητές που χρησιμοποίησαν μοριακές τεχνικές στη διερεύνηση του πιθανού ρόλου του *M. pneumoniae* (Mp) στην αιτιοπαθογένεση των ρινικών πολυπόδων το 1996. Σε μια πιλοτική μελέτη με 14 ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες (CRwNP), 5 ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα χωρίς ρινικούς πολύποδες (CRsNP) και 7 άτομα ως ομάδα ελέγχου (βλεννογόνο κάτω ρινικής κόγχης), χρησιμοποίησαν κλασσική PCR και ανακοίνωσαν παρουσία *M. pneumoniae* DNA σε 13/14 (93%) δείγματα της ομάδας CRwNP, σε 4/5 (80%) δείγματα της ομάδας CRsNP, αλλά μόνο σε 1/7 (14%) των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου. Ως εκ τούτου, με βάση τα ευρήματα αυτά υποστήριξαν μια αιτιολογική συσχέτιση του *M. pneumoniae* με την παθογένεση των ρινικών πολυπόδων.

Οι Bucholtz *et al* [178] όμως σε μια ανάλογη μελέτη το 2002 απέτυχαν να επιβεβαιώσουν την παρουσία Mp DNA στους ρινικούς ιστούς σε ασθενείς με ρινικούς πολύποδες και υγιείς εθελοντές. Οι ερευνητές έλεγξαν 40 δείγματα από ασθενείς με CRwNP, 6 με CRsNP και 9 δείγματα βλεννογόνου κάτω ρινικών κογχών για την παρουσία Mp DNA. Χρησιμοποίησαν ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο *16S rRNA* σε 41 δείγματα (31 CRwNP, 4 CRsNP και 6 controls) και επιπλέον consensus sequence-based PCR χρησιμοποιώντας ευρέος φάσματος εκκινητές για ευκαριωτικό DNA που κωδικοποιούσε το γονίδιο *16S rRNA* σε 38 δείγματα (26 CRwNP, 5 CRsNP και 7controls) και δεν βρήκαν καθόλου Mp-ειδικό DNA κωδικοποιόν *16S rRNA* σε κανένα από τα δείγματα.

Πρόσφατα οι Pandak *et al* [179], χρησιμοποιώντας real time PCR σε εκπλύματα παραρινίων κόλπων, απέτυχαν να ανιχνεύσουν οποιαδήποτε παρουσία Mp DNA σε 60 ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα (24 CRsNP - 36 CRwNP).

Αντίθετα οι Nia *et al* [180], χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό PCR – ELISA, ανακοίνωσαν παρουσία Mr DNA σε 19.6% των δειγμάτων από ασθενείς με CRwNP (10/51 δείγματα) σε αντιδιαστολή με 0 σε 19 δείγματα ομάδας ελέγχου από ασθενείς που υποβάλλονταν σε επέμβαση για ρινικά κατάγματα. Τα ευρήματα αυτά ήταν παρόμοια με εκείνα που ανακοινώθηκαν αρχικά από τους Gurr *et al* [177].

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας την υψηλής ευαισθησίας ποσοτική PCR σε ιστούς ρινικών πολυπόδων και βλεννογόνο κάτω ρινικής κόγχης από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε διαφραγματοπλαστική και χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου δεν ανιχνεύσαμε καμιά παρουσία Mr DNA σε 62 δείγματα ρινικών πολυπόδων και 24 δείγματα ομάδας ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της απουσίας συσχέτισης του *M. pneumoniae* με την αιτιοπαθογένεση των ρινικών πολυπόδων.

Τα παραπάνω ευρήματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				
	CRwNP	CRsNP	Controls	Technique
	(positive / n)	(positive / n)	(positive / n)	
Gurr et al	13/14*	4/5*	1/7*	PCR
Bucholtz et al	0/40*	0/6*	0/9*	PCR
Nia et al	10/51*	-	0/19*	PCR ELISA
Pandak et al	0/36**	0/24**	-	Real time PCR
Present study	0/62*	-	0/24*	Real time PCR

* tissue samples **aspirates of sinus lavage

Τέλος, η πιθανότητα της συσχέτισης του *Chlamydia pneumoniae* (Cp) με την αιτιοπαθογένεση των ρινικών πολυπόδων διερευνήθηκε αρχικά από τους Lee *et al* [181] το 2005. Οι ερευνητές σε μια πιλοτική μελέτη, χρησιμοποιώντας ποιοτική PCR, ανέδειξαν την απουσία Cp DNA σε δείγματα 11 δειγμάτων ασθενών με χρόνια ρινοκολπίτιδα και 6 πτωματικά δείγματα, που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Αντίθετα οι Aran *et al* [182], χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε δείγματα ιστών 30 ασθενών με CRwNP και 30 υγιών εθελοντών αναλόγου ηλικίας και φύλου, ανακοίνωσαν στατιστικά σημαντική υψηλότερη παρουσία Cp DNA στην ομάδα με CRwNP (16/30, 53,3%) έναντι της ομάδας ελέγχου (8/30, 26,6%) ($p = 0.034$).

Εντούτοις, μελέτες που ακολούθησαν, οι οποίες χρησιμοποίησαν ποιοτική PCR σε δείγματα ιστών έδειξαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Το 2008, οι Fahrenholz *et al* [183] δεν ανίχνευσαν καμιά παρουσία *C. pneumoniae*, χρησιμοποιώντας ποιοτική PCR σε 27 ασθενείς με ανθεκτική σε συντηρητική θεραπεία χρόνια ρινοκολπίτιδα και σε 5 υγιείς εθελοντές της ομάδας ελέγχου, ενώ, το 2014, οι Shokrollahi *et al* [184] ανακοίνωσαν την παρουσία Cp DNA σε 10/51 δείγματα ασθενών με CRwNP (19.6%) σε αντιδιαστολή με 0/19 (0%) στην ομάδα ελέγχου.

Ο κύριος περιορισμός των παραπάνω μελετών ήταν το μικρό δείγμα ασθενών. Μια μελέτη με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος υλοποιήθηκε από τους Pandak *et al* [179]. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ποσοτική real time PCR σε εκπλύματα παραρρινίων κόλπων σε 60 ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα (24 CRsNP και 36 CRwNP) και ανακοίνωσαν πλήρη απουσία Cp DNA. Το κύριο μειονέκτημα της μελέτης ήταν ότι χρησιμοποίησε ως δείγματα υγρό εκπλύσεων παραρρινίων κόλπων κατά τη διάρκεια ενδοσκοπικής χειρουργικής ρινός παραρρινίων και όχι ρινικούς ιστούς (πολύποδες – βλεννογόνο ρινικών κογχών), όπως σε

ανάλογες μελέτες. Με δεδομένο τον ενδοκυττάριο κύκλο ζωής του *C. pneumoniae* και την καταγεγραμμένη αυξημένη συχνότητα αναστολέων πολλαπλασιασμού (PCR) [185] σε σχέση με τα ιστικά δείγματα, αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας ποσοτική Real Time – PCR σε ιστικά δείγματα από ασθενείς με CRwNP και υγιείς εθελοντές, επιβεβαιώνουμε τα ευρήματα των Pandak *et al* [179] υποστηρίζοντας τη μη συμμετοχή του *C. pneumoniae* στην αιτιοπαθογένεση των ρινικών πολυπόδων.

