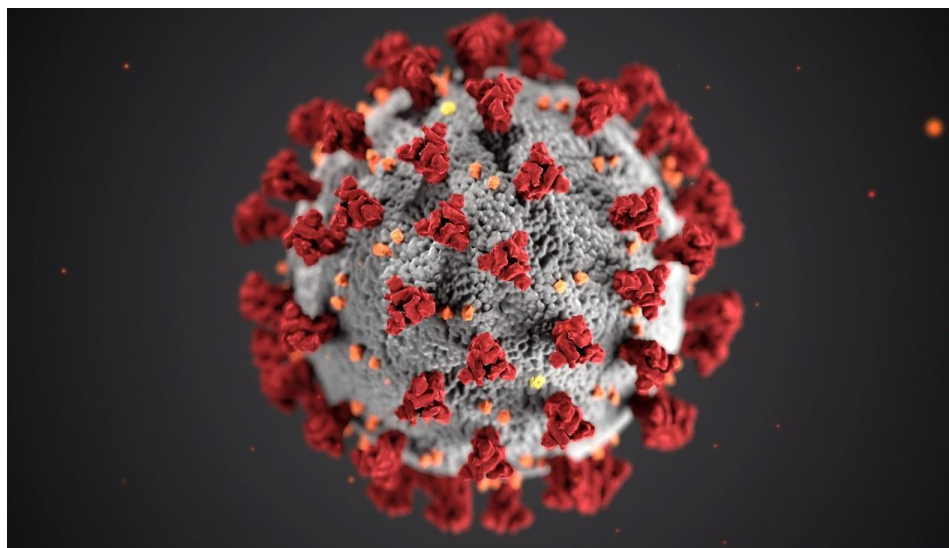




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ(ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του
ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα**



ΚΟΥΤΣΙΑΝΑ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής : Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

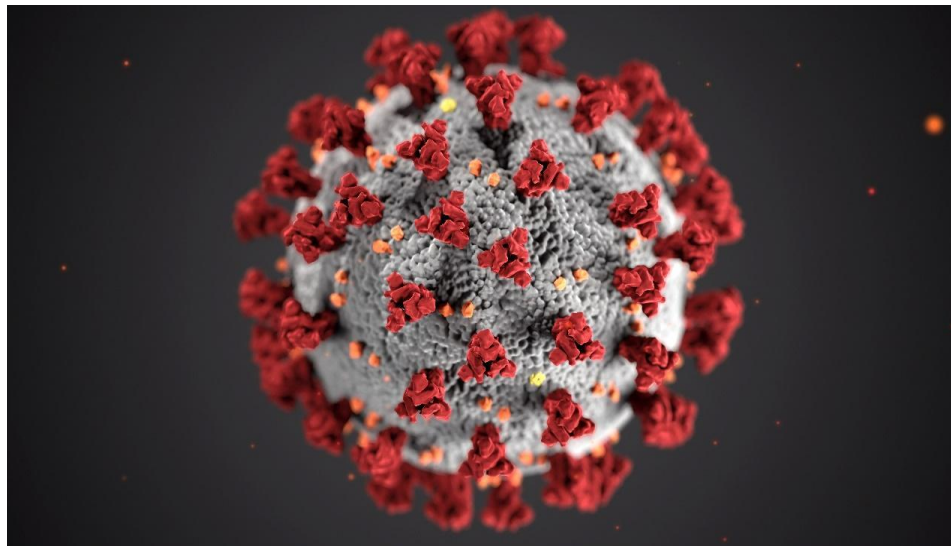
Ιωάννινα 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ(ΒΒΕ)»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του
ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα**



ΚΟΥΤΣΙΑΝΑ ΕΛΕΝΗ

Επιβλέπων Καθηγητής : Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Ιωάννινα 2022

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Μεταπτυχιακός φοιτητής : Κουτσιανά Ελένη

«Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα»

Επιβλέπων καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ημερομηνία παρουσίασης: 15-12-2022

Εξεταστική επιτροπή :

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπλ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιωάννινα

Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Αθήνα

Μποζίδης Πέτρος , Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Ιωάννινα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων η οποία ως επιβλέπουσα καθηγήτρια μου προσέφερε με μεγάλη χαρά την βοήθεια της τόσο στο πρακτικό, γνωστικό και συγγραφικό κομμάτι της διπλωματικής εργασίας όσο και στο ψυχολογικό και υποστηρικτικό κομμάτι. Ήταν πάντα διαθέσιμη για μένα, παρά το μεγάλο φόρτο εργασίας της, για οποιαδήποτε απορία και έβρισκε πάντα χρόνο να με κατευθύνει.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στο διευθυντή του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE) και σε όλο το διδακτικό προσωπικό για τις γνώσεις που προσέφεραν σε μένα αλλά και στους συμφοιτητές μου. Στην δύσκολη αλλά και πρωτόγνωρη περίοδο την οποία διανύουμε και καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε, ανταποκρίθηκαν επάξια.

Επίσης θερμές ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής κ. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας τμήματος Ιατρικής Αθηνών και τον κ. Μποζίδη Πέτρο, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθεια τους, τη μετάδοση γνώσεων και την καθοδήγησή τους στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος BBE.

Τέλος, με όλη μου την καρδιά να ευχαριστώ τους γονείς μου διότι χωρίς την προτροπή, την επιμονή και την στήριξη τους δεν θα είχα καταφέρει να παρακολουθήσω αυτό το πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών εδώ στα Ιωάννινα. Αλλά και ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στις δύο αδερφές μου, Ελισάβετ και Βασιλεία, οι οποίες με στήριξαν τόσο ψυχολογικά όσο και συμβουλευτικά.

Πρόλογος

Ήταν αρχές του 1930 που ανακαλύφθηκαν οι κορωνοϊοί και έκτοτε έχουν απασχολήσει διεθνώς την ανθρωπότητα τρεις φορές μέχρι σήμερα. Η τελευταία φορά βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη και είναι η μεγαλύτερη σε έκταση πανδημία με την οποία έχει έρθει αντιμέτωπος ο κόσμος τον 21ο αιώνα. Πρόκειται για τον ιό SARS-CoV-2 ο οποίος προκαλεί το Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο Coronavirus-2 γνωστό ως COVID-19 που αρχικά εμφανίστηκε σε ζώα και στην συνέχεια μεταδόθηκε στον άνθρωπο μέσω των αναπνευστικών σταγονιδίων. Η μεταδοτικότητα της νόσου είναι εξαιρετικά εύκολη και γρήγορη γεγονός που καθιστά εξαιρετικής σημασίας την έγκαιρη διάγνωση οδηγώντας στον περιορισμό της νόσου και τη μείωση της μετάδοσης με απομόνωση και γρήγορη αντιμετώπιση της κατάστασης των ασθενών. Η COVID-19 μπορεί να κυμαίνεται από μία ασυμπτωματική νόσηση, απλή γρίπη έως και απειλητική για τη ζωή. Σε σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να είναι μία νόσος η οποία δε θα επηρεάσει μόνο το αναπνευστικό σύστημα αλλά το γαστρεντερικό, το νευρικό και το καρδιαγγειακό. Τα πιο κοινώς αναφερόμενα συμπτώματα είναι ο βήχας, η απώλεια γεύσης και όσφρησης. Τα μέτρα προστασίας της δημόσιας υγείας που έχουν ληφθεί είναι η χρήση μάσκας, το τακτικό πλύσιμο των χεριών και κατά διαστήματα εφαρμόστηκαν και μέτρα περιορισμού όπως το lockdown. Στα πρώτα στάδια της πανδημίας όπου η εξάπλωση ήταν εξαιρετικά γρήγορη τα μέτρα αυτά θεωρήθηκαν υποχρεωτικά για τον περιορισμό της νόσου αν και είχαν σημαντικές αρνητικές κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις και έτσι δεν μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον ιό SARS-CoV-2 είναι η ανάπτυξη εμβολίων κυρίως της τεχνολογίας mRNA τα οποία έχουν συμβάλει σημαντικά στον περιορισμό της πανδημίας .

Ωστόσο, οι μέθοδοι ανίχνευσης του ιού αυτού παραμένει τι πιο κρίσιμο εργαλείο. Το πιο γνωστό και σχεδόν αποκλειστικά χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην διαδικασία της διάγνωσης είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (rRT-PCR). Η αυξανόμενη ανάγκη όμως για άμεσα και γρήγορα αποτελέσματα, ακόμα και εκτός εργαστηρίων, έδωσε το έναυσμα για δημιουργία διαγνωστικών μεθόδων ταχείας ανίχνευσης. Πρόκειται για τεχνολογίες οι οποίες ανταποκρίνονται πλήρως στην επείγουσα κατάσταση της πανδημίας.

Σ αυτή την εργασία αρχικά αναλύονται τα βιολογικά χαρακτηριστικά του SARS-CoV-2 ώστε να γίνει κατανοητός ο τρόπος λειτουργίας του και στη συνέχεια να κατανοηθούν πλήρως οι μοριακές και ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσής του. Στη συνέχεια αναλύονται όλες οι διαθέσιμες τεχνολογίες ανίχνευσής του που περιλαμβάνουν μοριακές, ορολογικές και αντιγονικές μεθόδους συμπεριλαμβανομένων και των μεθόδων ταχείας διάγνωσης. Τέλος, καθώς οι τεχνολογίες προχωράνε και εξελίσσονται ταχέως έχουμε συνεχώς νέα δεδομένα πάνω στη ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 ο οποίος θα μας απασχολήσει για αρκετό καιρό ακόμη από όσο δείχνουν τα δεδομένα.

Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος	8
Πίνακας εικόνων	14
1. Εισαγωγή	16
1.1. Ιστορική αναδρομή	17
2. Ταξινόμηση-Δομή κορωνοϊών	22
2.1 . Ταξινόμηση των κορωνοϊών	22
2.2. Δομή.....	30
2.2.1. Πρωτεΐνη Μ της μεμβράνης του ιού.....	31
2.2.2. Πρωτεΐνη Ε του φακέλου του ιού	32
2.2.3 . Πρωτεΐνη S των ακίδων του ιού	34
2.2.4. Νουκλεοκαψίδιο του ιού.....	37
2.3. Γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2.....	39
3. Κύκλος ζωής , παθογένεια και μετάδοση του ιού SARS-CoV-2	41
3.1 . Κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2	41
3.2. Παθογένεια, μετάδοση, κλινική συμπτωματολογία.....	44
4. Επιδημιολογία του ιού SARS-CoV-2	49
5. Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα.....	52
5.1. Λήψη κλινικού δείγματος για ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 στο εργαστήριο	54
5.2. Συλλογή, συσκευασία και μεταφορά του κλινικού δείγματος που προορίζεται για έλεγχο του ιού SARS-CoV-2.....	58
5.3. Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα.....	63
5.3.1. Κυτταροκαλλιέργεια και μικροσκόπηση	66
5.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφής μεταγραφής (rRT-PCR).....	67

5.3.2.1. Σφάλματα στην εκτέλεση της rRT-PCR.....	76
5.3.3. Μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων	83
5.3.3.1 : Ισοθερμική ενίσχυση αντίστροφης μεταγραφής με την μεσολάβηση βρόγχου (loop-mediated isothermal amplification LAMP, RT-LAMP)	83
5.3.3.2. Άλλες μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης	84
5.3.3.3. Μέθοδος CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats).....	86
5.3.4. Μεταγονιδιωματικός προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς (mNGS).....	88
5.3.5. Ορολογικές μέθοδοι.....	91
5.4. Βιοδείκτες που συμβάλουν στην διάγνωση της νόσου COVID-19.....	98
6. Συμπεράσματα	99
7. Περίληψη	102
8. Abstract.....	103
9. Βιβλιογραφία	104
10. Ιστοσελίδες	133
11. Βιβλία.....	136

Πίνακας εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1 : Η ALMEIDA JUNE ΣΤΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΤΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΟΝΤΑΡΙΟ ΣΤΟ ΤΟΡΟΝΤΟ, 1963	18
ΕΙΚΟΝΑ 2 : ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΩΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΕΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΚΟΡΩΝΟΪΟΥΣ	21
ΕΙΚΟΝΑ 3 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΔΟΜΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-COV-230	
ΕΙΚΟΝΑ 4 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Ε ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-COV-2 ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΞΕΝΙΣΤΗ	33
ΕΙΚΟΝΑ 5 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ S ΤΩΝ ΚΟΡΩΝΟΪΩΝ	36
ΕΙΚΟΝΑ 6 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ N ΤΟΥ ΙΟΥ SARS- COV-2	38
ΕΙΚΟΝΑ 7 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-COV-2	40
ΕΙΚΟΝΑ 8 : Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-COV-2	43
ΕΙΚΟΝΑ 9 : ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19 ...	45
ΕΙΚΟΝΑ 10 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-COV-2 ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΒΟΛΗ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	46
ΕΙΚΟΝΑ 11 : ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19.....	48
ΕΙΚΟΝΑ 12 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19 ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΟ ΣΑΛΙΟ	55
ΕΙΚΟΝΑ 13 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ ΕΝΔΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΛΛΟΓΗ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΟΣΟ COVID-19	59
ΕΙΚΟΝΑ 14 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑ ΜΕ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΑΦΑΙΡΕΙΤΑΙ Ο ΙΑΤΡΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	60
ΕΙΚΟΝΑ 15 : ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΡΙΠΛΗΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΣΗ «ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ Α, ΛΟΙΜΩΔΗΣ ΠΑΡΑΓΩΝ»....	62
ΕΙΚΟΝΑ 16 : ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΝΟΣΟ COVID-19	65
ΕΙΚΟΝΑ 17 : Α. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΠΙΚΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΚΑΨΙΔΙΩΝ ΚΑΙ Β. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΟΠΟΥ ΦΑΙΝΕΤΑΙ ΕΝΑ ΣΩΜΑΤΙΟ ΚΟΡΩΝΟΪΟΥ	66

ΕΙΚΟΝΑ 18 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ PCR ΕΝΟΣ ΚΑΙ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ	70
ΕΙΚΟΝΑ 19 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΧΡΩΣΤΙΚΗΣ SYBR GREEN I	72
ΕΙΚΟΝΑ 20 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΕΝΙΣΧΥΤΗ ΤΑQΜΑΝ.....	72
ΕΙΚΟΝΑ 21 : ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΙΑΣ RRT-PCR.....	74
ΕΙΚΟΝΑ 22 : ΑΝΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΦΑΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ RRT-PCR SARS-COV-2.	77
ΕΙΚΟΝΑ 23 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΠΛΕΥΡΙΚΗΣ ΡΟΗΣ (LFIA).....	94
ΕΙΚΟΝΑ 24 : ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΕΝΟΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΥ RAPID TEST ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ LFIA	97

1. Εισαγωγή

Οι ιοί αποτελούν μια πολύ μεγάλη, αν όχι τη μεγαλύτερη, οικογένεια βιολογικά ζωντανών οργανισμών στον πλανήτη μας (Lawrence, et al., 2009). Αποτελούνται είτε από DNA είτε από RNA, το οποίο περιβάλλεται από το νουκλεοκαψίδιο (πρωτεϊνικό περίβλημα). Χαρακτηριστικό των ιών αποτελεί το γεγονός ότι δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν από μόνοι τους, αλλά είναι απαραίτητο να μολύνουν πρώτα κάποιο κύτταρο-ξενιστή. Υπάρχουν πάνω από 3.600 είδη ιών, τα οποία επιπρόσθετα κατηγοριοποιούνται και ανάλογα με τον ξενιστή τον οποίο προσβάλλουν (Wimmer, et al., 2009).

Οι κορωνοϊοί ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια ιών, η πλειοψηφία των οποίων προσβάλλει κυρίως το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα. Εκτιμάται ότι περίπου το ένα τρίτο των λοιμώξεων ανώτερου αναπνευστικού στον άνθρωπο μπορεί να προκαλείται από κορωνοϊούς με την εμφάνιση συμπτωμάτων, όπως ένα απλό κρυολόγημα ή γριπώδη συνδρομή, με εξαίρεση κυρίως τον κορωνοϊό που προκαλεί το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, γνωστό και ως SARS, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV), αλλά και αυτόν που προκαλεί το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής, τον Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για σοβαρότερες λοιμώξεις του αναπνευστικού κυρίως συστήματος (Zhu, et al., 2020). Έχουν σχήμα στρογγυλό ή ελλειψοειδές, είναι RNA ιοί και το καψίδιο τους δημιουργεί χαρακτηριστικές προεκβολές που μοιάζουν με ακίδες, γεγονός που αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο ταυτοποίησής τους (Cunningham and Tyrrell., 1968).

1.1. Ιστορική αναδρομή

Οι κορωνοϊοί ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 1930, μετά από μια οξεία αναπνευστική λοίμωξη η οποία εμφανίστηκε σε κοτόπουλα και αποδείχθηκε ότι προκλήθηκε από έναν ιό που σήμερα αναφέρετε ως ιός της λοιμώδους βρογχίτιδας των πτηνών (Infectious Bronchitis virus, IBV) (Lalchhandama, 2020). Έως τότε, αυτή η ομάδα των ιών θεωρούνταν πως περιέχει κάποια μέλη παθογόνα για τον άνθρωπο, χωρίς όμως να απειλούν σοβαρά την υγεία του (V'kovski, et al., 2021).

Μετέπειτα, το 1950, ποντικοί οι οποίοι παρέμεναν σε εργαστήριο μολύνθηκαν από έναν ιό, γνωστό σήμερα ως ιός της ηπατίτιδας των ποντικών (Murine Hepatitis Virus, MHV) (Greenwood, et al., 2011).

Αργότερα, το 1960 μετά από μια μελέτη της επιστημονικής ομάδας του Dr. David Tyrrell, ο οποίος έκανε έρευνα για το κοινό κρυολόγημα στο Salisbury (Tyrrell and Bynoe, 1965), χρησιμοποίησε δείγματα ρινικών εκπλυμάτων από εθελοντές με κοινό κρυολόγημα στη Μεγάλη Βρετανία, τα οποία άλλα περιείχαν τον ιό του κοινού κρυολογήματος και άλλα όχι. Δείγμα από ένα μαθητή στο Surrey, το στέλεχος του οποίου έγινε γνωστό ως B814, είχε προβληματίσει ιδιαίτερα τους ερευνητές. Διαπίστωσαν ότι μπορούσαν να μεταδώσουν τα συμπτώματα κοινού κρυολογήματος σε εθελοντές, αλλά δεν μπορούσαν να το απομονώσουν σε κυτταροκαλλιέργεια. Ωστόσο, οι μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε καλλιέργεια οργάνων, ενώ παράλληλα δημιουργήθηκε η ανάγκη παρατήρησής του στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM) (Monto, 1974). Το δείγμα στάλθηκε στο εργαστήριο της Almeida June (Εικόνα 1), στο νοσοκομείο St Thomas του Λονδίνου, για μελέτη στο HM. Η Almeida June ήταν μία διεθνώς γνωστή ιολόγος εξειδικευμένη, αλλά και πρωτοστάτης στον τομέα της απεικόνισης, της παρατήρησης και αναγνώρισης των ιών στο μικροσκόπιο. Είχε αναπτύξει δεξιότητα όχι μόνο στο να παρατηρεί και να αναγνωρίζει ιούς των οποίων η δομή ήταν μέχρι τότε άγνωστη, αλλά και να συμβάλλει στην διερεύνηση της παθογένειας και της διάγνωσης των ιογενών λοιμώξεων (Richmond, 2008). Σε συνεργασία με τον Dr. Tyrrell και με την νέα του ανάπτυξη καλλιιεργειών οργάνων οδηγήθηκαν στην αναγνώριση του ιού του κοινού κρυολογήματος, αλλά και άλλων ιών οι οποίοι δεν μπορούσαν να ακολουθήσουν μια συμβατική καλλιέργεια, συμπεριλαμβανομένων και των κορωνοϊών όπως ο SARS-CoV (Richmond, 2008).



