

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**



TEZĂ DE DOCTORAT

***Cercetări privind elaborarea unui sistem de testare
moleculară pentru evaluarea morbidității sarcinii***

-Rezumat-

CONDUCĂTOR DOCTORAT

Prof.Univ.Dr. Francisc Mixich

STUDENT DOCTORAND

Andreea Gabriela Anghel

CRAIOVA

2015

CUPRINS

STADIUL CUNOAȘTERII

1. FACTORII DETERMINANȚI AI UNEI ISTORII

OBSTETRICE NEFAVORABILE LA GRAVIDE

1.1. Cauzele imunologice ale sarcinii cu istoric nefavorabil

1.2. Cauzele genetice ale sarcinii cu istoric nefavorabil

1.3. Cauzele infecțioase ale sarcinii cu istoric nefavorabil

CONTRIBUȚII PERSONALE

INTRODUCERE

OBIECTIVELE CERCETĂRII

METODOLOGIA CERCETĂRII

Materialul de studiu

Colectarea datelor

Testele serologice

Testele moleculare

Analiza datelor

REZULTATE

Caracteristicile loturilor studiate

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Toxoplasma*

Investigațiile serologice și moleculare pentru Rubella

Investigațiile serologice și moleculare pentru CMV

Investigațiile serologice și moleculare pentru Herpes

Investigațiile serologice și moleculare pentru Parvovirus

Investigațiile serologice și moleculare pentru Varicella

Investigațiile serologice pentru Anticorpii antifosfolipidici

Investigațiile moleculare pentru mutația G1691A (Factorul V Leiden)

Investigațiile moleculare pentru mutația G20210A din gena protrombinei

DISCUȚII

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

STADIUL CUNOAȘTERII

1. FACTORII DETERMINANȚI AI UNEI ISTORII OBSTETRICE NEFAVORABILE LA GRAVIDE

Istoria obstetrică nefavorabilă implică precedente nefavorabile de dezvoltare fetală, două sau mai multe avorturi spontane consecutive, antecedente de moarte fetală intrauterină, creștere intrauterină retardată, nașterea unui copil mort, deces neonatal precoce, și/sau anomalii congenitale. Cauzele pot fi genetice, hormonale, reacție imună maternă anormală și infecțiile materne.

1.1. Cauzele imunologice ale sarcinii cu istoric nefavorabil

Factorii imunologici ai unei sarcini cu istoric nefavorabil, respectiv ai pierderilor de sarcină, sunt clasificați în factori autoimuni și factori aloimuni.

Factorii autoimuni:

- Anticorpii antifosfolipidici
- Anticorpii antinucleari
- Anticorpii antitirodieni

Factorii alloimuni:

Există discuții că antigenele leucocitare umane (HLA) ar fi responsabile de asemenea reacții alloimune

1.2. Cauzele genetice ale sarcinii cu istoric nefavorabil

Majoritatea avorturilor spontane sunt cauzate de un cariotip anormal al embrionului. Cel puțin 50% din avorturile din primul trimestru sunt citogenetic anormale. Această situație nu include și anomaliile cauzate de boli genetice cum ar fi bolile genetice mendeliene sau mutații pe anumii loci (trombofiliile ereditare etc.). Alte exemple care nu pot fi detectate prin evaluarea citogenetică sunt bolile poligenice sau multifactoriale.

1.3. Cauzele infecțioase ale sarcinii cu istoric nefavorabil

- Infecțiile virale
- Infecțiile microbiene
- Toxoplasma

CONTRIBUȚII PERSONALE

INTRODUCERE

Cercetarea dorește să propună standardizarea și introducerea utilizării pe scară largă a testelor moleculare pentru monitorizarea morbidității sarcinii. Rigurozitatea științifică a testelor moleculare, net superioară celor serologice, ar putea crește starea de sănătate a mamei și fătului prin reducerea influenței factorilor de risc, care induc nașterea prematură, mortalitatea și morbiditatea fetală. Investigațiile actuale se bazează în principal pe metode imunologice de tip ELISA. Datele obținute din aceste teste sunt încă în dezbateri datorită dificultăților serioase în interpretarea potențialei expuneri fetale pe parcursul sarcinii. Aceste aspecte pun problema identificării unor metode mult mai sensibile și mai specifice. Metodele biologiei moleculare au devenit astăzi adaptabile și ușor de utilizat pentru diagnosticul clinic de laborator cu performanțe tehnice net superioare.