Τα παραπάνω ευρήματα συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

<i>Clamydia pneumonia</i>					
	CRwNP	CRsNP	CRS	Controls	Technique
	(positive /n)	(positive /n)	(positive /n)	(positive /n)	
Lee et al			0/11*	0/6*	PCR
Apan et al	16/30*			08/30*	IF
Fahrenholz et al			0/27*	0/5*	PCR
Shokrollahi et al	10/51*			0/19*	PCR
Pandak et al	0/36**	0/24**	0/60**	-	Real time PCR
Present study	0/62*			0/24*	Real time PCR

IF: indirect immunofluorescence

* tissue samples, **aspirates of sinus lavage

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διάγνωση της λοίμωξης από *M. pneumoniae* ή *C. pneumoniae* βασίζεται στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό, ενώ κλασσικές μέθοδοι, όπως η καλλιέργεια και η ανίχνευση αντιγόνων δεν εφαρμόζονται [186].

Από τη μεριά τους, και οι μοριακές τεχνικές, ωστόσο, εμφανίζουν περιορισμούς. Ειδικότερα η επιμόλυνση κατά την επεξεργασία των δειγμάτων μπορεί να οδηγήσει σε

ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ενώ η παρουσία αναστολέων στα δείγματα μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [187,188].

Επιπρόσθετα το είδος του δείγματος είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη διάγνωση άτυπων παθογόνων σε προσβεβλημένους ασθενείς με βάση την PCR. Πχ στο έλεγχο για τη διάγνωση της πνευμονίας της κοινότητας από άτυπα βακτήρια το φλέγμα ως τύπος δείγματος παρουσιάζει μεγαλύτερη αξιοπιστία από τα επιχρίσματα του φάρυγγα και τα δείγματα του ρινοφάρυγγα [189]. Τα εκπλύματα έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι μη διαγνωστικά σε σχέση με τα φαρυγγικά δείγματα, καθώς συχνά περιέχουν ανεπαρκή ποσότητα υλικού ή αυξημένη παρουσία αναστολέων [185] και κατά συνέπεια είναι πιθανότερο να οδηγούν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Παράλληλα η ανίχνευση του DNA μπορεί να επηρεάζεται από το χρόνο συλλογής του δείγματος κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, όπως για παράδειγμα στην πνευμονία της κοινότητας από άτυπα βακτηρίδια [189].

Στη ίδια λογική η λοίμωξη από *M. pneumoniae* είναι γνωστό ότι παρουσιάζει εξάρσεις κάθε 4-7 έτη και είναι σημαντικά συχνότερη στη διάρκεια του Χειμώνα από ότι στις υπόλοιπες εποχές [190]. Επιπρόσθετα σε μελέτες μακράς διάρκειας παρακολούθησης λοίμωξης από *M. pneumoniae* (Nilsson *et al* [187]) έχει διαπιστωθεί ότι, παρόλο που οι περισσότεροι ασθενείς έχουν ανιχνεύσιμες ποσότητες Mr DNA στις φαρυγγικές τους εκκρίσεις για 7 εβδομάδες μετά την έναρξη της ασθένειας και μερικοί παραμένουν θετικοί στην PCR για μερικούς μήνες, το φορτίο του Mr DNA βαθμιαία μειώνεται και με την πάροδο του χρόνου όλοι οι ασθενείς γίνονται αρνητικοί στην PCR. Το πρότυπο αυτό συνηγορεί εναντίον της μετάβασης από την ενεργό λοίμωξη από *M. pneumoniae* σε μια κατάσταση χρόνιου εποικισμού, περιορίζοντας την πιθανότητα να λειτουργεί ως ένα διαρκές ερέθιστικό παράγοντα που προάγει τη φλεγμονή σε ασθενείς με CRwNP και σε συνδυασμό με την εποχιακή και επιδημική εμφάνισή των λοιμώξεων από *M. pneumoniae*

προσφέρει μια πιθανή εξήγηση τις διαφορές ως προς την επίπτωσή του στις διάφορες μελέτες.

Οι παραπάνω πιθανοί περιορισμοί του ελέγχου με τη χρήση μοριακών τεχνικών PCR, σε συνδυασμό με τις διαφορές στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν και τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, μπορεί να προσφέρει μια λογική εξήγηση για τις διαφορές στα αποτελέσματα μεταξύ των μελετών που συζητήθηκαν παραπάνω.

Στην παρούσα μελέτη ελήφθησαν όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις για να ελαχιστοποιηθούν οι περιορισμοί των μοριακών τεχνικών. Έτσι α) επιλέχθηκε η λήψη και η εξέταση βιοπτικών δειγμάτων ρινικών ιστών αντί της χρήσης υγρού έκπλυσης των παραρρινίων κόλπων, β) έγινε έλεγχος σε ένα σχετικά μεγάλο μέγεθος δείγματος (62 CRwNP και 24 controls), γ) επιλέχθηκε ένα Q-PCR Kit που χρησιμοποιεί την τεχνολογία TaqMan®-MGB, η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ειδικότητα και ευαισθησία ώστε βνα αποφευχθούν ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Κεφάλαιο 12

Συμπεράσματα.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι EBV και HHV-6 DNA ανιχνεύεται σε δείγματα ασθενών με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολυπόδες, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά από ότι στην ομάδα ελέγχου από άτομα χωρίς χρόνια ρινοκολπίτιδα.

Επιπλέον καταδεικνύεται η απουσία HR-HPV and LR-HPV DNA τόσο στην ομάδα της χρόνιας ρινοκολπίτιδας με ρινικούς πολυπόδες, όσο και στην ομάδα ελέγχου.

Παράλληλα, η παρούσα μελέτη καταδεικνύει την πλήρη απουσία γενετικού υλικού *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* σε υλικό βιοψίας από ασθενείς με CRwNP καθώς και σε υγιείς μάρτυρες.

Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την απουσία εμπλοκής των ατύπων αυτών βακτηριδίων στην παθογένεση της CRwNP.

Παρόλα αυτά, ενώ δεν φαίνεται πιθανό τα άτυπα αυτά βακτηρίδια να αποτελούν χρόνιο ερεθιστικό παράγοντα που επάγει την φλεγμονώδη διεργασία, δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα οι μικροοργανισμοί αυτοί να παίζουν ένα ρόλο στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως άλλωστε έχει καταδειχτεί στη περίπτωση της αλλεργίας και του άσθματος, ή να λειτουργούν ως παράγοντας τροποποίησης της νόσου.