Εικόνα 1 : Η Almeida June στο ηλεκτρονικό της μικροσκόπιο στο Ινστιτούτο Καρκίνου του Οντάριο στο Τορόντο, 1963 (<https://www.bbc.com/news/uk-scotland-52278716>).

Ύστερα από δική της μελέτη κατέγραψε τον ιό αυτό σαν παρόμοιο με τον ιό του κρυολογήματος, αλλά όχι ίδιο. Είχε παρατηρήσει κάτι παρόμοιο στο παρελθόν, ύστερα από μια μελέτη που έκανε στον ιό που προκαλούσε ηπατίτιδα στα ποντίκια και στον ιό που προκαλούσε βρογχίτιδα στα κοτόπουλα. Ωστόσο, η αρχική της καταγραφή-δημοσίευση δεν είχε εγκριθεί από τους υπεύθυνους, ώστε να προχωρήσει σε περαιτέρω δημοσίευση.

Το 1968, οι Dr. Tyrrell και Almeida June μαζί με τον καθηγητή Tony Waterson, τον υπεύθυνο του St. Thomas, έδωσαν σε αυτόν τον ιό την ονομασία κορωνοϊός. Η ονομασία "κορωνοϊός", που προέρχεται από την Λατινική λέξη "corona", δηλαδή "στέμμα", προήλθε από την μορφή που είχε ο ιός στο ΗΜ μετά από αρνητική χρώση, κατά την οποία διακρίνονταν χαρακτηριστικά εξογκώματα, περιμετρικά της επιφάνειάς του, που του έδιναν την μορφή στέμματος (Henry, et al., 2019).

Οι κορωνοϊοί είναι οικογένεια ιών με περίβλημα και φέρουν ως γονιδίωμα μονόκλωνο RNA θετικής (+) πολικότητας. Έχουν το μεγαλύτερο γονιδίωμα μεταξύ των RNA ιών καθώς αποτελείται από περίπου 26-32 χιλιάδες βάσεις (Woo, et al., 2010). Το 1975, η οικογένεια των ιών αυτών ονομάστηκε Coronaviridae. Πλέον οι

κορωνοϊοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στην φύση και προσβάλλουν τόσο τους ανθρώπους, όσο και τα ζώα, προκαλώντας μια ποικιλία συμπτωμάτων με ισχυρό ιστολογικό τροπισμό. Στον άνθρωπο, προκαλούν κυρίως λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και σπανιότερα του εντερικού σωλήνα. Οι τελευταίες μελέτες έχουν δώσει έμφαση στην εμπλοκή των ιών αυτών σε λοιμώξεις του νευρικού συστήματος στον άνθρωπο (Greenwood, et al., 2011).

Μέχρι και σήμερα οι κορωνοϊοί έχουν έντονα απασχολήσει τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), αλλά και όλη την επιστημονική και μη κοινότητα. Ο ανθρώπινος κορωνοϊός που ανακαλύφθηκε το 2003, ο SARS-CoV, ήταν αυτός που προκάλεσε από το Νοέμβριο του 2002 έως τον Ιούλιο του 2003, μια έξαρση συμπτωμάτων σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS), το οποίο έλαβε χώρα αρχικά στην Νότια Κίνα (Cherry, 2004). Πρόκειται για μια ιογενή νόσο ζωικής προέλευσης, για την οποία οι επιστήμονες ανακάλυψαν πως ο ιός προερχόταν από νυχτερίδες των σπηλαίων στην επαρχία της Yunnan. Παρατηρήθηκε ότι η μετάδοση στον άνθρωπο από τις νυχτερίδες πραγματοποιήθηκε με ενδιάμεσο ξενιστή τη μοσχογαλή (Mackie, 2017).

Ο SARS είναι ένας ιός που μεταδίδεται μέσω σταγονιδίων σιέλου με παρόμοιο τρόπο με το κοινό κρυολόγημα. Ένας δευτερεύων αλλά πιθανός τρόπος μετάδοσης ήταν και η επαφή με μολυσμένες επιφάνειες. Η ασθένεια αυτή αποτέλεσε την πρώτη ασθένεια τον 21ο αιώνα, η οποία είχε τόσο εύκολη μετάδοση. Η νόσος επεκτάθηκε σε 37 χώρες και συνολικά καταγράφηκαν 8098 κρούσματα με 774 θανάτους (NHS, 2019). Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ, οι ασθενείς ήταν ηλικίας 20-75 ετών, ενώ πολύ λίγα κρούσματα καταγράφηκαν σε παιδιά ηλικίας κάτω των 15 ετών. Η θνητότητα για ασθενείς και ύποπτα κρούσματα άγγιξε το 3% (WHO, 2003 ; Smith, 2006).

Λίγα χρόνια αργότερα, το Σεπτέμβριο του 2012, ένα νέο στέλεχος κορωνοϊού προκάλεσε το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (MERS-CoV), το οποίο διέφερε από τον SARS-CoV που προκάλεσε την πανδημία του 2003. Για πρώτη φορά ο ιός αυτός απομονώθηκε από ασθενείς με σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο στην Αραβική Χερσόνησο. Τα πιο κοινά συμπτώματα της νόσου είναι βήχας, πυρετός και δύσπνοια, ενώ μπορεί να προκληθεί πνευμονία σε ανθρώπους με άλλα υποκείμενα νοσήματα. Σε βαρύτερης μορφής περιστατικά, η νόσος έχει οδηγήσει σε επιπλοκές, όπως το Οξύ Σύνδρομο Αναπνευστικής Δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), νεφρική ανεπάρκεια, πολυοργανική ανεπάρκεια ή θάνατο. Δεν είναι ξεκάθαρη η πηγή μετάδοσης της λοίμωξης, ωστόσο φαίνεται ότι ξεκίνησε από τις

νυχτερίδες και βασικό ρόλο σε αυτό φαίνεται να έχουν και οι καμήλες. Το πρώτο κρούσμα καταγράφηκε στην Σαουδική Αραβία και επεκτάθηκε σε 27 ακόμη χώρες παγκοσμίως. Μέχρι τον Απρίλιο του 2017 έχουν αναφερθεί περίπου 2000 κρούσματα με ποσοστό θνητότητας 36%. Μετά το 2012, έχουν αναφερθεί νέα περιστατικά λοίμωξης από τον ιό MERS-CoV: το 2015 στην Νότια Κορέα και το 2018 στην Σαουδική Αραβία, την Νότια Κορέα και άλλες χώρες (Scheel, 2020 ; Taleghani and Taghipour, 2021).

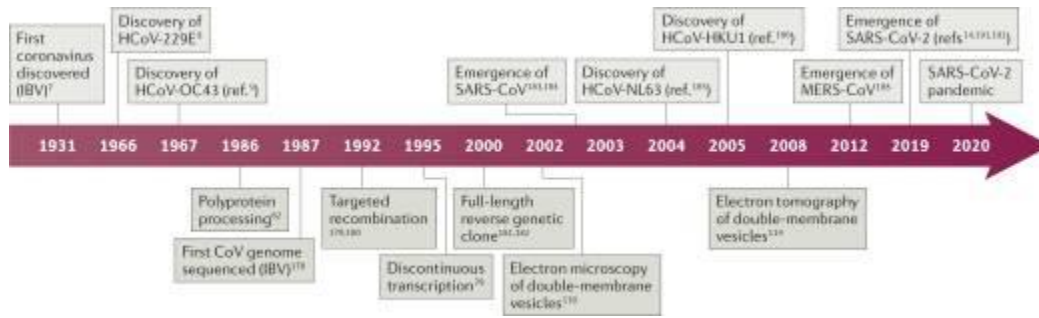
Τέλος, το Δεκέμβριο του 2019, ένας νέος κορωνοϊός αναφερόμενος ως κορωνοϊός της Wuhan (γνωστός ως SARS-CoV-2), προκάλεσε πανδημία η οποία πρωτοεμφανίστηκε στην πόλη Wuhan, επαρχία Hubei, στην Κίνα. Η νόσος που προκαλεί ο ιός αυτός αρχικά ονομάστηκε 2019 novel coronavirus αλλά πλέον είναι γνωστή ως COVID-19 (Coronavirus disease)

([https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)).

Πιστεύεται πως η μετάδοση ξεκίνησε από μία μεγάλη αγορά ζώων της παραπάνω επαρχίας (Scheel, 2020). Στα τέλη Φεβρουαρίου του 2020 καταγράφηκε ο ασθενής μηδέν με λοίμωξη από SARS-CoV-2 στην Ελλάδα. Έκτοτε, ο ιός έχει εξαπλωθεί παγκοσμίως και η πανδημία συνεχίζεται μέχρι και σήμερα όπου καταγράφονται χιλιάδες κρούσματα αλλά και θάνατοι

(<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>). Όπως και οι SARS-CoV και MERS-CoV, έτσι και ο SARS-CoV-2 προσβάλλει κυρίως το αναπνευστικό με συχνότερα συμπτώματα πυρετό, βήχα, δύσπνοια αλλά και απώλεια της γεύσης και της οσμής. Επίσης μπορεί να εξελιχθεί σε προοδευτική πνευμονική ανεπάρκεια αλλά να καταλήξει και σε θάνατο (Zhou, et al., 2020).

Έτσι, είναι φανερό ότι πρόκειται για μια οικογένεια ιών, που η παρουσία της καταγράφεται από πολύ παλιά και μέσα σε τόσα χρόνια έχουν γίνει πολλές και σημαντικές ανακαλύψεις τόσο νέων κορωνοϊών, όσο και γενετικών, δομικών και στοιχείων παθογονικότητας αυτών (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Παρουσίαση των σημαντικότερων ανακαλύψεων σε σχέση με τους κορωνοϊούς (V'kovski, et al., 2021).

2. Ταξινόμηση-Δομή κορωνοϊών

Οι κορωνοϊοί στο σύνολό τους έχουν κατά βάση κοινά χαρακτηριστικά και ιδιότητες και αυτός είναι ο κύριος λόγος που ανήκουν στην ίδια οικογένεια ιών. Ωστόσο, μικρές διαφορές, κυρίως στην δομή τους, είναι αυτό που τους διαχωρίζει και τους κατατάσσει σε διαφορετικές υποομάδες.

2.1 . Ταξινόμηση των κορωνοϊών

Αρχικά, οι κορωνοϊοί κατηγοριοποιήθηκαν στην οικογένεια Coronaviridae με κριτήριο την εμφάνισή τους στο ΗΜ, η οποία μοιάζει με φωτοστέφανο (Tyrrell and Bynoe, 1965 ; Lalchhandama, 2020).

Οι κορωνοϊοί (CoVs), είναι μία εξαιρετικά μεγάλη ομάδα ιών (ίσως η μεγαλύτερη) που ανήκουν στην τάξη Nidovirales, η οποία περιλαμβάνει τις οικογένειες Coronaviridae, Arteriviridae, Mesoniviridae και Roniviridae (Gorbalenya, et al., 2020). Η ονομασία Nidovirales προέρχεται από τη λέξη nido που είναι το λατινικό nest (φωλιά), δεδομένου ότι μερικοί από αυτούς παράγουν nested mRNA (messenger RNA). Οι ιοί της τάξης αυτής έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά σε ό,τι αφορά την οργάνωση και την έκφραση των γονιδίων τους (Gorbalenya, et al., 2020 ; Weis, et al., 2021).

Η οικογένεια Coronaviridae απαρτίζεται από δύο γένη, τους Coronavirinae και τους Torovirinae, ενώ από τα δύο γένη, αυτό των Coronavirinae χωρίζεται σε τέσσερις κύριες υποομάδες, γνωστές ως άλφα, βήτα, γάμμα και δέλτα (Gorbalenya, et al., 2020). Το γένος των Torovirinae προσβάλλει κυρίως τα ζώα, ενώ στον άνθρωπο έχουν ανιχνευθεί σε περιστατικά γαστρεντερίτιδας παιδιών. Τέλος, η οικογένεια Arteriviridae αποτελείται από ένα μόνο γένος, τους Arterivirus, οι οποίοι όμως δεν προσβάλλουν καθόλου τον άνθρωπο (Greenwood, et al, 2011 ; Machhi, et al., 2020).

Όλοι οι ιοί που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι RNA ιοί, θετικής πολικότητας και δομούνται από πολύ μεγάλα γονιδιώματα με μερικούς από αυτούς να αποτελούνται από τα μεγαλύτερα αναγνωρισμένα γονιδιώματα (έως και 33,5 kb). Ωστόσο, έχουν και άλλα κοινά χαρακτηριστικά τα οποία είναι : α) η εξαιρετικά διατηρημένη οργάνωση του γονιδιώματος β) η έκφραση αρκετών μη δομικών γονιδίων με ριβοσωματική αλλαγή πλαισίου γ) αρκετές ειδικές ενζυματικές δραστηριότητες και

δ) η έκφραση των γονιδίων με σύνθεση 3' mRNAs. Ταυτόχρονα στις κύριες διαφορές τους είναι ο αριθμός, το είδος και το μέγεθος των δομικών πρωτεϊνών, οι οποίες δημιουργούν διάφορες αλλαγές στην δομή και την μορφολογία του νουκλεοκαψιδίου (Gorbalenya, et al., 2020).

Οι 4 ομάδες των κορωνοϊών είναι οι εξής:

I. Ομάδα A (Alpha-CoV)

Οι Alpha-Cov μολύνουν κυρίως θηλαστικά και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται 14 υπογένη: Colacovirus, Decacovirus, Luchacovirus, Duvinacovirus, Minacovirus, Minunacovirus, Myotacovirus, Nyctacovirus, Pedacovirus, Rhinacovirus, Setracovirus, Soracovirus, Sunacovirus και Tegacovirus τα οποία αντιπροσωπεύουν 19 είδη Alpha-CoVs (Zhou, Qiu and Ge, 2021).

Ia. Ανθρώπινοι Alpha-CoVs

- Corona-ϊός HCoV-229E
- Corona-ϊός HCoV-NL63

Και οι δύο προκαλούν είτε ήπια συμπτώματα ενός απλού κρυολογήματος, είτε οξεία αναπνευστική νόσο και σε ενήλικες και σε παιδιά. Υπάρχουν στοιχεία που έχουν δείξει πως και οι δύο αυτοί τύποι έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τον CoV της νυχτερίδας, κάτι που υποδεικνύει την πιθανότητα ιογενούς μόλυνσης από την νυχτερίδα (Van Der Hoek, et al., 2004).

Ιβ. Alpha-CoVs που προέρχονται από νυχτερίδες και μολύνουν και άλλα ζώα

11 από τα 19 είδη των Alpha-CoVs ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και είναι:

- Κορωνοϊός τη νυχτερίδας CDPHE15 (BtCoV-CDPHE15), το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό είδος του υπογένους Colacovirus και έχει εντοπιστεί στην μικρή καφέ νυχτερίδα (*Myotis lucifugus*)
- Κορωνοϊός HKU10 (BtCoV-HKU10), ο οποίος έχει δύο μορφές ανάλογα με το είδος της νυχτερίδας από την οποία προέρχεται, τον Ro-BatCoVHKU10 (ο οποίος προέρχεται από τη νυχτερίδα *Rousettus leschenaultia*) και τον Hi-BatCoVHKU10 (ο οποίος προέρχεται από την νυχτερίδα *Hipposideros roponoma*), και τα δύο είδη CoVs ανήκουν στο υπογένος Decacovirus (Lau, et al., 2012 ; Wang, et al., 2021)
- Ο *Rhinolophus ferrumequinum alpha coronavirus*, HuB-2013 (BtRfCoV-HuB13), στον οποίο ανήκουν πολλά στελέχη, δύο από τα οποία είναι το BtRf-Alpha-CoV/HuB2013 που ανιχνεύθηκε στο είδος *Rhinolophus ferrumequinum* και το στέλεχος BtMs-Alpha-CoV/GS2013, το οποίο ανιχνεύθηκε στις νυχτερίδες *Myotis* (Fan, et al., 2019)
- Το υπογένος *Minunacovirus* περιέχει δύο είδη και αυτά είναι το *Miniopterus batcoronavirus 1* (BtMiCoV-1) και *Miniopterus coronavirus HKU8* (BtMiCoV-HKU8). Και τα δύο είναι κοινοί κορωνοϊοί σε νυχτερίδες των ειδών *Miniopterus schreibersii*, *Miniopterus fuliginosus* και *Miniopterus pusillus* (Chu, et al., 2008; Zhou, Qiu and Ge, 2021)
- Το υπογένος *Myotacovirus* αποτελείται από ένα είδος, τον *Myotis ricketti alphacoronavirus Sax-11* (BtMy-Sax-11) (Zhou, Qiu and Ge, 2021)
- Το υπογένος *Nyctacovirus* περιέχει τρία είδη το *Nyctalus velutinu salphacoronavirus SC-2013* (BtNv-Alpha-CoV/SC2013) και το *Nyctalus velutinus alphacoronavirus* και τον *Pipistrellus kuhlii coronavirus 3398* (Bat-CoV/P.kuhlii/Italy/3398) (Zhou, Qiu and Ge, 2021)
- Το υπογένος *Rhinacovirus* περιέχει ένα είδος και αυτό είναι το *Rhinolophus bat coronavirus HKU2* (BatCoV-HKU2, το οποίο ανακαλύφθηκε αρχικά σε ένα είδος νυχτερίδας στην Κίνα αλλά αργότερα ταυτοποιήθηκε και σε άλλα είδη νυχτερίδων. Διαφέρει γενετικά σε ό,τι αφορά τους άλλους alpha-CoVs που προέρχονται από νυχτερίδες. Αργότερα, ο ίδιος αυτός ιός βρέθηκε να προκαλεί

μία έντονη έξαρση συμπτωμάτων σε χοίρους στην Κίνα και ονομάστηκε εντερικός Alphacoronavirus των χοίρων (SeACoV) ή PEAV ή SADS-CoV (Wang, Hu and Fan, 2020 ; Zhou, Qiu and Ge, 2021)

- Το υπογένος Pedacovirus περιέχει δύο είδη, τον ιό επιδημικής διάρροιας χοίρων (Porcine epidemic diarrhoeavirus-PEDV), ο οποίος προσβάλλει χοίρους όλων των ηλικιών και κατά περιόδους έχει προκαλέσει σημαντικές απώλειες στην βιομηχανία χοίρων, όπως για παράδειγμα στην Κορέα (Park, et al., 2011), αλλά και Scotophilus batcoronavirus 512 (BtCoV/512), ο οποίος βρέθηκε σε νυχτερίδες Scotophilus kuhlii στην Κίνα. Πρόκειται για δύο διαφορετικούς ιούς αλλά με κοινό εξελικτικό πρόδρομο (Huang, et al., 2013)

Το υπογένος Tegacovirus περιέχει ένα μόνο είδος, τον Alphacoronavirus 1 και αυτό το είδος περιλαμβάνει ένα πλήθος κοινών παθογόνων τα οποία μολύνουν ζώα όπως είναι:

- a. Μεταδιδόμενος ιός γαστρεντερίτιδας χοίρων (Transmissible gastroenteritis virus-TGEV), ο οποίος μολύνει χοίρους όλων των ηλικιών και προκαλεί σοβαρή διάρροια (Kim, et al., 2000)
- b. Ο κορωνοϊός του αναπνευστικού χοίρων (Porcine respiratory coronavirus-PRCV), προκαλεί αναπνευστικά προβλήματα και είναι μία παραλλαγή του TGEV (Kim, et al., 2000)
- c. Κορωνοϊός σκύλων (Canine Coronavirus-CCoV) που προκαλεί ήπια συμπτώματα γαστρεντερίτιδας σε νεαρούς σκύλους και διακρίνεται σε δύο τύπους, τον CCoV τύπου I και τον CCoV τύπου II (He, et al., 2020)
- d. Κορωνοϊός των αιλουροειδών (Feline coronavirus-FCoV), που προκαλεί ασυμπτωματική νόσος ή πολύ ελαφρά συμπτώματα γαστρεντερίτιδας, μπορεί όμως να εξελιχθεί σε σοβαρή περιτονίτιδα, η οποία είναι γνωστή ως ιός λοιμογόνου περιτονίτιδας αιλουροειδών (Feline infectious peritonitis-FIPV) (Battilani, et al., 2003).