OBIECTIVELE CERCETĂRII

1. Cercetarea a fost efectuată în scopul obținerii reducerii ratei morbidității sarcinii, rată a cărei scădere nu s-a remarcat în ultima decadă. În plus, incidența restricției de creștere intrauterină nu s-a schimbat semnificativ în ultimii 20 de ani. Cercetarea dorește să demonstreze că expunerea maternă la o serie de factori de risc (infecțioși și genetici) care determină semnificativ morbiditate gravidică, dacă este investigată în mod standardizat, poate asigura supravegherea obiectivă a sarcinii în scopul reducerii efectelor adverse cum ar fi mortalitatea și morbiditatea fetală.
2. Statutarea unui protocol bazal, adresat femeilor gravide cu morbiditate a sarcinii, ce constă în standardizarea și introducerea utilizării pe scară largă, economic și eficient, a testelor moleculare pentru monitorizarea morbidității sarcinii care va fi utilizat de instituțiile de resort, pentru introducerea în pachetul minim de servicii medicale oferite gravidei ce prezintă factori de risc.

METODOLOGIA CERCETĂRII

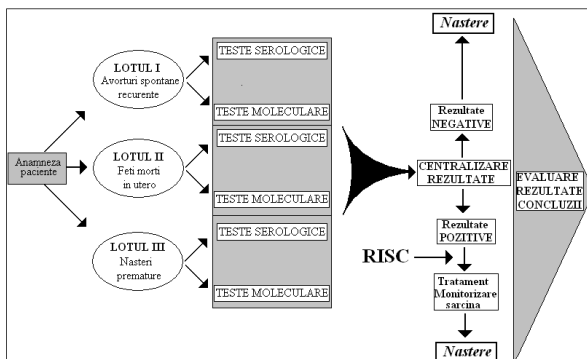
Materialul de studiu

Cazurile luate în studiu provin din mai multe cabinete de ginecologie din principalele orașe din regiunea Olteniei (Craiova, Slatina, Târgu Jiu, Târgu Cărbunești, Balș, Băilești), în perioada 2010-2014. Lotul luat în considerare pentru studiu, selectat dintr-un număr de 1914 gravide, cuprinde gravide cu antecedente obstetrice nefavorabile, respectiv avorturi spontane, sarcini oprite în evoluție, feți născuți morți, retardarea creșterii intrauterine, nașteri premature sau malformații congenitale. Lotul de control, constând din gravide multipare fără antecedente negative a fost extras din aceeași sursă. Din cele 1914 gravide, 108 au fost identificate ca având sarcini cu risc istoric. Deci au fost incluse în studiu aceste 108 gravide cu sarcini cu risc în antecedente și 108 gravide multipare cu risc normal, în total, în total 216 paciente.

Colectarea datelor

Toate cele 1914 gravide au fost identificate în cadrul oficiilor de specialitate de specialitate. S-a constituit o bază de date pe baza fișelor întocmite, cu acordul pacientelor. Ele au fost monitorizate în dinamică, de-a lungul sarcinii, iar rezultatele obținute au fost introduse în baza de date, care a permis efectuarea corelațiilor corespunzătoare. Unicul criteriu de includere a fost prezentarea la primul consult antenatal în care s-a stabilit prin anamneză istoricul nefavorabil privind sarcinile anterioare ale pacientei.

Loturile de studiu



Testele serologice

Testul ELISA pentru *Toxoplasma gondii*

Testul ELISA pentru *Rubella*

Testul ELISA pentru *Citomegalovirus (CMV)*

Testul ELISA pentru *Herpes simplex virus tip 2*.

Testul ELISA pentru *Parvovirusul B19*.

Testul ELISA pentru *Varicella zoster*

Testul ELISA pentru anticorpii antifosfolipidici

Testele moleculare

Real time PCR cantitativ pentru *Toxoplasma*

Real time PCR cantitativ pentru *CMV*

Real time RT PCR cantitativ pentru *Rubella*

Real time PCR cantitativ pentru *Herpes simplex tip 2*

Real time PCR cantitativ pentru *Parvovirusul B19*

Real time PCR cantitativ pentru virusul *Varicella Zoster*

PCR-RFLP pentru analiza mutației G1691A (factorul V Leiden) și a mutației G20210A din gena protrombinei.