Πιθανή κατευθύνη για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να αποτελέσει μια προοπτική μακροπρόθεσμη μελέτη, που θα αξιολογούσε την επίπτωση CRwNP σε ασθενείς με διαγνωσμένη λοίμωξη από άτυπα βακτηρίδια σε σχέση με υγιείς εθελοντές.

Βιβλιογραφία.

- [1] **Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., et al.** "EPOS 2012: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. A summary for otorhinolaryngologists." ,*Rhinology*, 2013:50(1):1-12.
- [2] **Collins J.G., Blackwell D.L., Tonthat L., et al.** "Prevalence of selected chronic conditions: United States, 1990-1992 Summary health statistics for the U.S. population: National Health Interview Survey, 1997 Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota The role of nasal endoscopy in outpatient management.", *Vital Health Stat.* 10, 1997:130(194):1-89.
- [3] **Huges R.G., Jones N.S.** "The role of nasal endoscopy in outpatient management.", *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 1998:23(3):224-226.
- [4] **Bhattacharyya Neil.** "Clinical and Symptom criteria for the accurate diagnosis of chronic rhinosinusitis.", *The Laryngoscope*, 2006:116(S110):1-22.
- [5] **Bonfils P., Nores J.M., Halimi P., Avan P., Le Bihan C. Landais P.** "Correlation between nasosinusual symptoms and topographic diagnosis in chronic rhinosinusitis.", *Annals of otology, rhinology & laryngology*, 2005:114(1):74-83.
- [6] **Chen Y., Dales R., Lin M.** "The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians.", *The Laryngoscope*, 2003:113(7):1199-1205.
- [7] **Hastan D., Fokkens W.J., Bachert C., et al.** "Chronic rhinosinusitis in Europe—an underestimated disease. A GA2LEN study." *Allergy*, 2011:66(9):1216-1223.
- [8] **Johansson L., Akerlund A., Holmberg K., Melen I., Bende M.** "Prevalence of nasal polyps in adults: The skovde population-based study.", *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 2003:112(7):625-629.
- [9] **Johansson L., Bramerson A., Holmberg K., Melen I., Bende M.** "Clinical relevance of nasal polyps in individuals recruited from a general population-based study. ", *Acta oto-laryngologica*, 2004:124(1):77-81.

- [10] **Min Y. G., Jung H. W., Kim H. S., Park S.K., Yoo K. Y.** "Prevalence and risk factors of chronic sinusitis in Korea: Results of a nationwide survey.", *European archives of oto-rhino-laryngology (EUFOS)*, 1996:253(7):435-439.
- [11] **Hedman J. Kaprio J. Poussa T. Nieminen M.M.** "Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study.", *International journal of epidemiology* 1999:28(4):717-722.
- [12] **Klossek J.M., Neukirch F., Pribil C., et al.** "Prevalence of nasal polyposis in france: A cross-sectional, case-control study.", *Allergy* 2005:60(2):233-237.
- [13] **Larsen P. L., Tos M.** "Origin of nasal polyps.", *The Laryngoscope*, 1991:101(3):305-312.
- [14] **Larsen P.L., Tos M.** "Site of origin of nasal polyps. Transcranially removed naso-ethmoidal blocks as a screening method for nasal polyps in autopsy material.", *Rhinology*, 1995:33(4):185-188.
- [15] **Larsen P.L., Tos M.,** "Anatomic site of origin of nasal polyps: Endoscopic nasal and paranasal sinus surgery as a screening method for nasal polyps in autopsy material.", *American journal of rhinology*, 1996:10(4):211-216.
- [16] **Larsen K., Tos M.** "The estimated incidence of symptomatic nasal polyps.", *Acta otolaryngologica*, 2002:122(2):179-182.
- [17] **Hosemann W., Gode U., Wagner W.** "Epidemiology, pathophysiology of nasal polyposis, and spectrum of endonasal sinus surgery.", *American journal of otolaryngology*, 1994:15(2):85-98.
- [18] **Szczeklik A., Nizankowska E., Duplaga M. & O.B. of Aiane Investigators** "Natural history of aspirin-induced asthma. European network on aspirin-induced asthma.", *The European respiratory journal*, 2000:16(3):432-436.
- [19] **Kohlmeier J.E., Woodland D.L.** "Immunity to respiratory viruses.", *Annual review of immunology*, 2009:27:61-82.
- [20] **Gwaltney J.M. Jr., Phillips C.D., Miller R.D., Riker D.K.** "Computed tomographic study of the common cold.", *New England journal of medicine*, 1994:330(1):25-30.
- [21] **Wood A.J., Antoszewska H., Fraser J., Douglas R.G.** "Is chronic rhinosinusitis caused by persistent respiratory virus infection?", *International forum of allergy & rhinology*, 2011:1:95-100.
- [22] **Jang Y.J., Kwon H.J., Park H.W., Lee B.J.** "Detection of rhinovirus in turbinate epithelial cells of chronic sinusitis.", *American journal of rhinology*, 2006:20(6):634-636.

- [23] **Sigurs N.** "Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link.", *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2001:163:S2-S6.
- [24] **Sly P.D., Kusel M., Holt P.G.** "Do early-life viral infections cause asthma?", *The journal of allergy and clinical immunology*, 2010:125:1202-1205.
- [25] **Sykes A., Johnston S.L.** "Etiology of asthma exacerbations.", *The journal of allergy and clinical immunology*, 2008:122(4):685-688.
- [26] **Rosenthal L.A., Avila P.C., Heymann P.W. et al.** "Viral respiratory tract infections and asthma: The course ahead.", *Journal of allergy and clinical immunology*, 2010:125(6):1212-1217.
- [27] **Holt P.G., Strickland D.H.** "Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: New perspectives from studies on acute exacerbations.", *Journal of allergy and clinical immunology*, 2010:125(5):963-972.
- [28] **Jackson D.J., Johnston S.L.** "The role of viruses in acute exacerbations of asthma.", *Journal of allergy and clinical immunology*, 2010:125(6):1178-1187
- [29] **Yamin M., Holbrook E.H., Gray S.T., et al.** "Cigarette smoke combined with Toll-like receptor 3 signaling triggers exaggerated epithelial regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted/CCL5 expression in chronic rhinosinusitis.", *Journal of allergy and clinical immunology*, 2008:122(6):1145-1153.
- [30] **Pedersen M., Sakakura Y., Winther B., Brofeldt S., Mygind N.** "Nasal mucociliary transport, number of ciliated cells, and beating pattern in naturally acquired common colds.", *European journal of respiratory diseases. Supplement*, 1983:128:355-365.
- [31] **Önerci M., Ferguson B.J.** "Nasal polyposis: pathogenesis, medical, and surgical treatment", Springer, 2010.
- [32] **Tos M., Mogensen C.** "Mucus production in chronic maxillary sinusitis. A quantitative histopathological study.", *Acta oto-laryngologica* 1984:97(1-2):151-159.
- [33] **Augusto A.G., Bussolotti Filho I., Dolci J.E., König B. Jr.** "Structural and ultrastructural study of the anterior portion of the nasal septum and inferior nasal concha.", *Ear, nose, & throat journal*, 2001:80(5):325-327, 333-328.
- [34] **Agha-Mir-Salim P., Rauhut O., Merker H.J.** "Electron and fluorescence microscopic investigations on composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha.", *European archives of oto-rhino-laryngology (EUFOS)*, 1993:250(7):401-407.