Iγ. Άλλοι Alpha-CoVs

- Ο MCoV (Minkcoronavirus 1) είναι ένας άλφα κορωνοϊός που προσβάλλει τα μινκ προκαλώντας επιζωοτική καταρροϊκή γαστρεντερίτιδα και έχει επηρεάσει κατά καιρούς την βιομηχανία αυτών των ζώων. Προέρχεται από το υπογένος Minacovirus. Στην κατηγορία αυτή ανήκει επίσης και ο κορωνοϊός που μολύνει κουνάβια (Ferret coronavirus-FRCoV) και ο οποίος αποτελείται από δύο είδη, τον συστηματικό κορωνοϊό κουναβιών (Ferret systemic coronavirus-FRSCV) και τον εντερικό κορωνοϊό κουναβιών (Ferret enteric coronavirus-FRECV) (Lamers, et al., 2016)
- Στο υπογένος Luchacovirus ανήκει ο κορωνοϊός αρουραίων, Lucheng Rn (Lucheng Rn ratcoronavirus-LRNV) (Zhou, QiuandGe, 2021)

II. Ομάδα Β (Beta-CoV)

Οι Beta-CoV μολύνουν θηλαστικά και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται 5 υπογένη Embecovirus, Hibecovirus, Merbecovirus, Nobecovirus και Sarbecovirus τα οποία αντιπροσωπεύουν 14 είδη Beta-CoVs (Zhou, Qiu and Ge, 2021).

- Κορωνοϊός HCoV-OC43 (Human coronavirus OC43 ή Betacoronavirus 1) που προκαλεί νόσο εντοπισμένη στο αναπνευστικό, γαστρεντερικό και νευρικό σύστημα και όπως δείχνουν μέχρι τώρα τα δεδομένα προέρχεται από τρωκτικά, τα οποία μπορούν να μεταδώσουν τον ιό στον άνθρωπο με ενδιάμεσο ξενιστή μία άλλη κατηγορία ζώων, τα βοοειδή (Kin, et al., 2015 ; Morfopoulou, et al., 2016)
- Κορωνοϊός HCoV-HKU1 (Human coronavirus HKU1), ο οποίος έχει ίδια δράση με τον HCoV-OC43 με την διαφορά ότι ο ενδιάμεσος ξενιστής μόλυνσης δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί (Siu, et al., 2014 ; Kin, et al., 2015)
- Κορωνοϊός που ευθύνεται για το αναπνευστικό σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (Middle East respiratory syndrome, MERS-CoV), ενδιάμεσος ξενιστής είναι οι καμήλες και προκάλεσε την πανδημία του 2012 (Fan, et al., 2019)

- Κορωνοϊός SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), ο οποίος μεταδίδεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού προκαλώντας οξεία αναπνευστική πνευμονία (Van Der Hoek, et al., 2004)
- Κορωνοϊός SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), ο οποίος ανήκει στο υπογένος Sarbecovirus και εκτός από το αναπνευστικό σύστημα προσβάλλει το νευρικό σύστημα, το γαστρεντερικό και τους νεφρούς (Zhou, Qiu and Ge, 2021)
- Κορωνοϊός αρουραίου (China Rattus coronavirus HKU24, RtCoV-HKU24), ο οποίος προκαλεί αναπνευστική νόσο και απομονώθηκε από αρουραίους στην Κίνα. Αυτός ο κορωνοϊός αντιπροσωπεύει την προέλευση του Betacoronavirus 1 (Bartak, et al., 2021)
- Άλλα δύο στελέχη κορωνοϊού αρουραίων (Rat coronavirus, RCoV), που προκαλούν αναπνευστική νόσο και έχουν απομονωθεί από μολυσμένους πνεύμονες αρουραίων, είναι ο ιός σιαλοδακρυσαδενίτιδας (Sialodacryoadenitis virus, RCoV-SDAV) και ο ιός αρουραίων Parker (Parker's rat coronavirus, RCoV-P) (Miura, et al., 2006 ; Bartak, et al., 2021)
- Δύο κορωνοϊοί νυχτερίδων ο Tylonycteris bat coronavirus HKU4 (BtTyCoV-HKU4) και ο Pipistrellus bat coronavirus HKU5 (BtPiCoV-HKU5). Το γονιδίωμα τους βρέθηκε για πρώτη φορά το 2006 σε νυχτερίδες Tylonycteris pachypus και Pipistrellus abramus αντίστοιχα και έχουν μία στενή φυλογενετική σχέση με τον ιό MERS (Wang, et al., 2014)
- Κορωνοϊός των ίππων (Equine coronavirus, ECoV) με κύρια οδό μετάδοσης τα κόπρανα (στα οποία ανιχνεύεται) και προκαλεί πυρετό, ανορεξία, λήθαργο και διάρροια (Nemoto, Schofield and Cullinane, 2019)
- Ιός της αιματοσυγκολλητικής εγκεφαλομυελίτιδας χοίρων (Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, PHEV) είναι υπεύθυνος για νευρολογική νόσο σε χοίρους, προκαλώντας συμπτώματα εξαρτώμενα από την ηλικία του ζώου (Mora-Díaz, et al., 2019)
- Κορωνοϊός βοοειδών (Bovine coronavirus, BCoV), ο οποίος προσβάλλει τους πνεύμονες αλλά και το εντερικό σωλήνα των βοοειδών αλλά και άλλων μηρυκαστικών (Vlasova and Saif, 2021)
- Ιός ηπατίτιδας ποντικών (Murine Hepatitis virus MHV), ο οποίος προκαλεί μία ποικιλία ασθενειών σε τρωκτικά, όπως ηπατίτιδα, εγκεφαλομυελίτιδα και εντερίτιδα (Barthold and Smith, 2007)

- Δύο ακόμη κορωνοϊοί των νυχτερίδων, ο Roussettus batcoronavirus GCCDC1 (RoBat-CoV) και ο Rusettus batcoronavirus HKU9 (BtRoCoV-HKU 9) (Fan, et al., 2019)
- Ο κορωνοϊός του σκαντζόχοιρου (Hedgehog coronavirus 1, EriCoV-1 ή Ea-HedCoVHKU31), ο οποίος εντοπίστηκε σε σκαντζόχοιρους στην Ευρώπη και στην Κίνα (Zhou, Qiu and Ge, 2021)

III. Ομάδα Γ (Gamma-CoV)

Οι Gamma-CoVs μολύνουν κυρίως πτηνά, αλλά κάποιοι από αυτούς μολύνουν και θηλαστικά. Περιλαμβάνουν 3 υπογένη: Igacovirus, Brangacovirus και Cegacovirus τα οποία αντιπροσωπεύουν 5 είδη Gamma-CoVs (Zhou, QiuandGe, 2021).

- Ιός λοιμώδους βρογχίτιδας (Infectious bronchitis virus, IBV), ο οποίος μολύνει την ανώτερη αναπνευστική οδό πτηνών, όπως κοτόπουλα, γαλοπούλες, πάπιες, φασιανούς, πέρδικες και περιστέρια και ανήκει στο υπογένος Igacovirus (Cavanagh, 1983 ; Zhou, QiuandGe, 2021)
- Κορωνοϊός της χήνας CB17, ο οποίος πήρε το όνομά του από έναν σχετικά πρόσφατα αναγνωρισμένο corona-ϊό, τον Canada goose coronavirus (CGCoV), που μολύνει ένα είδος χήνας (Brantacandensis) και είναι παρόμοιος με τον άλφα κορωνοϊό των πτηνών (ACoV). Ο ιός αυτός ανήκει στο υπογένος Brangacovirus (Papineau, et al., 2019)
- Κορωνοϊός της φάλαινας beluga SW1 (Belugaw Hale coronavirus SW1, BWCoVSW1) που θεωρείται ότι είναι η εξέλιξη του ACoV. Αποτελεί ικό στέλεχος του υπογένους Cegacovirus (Woo, et al., 2009)
- Κορωνοϊός ρινοδέλφινου, HKU22 (BdCoVHKU22), για τον οποίο ισχύει το ίδιο με τον BWCoVSW1 (Zhou, Qiu and Ge, 2021)
- Κορωνοϊός γαλοπούλας (Turkey coronavirus, TCoV), αιτία για την οξεία εντερίτιδα στις οικόσιτες γαλοπούλες και σχετίζεται με τον ιό IBV(Guy, 2000)

IV. Ομάδα Δ (Delta-CoV)

Οι Delta-CoV μολύνουν πτηνά αλλά και θηλαστικά, όπως είναι οι χοίροι και περιλαμβάνουν 3 υπογένη Andecovirus, Buldecovirus και Heldecovirus (Zhou, Qiu and Ge, 2021). Έχουν εντοπιστεί 9 Delta -CoVs πτηνών (HKU-15-44) και δύο Delta-CoVs χοίρων (HKU 15-155) (Li, et al., 2014).

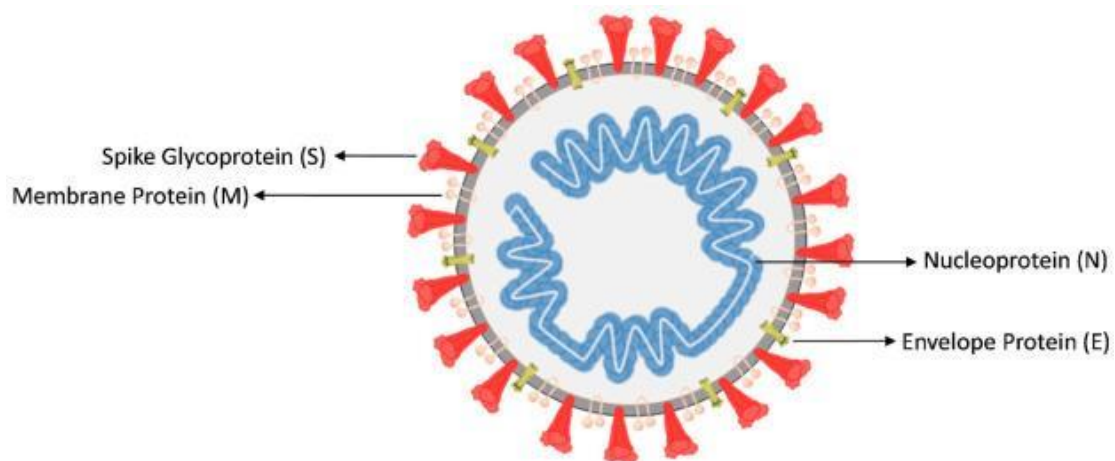
- Κορωνοϊός των χοίρων (PDCoV) μολύνει το πεπτικό σύστημα χοίρων και προκαλεί διάρροια και άλλα κλινικά συμπτώματα παρόμοια με τον PED και τον TGE (Zhou, Qiu and Ge, 2021). Πρόσφατα βρέθηκε άλλος ένας Delta-CoV, ο οποίος μολύνει χοίρους και ονομάστηκε HKU15 (PorCoVHKU15) (Lau, et al., 2018)
- Στην κατηγορία των πτηνών έχουν εντοπιστεί κάποια είδη που περιλαμβάνουν τους εξής κορωνοϊούς: bulbul coronavirus HKU11 (BuCoVHKU11), thrush coronavirus HKU12 (ThCoVHKU12) και munia coronavirus HKU13 (MunCoVHKU13) (Woo, et al., 2012). Πιο πρόσφατα βρέθηκαν άλλοι έξι Delta-CoVs που μολύνουν πτηνά και είναι: κορωνοϊός λευκού ματιού HKU16 (White-eye coronavirus HKU16, WECoVHKU16), κορωνοϊός σπουργιτιού HKU17 (Sparrow coronavirus HKU17, SpCoVHKU17), κορωνοϊός καρακάξας HKU18 (MRCoVHKU18), κορωνοϊός του νυχτερινού ερωδιού HKU19 (Night heron coronavirus HKU19, NHCoVHKU19), κορωνοϊός της πάπιας wigeon HKU20 (Wigeon coronavirus HKU20, WiCoVHLU20) και ο κοινός κορωνοϊός της κότας moorhen HKU21 (Common moorhen coronavirus HKU21, CMCoVHKU21) (Lau, et al., 2018)

Η πλειοψηφία των κορωνοϊών που προσβάλλουν τον άνθρωπο ανήκουν κυρίως στην ομάδα Α ή στην ομάδα Β και πιο συγκεκριμένα είναι: ο HCoV-229E, ο HCoV-NL63, ο HCoV-OC43, ο HCoV-HKU1, ο MERS-CoV, ο SARS-CoV και ο SARS-CoV-2. Παρόλο που πρόκειται για διαφορετικούς τύπους κορωνοϊών, όλοι προσβάλλουν τον άνθρωπο προκαλώντας ήπια συμπτώματα, κυρίως από το αναπνευστικό σύστημα, αλλά έχουν μεταξύ τους διαφορές, τόσο στους ενδιάμεσους ξενιστές και τους αντιγονικούς προσδιοριστές, όσο και στις απαιτήσεις που έχουν στην καλλιέργειά τους (El-Sayed and Kamel, 2021).

2.2. Δομή

Ένας κορωνοϊός είναι αρκετά μεγάλος στο μέγεθός του (Goldsmith, et al., 2004). Η διάμετρός του είναι συνήθως από 80 έως 120 nm, αλλά υπάρχουν και μεγαλύτεροι με διάμετρο έως 200 nm (Masters, 2006). Το μέσο συνολικό βάρος του ιού είναι γύρω στα 40.000 kDa.

Εξωτερικά καλύπτεται από φακέλο αποτελούμενο από μια λιπιδική διπλοστιβάδα, μόρια πρωτεΐνης και εσωτερικά το νουκλεοκαψίδιο. Τα παραπάνω προστατεύουν τον ιό όταν κυκλοφορεί και βρίσκεται εκτεθειμένος χωρίς να έχει εισέλθει σε κάποιο κύτταρο-ξενιστή (Lalchhandama, 2020). Η λιπιδική διπλοστιβάδα του φακέλου περιλαμβάνει τις δομικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (membrane, M), του φακέλου (envelope, E), της ακίδας (spike, S) και του νουκλεοκαψιδίου (nucleocapsid, N) (Maier, et al., 2015 ; Taleghani and Taghipour, 2021). Οι πρωτεΐνες M και E είναι οι δομικές πρωτεΐνες του φακέλου, οι οποίες συμβάλλουν, μαζί με την λιπιδική διπλοστιβάδα, στη διαμόρφωση του φακέλου αλλά και στη σταθεροποίηση της δομής του, ενώ η πρωτεΐνη S είναι η κυρίως δομική πρωτεΐνη των ακίδων που συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ξενιστή (Εικόνα 3). Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη N είναι η μοναδική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου, όπου ο κύριος ρόλος της είναι η δέσμευση του ιικού RNA (Gorbalenya, et al., 2020).



Εικόνα 3 : Απεικόνιση των δομικών πρωτεϊνών του ιού SARS-CoV-2 (Taleghani and Taghipour, 2021).

2.2.1. Πρωτεΐνη M της μεμβράνης του ιού

Η πρωτεΐνη M είναι πρωτεΐνη της μεμβράνης του φακέλου τύπου III, βρίσκεται σε πολύ μεγάλη ποσότητα στον ιό και παίζει πολύ σημαντικό και βασικό ρόλο στην διαμόρφωση του σχήματός του. Είναι μια μικρή πρωτεΐνη (περίπου 25-30 kDa) που δομείται από 218 έως 263 αμινοξέα και δημιουργεί αρκετά παχύ στρώμα γύρω στα 7,8 nm, παρά το μικρό της μέγεθος (Gorbalenya, et al., 2020 ; Lalchhandama, 2020).

Αποτελείται από ένα N-τερματικό γλυκοζυλιωμένο άκρο, που είναι συνήθως μόλις 20 αμινοξέα, τα οποία εκτείνονται στην εξωτερική πλευρά του ιού, τρεις διαμεμβρανικές περιοχές στο εσωτερικό του ιού και μια O-τερματική περιοχή, η οποία επίσης εκτείνεται γύρω στα 6-8 nm εσωτερικά του ιού (Lalchhandama, 2020 ; Gorbalenya, et al., 2020 ; Cavanagh, 2005). Στο εσωτερικό του φακέλου βρίσκεται το 50% του μορίου της πρωτεΐνης M. Ωστόσο, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο το N όσο και το O άκρο εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά του ιού (Narayanan, et al., 2000 ; Lalchhandama, 2020).

Η πρωτεΐνη M έχει πολύ σημαντικό ρόλο στον κύκλο ζωής του ιού, καθώς συμβάλλει στα στάδια συναρμολόγησής του μέσω της σύνδεσης του νουκλεοκαψιδικού πυρήνα στον ιικό φάκελο κατά τη διαδικασία της εκβλάστησης, αλλά και στην παθογένεια του ιού (Neuman, et al., 2011). Η πρωτεΐνη M του SARS-CoV-2 σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεΐνες και μεσολαβεί στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις στους ξενιστές (Satarker and Namproothiri, 2020).

Ανήκει επίσης στην κατηγορία των πρωτεϊνών οι οποίες είναι ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς σε αυτή την περίπτωση αποδομούνται και επηρεάζονται από λιπιδικούς διαλύτες (σαπούνι), φορμαλδεΰδη, μη ιοντικά απορρυπαντικά, οξειδωτικά μέσα αλλά και από την υπεριώδη ακτινοβολία. Αυτός είναι και ο λόγος που συνιστάται το τακτικό πλύσιμο χεριών με σαπούνι, ώστε να αποφευχθεί η μετάδοση του κορωνοϊού μέσω του δέρματος (Narayanan, et al., 2000 ; Lalchhandama, 2020).

2.2.2. Πρωτεΐνη E του φακέλου του ιού

Η πρωτεΐνη E (παλαιότερα ονομαζόταν sM) είναι ένα αρκετά μικρό πολυπεπτίδιο, το οποίο βρίσκεται σε μικρή ποσότητα μέσα στον ιό, κυμαίνεται συνήθως από 7,8 έως 12 kDa κάτι που αντιστοιχεί σε περίπου 76-109 αμινοξέα (Lalchhandama, et al., 2020 ; Gorbalenya, et al., 2020).