Analiza datelor

Datele obținute au fost compilate în fișe de calcul Microsoft Excel. Pentru a identifica orice asociere dintre datele apropiate categoric, a fost folosit testul chi-pătrat prin folosirea unui soft Epi Info (versiunea 3.5.1). Datele au fost exprimate procentual sau ca frecvență a alelelor. Frecvența alelelor a fost calculată prin metode "gene-counting". Analiza statistică s-a făcut cu un software SPSS, versiunea 11.5. Distribuția genotipurilor pentru fiecare mutație, frecvența heterozigoților și homozigoților au fost comparate între pacienți și control cu testul Pearson's Chi-square. Valoarea $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă.

REZULTATE

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Toxoplasma gondii*

42.59% de cazuri sunt seropozitive la lotul studiat și 13.88% la lotul de control. Seropozitivitatea numai pentru IgG este de 30.55%, respectiv 10.18%. Pentru anticorpii IgG și IgM, seropozitivitatea este 12.03% din lotul de studiu și 3.70% din lotul de control. Diferența dintre seropozitivități este semnificativă ($p=0.00$). Determinările de ADN *Toxoplasma* au identificat doar 8 cazuri la lotul cu risc (7,40%) și 3 cazuri la lotul de control (2,77%).

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Rubella*

Cazurile pozitive serologic pentru IgM, ceea ce semnifică infecția acută, sunt în număr absolut nesemnificative și fără nici o semnificație statistică între lotul de control și lotul studiat. Mai mult, cele 3, respectiv 4 cazuri de pozitivitate IgM, nu au fost confirmate de testele moleculare.

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Cytomegalovirus (CMV)*

Cazurile pozitive serologic pentru IgM, ceea ce semnifică infecția acută, sunt în număr absolut nesemnificative și fără nici o semnificație statistică între lotul de control și lotul studiat. Din cele 2 cazuri, respectiv 1 caz de seropozitivitate IgM, testele moleculare au confirmat prezența ADN CMV la un caz din lotul de control.

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Herpes simplex tip 2*

Nu există o diferență semnificativă între lotul de control și lotul de femei cu istoric nefavorabil al sarcinii. În plus, deoarece doar prezența de anticorpi IgM prezintă importanță pentru riscul fetal, pentru ca semnifică o infecție acută, numărul de cazuri pozitive pentru IgM (6, respectiv 7) prezintă de asemenea o diferență între cele două loturi, de asemenea nesemnificativă. Aceste cazuri, cu IgM pozitiv au fost confirmate prin testele moleculare doar în proporție de o treime.

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Parvovirus B19*

Cazurile pozitive serologic pentru IgM, ceea ce semnifică infecția acută, nu au fost identificate nici la lotul de studiu și nici la control. Testele moleculare au confirmat rezultatele serologice.

Investigațiile serologice și moleculare pentru *Varicella zoster*

Cazurile pozitive serologic pentru IgM, ceea ce semnifică infecția acută, nu au fost identificate nici la lotul de studiu și nici la control. Testele moleculare au confirmat rezultatele serologice.

Investigațiile serologice pentru anticorpii antifosfolipidici

Seropozitivitatea numai pentru IgG este de 27,77%, respectiv 8,33%. Pentru anticorpii IgG și IgM, seropozitivitatea este 5,55% din lotul de studiu și 0% din lotul de control. Diferența dintre seropozitivități este semnificativă ($p=0.03$).

Investigațiile moleculare pentru mutația G1691A (factorul V Leiden)

Mutația Factorului V Leiden este semnificativ asociată cu boala tromboembolică la lotul de femei gravide cu istoric nefavorabil al sarcinii cu un odds ratio (95% CI) = 6,41(1,81-22,76); $p = 0,004$.

Investigațiile moleculare pentru mutația G20210A din gena protrombinei

Frecvența mutației G20210A din gena protrombinei nu diferă semnificativ la lotul studiat față de lotul de control.