- [35] **Weinreb I., Gnepp D.R., Laver N.M., et al.** "Seromucinous hamartomas: A clinicopathological study of a sinonasal glandular lesion lacking myoepithelial cells.", *Histopathology*, 2009:54(2):205-213.
- [36] **Ali M.S., Wilson J.A., Pearson J.P.** "Mixed nasal mucus as a model for sinus mucin gene expression studies.", *The Laryngoscope*, 2002:112(2):326-331.
- [37] **Montag A.G., Tretiakova M., Richardson M.** "Steroid hormone receptor expression in nasopharyngeal angiofibromas. Consistent expression of estrogen receptor beta.", *American journal of clinical pathology*, 2006:125(6):832-837.
- [38] **Matthias C., De Souza P., Merker H.J.** "Electron microscopic and immunomorphological investigations on the mucosa of the human paranasal sinuses.", *European archives of oto-rhino-laryngology (EUFOS)*, 1997:254(5):230-235.
- [39] **Berger G., Finkelstein Y., Ophir D., Landsberg R.** "Old and new aspects of middle turbinate histopathology.", *Otolaryngology--head and neck surgery*, 2009:140(1):48-54.
- [40] **Debertin A.S., Tschernig T., Tönjes H., Kleemann W.J., Troger H.D., Pabst R.** "Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): Frequency and localization in young children.", *Clinical and experimental immunology*, 2003:134(3):503-507.
- [41] **Bhattacharyya N.** "Clinical and symptom criteria for the accurate diagnosis of chronic rhinosinusitis.". *The Laryngoscope*, 2006:116(S110):1-22.
- [42] **Aydil U., Karadeniz H., Sahin C.** "Choanal polyp originated from the inferior nasal concha.", *European archives of oto-rhino-laryngology (EUFOS)*, 2008:265(4):477-479.
- [43] **Christmas D.A., Mirante J.P., Yanagisawa E.** "Endoscopic view of 'mulberry hypertrophy' of the inferior turbinates.", *Ear, nose, & throat journal*, 2005:84(10):622-623.
- [44] **Zukerberg L.R., Rosenberg A.E., Randolph G., Pilch B.Z., Goodman M.L.** "Solitary fibrous tumor of the nasal cavity and paranasal sinuses.", *The American journal of surgical pathology*, 1991:15(2):126-130.
- [45] **Lai V., Wong Y.C., Lam W.Y., Tsui W.C., Luk S.H.** "Inflammatory myofibroblastic tumor of the nasal cavity.", *AJNR American journal of neuroradiology*, 2007:28:135-137.
- [46] **Aydin Ö., Keskin G., Ustundag E., Iseri M., Ozkarakas H.** "Choanal polyps: An evaluation of 53 cases.", *American journal of rhinology*, 2007:21(2):164-168.
- [47] **Tos M., Mogensen C.** "Mucus production in the nasal sinuses.", *Acta oto-laryngologica Supplementum* 1979:360:131-134.

- [48] **Barnes L.** "Schneiderian papillomas and nonsalivary glandular neoplasms of the head and neck.", *Modern pathology*, 2002;15(3):279-297.
- [49] **Coutinho-Camillo C.M., Brentani M.M., Nagai M.A.** "Genetic alterations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas.", *Head & neck* 2008;30(3):390-400.
- [50] **Penner C.R., Thompson L.** "Nasal glial heterotopia: A clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 10 cases with a review of the literature.", *Annals of diagnostic pathology* 2003;7:354-359.
- [51] **Leopold D.A., Hummel T., Schwob J.E., Hong S.C., Knecht M., Kobal G.** "Anterior distribution of human olfactory epithelium.", *The Laryngoscope* 2000;110(3):417-421.
- [52] **Shvili I., Hadar T., Shvero J., Feinmesser R., Koren R.** "Cholesterol granulomas in antrochoanal polyps: A clinicopathologic study.", *European archives of oto-rhino-laryngology and head & neck* 2005;262(10):821-825.
- [53] **Templeton N.S.** "The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. Diagnostic molecular pathology", *American journal of surgical pathology part B*, 1992;1(1):58-72.
- [54] **Raby B.A., Slavotinek A., Tirnauer J.S.** " Polymerase chain reaction.", In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Updated February 1 2013. Accessed on February 2, 2015.
- [55] **Eckert K.A., Kunkel T.A.** "DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.", *PCR methods and applications*, 1991;1:17-24.
- [56] **Rozen S., Skaletsky H.** "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.", *Methods in molecular biology*, 2000;132:365-386.
- [57] **Clarke J.R., McClure M.O.** "Hiv-1 viral load testing.", *The Journal of infection*, 1999;38:141-146.
- [58] **Churchill D., Weber J.** "Measurement of plasma HIV viral load--clinical applications." *Journal of infection*, 1999;38(3):147-150.
- [59] **Takeuchi T., Katsume A., Tanaka T., et al.** "Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome.", *Gastroenterology*, 1999;116(3):636-642.
- [60] **Martell M., Gomez J., Esteban J.I., et al.** "High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA.", *Journal of clinical microbiology*, 1999;37(2):327-332.
- [61] **Wagner H.J., Wessel M., Jabs W., et al.** "Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: Plasma versus peripheral blood

- mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction.”, *Transplantation*, 2001:72:1012-1019.
- [62] **Ryan K.J., Ray C.G.** “Sherris Medical Microbiology (4th ed.).”, McGraw Hill Medical Publishing, 2004
- [63] **Mettenleiter, et al.** “Molecular Biology of Animal Herpesviruses.”, Caister Academic Press, 2008.
- [64] **Sandri-Goldin R.M.** “Alpha Herpesviruses: Molecular and Cellular Biology.”, Caister Academic Press, 2006.
- [65] **Chayavichitsilp P., Buckwalter J.V., Krakowski A.C., Friedlander S.F.** “Herpes simplex.”, *Pediatrics in review/American Academy of Pediatrics*, 2009:30(4):119-129.
- [66] **Staras S.A., Dollard S.C., Radford K.W., Flanders W.D., Pass R.F., Cannon M.J.** “Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the united states, 1988-1994.”, *Clinical infectious diseases*, 2006:43(9):1143-1151.
- [67] **O.A. Ryder, Byrd M.L.** “One Medicine: A Tribute to Kurt Benirschke, Director Center for Reproduction of Endangered Species Zoological Society of San Diego and Professor of Pathology and Reproductive Medicine University of California San Diego from his Students and Colleagues.”, Springer Science & Business Media, 1984:296–308.
- [68] **Davison A.J.** “Herpesvirus systematics.”, *Veterinary microbiology* 2010:143(1):52-69.
- [69] **Adams M.J., Carstens E.B.** “Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses (2012).”, *Archives of virology*, 2012:157:1411-1422.
- [70] **Whitley R.J.** “Herpesviruses.”, In: Baron S. et al., ed. *Medical Microbiology* (4th ed.), University of Texas, Medical Branch, 1996.
- [71] **Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.** “Medical Microbiology (5th ed.).”, Elsevier Mosby, 2005.
- [72] **Spencer J.V., Lockridge K.M., Barry P.A., et al.** “Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10.”, *Journal of virology*, 2002:76(3):1285-1292.
- [73] **Lin A., Xu H., Yan W.** “Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion.”, *Cellular & molecular immunology*, 2007:4(2):91-98.
- [74] **Doorbar J.** “Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.” *Clinical science*, 2006:110:525-541.
- [75] **De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H.** “Classification of papillomaviruses.”, *Virology*, 2004:324(1):17-27.

- [76] **Muñoz N., Bosch F.X., de Sanjosé S., et al.** "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer." *New England journal of medicine*, 2003;348(6):518-527.
- [77] **Walboomers J.M., Jacobs M.V., Manos M.M., et al.** "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.", *Journal of pathology*, 1999;189(1):12-19.
- [78] **Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., et al.** "Human papillomavirus and cervical cancer.", *Lancet*, 2007;370:890.
- [79] **Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P.** "Global cancer statistics, 2002.", *CA Cancer J. Clin.*, 2005;55:74.
- [80] **D'Souza G., Kreimer A.R., Viscidi R., et al** "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer.", *New England journal of medicine*, 2007;356(19):1944-1956.
- [81] **Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S.** "Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review.", *Cancer epidemiology biomarkers & prevention* 2005;14(2):467-475
- [82] **Ferlay J., Shin H.R., Bray F., et al.** "GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10.", *International agency for research on cancer*, Lyon, France, 2010.
- [83] **De Sanjose S., Quint W.G., Alemany L., et al.** "Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study.", *Lancet oncology*, 2010;11(11):1048-1056.
- [84] **Yang R., Yutzy W.H. 4th, Viscidi R.P., Roden R.B.** "Interaction of L2 with beta-actin directs intracellular transport of papillomavirus and infection.", *Journal of biological chemistry*, 2003;278(14):12546-12553.
- [85] **Yang R., Day P.M., Yutzy W.H. 4th, et al.** "Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection.", *Journal of virology*, 2003;77(6):3531-3541.
- [86] **Lowy D.R., Schiller J.T.** "Prophylactic human papillomavirus vaccines.". *Journal of clinical investigation*, 2006;116(5):1167.
- [87] **Johnson K.M., Kines R.C., Roberts J.N., et al.** "Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus.", *Journal of virology*, 2009;83(5):2067-2074.

- [88] **Selinka H.C., Florin L., Patel H.D., et al.** "Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus.", *Journal of virology*, 2007:81(20):10970-10980.
- [89] **Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., et al.** "Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses." *Journal of virology*, 2003:77(24):13125-13135.
- [90] **Herrero R., Castle P.E., Schiffman M., et al.** "Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica.", *Journal of infectious diseases* 2005:191(11):1796-1807.
- [91] **Zhao F.H., Lewkowitz A.K., Hu S.Y., et al.** "Prevalence of human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia in China: a pooled analysis of 17 population-based studies.", *International journal of cancer*, 2012:131(12):2929-2938.
- [92] **Centers for Disease Control and Prevention**, "Genital HPV infection: Fact sheet", <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>, Published January 23, 2014, Updated February 23, 2015, Accessed February 24, 2015
- [93] **Plummer M., Schiffman M., Castle P.E., et al.** "A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion.", *Journal of infectious diseases*, 2007:195(11):1582-1589.
- [94] **Wang S.S., Hildesheim A.** "Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression.", *Journal of the national cancer institute. Monographs*, 2003:31:35-40.
- [95] **Carrington M., Wang S., Martin M.P., et al.** "Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci.", *Journal of experimental medicine* 200:201(7):1069-1075.
- [96] **Dunne E.F., Unger E.R., Sternberg M., et al.** "Prevalence of HPV infection among females in the united states.", *Jama* 2007:297(8):813-819.
- [97] **Rodríguez A.C., Schiffman M., Herrero R., et al.** "Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections.", *Journal of the national cancer institute*, 2008:100(7):513-517.
- [98] **Castle P.E., Fetterman B., Akhtar I., et al.** "Age-appropriate use of human papillomavirus vaccines in the U.S.", *Gynecologic oncology*, 2009:114(2):365-369.
- [99] **Einstein M.H., Schiller J.T., Viscidi R.P., et al.** "Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns.", *Lancet infectious diseases*, 2009:9(6):347-356.

- [100] **Stanley M.** "Immune responses to human papillomavirus.", *Vaccine* 2006;24:S16-22.
- [101] **Baum S.G., Bartlett J.G., Thorner A.R.** "Mycoplasma pneumoniae infection in adults.", In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Updated on June 26, 2012. Accessed on February 2, 2015.
- [102] **Taylor-Robinson D.** "Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: an update.", *Clinical infectious diseases* 1996;23:671-682.
- [103] **Baum S.G.** "Mycoplasma pneumoniae and atypical pneumonia.", In: Mandell G.L., Bennett J.E. & Dolin R., ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th Ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2010:2481.
- [104] **Baseman J.B., Tully J.G.** "Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety.", *Emerging infectious diseases*, 1997;3(1):21.
- [105] **Krause D.C., Balish M.F.** "Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae.", *Molecular microbiology*, 2004;51(4):917-924.
- [106] **Yavlovich A., Tarshis M., Rottem S.** "Internalization and intracellular survival of Mycoplasma pneumoniae by non-phagocytic cells.", *FEMS microbiology letters*, 2004;233(2):241-246.
- [107] **Seya T., Matsumoto M.** "A lipoprotein family from Mycoplasma fermentans confers host immune activation through Toll-like receptor 2.", *International journal of biochemistry & cell biology*, 2002;34(8):901-906.
- [108] **Lührmann A., Deiters U., Skokowa J., et al.** "In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of Mycoplasma fermentans after pulmonary application.", *Infection and immunity*, 2002;70(7):3785-3792.
- [109] **Yang J., Hooper W.C., Phillips D.J., Talkington D.F.** "Cytokines in Mycoplasma pneumoniae infections.", *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004;15:157.
- [110] **Feizi T., Loveless R.W.** "Carbohydrate recognition by Mycoplasma pneumoniae and pathologic consequences.", *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1996;154(4):S133.
- [111] **Baseman J.B., Reddy S.P., Dallo S.F.** "Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections.", *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1996;154:S137-144.