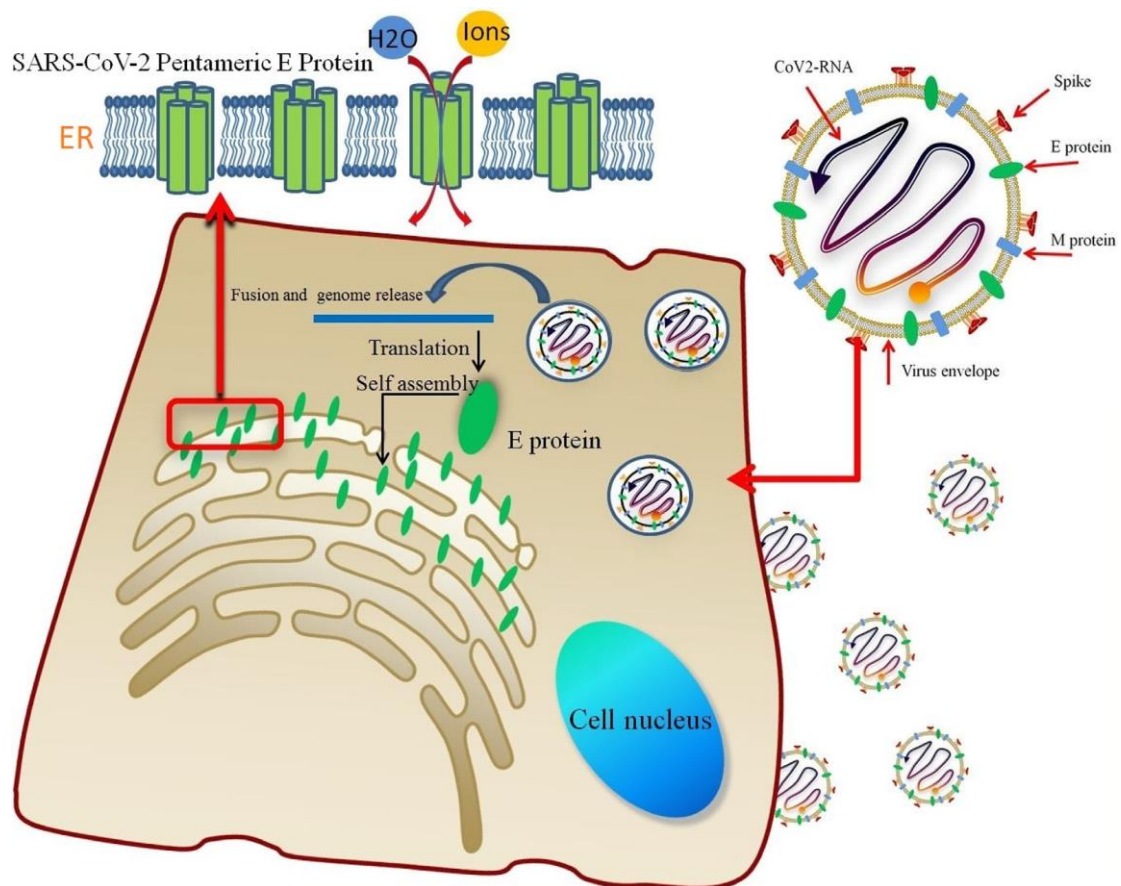
Πρόκειται για μια δομική πρωτεΐνη του φακέλου, η οποία ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα, σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του, ως συστατικό του ιού. Το γεγονός αυτό οφείλεται αποκλειστικά στο πολύ μικρό μέγεθος του μορίου αυτού. Η αξία αλλά και η σημασία αυτού του μικρού μορίου, επισκιάστηκε από το γεγονός ότι η περιοχή που κωδικοποιεί και αναγνωρίζει την πρωτεΐνη E παρουσιάζεται ως το πιο απομακρυσμένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) στο mRNA και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να «εκφράζεται» από έναν μη τυπικό μηχανισμό μετάφρασης (Masters, et al., 2006 ; Verdiá-Báguena, et al., 2013) .

Οι πρωτεΐνες E των κορωνοϊών διαφέρουν μεταξύ τους, ωστόσο έχουν κοινή αρχιτεκτονική δομή. Αποτελούνται από ένα βραχύ αμινοτελικό άκρο (N-τερματικό άκρο), σχετικά μικρό σε μέγεθος (8-12 αμινοξέα), το οποίο είναι υδρόφιλο και βρίσκεται εξωτερικά του φακέλου και από ένα μακρύ καρβοξυτελικό (C-τερματικό άκρο) μεγάλου μεγέθους (39-76 αμινοξέα), το οποίο σε αντίθεση με το προηγούμενο είναι υδρόφοβο, βρίσκεται εσωτερικά του φακέλου και έχει τα χαρακτηριστικά ενός διαύλου ιόντων (Εικόνα 4). Ανάμεσα σε αυτές τις δύο περιοχές βρίσκεται μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή, εσωτερικά του φακέλου (21-29 αμινοξέα), αποτελούμενη από 2-4 κυστεΐνες, η οποία ολιγομερίζεται για να σχηματίσει πενταμερείς διαύλους ιόντων και μαζί με την καρβοξυτελική ουρά αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του μορίου (Masters, 2006).

Μια από τις λειτουργίες της είναι η δόμηση νέων ιοσωμάτων κατά τη συναρμολόγηση του ιού και η ευκολότερη απελευθέρωση από το κύτταρο μέσω εκβλάστησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάποιοι ιοί που δεν έχουν την συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν είναι πάντα θανατηφόροι (Gorbalenya, et al., 2020).

Σε ότι αφορά τον ιό SARS-CoV-2, η πρωτεΐνη E δεν είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση της αντιγραφής του ιού, αλλά είναι σημαντική κυρίως για την παθογένεια (Gorbalenya, et al., 2020). Επιπρόσθετα, έχει ρόλο καναλιών Ca^{2+} , τα οποία κατά την διάρκεια την μόλυνσης από τον ιό ενεργοποιούν την κασπάση-1 και

ωριμάζουν την προ-φλεγμονώδη IL-1 β (Lalchhandama, 2020 ; Cao, et al., 2021). Μετά από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την πρωτεΐνη E, οι επιστήμονες έχουν καταλήξει στο ότι η πρωτεΐνη αυτή διαφέρει στους κορωνοϊούς SARS-CoV στο γεγονός ότι η υδρόφοβη περιοχή της δημιουργεί μία "φουρκέτα", η οποία περιστρέφεται γύρω από τη μεμβράνη. Αυτή η διαμόρφωση είναι ειδική και μοναδική για την ομάδα αυτή των κορωνοϊών (Masters, 2006).



Εικόνα 4 : Απεικόνιση της εισαγωγής της πρωτεΐνης E του ιού SARS-CoV-2 στο κύτταρο ξενιστή (Cao, et al., 2021).

2.2.3 . Πρωτεΐνη S των ακίδων του ιού

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού αποτελείται από προεξέχουσες δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες μεγάλης επιφάνειας και ονομάζονται πρωτεΐνες ακίδας S (Satarker and Namproothiri, 2020).

Η πρωτεΐνη S (παλαιότερα ονομαζόταν E2), είναι μια δομική πρωτεΐνη των ακίδων μεγέθους περίπου 150 kDa, οι οποίες αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ιού εξαιτίας των οποίων έχει αποκτήσει και το όνομά του, καθώς είναι ορατές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και του δίνουν την όψη κορώνας (Gorbalenya, et al., 2020).

Οι ακίδες των κορωνοϊών έχουν διάμετρο περίπου 15-20 nm, αλλά στον ιό SARS-CoV έχουν το μικρότερο μέγεθος, περίπου 9-12 nm (Lalchhandama, 2020). Κάθε μία πρωτεΐνη S μπορεί να δομείται με έως και 1273 αμινοξέα (Gorbalenya, et al., 2020). Ένας κορωνοϊός μπορεί να αποτελείται από 50-100 ακίδες (Satarker and Namproothiri, 2020).

Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή και στη συνέχεια συμβάλει στην προσκόλληση πάνω του αλλά και την σύντηξη της μεμβράνης. Αποτελείται από μία μεγάλη εκτομή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα κοντό ενδοκυττάριο τμήμα (ουρά) C. Η εκτομή με τη σειρά της αποτελείται από δύο υπομονάδες, την S1 και την S2, από τις οποίες η πρώτη είναι το τμήμα όπου συνδέεται ο υποδοχέας και η δεύτερη είναι υπεύθυνη για τη σύντηξη του φακέλου του ιού με το κύτταρο-ξενιστή. Υπάρχουν τρεις υπομονάδες S1, οι οποίες είναι τοποθετημένες πάνω στην S2 (Εικόνα 5) (Satarker and Namproothiri, 2020).

Οι πρωτεΐνες S βοηθούν επίσης στην περαιτέρω προσκόλληση των μολυσμένων κυττάρων με άλλα γειτονικά μη μολυσμένα κύτταρα με σκοπό την εξάπλωση του ιού (Satarker and Namproothiri, 2020).

Υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υπομονάδων. Οι σφαιρικές δομές των ακίδων αποτελούνται από τρεις υπομονάδες S1, περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για την αναγνώριση του ιού από το κύτταρο ξενιστή, μετά την οποία ακολουθεί η σύντηξη με την μεμβράνη του κυττάρου, ώστε να προχωρήσει η είσοδος του ιού. Έτσι, με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την παθογένεια αλλά και τις ανοσογονικές ιδιότητες του ιού. Τρεις S1 πρωτεΐνες συνδέονται με δύο S2 πρωτεΐνες και το διαμεμβρανικό τμήμα βοηθάει στην αγκυροβόληση του S2 στην επιφάνεια του ιού που εκτίθεται στο εσωτερικό του ως ενδοκυτταρική ουρά (Lalchhandama, 2020).

Από τις δύο υπομονάδες, η S1 αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό κομμάτι του κορωνοϊού καθώς αναγνωρίζεται και αλληλοεπιδρά άμεσα με τον ξενιστή. Παράλληλα αποτελεί και το πιο μεταβλητό στοιχείο το οποίο δομεί τον ιό καθώς διαφέρει από ομάδα σε ομάδα (Masters, 2006 ; Lalchhandama, 2020). Από την άλλη πλευρά η υπομονάδα S2 των κορωνοϊών έχει αρκετά σταθερή δομή (Masters, 2006).

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή ξεκινάει όταν η υπομονάδα S1 προσκολλάται σε υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή και στη συνέχεια η υπομονάδα S2 με την σειρά της προκαλεί την συγχώνευση των δύο μεμβρανών, δηλαδή αυτή του ιού και αυτή του κυττάρου ξενιστή, επιτρέποντας έτσι στο γονιδίωμα του ιού να εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστή. Αυτή η διαδικασία αποτελεί και την αρχή της μόλυνσης (Li, 2016).

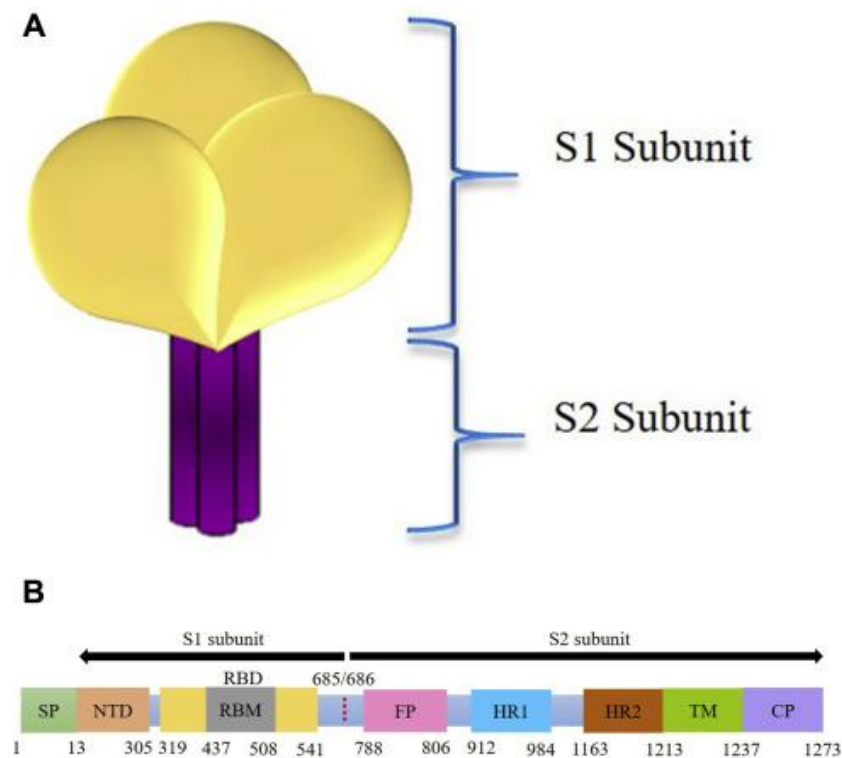
Οι κορωνοϊοί έχουν ο καθένας ένα ξεχωριστό και μοναδικό τρόπο να αναγνωρίζουν τον υποδοχέα σύνδεσης, χωρίς να ακολουθούν όλοι το ίδιο πρότυπο. Μερικά παραδείγματα είναι ο HCoV-NL63 και ο SARS-CoV που αναγνωρίζουν το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (zincpeptidase angiotensin-converting enzyme 2, ACE2), ο TGEV, ο PEDV, ο PRCV που αναγνωρίζουν την αμινοπεπτιδάση N (aminopeptidase N, APN), η οποία είναι μία πεπτιδάση ψευδαργύρου, ο MERS-CoV και ο HKU4 που αναγνωρίζουν μια διπεπτιδυλική πεπτιδάση 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4), ο MHV που αναγνωρίζει το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο σχετιζόμενο με το κυτταρικό μόριο προσκόλλησης 1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule, CEACAM1) (Li, 2016 ; Wang and Xiang, 2020).

Ταυτόχρονα, η ίδια η πρωτεΐνη S1 είναι χωρισμένη σε διάφορα μέρη από τα οποία το καθένα έχει τη δική του λειτουργία. Αυτά είναι η N-τερματική περιοχή (N-terminal domain, S1-NTD) και η C-τερματική περιοχή (C-terminal domain, S1-CTD), με την πρώτη να αναγνωρίζει αλλά και να δεσμεύει σάκχαρα στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή, αλλά και να έρχεται σε άμεση επαφή με την S2, την οποία περιορίζει δομικά (Lalchhandama, 2020). Η δεύτερη περιοχή αναγνωρίζει τον εκάστοτε πρωτεϊνικό υποδοχέα. Η μία ή και οι δύο από αυτές τις περιοχές μπορούν να δεσμεύσουν υποδοχέα, οπότε έχουν τον ρόλο περιοχής σύνδεσης υποδοχέα (receptor-binding domain, RBD) (Li, 2016).

Η ακίδα του κορωνοϊού αποτελεί μέλος της κατηγορίας I των πρωτεϊνών σύντηξης ιικής μεμβράνης, μία ομάδα η οποία συμπεριλαμβάνει και αυτές του ιού της γρίπης, του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human immunodeficiency virus, HIV) και του ιού Ebola. Η καλύτερα μελετημένη είναι η γλυκοπρωτεΐνη

αιμοσυγκολλητίνης (hemagglutinin glycoprotein, HA). Σε αντίθεση με τους άλλους ιούς, ο κορωνοϊός έχει τοποθετημένο το πεπτιδίο σύντηξης κάτω από το N άκρο της S2 υπομονάδας, άρα πρόκειται για εσωτερική σύντηξη (Li, 2016).

Σε ό,τι αφορά τον ιό SARS-CoV-2, τα στοιχεία δείχνουν ότι η αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης S έχει περίπου 75% ομολογία με αυτή του ιού SARS-CoV. Η υπομονάδα S1 έχει 70% ομοιότητα, ενώ η S2 έχει 99% ομοιότητα με αυτή του SARS-CoV. Το μοριακό βάρος του SARS-CoV-2 είναι 141178 kDa και αποτελείται από 1273 αμινοξέα (Satarker and Namproothiri, 2020).



Εικόνα 5 :Απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης S των κορωνοϊών (Satarker and Namproothiri, 2020).

2.2.4. Νουκλεοκαψίδιο του ιού

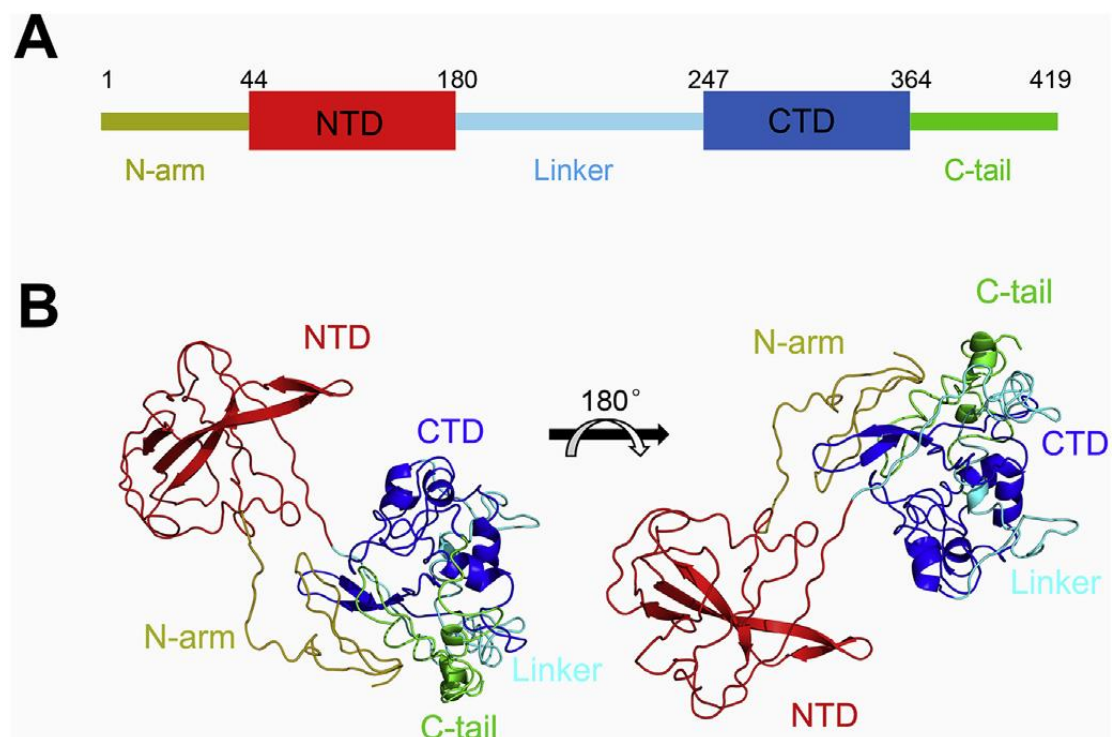
Η πρωτεΐνη N του νουκλεοκαψιδίου είναι μία φωσφοπρωτεΐνη με μέγεθος 43-50 kDa και 422 αμινοξέα, η οποία δεσμεύει το γονιδιωματικό RNA και βρίσκεται μέσα στον φάκελο (Fig, et al., 2020) .

Οι πρώτες έρευνες για την πρωτεΐνη N έγιναν το 1990, οι οποίες παρουσίαζαν το συγκεκριμένο μοντέλο: η πρωτεΐνη αυτή χωρίζεται σε τρεις τομείς και μεταξύ τους διαχωρίζονται από δύο αρκετά μεταβλητές περιοχές. Το μεγαλύτερο μέρος καταλαμβάνουν οι τομείς 1 και 2, οι οποίοι είναι άφθονοι σε αργινίνες και λυσίνες, γεγονός που το συναντάμε πολύ συχνά σε πρωτεΐνες οι οποίες είναι συνδεδεμένες με ιικό RNA. Από την άλλη, ο τομέας 3, θεωρείται ότι αποτελεί έναν ξεχωριστό τομέα, είναι ένα καρβοξυτελικό άκρο αρκετά κοντό με αρνητικό φορτίο, το οποίο είναι αποτέλεσμα της περίσσειας όξινων έναντι βασικών υπολειμμάτων αμινοξέων. Οι τομείς αυτοί δεν είναι ξεκάθαρα διαχωρισμένοι μεταξύ τους με μία εξαίρεση η οποία αντιστοιχεί σε μια έκταση 30 αμινοξέων (στην διασταύρωση των 1 και 2 περιοχών), η οποία δομείται από αρκετά αρωματικά υδρόφοβα μόρια. Η σταθερότητα του νουκλεοκαψιδίου - τουλάχιστον ένα σημαντικό μέρος, αν όχι εξ ολοκλήρου - μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης N-N μονομερών (Masters, 2006 ; Hasöksüz, Kiliç and Saraç, 2020).