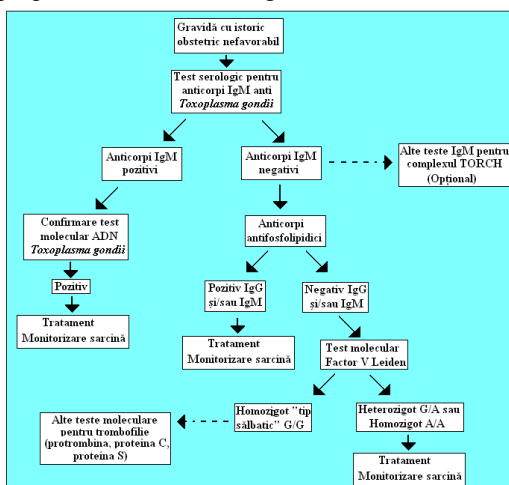
DISCUȚII

Din analiza rezultatelor din tabel se observă că o asocieră semnificativă dintre istoricul obstetric nefavorabil și riscul pentru sarcină, dacă comparăm rezultatele cu cele obținute la lotul de control, există doar în cazul infecțiilor cu *Toxoplasma*, anticorpii antifosfolipidici și Factorul V Leiden. În toate celelalte determinări, rezultatele noastre prezintă o asocieră nesemnificativă, respectiv nu prezintă nici o asocieră. Prin prisma acestor date se impune o reconsiderare drastică a setului de teste la care trebuie supusă o gravidă care prezintă în antecedente eșecuri ale sarcinii.

Tabel 11. Sinteza rezultatelor obținute la lotul studiat și lotul de control

Cauze infectioase	Seropozitivitate IgG		Seropozitivitate IgM		Teste moleculare		Statistica Gradul de asociere
	Lotul de studiu	Control	Lotul de studiu	Control	Lotul de studiu	Control	
Toxoplasma	33(30,55)	11(10,18)	13(12,03)	4(3,70)	8(7,40)	3(2,77)	Semnificativ
Rubella	105(97,22)	104(96,29)	3(2,77)	3(2,77)	0(0)	0(0)	Nesemnificativ Nesemnificativ
CMV	106(98,14)	107(99,07)	2(1,85)	1(0,92)	1(0,92)	0(0)	
Herpes 2	33(30,55)	41 (37,9)	6 (5,55)	7(6,48)	2(1,85)	1(0,92)	Nesemnificativ
Parvovirus B19	6(5,55)	4(3,70)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	Nesemnificativ
Varicella zoster	8(5,55)	8(5,55)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	7(6,49)
Cauze imunologice	Seropozitivitate IgG		Seropozitivitate IgM		-		Statistica Gradul de asociere
	Lotul de studiu	Control	Lotul de studiu	Control			
Anticorpi antifosfolipidici	30(27,77)	9(8,33)	9(8,33)	1(0,92)			Semnificativ
Cauze genetice Trombofilie ereditară	Tip salbatic G/G		Heterozigot G/A		Homozigot A/A		Statistica
	Lotul de studiu	Control	Lotul de studiu	Control	Lotul de studiu	Control	
Factor V Leiden G1691A	91(84,25)	105(97,22)	17(15,75)	3 (2,78)	0	0	Semnificativ
Protrombina G20210A	103(95,37)	101(93,51)	5(4,63)	7(6,49)	0	0	Nesemnificativ

În contextul datelor obținute din studiul nostru, algoritmul investigațiilor pentru gravidele cu istoric nefavorabil al sarcinilor, pe care îl propunem, ar fi cel din figură.



CONCLUZII

1. O asociere semnificativă dintre istoricul obstetric nefavorabil și riscul pentru sarcină, dacă comparăm rezultatele cu cele obținute la lotul de control, există doar în cazul infecțiilor cu *Toxoplasma*, sindromul antifosfolipidic și Factorul V Leiden. În toate celelalte determinări, rezultatele noastre prezintă o asociere nesemnificativă, respectiv nu prezintă nici o asociere.
2. În urma obținerii acestor rezultate se impune o reconsiderare drastică a setului de teste la care trebuie supusă o gravidă care prezintă în antecedente eșecuri ale sarcinii.
3. Cauzalitatea infecțioasă a acestor eșecurilor din sarcină se restrânge foarte mult. Din rezultatele noastre, noi deducem că cel mai important test din complexul TORCH este testul pentru *Toxoplasma g.* și, chiar și în acest caz, devine suficientă doar testarea anticorpilor IgM.
4. Pe baza datelor din literatură, precum și pe baza rezultatelor obținute de noi, putem afirma că testarea complexului TORCH pentru anticorpul IgG, este inutilă. Ar fi suficientă doar testarea anticorpilor IgM, iar în cazul în care aceștia sunt pozitivi rezultatul poate fi confirmat prin testele moleculare de evidențiere a acidului nucleic al agentului patogen. Costul testelor serologice s-ar reduce astfel la jumătate, diferența putând fi investită în testele moleculare care sunt mult mai precise și oferă date mult mai exacte.
5. Investigarea anticorpilor antispermatici are însă o valoare deosebită pentru găsirea cauzelor unui istoric obstetric nefavorabil, iar rezultatele obținute de noi confirmă acest fapt, gradul de asociere al riscului la femeile cu istoric nefavorabilă a sarcinii, față de lotul de control, fiind semnificativ statistic.
6. Dintre testele genetice privind riscul pentru trombofilie, mutația Factorului V Leiden, are valoare semnificativă, după cum se afirmă și în majoritatea datelor din literatură. Investigarea mutației G20210A pe gena protrombine are o valoare mai mică, aceasta fiind mai rară, iar noi am obținut valori ale riscului nesemnificative.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Surpam RB, Kamlakar UP, Khadse RK, Qazi MS, Jalgaonkar SV. Serological study for TORCH infections in women with bad obstetric history. *J Gynec Obstet India* 2006;56:41-43.

Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortion: an overview of genetic and non-genetic background. *Int J Hum Gen* 2006;6:109-117.

Singh G, Sidhu K, Bad obstetric history: A prospective study. *Med J Armed Forces India* 2010; 66, 2: 117–120.

Koppad C, Lakshmi KS, Immunological Causes of Bad Obstetric History. *Journal of Evidence based Medicine and Healthcare* 2014; 1(16): 2086-2099.

Djelmis J, Radoncic E, Ivanisevic M. Antiphospholipid antibody syndrome and fetal outcome. *Acta Med Croatica* 2001; 55 (3): 123-30.

Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, Krilis SA. Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *Blood* 2007; 109 (2): 422-30.

Greer IA. Thrombophilia: implications for pregnancy outcome. *Thromb Res* 2003; 109:73-81.

Zonouzi AP, Chaparzadeh N, Ghorbian S, Sadaghiani MM, Farzadi L, Ghasemzadeh A, Kafshdooz T, Sakhinia M, Sakhinia E. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2013; 30(10).

Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132(2):171–196.

Montoya JG, Liesenfeld O. "Toxoplasmosis". *Lancet* 2004; 363 (9425): 1965–76.

Trifa A, Popp R. Thrombophilia – It's time to stick to the international Guidelines. *Rom. J. Rare Dis* 2015; Suppl 1: 18-19.

CURRICULUM VITAE

Informatii personale:

Nume / Prenume: *Anghel Andreea Gabriela*

Adresa: Unirii, Craiova (România)

Telefon: 0745363512

E-mail: andeea_anghel@yahoo.com

Naționalitatea: română

Data nașterii: 23/08/1985

Sexul: Feminin

Experienta profesionala:

Perioada 01/10/2010–Prezent

Functia sau postul ocupat: Medic Dentist

Tipul activitatii sau sectorul de activitate: Medicina/Sanatate

Educatie si formare:

2000-2004 – Colegiul National “Fratii Buzesti”, Craiova

2004-2010 – Facultatea de Medicina Dentara, Universitatea de Medicina si Farmacie, Craiova

2010-2011 – Master “Reabilitare protetica cu sprijin implantar”, Universitatea de Medicina si Farmacie, Craiova

2011-Prezent – Doctorand Disciplina Biologie Celulara si Moleculara, Universitatea de Medicina si Farmacie, Craiova

Aptitudini si competente personale:

Limba(i) materna(e) – Romana

Limba(i) straina(e) cunoscuta(e)

(*) Nivelul Cadrului European Comun de Referinta Pentru Limbi Straine

Autoevaluare	Intelegere				Vorbire				Scriere	
Nivel european	Ascultare		Citire		Participare la conversatie		Discurs oral		Exprimare scrisa	
Engleza	C2	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat	C2	Utilizator experimentat
Franceza	C1	Utilizator experimentat	C1	Utilizator experimentat	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent
Spaniola	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent	B2	Utilizator independent

Competente si aptitudini de utilizare a calculatorului:

- Operare Microsoft Office Word
- Microsoft Office Excel
- Microsoft Office Power Point

Permis(e) de conducere: Categoria B

Lucrari publicate si cotate BDI:

- -Original Paper - Serological Screening for Toxoplasma G in women with bad obstetric history in Oltenia Region, Romania. (Current Health Science Journal, Volume 40, 2014 Supplement 7)
- -Original Paper- The predictive value of A1298C and C677T MTHFR gene mutations for the recurrent spontaneous abortions risk (Current Health Science Journal, Volume 41, 2014 Supplement 1)