- [112] **Martin R.E., Bates J.H.** "Atypical pneumonia.", *Infectious disease clinics of North America*, 1991;5(3):585-601.
- [113] **Luby J.P.** "Pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae* infection.", *Clinics in chest medicine*, 1991;12(2):237-244.
- [114] **Kannan T.R., Baseman J.B.** "ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens.", *Proceedings of the national academy of sciences, USA*, 2006;103(17):6724-6729.
- [115] **Clyde W.A. Jr.** "Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections.", *Clinical infectious diseases*, 1993;17: S32-36.
- [116] **Foy H.M., Kenny G.E., Cooney M.K., Allan I.D.** "Long-term epidemiology of infections with *Mycoplasma pneumoniae*.", *Journal of infectious diseases*, 1979;139(6):681-687.
- [117] **Gray G.C., Witucki P.J., Gould M.T., et al.** "Randomized, placebo-controlled clinical trial of oral azithromycin prophylaxis against respiratory infections in a high-risk, young adult population.", *Clinical infectious diseases*, 2001;33(7):983-989.
- [118] **Klausner J.D., Passaro D., Rosenberg J., et al.** "Enhanced control of an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with azithromycin prophylaxis.", *Journal of infectious diseases*, 1998;177(1):161-166.
- [119] **Hyde T.B., Gilbert M., Schwartz S.B., et al.** "Azithromycin prophylaxis during a hospital outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia." *Journal of infectious diseases*, 2001;183(6):907-912.
- [120] **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** "Outbreak of community-acquired pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*--Colorado, 2000.", *Morbidity and mortality weekly report (MMWR)*, 2001;50(12):227.
- [121] **Ito I., Ishida T., Osawa M., et al.** "Culturally verified *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Japan: a long-term observation from 1979-99.", *Epidemiology and infection*, 2001;127(2):365-367.
- [122] **Bartlett J.G., Mundy L.M.** "Community-acquired pneumonia.", *New England journal of medicine*, 1995;333(24):1618-1624.
- [123] **Hammerschlag M.R.** "Mycoplasma pneumoniae infections.", *Current opinion in infectious diseases*, 2001;14(2):181-186.

- [124] **Marrie T.J., Peeling R.W., Fine M.J., et al.** "Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course.", *The American journal of medicine*, 1996;101(5):508-515.
- [125] **Marrie T.J.** "Mycoplasma pneumoniae pneumonia requiring hospitalization, with emphasis on infection in the elderly.", *Archives of internal medicine*, 1993;153(4):488-494.
- [126] **Lieberman D., Schlaeffer F., Lieberman D., et al.** "Mycoplasma pneumoniae community-acquired pneumonia: a review of 101 hospitalized adult patients.", *Respiration*, 1996;63:261.
- [127] **Mansel J.K., Rosenow E.C. 3rd, Smith T.F., Martin J.W. Jr.** "Mycoplasma pneumoniae pneumonia.", *CHEST journal*, 1989;95(3):639-646.
- [128] **Tay Y.K., Huff J.C., Weston W.L.** "Mycoplasma pneumoniae infection is associated with Stevens-Johnson syndrome, not erythema multiforme (von Hebra).", *Journal of the American academy of dermatology*, 1996;35(5):757-760.
- [129] **Cherry J.D.** "Anemia and mucocutaneous lesions due to Mycoplasma pneumoniae infections.", *Clinical infectious diseases*, 1993;17(Supplement 1):S47-S51.
- [130] **Koskiniemi M.** "CNS manifestations associated with Mycoplasma pneumoniae infections: summary of cases at the University of Helsinki and review.", *Clinical infectious diseases*, 1993;17(Supplement 1):S52-S57.
- [131] **Daxboeck F.** "Mycoplasma pneumoniae central nervous system infections.", *Current opinion in neurology*, 2006;19(4):374-378.
- [132] **Bitnun A., Ford-Jones E., Blaser S., Richardson S.** "Mycoplasma pneumoniae ecephalitis.", *Seminars in pediatric infectious diseases*, 2003;14(2):96-107.
- [133] **Smith R., Eviatar L.** "Neurologic manifestations of Mycoplasma pneumoniae infections: diverse spectrum of diseases. A report of six cases and review of the literature.", *Clinical pediatrics*, 2000;39(4):195-201.
- [134] **Nagashima M., Higaki T., Satoh H., Nakano T.** "Cardiac thrombus associated with Mycoplasma pneumoniae infection.", *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 2010;11(6):849-851.
- [135] **Chaudhry R., Nisar N., Malhotra P., et al.** "Polymerase chain reaction confirmed Mycoplasma pneumoniae arthritis: a case report.", *Indian journal of pathology and microbiology*, 2003;46(3):433-436.

- [136] **Davis C.P., Cochran S., Lisse J., et al.** "Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from synovial fluid samples in a patient with pneumonia and polyarthritits.", *Archives of internal medicine*, 1988:148(4):969-970.
- [137] **Vitullo B.B., O'Regan S., de Chadarevian J.P, Kaplan B.S.** "Mycoplasma pneumonia associated with acute glomerulonephritis.", *Nephron*, 1978:21(5):284-288.
- [138] **Romero-Gómez M., Otero M.A., Sánchez-Muñoz D., et al.** "Acute hepatitis due to *Mycoplasma pneumoniae* infection without lung involvement in adult patients.", *Journal of hepatology*, 2006:44(4):827-828.
- [139] **Weinstein O., Shneck M., Levy J., Lifshitz T.** "Bilateral acute anterior uveitis as a presenting symptom of *Mycoplasma pneumoniae* infection.", *Canadian journal of ophthalmology*, 2006:41(5):594-595.
- [140] **Yashar S.S., Yashar B., Epstein E., Viani R.M.** "Uveitis associated with *Mycoplasma pneumoniae* meningitis.", *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 2001:79(1):100-101.
- [141] **Rifkind D., Chanock R, Kravetz H., et al.** "Ear involvement (Myringitis) and primary atypical pneumonia following inoculation of volunteers with Eaton agent.", *American review of respiratory disease*, 1962:85(4):479-489.
- [142] **Zaleznik D.F., Bartlett J.G., Thonrer A.R.** "Pneumonia caused by *Chlamydia pneumoniae* in adults", In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. Updated on June 14, 2012. Accessed on February 2, 2015.
- [143] **Stamm W.E., Jones R.B., Batteiger B.E.** "Introduction to Chlamydial diseases.", In: Mandell G.L., Bennett J.E. and Dolin R., ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th edition, Churchill Livingstone, Philadelphia 2005:2236.
- [144] **Shirai M, Hirakawa H, Kimoto M, et al.** "Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA.", *Nucleic acids research*, 2000:28(12):2311-2314.
- [145] **Shirai M, Hirakawa H, Ouchi K, et al.** "Comparison of outer membrane protein genes omp and pmp in the whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Japan and the United States.", *Journal infectious diseases*, 2000:181(Supplement 3):S524-S527.
- [146] **Morrison R.P., Manning D.S., Caldwell H.D.** "Immunology of *Chlamydia trachomatis* infections.", In: Quinn T.C., ed. *Sexually Transmitted Diseases*, 1992:57-84.