Η πανδημία του 2003 από τον ιό SARS-CoV υπήρξε η αφορμή για περαιτέρω ανάλυση της πρωτεΐνης N του νουκλεοκαψιδίου των κορωνοϊών. Η πρωτεΐνη αυτή φάνηκε να δημιουργεί ένα διμερές, το οποίο είναι το σημαντικότερο δομικό του στοιχείο και πρόκειται για το CTD άκρο, το οποίο δομείται από 248-365 αμινοξέα (Chang, et al., 2009). Το NTD άκρο, δομείται από 45-181 αμινοξέα και έχει την ικανότητα να συνδέεται στο ιικό RNA (Εικόνα 6). Οι δυο αυτές περιοχές του μορίου είναι ανεξάρτητες και δεν έρχονται σε καμία επαφή η μία με την άλλη, παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί πως και οι δύο έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν RNA. Ανάμεσα σε αυτές τις δύο δομές υπάρχουν τρεις άλλες δομές γνωστές ως εγγενώς διαταραγμένες περιοχές (intrinsically disordered regions, IDRs). Έτσι, το αρχικό μοντέλο των τριών τομέων αντικαταστάθηκε από το συγκεκριμένο μοντέλο (Chang, et al., 2014).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης N είναι η σύνδεση με το ιικό RNA. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη N στον SARS-CoV ρυθμίζει τον κυτταρικό μηχανισμό του ξενιστή και μπορεί να δρα ρυθμιστικά κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του ιού (Chang, et al., 2020).

Στον SARS-CoV-2 η πρωτεΐνη N έχει γενετική ομοιότητα περίπου 90% με αυτήν του SARS-CoV (Zeng, et al., 2020). Η πρωτεΐνη του νουκλεοκαπιδίου έχει αποδειχτεί ότι συντελεί σε διάφορες διεργασίες απαραίτητες για την πλήρη λειτουργία και τον πολλαπλασιασμό του ιού και είναι ένα σημαντικό συστατικό αμέσως μετά την πρωτεΐνη της ακίδας. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες δίνουν μαζί ένα ελπιδοφόρο μοντέλο μελέτης για την θεραπευτική αντιμετώπιση του ιού (Satarker and Namproothi, 2020).



Εικόνα 6 : Απεικόνιση της δομής της πρωτεΐνης N του ιού SARS-CoV-2 (Zeng, et al., 2020).

2.3. Γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2

Οι ιοί CoVs αποτελούνται από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα (26-32 kb) ανάμεσα σε όλες τις οικογένειες ιών οι οποίες έχουν γενετικό υλικό RNA. Ο ιός SARS-CoV-2 είναι ένας μονόκλωνος RNA ιός, θετικής πολικότητας, περίπου 30kb. Έχει πραγματοποιηθεί ανάλυση του γονιδιώματος του ιού που ανιχνεύτηκε σε κατοίκους στην Wuhan που έδειξε ότι έχει πολύ μεγάλο μέγεθος και δεν περιέχει το γονίδιο αιμοσυγκολλητίνης-εστεράσης. Το γονιδίωμά του έχει αρκετή ομοιότητα με τον ανθρώπινο SARS-CoV σε ποσοστό 79-82% (T. J. Chang, et al., 2020).

Αρχικά, δομείται από μία αλληλουχία που αποτελείται από δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs), τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του RNA, αλλά και άλλα είδη γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν μη δομικές πρωτεΐνες (non-structural proteins, nsps) (Εικόνα 7). Πρόκειται για το ORF1ab (ORF1a και ORF1b), το οποίο έχει έναν πολύ κρίσιμο ρόλο στην γονιδιακή έκφραση του ιού κατά την αντιγραφή του, αλλά και στην κωδικοποίηση πολυπρωτεϊνών ρεπλικάσης, οι οποίες είναι σημαντικές για την αντιγραφή και μεταγραφή του RNA (Yin, 2020).

Τα ORFs 1a και 1b εκφράζουν αρχικά δύο μεγάλες πολυπρωτεΐνες ρεπλικάσης (PP1a και PP1ab), οι οποίες διασπώνται περαιτέρω από πρωτεάσες για να παράγουν τις μη δομικές πρωτεΐνες. Η πρώτη πρωτεάση που κωδικοποιείται από το ORF1ab είναι η πρωτεάση κυστεΐνης τύπου παπαΐνης (papain-like protease, PL^{pro}, ns3), η οποία είναι επίσης ένα σημαντικό σύμπλεγμα αντιγραφής-μεταγραφής. Η PL^{pro} προκαλεί την διάσπαση των nsps 1-3 και ταυτόχρονα μπλοκάρει την απόκριση του ανοσοποιητικού του ξενιστή και αυτό γίνεται με την παραγωγή κυτοκινών (Zella, et al., 2021).

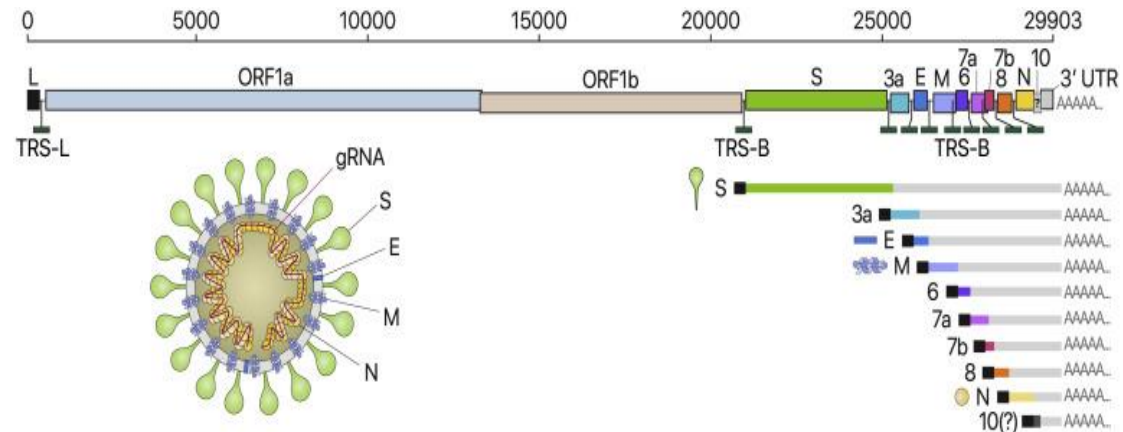
Άλλες μη δομικές πρωτεΐνες με σημαντικό ρόλο είναι η 3CL^{pro} (3-chymotrypsin like protease, ns5) απαραίτητη για την αντιγραφή του RNA, η ns6 και η ns4, οι οποίες μαζί με την ns3 έχουν την δυνατότητα να δημιουργήσουν κυστίδια διπλής μεμβράνης (double-membrane vesicle, DMV) (Zella, et al., 2021).

Η αντιγραφή του RNA του συγκεκριμένου ιού είναι μία μοναδική διαδικασία και πραγματοποιείται με την συμμετοχή δύο RNA πολυμερασών (RNAPol) (Yin, 2020). Η μία πολυμεράση είναι εξαρτώμενη από τον εκκινητή-μη δομική πρωτεΐνη 12 (ns12), που έχει ρόλο RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RNA-dependent RNA Polymerase, RdRP) και η άλλη είναι η ns8, που έχει την ικανότητα να προκαλεί de

νονο έναρξη της αντιγραφής χωρίς εκκινήτη, δηλαδή έχει την ικανότητα πριμάσης (Kim, et al., 2020 ; Guo, et al., 2020). Η nsp7 και nsp8 μαζί έχουν την ικανότητα να προκαλούν de novo αντιγραφή αλλά και να επεκτείνουν τους εκκινήτες (Yin, 2020).

Πιο συγκεκριμένα, το γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2 έχει συνολικά 14 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs), τα οποία με την σειρά τους κωδικοποιούν 27 πρωτεΐνες. Το πιο μεγάλο από τα ORFs αναφέρεται στο 5' άκρο και κωδικοποιεί 15 μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμβάλλουν στην αντιγραφή. Από την άλλη, το 3' άκρο κωδικοποιεί δομικές και βοηθητικές πρωτεΐνες (Jain, et al., 2021). Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού είναι η S, M, E και N που αναφέρθηκαν παραπάνω και εμπλέκονται σε διάφορες ιικές διεργασίες.

Από όσα έχουν δείξει μέχρι στιγμής οι μελέτες, η ORF3b είναι μια πρωτοποριακή πρωτεΐνη που πιθανότατα να παίζει πολύ βασικό ρόλο στην παθογένεια του ιού, ενώ από την άλλη η ORF8 φαίνεται να είναι άγνωστης σημασίας αλλά και λειτουργικότητας (Abduljalil, 2020 ; Guo, et al., 2020).



Εικόνα 7 : Απεικόνιση του γονιδιώματος του ιού SARS-CoV-2 (Kim, et al., 2020).

3. Κύκλος ζωής , παθογένεια και μετάδοση του ιού SARS-CoV-2

Ο ιός SARS-CoV-2 είναι ένας ζωντανός οργανισμός που έχει τον δικό του κύκλο ζωής. Καθώς ο κύκλος αυτός εξελίσσεται και προχωράει, ο ιός εγκαθίσταται πλήρως στον ξενιστή και αρχίζει να προκαλεί συμπτώματα στον ασθενή που έχει μολυνθεί. Επίσης, καθώς πρόκειται για εύκολα μεταδιδόμενο ιό, την ίδια στιγμή πραγματοποιείται και η μετάδοσή του.

3.1 . Κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2

Ο κύκλος ζωής του SARS-CoV-2 (Εικόνα 8) περιλαμβάνει την προσκόλληση και είσοδό του σε ένα κύτταρο, την εγκατάστασή του, την έκφρασή του και στην συνέχεια την δημιουργία «απογόνων», δηλαδή τον πολλαπλασιασμό του. Μετά από αυτά δύναται να πραγματοποιηθεί και η έξοδος του ιού από το κύτταρο.

Πιο αναλυτικά ο κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2 μπορεί να χωριστεί σε εξής 5 βήματα :

Βήμα 1^ο : Η πρωτεΐνη S αποτελείται από τρία μονομερή S πολυπεπίδια όπου το κάθε μονομερές περιλαμβάνει τις υπομονάδες S1 και S2 με πολλές λειτουργικές περιοχές. Ο ιός αυτός μέσω της περιοχής δέσμευσης υποδοχέα (RBD) της υπομονάδας S1 δεσμεύει τον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή, ο οποίος είναι το ένζυμο ACE2. Το ένζυμο αυτό εκφράζεται κατά κύριο λόγο από τα επιθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων, του λεπτού εντέρου αλλά και των νεφρών, της καρδιάς και άλλων ιστών (Scialo, et al., 2020). Σε μια πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε πως η πρωτεΐνη S μπορεί να συνδέεται και με νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs) και πιθανότατα αυτός να είναι και ο λόγος της παθογένεσης πολλαπλών οργάνων κατά την μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 (Yadav, et al., 2021 ; Peng, et al., 2021).

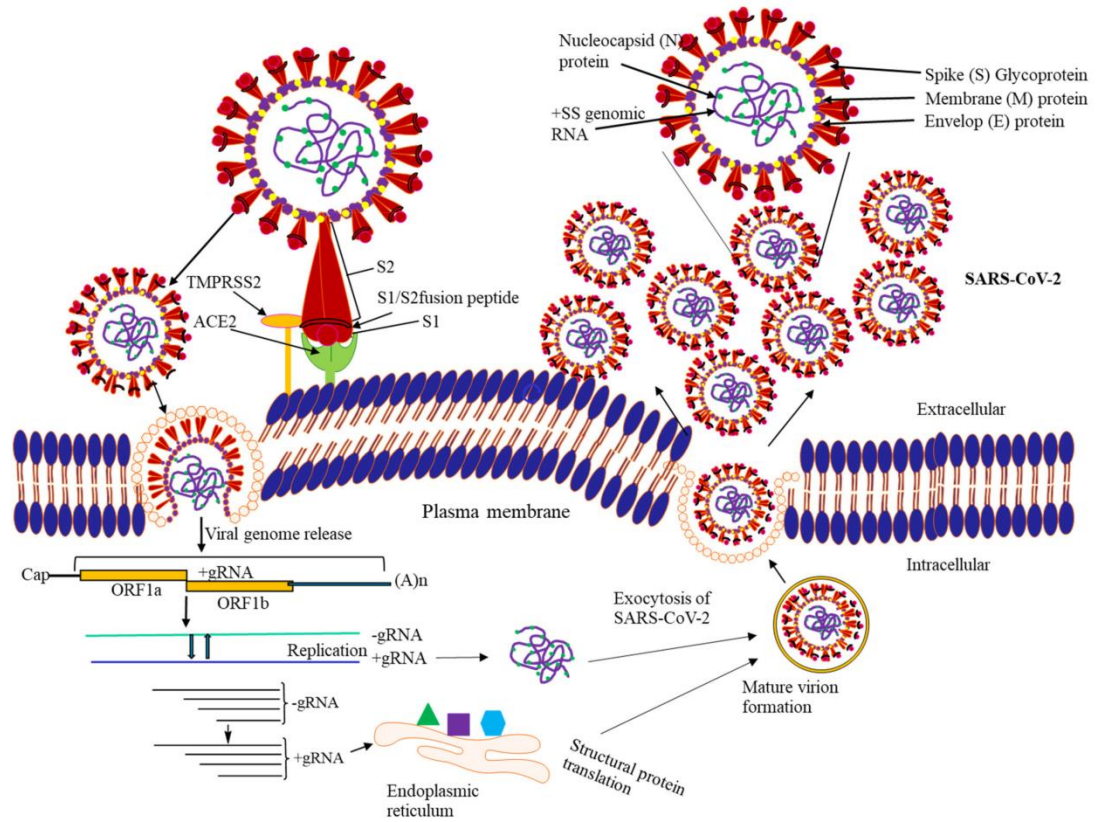
Αφού πραγματοποιηθεί η δέσμευση της πρωτεΐνης S του ιού και του υποδοχέα ACE2 του ξενιστή, η ακίδα του ιού διασπάται στη θέση S1/S2, μία θέση που και η ίδια υποβάλλεται σε διάσπαση από διάφορες πρωτεάσες. Επίσης, η πρωτεΐνη S είναι ένας βασικός στόχος για την εξουδετέρωση των αντισωμάτων του ιού και οποιαδήποτε αλλαγή σ αυτή την πρωτεΐνη μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή στην παθογένεση (Yadav, et al., 2021).

Βήμα 2^ο: Μετά τη σύνδεση του ιού με τον ξενιστή ακολουθεί η απελευθέρωση της πρωτεΐνης N του νουκλεοκαψιδίου μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Η διαδικασία αυτή επικουρείται από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα της τύπου II διαμεμβρανικής πρωτεάσης σερίνης 2 (TMPRSS2) (Sanyal, 2020 ; Yadav, et al., 2021).

Βήμα 3^ο: Αμέσως μετά προχωράει ο σχηματισμός συμπλέγματος αντιγραφής-μεταγραφής (Replication and Transcription Complex, RTC). Ως θετικής πολικότητας ιός, καθώς γίνεται η απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου, το ssRNA (positive-strand RNA viruses) χρησιμοποιείται σαν mRNA για το ORF1a που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη PP1a (440-500 kDa) και για το ORF1b, το οποίο κωδικοποιεί το PP1ab (740-810 kDa). Παρόλη την διαφορά μεγέθους το PP1a είναι περίπου 1,2 – 2,2 φορές πιο «εκφρασμένο». Στη συνέχεια αυτές οι δύο πρωτεΐνες πρωτεολύονται και αποδίδουν 16 nsps και μαζί δημιουργούν το RTC για την σύνθεση ενός RNA ιού (Whittaker, et al., 2021).

Βήμα 4^ο: Με τον σχηματισμό του RTC ξεκινάει και η μοριακή διαδικασία για την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων RNA του ιού (Whittaker, et al., 2021).

Βήμα 5^ο: Το τελικό βήμα αυτής της διαδικασίας αποτελεί η μοριακή συναρμολόγηση και απελευθέρωση του ιού SARS-CoV-2. Η σύνθεση των περισσότερων από τις δομικές και βοηθητικές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν σχέση με την μεμβράνη του ιού όπως S, M και E, συντίθεται από ριβοσώματα τα οποία συνδέονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ταυτόχρονα, οι δομικές πρωτεΐνες δέχονται τροποποίηση ακόμη και μετά από την μετάφρασή τους και έτσι διαμορφώνονται οι λειτουργίες τους. Από την άλλη, άλλες πρωτεΐνες όπως η N εκφράζονται από ελεύθερα ριβοσώματα του ξενιστή. Αφού πραγματοποιηθεί η πλήρης συναρμολόγηση του ιού, τότε αυτός προσκολλάται στο τοίχωμα και μέσω εκκριτικών οδών πραγματοποιεί την έξοδό του στην κυκλοφορία του πλάσματος και από εκεί σε όλα τα όργανα του σώματος (Yadav, et al., 2021).



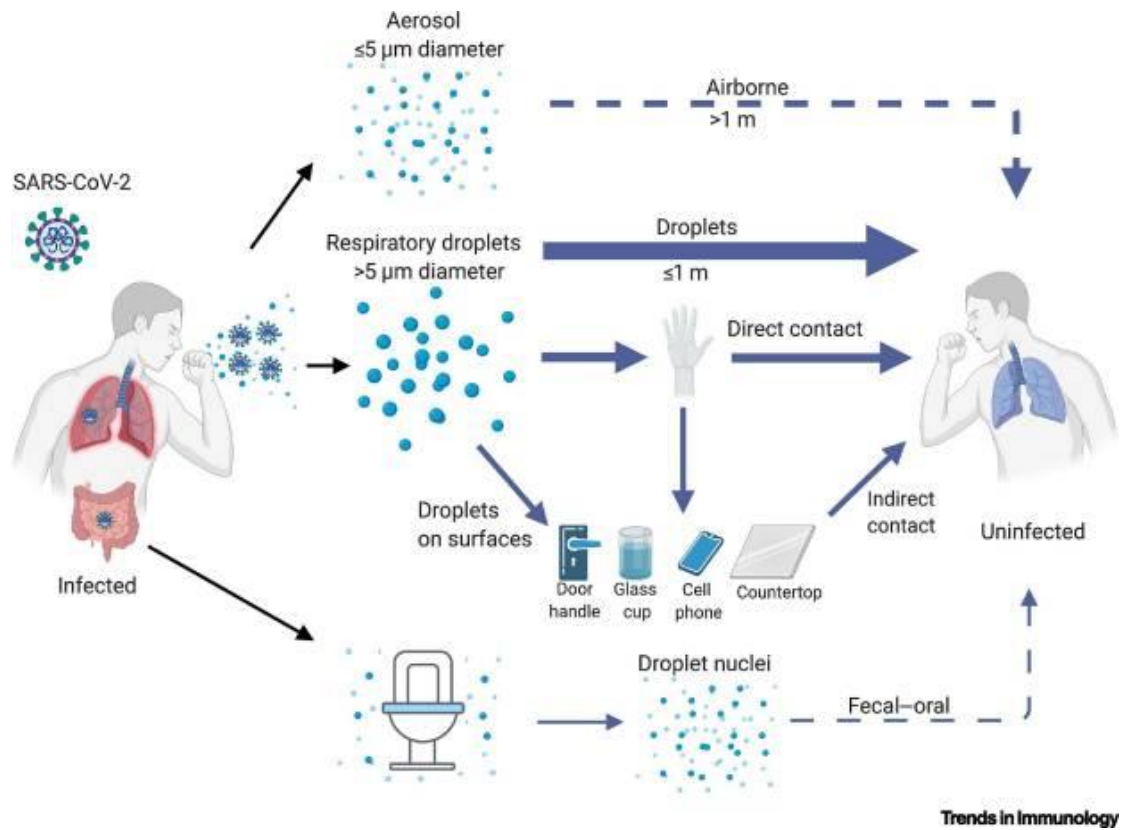
Εικόνα 8 : Ο κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2 (Yadav, et al., 2021).

3.2. Παθογένεια, μετάδοση, κλινική συμπτωματολογία

Κάθε ένας από τους κορωνοϊούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Σε ό,τι αφορά τον SARS-CoV-2 προκαλεί νόσο που προσβάλλει αδιαμφισβήτητα όλες τις ηλικιακές ομάδες (από 4 εβδομάδων μέχρι >90 ετών) με μεγαλύτερη βαρύτητα σε άτομα με υποκείμενα νοσήματα, με ιστορικό πρόσφατου χειρουργείου, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους. Ωστόσο, καταγράφονται περιπτώσεις ασθενών χωρίς υποκείμενη νόσο, οι οποίοι νόσησαν, νοσηλεύτηκαν και κάποιοι από αυτούς απεβίωσαν. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση περιλαμβάνονται όλες οι ηλικιακές ομάδες (Machhi, et al., 2020).

Η μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει με εξαιρετικά άμεσο τρόπο, δηλαδή ακόμη και μέσα σε ένα δευτερόλεπτο από ένα μολυσμένο άτομο σε ένα άλλο. Ένα ιδιαίτερα επικίνδυνο περιβάλλον στο οποίο έχει παρατηρηθεί μεγάλη διασπορά είναι το οικογενειακό, όπου η μετάδοση πραγματοποιείται μεταξύ των μελών της οικογένειας (Harrison, et al., 2020). Η κύρια οδός μετάδοσης του ιού SARS-CoV-2 είναι μέσω μολυσμένων σταγονιδίων (>5μm) που εκκρίνονται από το αναπνευστικό σύστημα ανθρώπων που έχουν μολυνθεί. Η μετάδοση αυτή των σταγονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά το φτέρνισμα, το βήχα ή απλώς με την ομιλία όταν είναι εκτεθειμένο το στόμα και η μύτη. Επιπρόσθετα, τα μολυσμένα σταγονίδια ($\leq 5\mu\text{m}$) μπορούν να παραμείνουν στον ατμοσφαιρικό αέρα του χώρου και να μολυνθεί κάποιος αερογενώς χωρίς να έχει έρθει σε άμεση επαφή με νοσούντα (Harrison, et al., 2020). Αναλυτικότερα, οι τρόποι μετάδοσης του ιού είναι (Εικόνα 9):

- A. Άμεση σωματική επαφή με μολυσμένα άτομα
- B. Δυνητικά, μετάδοση με επαφή με μολυσμένες επιφάνειες ή αντικείμενα καθώς ο ιός παραμένει πάνω σε πλαστικό, ανοξείδωτο χάλυβα έως και 72 ώρες, σε χαλκό > 4 ώρες και σε χαρτοκιβώτιο μέχρι 24 ώρες. Βέβαια δεν είναι ξεκάθαρο ακόμη αν η παρουσία του ιού στην κάθε επιφάνεια δηλώνει ταυτόχρονα και ενεργή μολυσματικότητα.
- C. Επαφή των μολυσμένων χεριών με το στόμα, τα μάτια και τη μύτη
- D. Σπάνια είναι η μετάδοση με επαφή ή οσμή περιττωμάτων. Ο έλεγχος δείγματος κοπράνων μολυσμένων ατόμων, έχει δείξει παρουσία του ιού στα κόπρανα και πιθανότητα μετάδοσης μέσω αυτών (Cevik, et al., 2020).



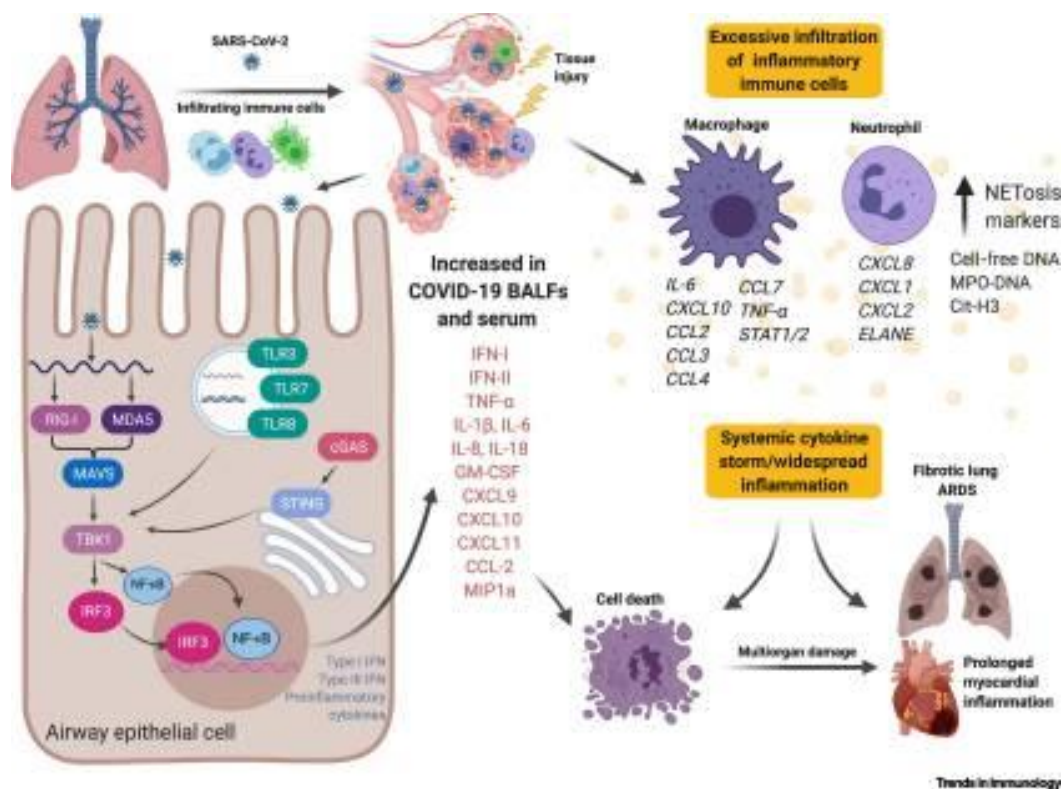
Εικόνα 9 : Ενδεικτικοί τρόποι μετάδοσης της νόσου COVID-19 (Harrison, et al., 2020).

Αν και υπάρχουν κάποια κενά σε ό,τι αφορά την παθογένεια του ιού, υπάρχουν εκτενή δεδομένα, ώστε να μπορούμε να γνωρίζουμε την παθογένεια της νόσου COVID-19.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, θεωρείται ότι τα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα είναι η βασική αρχική θέση της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2 και αυτό συμβαίνει εξαιτίας της έκφρασης υψηλών επιπέδων ACE2 στα κύτταρα αυτά. Ο ιός μολύνει και το κατώτερο αναπνευστικό και αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην διασπορά ιών λόγω αναρρόφησης στους πνεύμονες. Καθώς ο ιός φτάνει στο πνευμονικό παρέγχυμα, μολύνει κύτταρα τύπου Ιτου πνεύμονα και καθώς αναπαράγεται εξαιρετικά γρήγορα, τα μακροφάγα των πνευμόνων δεν προλαβαίνουν να ανταποκριθούν με συνέπεια να δημιουργείται μια εκτεταμένη φλεγμονή και κατ' επέκταση αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα. Αυτό οδηγεί στην συσσώρευση υγρών στις κυψελίδες, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται προσέλωση μονοκυττάρων, μακροφάγων και ουδετεροφίλων στην περιοχή (Εικόνα 10). Καθώς η ACE2 δεσμεύεται στον ιό SARS-CoV-2, απενεργοποιείται και εμποδίζεται η μετατροπή της προφλεγμονώδους αγγειοτενσίνης

Η σε αντιφλεγμονώδη αγγειοτενσίνη 1-7 και έτσι επιδεινώνεται η ήδη υπάρχουσα φλεγμονή. Αυτή η πλήρωση των κυψελίδων εμποδίζει τους πνεύμονες να «πληρωθούν» με αέρα, με συνέπεια το αίσθημα της δύσπνοιας και την πνευμονία, αλλά και τελικά τη μη λειτουργία των πνευμόνων και την αναπνευστική ανεπάρκεια (Woodby, et al., 2021).

Καθώς οι πνεύμονες δυσλειτουργούν, ο ιός εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και έτσι διασπείρεται και σε άλλα όργανα του σώματος, τα οποία εκφράζουν την ACE2 και σε αυτά συμπεριλαμβάνεται η καρδιά, οι νεφροί και ο γαστρεντερικός σωλήνας (Woodby, et al., 2021). Επιπρόσθετα, με την είσοδο του ιού στην κυκλοφορία, αυξάνονται οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές που κυκλοφορούν, οι οποίοι ενεργοποιούν την πήξη του αίματος και έτσι σχηματίζονται οι θρόμβοι (Martines, et al., 2020).



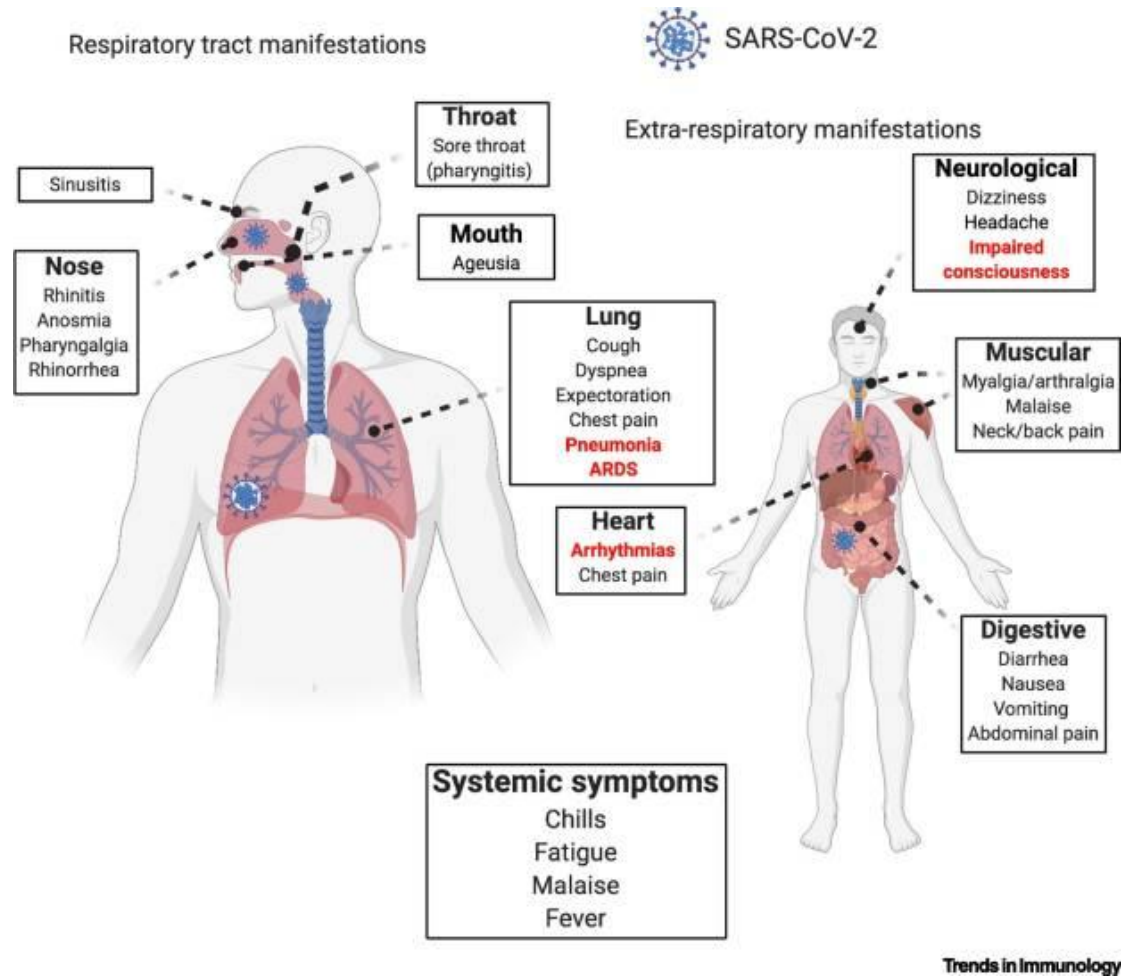
Εικόνα 10 : Απεικόνιση της παθογένειας του ιού SARS-CoV-2 μετά την προσβολή του πνεύμονα (Harrison, et al., 2020).

Ο βασικός αριθμός αναπαραγωγής (Reproduction number, R_0) κυμαίνεται με βάση την παρακολούθηση περιπτώσεων από την αρχή της πανδημίας, τα μέτρα πρόληψης και τη διασπορά του ιού στις διαφορετικές περιοχές, όπου υπολογίζεται. Ο χρόνος διπλασιασμού του ιού αναφέρεται περίπου στις 5 ημέρες. Έτσι, η περίοδος επώασης του ιού είναι περίπου 5-6 ημέρες, σε αντίθεση με νόσο από άλλο ιό SARS-CoV που θέλει 2-11 ημέρες για να αναπτυχθεί πλήρως (Setiawan, et al., 2020).

Σε ό,τι αφορά τη συμπτωματολογία, υπάρχουν πολλές καταγεγραμμένες περιπτώσεις στις οποίες ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός, δεν έχει κανένα σύμπτωμα. Από την άλλη, ο ιός SARS-CoV-2 προκαλεί σοβαρά συμπτώματα τα οποία μοιάζουν με αυτά της γρίπης, τα οποία όμως μπορούν να εξελιχθούν σε οξεία αναπνευστική δυσχέρεια (ARDS), πνευμονία, νεφρική ανεπάρκεια και θάνατο. Τα πιο κοινά συμπτώματα (Εικόνα 11) είναι πυρετός, βήχας και δύσπνοια τα οποία εμφανίζονται κατά 83%, 82% και 31% αντίστοιχα, σε ανθρώπους που έχουν νοσήσει από την νόσο COVID-19 (Harrison, et al., 2020).

Όσο η πανδημία εξελίσσεται, διαπιστώνεται ότι η λοίμωξη COVID-19 μπορεί να προσβάλει κυρίως το αναπνευστικό, αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις και το γαστρεντερικό σύστημα, ωστόσο υπάρχει πιθανότητα να έχει μακροχρόνιες επιπτώσεις στην καρδιά, όπως φλεγμονή του μυοκαρδίου (Εικόνα 11) (Harrison, et al., 2020). Επιπλέον, σε ασθενείς που έχουν νοσήσει από COVID-19 έχουν παρατηρηθεί σοβαρές επιπλοκές όπως αναπνευστική ανεπάρκεια, κάκωση του μυοκαρδίου, αρρυθμίες, εγκεφαλικό επεισόδιο, νεφρική ανεπάρκεια, διαταραχές πήκτικότητας, δευτερογενείς βακτηριακές λοιμώξεις και γαστρεντερική νόσο (Woodby, et al., 2021).

Όταν πρωτοεμφανίστηκε η νόσος COVID-19, ως κύρια αιτία θανάτου θεωρούνταν το ARDS, το οποίο οφείλεται στην υπερβολική αλλά και παρατεταμένη παραγωγή κυτοκινών, η οποία προκαλεί βλάβη στους ιστούς. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι στις αιτίες θανάτου συμπεριλαμβάνονται εκτός της αναπνευστικής ανεπάρκειας, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η βλάβη του μυοκαρδίου, οι αρρυθμίες, η διαταραχή της πήκτικότητας, η νεφρική ανεπάρκεια και οι δευτερογενείς λοιμώξεις. Συμπεραίνεται, πως στην πραγματικότητα, η θνησιμότητα και η νοσηρότητα της ασθένειας αυτής σχετίζονται κατά κύριο λόγο με την ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που χαρακτηρίζεται από απώλεια ανοσοκυττάρων, όπως των Β και Τ κυττάρων, κυρίως στον σπλήνα. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο οι ηλικιωμένοι επηρεάζονται περισσότερο και βαρύτερα από την λοίμωξη COVID-19 (Woodby, et al., 2021).



Εικόνα 11 : Κλινικά συμπτώματα της νόσου COVID-19 (Harrison, et al., 2020).

4. Επιδημιολογία του ιού SARS-CoV-2

Όπως συμβαίνει με όλους τους ιούς έτσι και ο SARS-CoV-2 με την πάροδο του χρόνου αλλάζει, προσαρμόζεται και καταφέρνει να εξελιχθεί και να μεταλλαχθεί. Ωστόσο, ο ιός SARS-CoV-2 είναι ένας RNA ιός, ο οποίος αν και μεταδίδεται και μεταλλάσσεται επιτυχώς ώστε να επιβιώνει, ο ρυθμός μετάλλαξής του είναι σχετικά πιο αργός σε σχέση με άλλους RNA ιούς (Zou, et al., 2022). Η πλειοψηφία των αλλαγών αυτών μπορεί να μην επηρεάζουν τις ιδιότητες του ιού. Παρόλα αυτά, ορισμένα χαρακτηριστικά του ιού επηρεάζονται, όπως η δυνατότητα και η ταχύτητα μετάδοσης και εξάπλωσής του, η σοβαρότητα της νόσου που προκαλεί, η αποτελεσματικότητα των εμβολίων, τα θεραπευτικά φάρμακα αλλά και γενικότερα η επίδραση αυτών των αλλαγών στην εξασφάλιση της δημόσιας υγείας.

Η πρώτη εμφάνιση κάποιων παραλλαγών (variants) του ιού έγινε στα τέλη του 2020. Οι αλλαγές αυτές ήταν η αφορμή της ταξινόμησης των αλλαγών αυτών ανάλογα με την σοβαρότητά τους και αν αξίζει ή όχι η περαιτέρω μελέτη και παρακολούθησή τους. Οι κυριότερες ομάδες ήταν αυτές των παραλλαγών ενδιαφέροντος (Variants of Interest, VOIs) και των παραλλαγών που εγείρουν ανησυχία (Variants of Concern, VOCs). Με αυτό τον τρόπο δίνεται προτεραιότητα στις αλλαγές που αξίζει να μελετηθούν, ώστε να γίνει και η αντίστοιχη ενημέρωση για την εξέλιξη της νόσου COVID-19. Έκτοτε, ο Π.Ο.Υ παρακολουθώντας τις νέες παραλλαγές του ιού, ενημερώνει τις χώρες και την παγκόσμια κοινότητα για τις ταξινομήσεις του ιού, για την γεωγραφική κατανομή των VOCs και τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους, καθώς και για οποιοσδήποτε αλλαγές χρειαστεί να γίνουν για την πρόληψη της εξάπλωσής τους (<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>).

Μέχρι στιγμής, τα μέτρα δημοσίας υγείας και κοινωνικής υγείας (public health and social measures, PHSM), συμπεριλαμβανομένων των μέτρων πρόληψης και ελέγχου λοιμώξεων (infection prevention and control, IPC) που έχουν εφαρμοστεί παγκοσμίως έχουν αποδειχθεί ικανά να αντιμετωπίσουν εξίσου αποτελεσματικά όλες τις αλλαγές που έχουν συμβεί στον ιό μέχρι σήμερα και να περιορίσουν τα κρούσματα, τις νοσηλείες αλλά και τους θανάτους.

Η ονοματολογία των ποικιλιών του ιού ήταν ένα θέμα που απασχόλησε ιδιαίτερα τον Π.Ο.Υ, που σε συνεργασία με διάφορους ερευνητές έχουν συστήσει ως ιδανική την χρήση γραμμάτων του Ελληνικού αλφαβήτου, δηλαδή ονόματα όπως Alpha, Beta, Gamma, Delta, κ.τ.λ., ώστε να είναι ευκολότερα, τόσο για το

επιστημονικό, όσο και για το ευρύ κοινό. Όταν χρησιμοποιείται αυτή η ονοματολογία και αναφερόμαστε στην πρώτη γονιδιωματική αλληλουχία του ιού SARS-CoV-2 που εντοπίστηκε στα τέλη του 2019 θα πρέπει να αναφέρεται ως «virusindex» (ιός-δείκτης) (<https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>). Δεδομένης της κατάστασης και της συνεχούς εξέλιξης του ιού SARS-CoV-2, οι παραλλαγές του μπορούν να ταξινομηθούν στις κατηγορίες VOCs, VOIs και VUMs (Variation under monitoring).