- [147] **Emre U., Roblin P.M., Gelling M., et al.** "The association of Chlamydia pneumoniae infection and reactive airway disease in children.", Archives of pediatrics and adolescent medicine, 1994:148(7):727-732.
- [148] **Emre U., Sokolovskaya N., Roblin P.M., et al.** "Detection of anti-Chlamydia pneumoniae IgE in children with reactive airway disease.", Journal of infectious disease, 1995:172(1):265-267.
- [149] **Johansson N., Kalin M., Tiveljung-Lindell A., et al.** "Etiology of community-acquired pneumonia: Increased microbiological yield with new diagnostic methods.", Clinical infectious diseases, 2010:50(2):202-209.
- [150] **Shibli F., Chazan B., Nitzan O., et al.** "Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in northern Israel.", The Israel medical association journal, 2010:12(8):477-482.
- [151] **Song J.H., Oh W.S., Kang C.I., et al.** "Epidemiology and clinical outcomes of community-acquired pneumonia in adult patients in Asian countries: a prospective study by the Asian network for surveillance of resistant pathogens.", International journal of antimicrobial agents 2008:31(2):107-114.
- [152] **Cillóniz C., Ewig S., Polverino E., et al.** "Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity.". Thorax, 2011:66:340.
- [153] **Kumar S., Hammerschlag M.R.** "Acute respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae: current status of diagnostic methods.", Clinical infectious diseases, 2007:44(4):568-576.
- [154] **Marrie T.J., Peeling R.W., Fine M.J., et al.** "Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course.", American journal of medicine, 1996:101(5):508-515.
- [155] **Myhra W., Mordhorst C.H., Wang S.P., et al.** "Clinical features of Chlamydia pneumoniae, strain TWAR, infection in Denmark 1975-1987." In: Bowie W.R., Caldwell H.D., Jones R.P., ed. Chlamydial Infections, 1980:422.
- [156] **Janssens J.P.** "Pneumonia in the elderly (geriatric) population.", Current opinion in pulmonary medicine 2005:11(3):226-230.
- [157] **Coon R.G., Balansay M.S., Faix D.J., et al.** "Chlamydia pneumoniae infection among Basic Underwater Demolition/SEAL (BUD/S) candidates, Coronado, California, July 2008.", Military medicine, 2011:176(3):320-323.

- [158] **Oktem I.M., Ellidokuz H., Sevinc C., et al.** "PCR and serology were effective for identifying *Chlamydomydia pneumoniae* in a lower respiratory infection outbreak among military recruits.", *Japanese journal of infectious diseases*, 2007:60(2/3):97.
- [159] **Chirgwin K., Roblin P.M., Gelling M., et al.** "Infection with *Chlamydia pneumoniae* in Brooklyn.", *Journal of infectious diseases*, 1991:163(4):757-761.
- [160] **Grayston J.T., Aldous M.B., Easton A., et al.** "Evidence that *Chlamydia pneumoniae* causes pneumonia and bronchitis.", *Journal of infectious diseases*, 1993:168(5):1231-1235.
- [161] **Miyashita N., Niki Y., Nakajima M., et al.** "Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults.", *Chest*, 2001:119:1416.
- [162] **Bourke S.J., Lightfoot N.F.** "*Chlamydia pneumoniae*: defining the clinical spectrum of infection requires precise laboratory diagnosis.", *Thorax*, 1995:50(Supplement 1):S43-S48.
- [163] **Kauppinen M.T., Lähde S., Syrjälä H.** "Roentgenographic findings of pneumonia caused by *Chlamydia pneumoniae*. A comparison with *streptococcus pneumoniae*.", *Archives of internal medicine*, 1996:156(16):1851-1856.
- [164] **Gaydos C.A., Roblin P.M., Hammerschlag M.R., et al.** "Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients.", *Journal of clinical microbiology*, 1994:32(4):903-905.
- [165] **Tuuminen T., Palomäki P., Paavonen J.** "The use of serologic tests for the diagnosis of chlamydial infections.", *Journal of microbiological methods*, 2000:42(3):265-279.
- [166] **Kozak F.K., Mahony J.B., Chernesky M.A., et al.** "Nasal polyposis: In search of a viral etiology using DNA hybridization.", *Journal of otolaryngology*, 1991:20(6):404-407.
- [167] **Sham C.L., To K.F., Chan P.K., Lee D.L., Tong M.C., Van Hasselt C.A.** "Prevalence of human papillomavirus, EpsteinBarr virus, p21, and p53 expression in sinonasal inverted papilloma, nasal polyp, and hypertrophied turbinate in hong kong patients.", *Head & neck*, 2012:34(4):520-533.
- [168] **Tao Q., Srivastava G., Dickens P., Ho F.C.** "Detection of EpsteinBarr virusinfected mucosal lymphocytes in nasal polyps.", *American journal of pathology*, 1996:149(4):1111-1118.