Για να χαρακτηριστεί μία παραλλαγή του ιού SARS-CoV-2 ως VOC, θα πρέπει να παρουσιάζει ένα ή περισσότερα από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά, που επηρεάζουν τη δημόσια υγεία:

- Αύξηση της μεταδοτικότητας ή επιδεινούμενη αλλαγή στην επιδημιολογία της νόσου COVID-19
- Αύξηση της λοιμογόνου ικανότητας του ιού ή αλλαγή στην κλινική εικόνα και πορεία της νόσου
- Μείωση της αποτελεσματικότητας των μέτρων δημόσιας υγείας που έχουν ληφθεί ή των διαθέσιμων θεραπευτικών μέσων και εμβολίων (Choi and Smith, 2021).

Η ποικιλία του ιού που κυκλοφορεί αυτή την στιγμή και ανήκει στην κατηγορία των VOCs είναι η Omicron (B.1.1.529), στην οποία περιλαμβάνονται και οι B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 and BA.5 υποπαραλλαγές. Η νέα αυτή παραλλαγή εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε μία επαρχία της Νότιας Αφρικής στα μέσα Νοεμβρίου 2021 και μέχρι τις 15 Δεκεμβρίου 2021 έχει ήδη εξαπλωθεί σε 77 χώρες και κυρίως στο Ηνωμένο Βασίλειο, Ινδία και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Jung, et al., 2022). Ο πρώτος θάνατος από την παραλλαγή Omicron καταγράφηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο. Σύμφωνα με όσα καταχωρήθηκαν στο GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data), 57 από αυτές τις χώρες μοιράστηκαν στο σύνολο 4992 διαφορετικές αλληλουχίες γονιδιώματος της Omicron. Το Ηνωμένο Βασίλειο είναι αυτό με τις περισσότερες μεταλλάξεις και εμφάνιση διαφορετικών αλληλουχιών της Omicron, οι οποίες αγγίζουν τις 3000 περίπου, ακολουθεί η Νότιος Αφρική, οι ΗΠΑ, η Δανία, η Γερμανία, η Αυστραλία και πολλές άλλες χώρες.

Το πιο ανησυχητικό με την παραλλαγή Omicron είναι ότι η πλειοψηφία των μεταλλάξεων αφορούν την πρωτεΐνη της ακίδας και την περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) που αλληλοεπιδρά με τα ανθρώπινα κύτταρα πριν την είσοδο του ιού σε αυτά, γεγονός που πιθανά ενισχύει την μεταδοτικότητά του (Mistry, et al., 2022).

Παλαιότερες ποικιλίες του ιού που καταγράφηκαν από τον ΠΟΥ και χρονικά εμφανιζόμενες είναι η Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) (Volz, et al., 2021; Mlcochova, et al., 2021).

Υπάρχει μία κατηγορία VOC, η οποία περιλαμβάνει ποικιλίες υπό παρακολούθηση (VOC lineages under monitoring, VOC-LUM). Αυτή η κατηγορία δημιουργήθηκε για να συμπεριλάβει VOCs με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με το αν μπορεί να αποτελούν πρόσθετη απειλή για την παγκόσμια δημόσια υγεία σε σύγκριση με άλλες ποικιλίες του ιού που κυκλοφορούν. Σε περίπτωση που κάποια παραλλαγή διαφέρει στα χαρακτηριστικά σε σχέση με την αρχική της VOC, τότε ο Π.Ο.Υ μπορεί να την αποδώσει με διαφορετική ονομασία. Οι πιο πρόσφατες παραλλαγές έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό άλλες παραλλαγές του ιού SARS-CoV-2, οι οποίες κυκλοφορούσαν την ίδια περίοδο. Έως τον Οκτώβριο του 2021, η παραλλαγή Delta ήταν εκείνη που κυριαρχούσε στο 90% των περιπτώσεων που έχουν υποβληθεί στη GISAID. Ωστόσο, από τον Φεβρουάριο του 2022, η κυρίαρχη μετάλλαξη είναι η Omicron, η οποία αντιπροσωπεύει πάνω από 98% των περιπτώσεων μόλυνσης.

Κάποιες VOCs που ανήκουν πλέον στην κατηγορία VOC-LUM είναι η BA.4, BA.5, BA.2.12.1, BA.2.9.1, BA.2.11 και BA.2.13. Από την άλλη, στην κατηγορία VOI δεν υπάρχουν αυτή την στιγμή κάποιες παραλλαγές, ενώ στο παρελθόν υπήρξαν. Αυτές είναι η Epsilon (B.1.427, B.1.429), Zeta (P.2), Eta (B.1.525), Theta (P.3), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), Lambda (C.37) και Mu (B.1.621).

Μία παραλλαγή η οποία έχει κατηγοριοποιηθεί ως VOC ή VOI και έχει αποδειχθεί ότι δεν αποτελεί πλέον απειλή για την παγκόσμια δημόσια υγεία, μπορεί να χαρακτηριστεί ως «VOC ή VOI που κυκλοφορούσε στο παρελθόν». Παρόλα αυτά, τα κράτη θα πρέπει να συνεχίσουν να παρακολουθούν VOCs και VOIs που κυκλοφορούσαν στο παρελθόν και να τα συγκρίνουν με κάθε τυχόν νέες παραλλαγές. Η αλλαγή της ονομασίας σε «VOC ή VOI που κυκλοφορούσε στο παρελθόν» είναι μια αντανάκλαση της απότομης πτώσης στην κυκλοφορία της παραλλαγής, αλλά αυτό δεν αποκλείει πιθανή επανεμφάνισή της. Τέλος, υπάρχει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός παραλλαγών του ιού SARS-CoV-2, οι οποίες όμως πλέον δεν κυκλοφορούν καθόλου ή κυκλοφορούν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να προκαλούν καμία επίπτωση στην επιδημιολογική κατάσταση. Τέτοιες παραδείγματα είναι η AV.1, AT.1, R.1, B.1.466.2, B.1.1.519, C.36.3, B.1.214.2, B.1.1.523, B.1.619, B.1.620, B.1.630, B.1.1.318, C.1.2, B.1.640 και XD (<https://gisaid.org/hcov19-variants>).

5. Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα

Στα τέλη του 2019 έγινε για πρώτη φορά καταγραφή ασθενούς, ο οποίος νόσησε με κάποιον άγνωστο μέχρι τότε ιό. Η μετάδοση ήταν ραγδαία και εξαπλώθηκε σε όλο τον κόσμο με τον Π.Ο.Υ να κηρύσσει την αρχή μια νέας πανδημίας (<https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>).

Σήμερα αυτός ο ιός μας είναι αρκετά, αν όχι πλήρως γνωστός, τόσο από την καθημερινή ενημέρωση για τις εξελίξεις που τον αφορούν, όσο και από τις επιστημονικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί όλο αυτό το διάστημα. Στόχος των ερευνών είναι η πλήρης κατανόηση της δράσης του ιού και η αποκωδικοποίησή του, με τελικό στόχο την αντιμετώπισή του. Ωστόσο, η εμφάνιση του ιού και η εξαιρετικά ραγδαία, αλλά και εύκολη μετάδοσή του, ανέδειξε την ανάγκη ανάπτυξης εργαστηριακών τεχνικών που να ανιχνεύουν τον ιό σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα..

Όσο η παρουσία του ιού είναι αισθητή, μαθαίνουμε όλο και περισσότερα για τον ιό αυτό, ενώ βασικά ερωτήματα αναδύθηκαν από την έναρξη της πανδημίας όπως:

- Ποια ανθρώπινα κλινικά δείγματα μπορεί να είναι καταλληλότερα για να γίνει η ανίχνευση του ιού;
- Αφού συλλεχθεί το δείγμα, ποια εργαστηριακή μέθοδο θα χρησιμοποιήσουμε ώστε να ανιχνεύσουμε την παρουσία ή μη του ιού και πως μπορούμε να αξιολογήσουμε τα αποτελέσματα σωστά, δεδομένου ότι πρόκειται για μια πρωτοεμφανιζόμενη, νέα παγκόσμια απειλή;

Υπό το πρίσμα των ραγδαίων εξελίξεων, οι επιστήμονες έχουν δώσει απαντήσεις σε πολλά από αυτά τα ερωτήματα και έχουν καταφέρει να αξιολογήσουν με επιτυχία όλες τις πτυχές αυτής της νόσου που ταλαιπώρησε και συνεχίζει να ταλαιπωρεί μέχρι σήμερα ολόκληρη την ανθρωπότητα.

Η πανδημία του SARS-CoV-2 και η αυξημένη μεταδοτικότητα του ιού απαιτούσε άμεση, έγκυρη, αξιόπιστη και αποτελεσματική διαγνωστική μέθοδο, καθώς είναι εξαιρετικής σημασίας για την αποτροπή εξάπλωσης του ιού η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση.

Εντούτοις, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που μπορεί να παρατηρηθούν κατά τη διενέργεια των εργαστηριακών μεθόδων ανίχνευσης του ιού, μπορεί να συμβάλλουν ενεργά στην εξάπλωση του ιού. Επιπρόσθετα, ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί

να οδηγήσουν σε άσκοπη θεραπευτική αγωγή και κόστος της ψυχικής υγείας του ασθενούς (Silva and Pena, 2021).

Σ' αυτό το σημείο θα αναφερθούμε σε ό,τι αφορά το καταλληλότερο κλινικό δείγμα για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, τη διάγνωση περιστατικών με COVID-19 και την επιλογή του καταλληλότερου διαγνωστικού εργαλείου, ώστε να πραγματοποιηθεί η παρακολούθηση της διασποράς του ιού και να αποφευχθεί η μετάδοσή του (Mathuria, et al., 2020).

5.1. Λήψη κλινικού δείγματος για ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 στο εργαστήριο

Σύμφωνα με όσα συστήνει το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), το ιδανικότερο δείγμα για άμεση διάγνωση προέρχεται από το ανώτερο αναπνευστικό και πιο συγκεκριμένα το ρινοφαρυγγικό επίχρισμα (nasopharyngeal swab, NS (Mathuria, et al., 2020).

Στην περίπτωση που η συλλογή ενός ρινοφαρυγγικού δείγματος είναι εξαιρετικά δύσκολη έως και αδύνατη, το CDC συστήνει κάποια εναλλακτικά δείγματα (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>).

Αυτές περιλαμβάνουν:

- δείγμα στοματοφαρυγγικού (oropharyngeal swab, OP)
- δείγμα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (Bronchoalveolar lavage, BAL)
- δείγμα μέσης ρινικής κόγχης (Nasal mid-turbinate, NMT)
- δείγμα ρινικής θαλάμης (Nasal swab, NS)
- δείγμα ρινοφαρυγγικής ή ρινικής πλύσης/αναρρόφησης (Nasal aspirate,

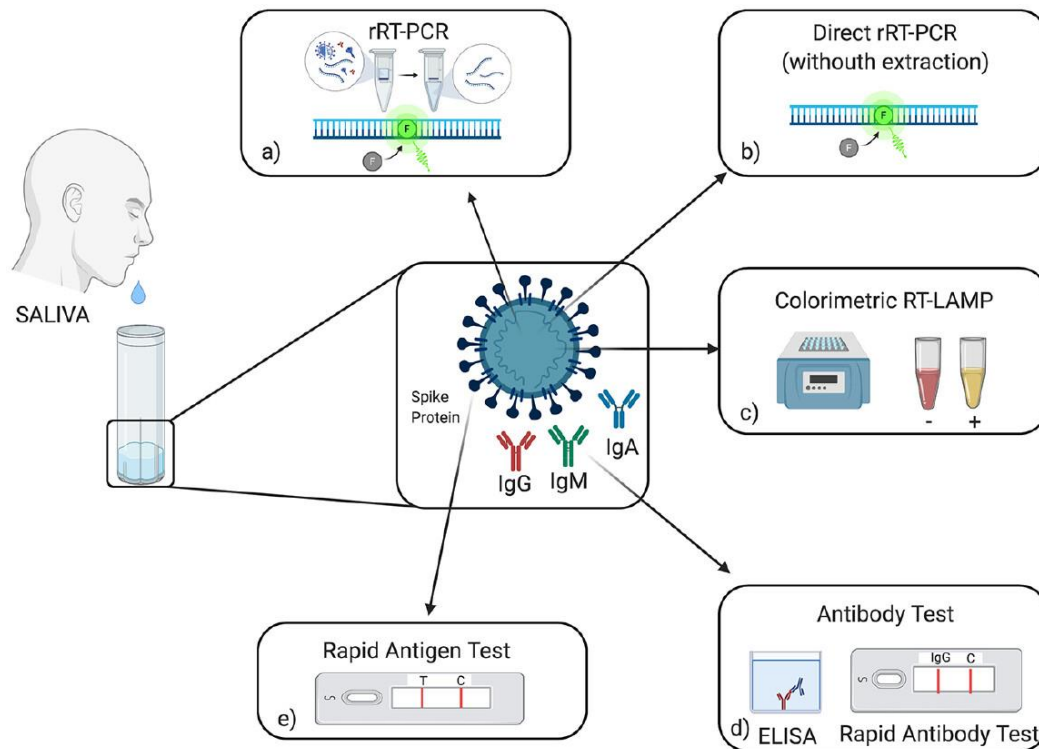
NA) (Mathuria, Yadav and Rajkumar, 2020).

Σε ότι αφορά την χρήση της σιέλου, ως δείγμα διάγνωσης τα πλεονεκτήματα είναι πολλά:

- πολύ εύκολη συλλογή δείγματος χωρίς σχεδόν καμία ενόχληση για τον ασθενή
- δεν είναι απαραίτητη η συλλογή και η διαχείρισή του από κάποιο εξειδικευμένο προσωπικό υγειονομικής περίθαλψης
- ελαχιστοποίηση κινδύνου μόλυνσης του χειριστή (Azzi, et al., 2021).

Επισημαίνεται ότι η σιέλος προερχόμενη από την οπίσθια στοματοφαρυγγική περιοχή («οπίσθια στοματοφαρυγγική σιέλος», posterior oropharyngeal saliva) αποτελεί μέρος των αναπνευστικών εκκρίσεων και θα πρέπει να διαφοροποιείται από τη σιέλο από τη στοματική κοιλότητα, που παράγεται από τους σιελογόνους αδένες, οι οποίοι δεν αποτελούν μέρος του αναπνευστικού συστήματος. Η ανάλυση του δείγματος της σιέλου (Εικόνα 12) γίνεται κυρίως με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time reverse-transcriptase polymerase-chain-reaction, rRT-PCR) ή με ταχεία rRT-PCR, κατά την οποία δεν απαιτείται εκχύλιση του γενετικού υλικού, αλλά απευθείας χρήση του

δείγματος, όπως και με μέθοδο ισοθερμικής αντίδρασης RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (Azzi, et al., 2021).



Εικόνα 12 : Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων διάγνωσης της νόσου COVID-19 με κλινικό δείγμα το σάλιο. Η συλλογή του γίνεται με προσοχή και αποφυγή του βήχα για να μην εξαπλωθούν σταγονίδια. Στην περίπτωση α) έχουμε την μέθοδο rRT-PCR, στη β) έχουμε την άμεση rRT-PCR χωρίς να χρειαστεί εξαγωγή RNA, στη γ) την ισοθερμική μέθοδο RT-LAMP στη δ) την ανίχνευση αντισώματος στο σάλιο είτε με τη μέθοδο ELISA είτε με τη μέθοδο πλευρικής ροής (Rapid test αντισωμάτων) και τέλος στην ε) η ταχεία ανίχνευση αντιγόνου με τη μέθοδο της πλευρικής ροής (Azzi, et al., 2021).

Διάφορες μελέτες προβάλλουν την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2, με κύριο δείγμα τη σίελο. Αυτή η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμη σε χώρους εργασίας, σχολεία, κινηματογράφους, αεροδρόμια αλλά και εμπορικά κέντρα, σε μέρη δηλαδή, όπου συγκεντρώνεται πολύς κόσμος και θα αποτελούσε ένα χρήσιμο εργαλείο, ώστε να ανιχνευτεί άμεσα ένας θετικός ασθενής και να αποφευχθεί η περαιτέρω μετάδοση. Ένα τέτοιο παράδειγμα μεθόδου ανιχνεύει την παρουσία του ιού στη σίελο ανιχνεύοντας την πρωτεΐνη της ακίδας μέσα σε πολύ λίγα λεπτά. Πρόκειται για ένα τεστ γνωστό ως Rapid Salivary Test (RST), το οποίο βασίζεται σε μέθοδο πλευρικής ροής LFA (Lateral Flow assay) (Azzi, et al., 2020). Παρόλα αυτά, στα νοσοκομεία δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα τέτοιου είδους κλινικό δείγμα, παρά μόνο σε συνδυασμό ή επιπρόσθετα με τον βασικό έλεγχο του ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος, για τη μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Η χρήση των διαφορετικών κλινικών δειγμάτων που προορίζονται για έλεγχο μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-2, έχει μελετηθεί, κυρίως στην αρχή της πανδημίας, από διάφορους επιστήμονες προκειμένου να διαπιστωθεί η κλινική σημασία τους. Στοιχεία ότι ο SARS-CoV-2 μπορεί να προσβάλλει το γαστρεντερικό σύστημα και να εισέλθει στην αιματική κυκλοφορία μαζί με το αναπνευστικό σύστημα, επισημαίνουν την πιθανή αξιοποίηση και άλλων, πλην του αναπνευστικού, κλινικών δειγμάτων. Οι Peng et.al., πραγματοποίησαν μία μελέτη, κατά την οποία συλλέχθηκαν δείγματα διαφορετικού τύπου από αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω και διεπίστωσαν τα εξής:

- ο έλεγχος φαρυγγικού δείγματος είχε το μεγαλύτερο, συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη δειγμάτων, ποσοστό θετικότητας, το οποίο άγγιζε το 78%,
- ο έλεγχος σε δείγμα αίματος αλλά και ορθοπρωκτικό επίχρισμα, παρουσίασε 22% θετικότητα έκαστο
- χαμηλότερο ποσοστό θετικότητας, περίπου 11%, βρέθηκε με τον έλεγχο δείγματος ούρων (Peng, et al., 2020).

Μία άλλη μελέτη, που πρόκειται για παρατήρηση μόνο σε έναν ασθενή, έδειξε ότι σε δείγμα, όπως το στοματοφαρυγγικό, ρινοφαρυγγικό αλλά και κοπράνων μπορούσε να ανιχνευτεί ο ιός SARS-CoV-2, ενώ ταυτόχρονα το δείγμα ορού αίματος και ούρων ήταν αρνητικά (Holshue, et al., 2019). Σε μεγαλύτερη μελέτη από την Κίνα, συμπεριλήφθηκαν 41 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα κρούσματα του ιού SARS-CoV-2. Μεταξύ αυτών, μόνο έξι δείγματα ορού αίματος βρέθηκαν θετικά, ενώ δείγματα

ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος βρέθηκαν θετικά και για τους 41 συμμετέχοντες στη μελέτη (Huang, et al., 2019).

Σε μια μετέπειτα δημοσιευμένη αναφορά περιστατικού από την Ιαπωνία, οι ερευνητές τεκμηρίωσαν ότι όταν η κλινική υποψία είναι υψηλή, ο αρνητικός έλεγχος PCR σε επιχρίσματα ανώτερου αναπνευστικού δεν επαρκεί για τον αποκλεισμό της λοίμωξης COVID-19. Σε αυτή την περίπτωση, δείγμα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) θα πρέπει να συστήνεται και να προτιμάται για την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης (Hase, et al., 2020).