- [169] **Zaravinos A., Bizakis J., Spandidos D.A.** "Prevalence of human papilloma virus and human herpes virus types 17 in human nasal polyposis.", *Journal of medical virology*, 2009:81(9):1613-1619.
- [170] **Costa C., Garzaro M., Boggio V., et al.** "Detection of herpesviruses 16 and community-acquired respiratory viruses in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyposis.", *Intervirology*, 2014:57(2):101-105.
- [171] **Brandsma J., Sciubba J., Shah K., Barrezueta N., Galli R.** "Papilloma infection of the nose.", *Cancer Cells*, 1987:30-18.
- [172] **Gaffey M.J., Frierson H.F., Weiss L.M., Barber C.M., Baber G.B., Stoler M.H.** "Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in sinonasal Schneiderian papillomas. An in situ hybridization and polymerase chain reaction study.", *American journal of clinical pathology*, 1996:106(4):475-482.
- [173] **Becker M., Forslund O., Hansson B.G., Malm L.** "Search for the human papillomavirus in nasal polyps, using a polymerase chain reaction method.", *Journal of otolaryngology*, 1994:23(5):344-346.
- [174] **Hoffmann M., Kahn T., Goeroegh T., et al.** "Tracing human papillomavirus DNA in nasal polyps by polymerase chain reaction.", *Acta oto-laryngologica*, 2000:120(7):872-875.
- [175] **Pei F., Chen X.P., Zhang Y., et al.** "Human papillomavirus infection in nasal polyps in a Chinese population.", *Journal of general virology*, 2011:92(8):1795-1799.
- [176] **Rizzo R., Malagutti N., Bortolotti D., Gentili V., Rotola A., Fainardi E.** "Infection and HLA-G molecules in nasal polyposis.", *Journal of immunology research*, 2014, 2014:407-430.
- [177] **Gurr P.A., Chakraverty A., Callanan V., Gurr S.J.** "The detection of *Mycoplasma pneumoniae* in nasal polyps.", *Clinical otolaryngology and allied sciences* 1996:21(3):269-273.
- [178] **Bucholtz G.A., Salzman S.A., Bersalona F.B., et al.** "PCR analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and hypertrophied turbinates for DNA encoding bacterial 16S rRNA.", *American journal of rhinology* 2002:16(3):169-173.
- [179] **Pandak N., Pajić-Penavić I., Židovec-Lepej S., Planinić A., Trošelj-Vukić B., Perić L.** "Chlamydia pneumoniae and mycoplasma pneumoniae were not identified in sinus mucosa of patients with chronic rhinosinusitis.", *European archives of otorhinolaryngology*, 2014:271(6):1553-1555.

- [180] **Nia S.J., Farhadi M., Darestani S.G., Tabatabaei A., Shamshiri A.R., Noorbakhsh S.** "Searching the M. Pneumonia in cases with nasal polyp accompanied by chronic rhinosinusitis using polymerase chain reaction in tissue and serology: a case control study.", *Open Access Scientific Reports*, 2013;2:711
- [181] **Lee R.E., Kaza S., Plano G.V., Casiano R.R.** "The role of atypical bacteria in chronic rhinosinusitis.", *Otolaryngology—Head and neck surgery*, 2005;133(3):407–410
- [182] **Apan T.Z., Alpay D., Alpay Y.** "The possible association of chlamydia pneumoniae infection with nasal polyps.", *European archives of otorhinolaryngology*, 2007;264(1):27-31
- [183] **Fahrenholz J., Stratton C., Wolf B., et al.** "Chlamydomphila pneumoniae and chronic sinusitis.", *Journal of allergy and clinical immunology*, 2008;121(2):S217
- [184] **Shokrollahi M.R., Farhadi M., Noorbakhsh S., Nia S.J., Ghavidel S., Shamshiri A.R.** "Role of C. Pneumoniae in nasal Polyp formation: PCR in tissue and serology: a cross sectional study: Tehran, Iran.", *International journal of current microbiology and applied sciences*, 2014;3:754-759
- [185] **Reznikov M., Blackmore T.K., Finlay-Jones J.J., Gordon D.L.** "Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in a polymerase chain reaction-based test for mycoplasma pneumoniae.", *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 1995;14(1):58-61
- [186] **Kuoppa Y., Boman J., Scott L., Kumlin U., Eriksson I., Allard A.** "Quantitative detection of respiratory chlamydia pneumoniae infection by real-time PCR.", *Journal of clinical microbiology*, 2002;40(6):2273-2274
- [187] **Nilsson A.C., Björkman P., Persson K.** "Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute Mycoplasma pneumoniae infection and reveals a high rate of persistent infection.", *BMC microbiology*, 2008;8(1):93
- [188] **Gibb A.P., Wong S.** "Inhibition of PCR by agar from bacteriological transport media.", *Journal of clinical microbiology*, 1998;36(1):275-276
- [189] **Cho M.C., Kim H., An D., et al.** "Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of mycoplasma pneumoniae, chlamydomphila pneumoniae, and legionella pneumophila.", *Annals of laboratory medicine*, 2012;32(2):133-138

- [190] **Sidal M., Kilic A., Unuvar E., Oguz F., Onel M., Agacfidan A.** “Frequency of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae Infections in Children.”, Journal of tropical pediatrics, 2007:53(4):225-23

Παράρτημα.

Δημοσιεύσεις – Παρουσιάσεις σε συνέδρια.

1. Παρουσιάσεις σε Συνέδρια.

- 1.1. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας Χειρουργικής Κεφαλής & Τραχήλου (Athens 2011).
 - Ιωαννίδης Δ, Τερζής Τ, Κολτσιδόπουλος Π, Γιαννακόπουλος Ι, Σκουλάκης Χ, Πετεινάκη Ε. Συσχέτιση της παρουσίας ιϊκού DNA με την αιτιοπαθογένεση των ρινικών πολυπόδων. 16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ωτορινολαρυγγολογίας Χειρουργικής Κεφαλής & Τραχήλου. Athens Hilton. 1-4 Δεκεμβρίου 2011. (προφορική ανακοίνωση)
- 1.2. 5th World Congress for Endoscopic Surgery (Vienna 2012).
 - Ioannidis D.G, Florou Z.A, Terzis T.F, Petinaki E.A, Skoulakis C.E. Detection of hsv 1-5 and hpv dna by real time pcr and the potential association with nasal polyps development. 5th World Congress for ENDOSCOPIC SURGERY of the Brain, Skull Base & Spine combined with the First Global Update on FESS, the Sinuses & the Nose. Reed Messe Vienna. Vienna. Austria. March 28 – April 1 2012. (αναρτημένη ανακοίνωση)
- 1.3. 22ο Μετεκπαιδευτικό ΩΡΛ Σεμινάριο (Thessaloniki 2014).
 - Ιωαννίδης Δ, Λαχανάς Β, Φλώρου Ζ, Τερζής Τ, Πετεινάκη Ε, Σκουλάκης Χ. Συγκριτική μελέτη της παρουσίας Mycoplasma Pneumoniae σε ασθενείς με χρόνια ρινοκολπίτιδα με ρινικούς πολύποδες και υγιείς στην κεντρική Ελλάδα. 22ο Μετεκπαιδευτικό ΩΡΛ Σεμινάριο. Grand Hotel Palace. Θεσσαλονίκη. 17-19 Οκτωβρίου 2014. (αναρτημένη ανακοίνωση)

2. Δημοσιεύσεις.

2.1. Journal of Laryngology & Otology (2015 ahead of print).

- Ioannidis DG, Lachanas VA, Florou Z, Bizakis JG, Petinaki E, Skoulakis CE. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydothila pneumoniae: a comparative study in patients with nasal polyposis and healthy controls. J Laryngol Otol. 2015 Jul 30:1-5

2.2. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology (2015 ahead of print).

- Dimitrios Ioannidis, Vasileios A. Lachanas, Zoe Florou, John G. Bizakis, Efthymia Petinaki, Charalampos E. Skoulakis. Herpes viruses and human papilloma virus in nasal polyposis and controls. Br J Otol. Sep 2015 (ahead of print)