Συμπεραίνεται ότι στις περιπτώσεις όπου η κλινική εικόνα παραπέμπει με ισχυρή υποψία σε λοίμωξη COVID-19, το ιδανικότερο είναι η λήψη διαφορετικών ειδών κλινικών δειγμάτων που θα αποσταλούν προς εξέταση για τη διερεύνηση του αιτιολογικού παράγοντα. Αυτό θα βελτιώσει το ποσοστό ανίχνευσης και πιθανά να μειώσει τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα (Mathuria, et al., 2020). Παρομοίως οι Peng, et al. υποστήριξαν τη σημασία του ελέγχου διαφορετικών τύπων δειγμάτων για τη διάγνωση μόλυνσης από τον SARS-CoV-2, την παρακολούθηση της εξέλιξης καθώς και για τον καθορισμό της πρόγνωσης της νόσου (Peng, et al., 2020).

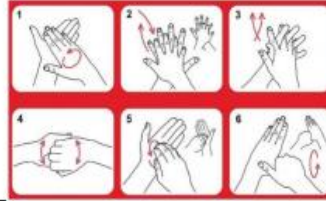
5.2. Συλλογή, συσκευασία και μεταφορά του κλινικού δείγματος που προορίζεται για έλεγχο του ιού SARS-CoV-2

Πριν από κάθε χειρισμό ύποπτου περιστατικού ή συλλογή οποιουδήποτε από τα προαναφερθέντα είδη δειγμάτων, ο επαγγελματίας υγείας, θα πρέπει αυστηρά να ακολουθεί τις οδηγίες πρόληψης και ελέγχου λοιμώξεων του Π.Ο.Υ, που αφορά τη χρήση του ειδικού εξοπλισμού ατομικής προστασίας (μέτρα ατομικής προστασίας, ΜΑΠ), όπως είναι η χειρουργική ποδιά, τα γάντια, τα προστατευτικά γυαλιά και η μάσκα υψηλής προστασίας FFP2 (Da Silva, et al., 2020). Για μεγαλύτερη προστασία αλλά και αποφυγή μόλυνσης κατά την ένδυση ή την απέκδυση του ατομικού εξοπλισμού προστασίας (ΑΕΠ), προτείνονται συγκεκριμένοι τρόποι σειράς εφαρμογής ή αφαίρεσης του ΑΕΠ (Εικόνα 13 και 14, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, η αφαίρεση του ΑΕΠ θα πρέπει να γίνεται σε ασφαλές μέρος και σε απόσταση >2 μέτρα από τον ασθενή, με κινήσεις που δεν θα πρέπει να είναι βιαστικές και θορυβώδεις, για την αποφυγή των επιμολύνσεων (<https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/PPE-donning-doffing.pdf>).

ΣΕΙΡΑ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ(ΕΝΔΥΣΗΣ) ΤΟΥ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Στο χώρο που θα φορεθεί ο Ατομικός Εξοπλισμός Προστασίας (ΑΕΠ) συστήνεται να υπάρχει καθρέπτης και αν είναι εφικτό και άλλο ένα άτομο που θα επιβλέπει τον τρόπο εκτέλεσης της διαδικασίας.

1. Εφαρμόστε **ΥΓΙΕΙΝΗ ΧΕΡΙΩΝ** και ελέγξτε την αρτιότητα του εξοπλισμού.



2. Φορέστε την **αδιάβροχη ρόμπα** με μακριά μανίκια και μανσέτα και δέστε τη πίσω σας. Αν αυτό είναι δύσκολο, δέστε τη στο πλάι (όχι μπροστά σας).



3. Φορέστε τη **μάσκα υψηλής αναπνευστικής προστασίας (FFP2 ή FFP3)** ανάλογα με το είδος της παρέμβασης. Εφαρμόστε σωστά τη μάσκα: καλύψτε όλο σας το πηγούνι και πιέστε το έλασμα πάνω και γύρω από τη μύτη. Οι ελαστικοί ιμάντες τοποθετούνται γύρω από τον αυχένα και τη μεσότητα του οπίσθιου μέρους της κεφαλής αντίστοιχα (Εικ.1-5).



Εφαρμόστε fittest: Εισπνεύστε ώστε να γίνει εσολκή στη μάσκα. Εκπνεύστε για να διαπιστώσετε εάν υπάρχει διαρροή από τα πλαϊνά και το άνω μέρος της μάσκας (Εικ.6).

4. Φορέστε **γυαλιά ή ασπίδα προσώπου**, ώστε να προσαρμόζονται στο πρόσωπο και τους οφθαλμούς. Αν χρησιμοποιείτε γυαλιά θα πρέπει να μην υπάρχει κενό μεταξύ μάσκας και γυαλιών στην περιοχή του ρινικού οστού.



5. Εφαρμόστε **ΥΓΙΕΙΝΗ ΧΕΡΙΩΝ**.

5. Φορέστε **γάντια** (αν είναι εφικτό με μακριά μανσέτα), έτσι ώστε να καλύπτονται τα μανίκια της προστατευτικής ενδυμασίας πάνω από τους καρπούς.



Εικόνα 13 : Σχηματική απεικόνιση της σειράς εφαρμογής ένδυσης του ιατρικού προσωπικού κατά την συλλογή αλλά και επεξεργασία των δειγμάτων για την νόσο COVID-19 (<https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/PPE-donning-doffing.pdf>).

ΣΕΙΡΑ ΑΦΑΙΡΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΤΟΜΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ-Α ΤΡΟΠΟΣ

Στο χώρο που θα αφαιρεθεί ο Ατομικός Εξοπλισμός Προστασίας (ΑΕΠ) προτείνεται να υπάρχει καθρέπτης και αν είναι εφικτό και άλλο ένα άτομο που θα επιβλέπει τον τρόπο εκτέλεσης της διαδικασίας.

1. Αφαιρέστε τα γάντια.



2. Εφαρμόστε ΥΓΙΕΙΝΗ ΧΕΡΙΩΝ και φορέστε ένα νέο ζευγάρι γάντια.



3. Αφαιρέστε τη ρόμπα: Η μπροστινή εξωτερική επιφάνεια της ρόμπας θεωρείται μολυσμένη. Λύστε τα κορδόνια. Ξεκινώντας από την πίσω πλευρά διπλώστε το ρυπαρό μέρος και ακολουθήστε την τεχνική του ξεφλουδίσματος. Κατεβάστε τη ρόμπα με αργές κινήσεις, τυλίγοντας σταδιακά και φέρνοντας την εσωτερική επιφάνεια προς τα έξω.



4. Αφαιρέστε τα γάντια και εφαρμόστε ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΧΕΡΙΩΝ.

5. Αφαιρέστε την προστασία των οφθαλμών.
Η πρόσθια επιφάνεια της οφθαλμικής προστασίας θεωρείται μολυσμένη - ΜΗΝ ΤΗΝ ΑΓΓΙΖΕΤΕ.
Για να αφαιρέσετε κρατείστε από τους βραχίονες των γυαλιών ή το κορδόνι των γυλιών ή της ασπίδας προσώπου.



6. Εφαρμόστε ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΧΕΡΙΩΝ.

7. Αφαιρέστε ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ τη μάσκα υψηλής αναπνευστικής προστασίας.
Η πρόσθια επιφάνεια της μάσκας θεωρείται μολυσμένη –ΜΗΝ ΤΗΝ ΑΓΓΙΖΕΤΕ. Πιάστε μόνο τους ιμάντες στο πίσω μέρος της κεφαλής: πρώτα τον κάτω ιμάντα και μετά τον επάνω. Αφού απελευθερωθεί το πίσω μέρος της κεφαλής από τους ιμάντες σκύψτε ελαφρά μπρος τα μπροστά, προσέχοντας να μην και απορρίψτε τη μάσκα στα μολυσματικά απορρίμματα.



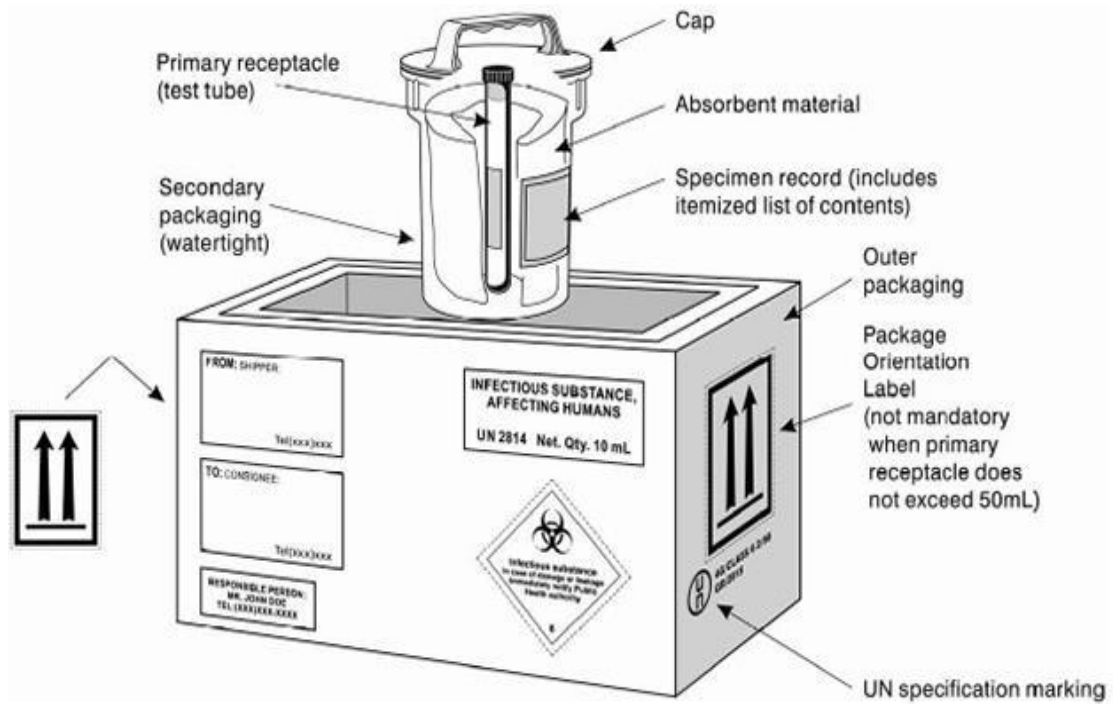
8. Εφαρμόστε ΥΓΙΕΙΝΗ ΤΩΝ ΧΕΡΙΩΝ.

Εικόνα 14 : Σχηματική απεικόνιση της σειρά με την οποία αφαιρείται ο ιατρικός εξοπλισμός (<https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/PPE-donning-doffing.pdf>).

Ανεξάρτητα από τον τύπο συλλογής του δείγματος, όλα πρέπει να τοποθετούνται σε σωληνάριο, το οποίο θα περιέχει ειδικό υλικό μεταφοράς, να μεταφέρονται και να παραδίδονται άμεσα και με ασφάλεια στο εργαστήριο. Το σύστημα της τριπλής συσκευασίας (Εικόνα 15) αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα, ώστε το κάθε φιαλίδιο:

1. να είναι κατάλληλα και σωστά σημασμένο και να καταγράφονται στο έξω μέρος της επιφάνειάς του όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ταυτοποίηση δείγματος-ασθενή
2. να είναι πολύ καλά σφραγισμένο, ώστε να μην υπάρχει καμία πιθανότητα διαρροής του δείγματος
3. να διατηρείται σε εξωτερικό κάλυμμα απορροφητικού υλικού (πρωτεύον δοχείο)
4. να τοποθετείται στη συνέχεια σε μία δεύτερη συσκευασία (δευτερεύον δοχείο)
5. να τοποθετείται τέλος σε ένα προστατευμένο κουτί, στο οποίο μαζί με τα δείγματα να τοποθετούνται και παγωμένες συσκευασίες γέλης.

Όλες οι διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της συσκευασίας, της επισήμανσης και της αποστολής πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του ΠΟΥ (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331337/WHO-COVID-19-laboratoryshipment-2020.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>).



Εικόνα 15 : Παράδειγμα συστήματος τριπλής συσκευασίας για τη συσκευασία και σήμανση «Κατηγορία Α, Λοιμώδης παράγων» (<https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/covid-19-ergastiriaki-diagnosi.pdf>).

5.3. Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινα δείγματα

Η χρήση διαφορετικών εργαστηριακών δοκιμών ποικίλει ανάλογα με τις διαθέσιμες εργαστηριακές εγκαταστάσεις, τους πόρους που έχουν διατεθεί αλλά και την επείγουσα ανάγκη για λήψη αποτελεσμάτων και τον τύπο των διαθέσιμων μεθόδων (Εικόνα 16). Οι επί του παρόντος διαθέσιμες εργαστηριακές μέθοδοι συνοψίζονται στις εξής :

1. Η κυτταροκαλλιέργεια ακολουθούμενη από μικροσκοπικές τεχνικές παρατήρησης και ανάλυσης είναι πολύ σημαντικές και στη συνεχιζόμενη πανδημία SARS-CoV-2 χρησιμοποιούνται για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς (Chu, et al., 2020).
2. Μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid amplification tests, NAAT), στις οποίες περιλαμβάνονται:
 - η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time reverse-transcriptase polymerase-chain-reaction, rRT-PCR)
 - η ισοθερμική ενίσχυση με την μεσολάβηση βρόγχου αντίστροφης μεταγραφής (loop-mediated isothermal amplification LAMP, RT-LAMP), η οποία είναι μία εναλλακτική επιλογή ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος (Oishee, et al., 2021).
 - άλλες μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης, είναι αυτές που περιλαμβάνουν ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), ενίσχυση ανασυνδυασμένης πολυμεράσης (recombinase polymerase amplification, RPA), ενίσχυση μέσω μεταγραφής (transcription-mediated amplification, TMA), ενίσχυση μετατόπισης πολλαπλών κλώνων (multiples strand displacement amplification, SDA), ισοθερμική ενίσχυση εξαρτώμενη από ελικάση (isothermal helicase-dependent amplification, HAD) (Oishee, et al., 2021). Αυτές οι μεθοδολογίες είναι εύκολες στην εφαρμογή, απαιτώντας θερμικό σύστημα ή λουτρό νερού που παρέχει σταθερή θερμοκρασία και έχει με διάφορες μελέτες υποστηριχτεί ότι έχουν υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία και ειδικότητα συγκρινόμενες με την RT-PCR για τον SARS-CoV-2 σε δείγματα ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος (Gorzalski, et al., 2020).

-η μέθοδος CRISPR (clustered regularly inter spaced palindromic repeats), η οποία χρησιμοποιεί νουκλεϊκό οξύ και είναι αρκετά ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση παθογόνων, καθώς και του SARS-CoV-2. Βασισμένα σε CRISPR μεθοδολογία έχουν κυκλοφορήσει εμπορικά κιτ για τον SARS-CoV-2 (π.χ. SHERLOCK, DETECTR) (<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>).

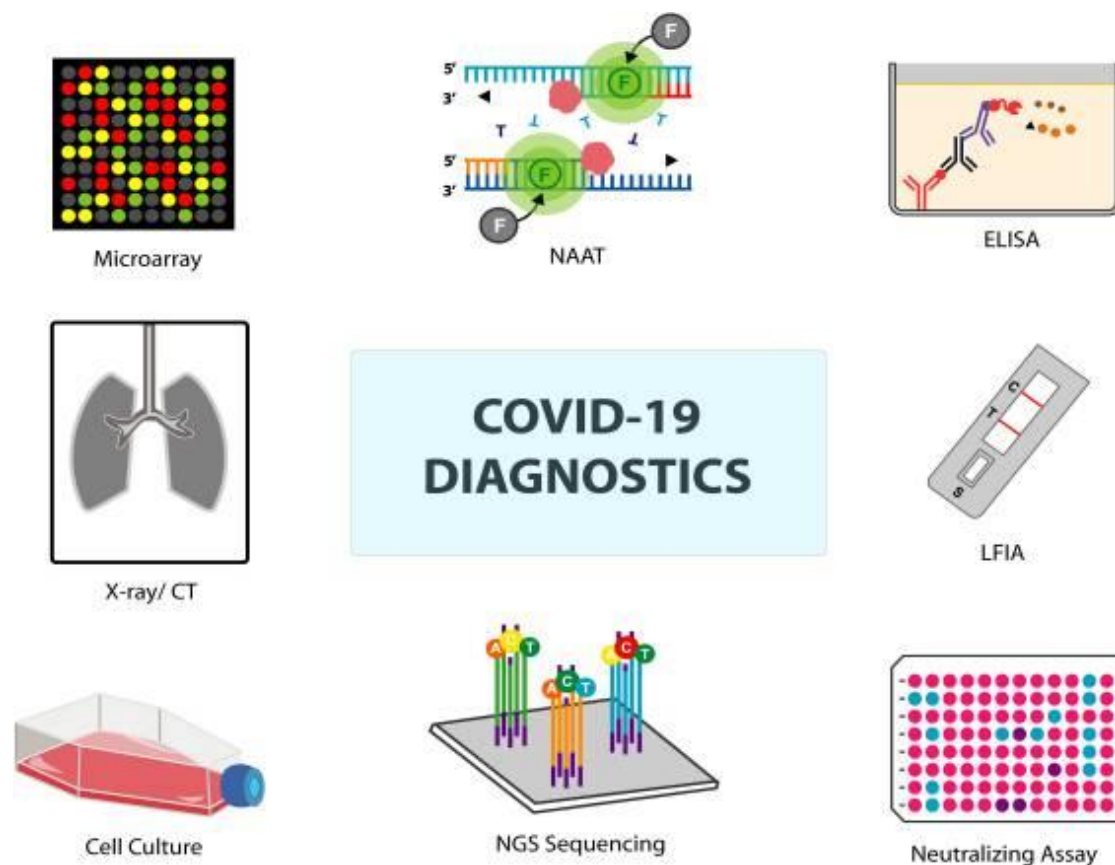
3. Επιπρόσθετα, η μεταγονιδιωματική αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Metagenomic Next Generation Sequencing, mNGS), με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα ανίχνευσης, αλλά και σφάλματα στην αλληλούχιση και υψηλό κόστος του απαιτούμενου εξοπλισμού, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την παρακολούθηση της εξέλιξης του ιού και της διασποράς του.

4. Ορολογικές μεθόδους, στις οποίες ανήκει η μέθοδος της ενζυμικής ανοσοπροσοφορικής δοκιμασίας ELISA για τον προσδιορισμό κυρίως των παραγόμενων αντισωμάτων (Guo, et al., 2020 ; Younes, et al., 2020) και οι μέθοδοι ανίχνευσης αντιγόνου (Antigen detection tests, AT) που είναι ανοσοδοκιμασίες, οι οποίες ανιχνεύουν συγκεκριμένες ιικές πρωτεΐνες. Μπορεί να είναι είτε ανοσοδοκιμασίες πλευρικής ροής (Lateral flow immunoassays, LFIA), είτε φθορίζουσες ανοσοδοκιμασίες (Fluorescent immunoassays, FIA), είτε χημειοφωταύγειας (Chemi luminescence enzyme immunoassays, CLEIA) (Tapari, et al., 2022). Στη κατηγορία αυτή ανήκει και ο προσδιορισμός εξουδετερωτικών αντισωμάτων, όπου ανιχνεύονται αντισώματα που αναστέλλουν την ιογενή λοίμωξη, εξουδετερώνοντάς τα (Oishee, et al., 2021).

Ωστόσο, η επικρατέστερη μέθοδος ανίχνευσης και αυτή που χρησιμοποιείται ευρύτερα παγκοσμίως είναι η rRT-PCR. Από τα κλινικά δείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω τα κυριότερα για αυτή την μέθοδο είναι τα δείγματα του αναπνευστικού και πιο συγκεκριμένα το ρινοφαρυγγικό επίχρισμα. Όμως, αυτή η εργαστηριακή μέθοδος απαιτεί προσωπικό ειδικά εκπαιδευμένο, αλλά και αρκετό συγκριτικά χρόνο ώστε να αποκτηθεί το τελικό αποτέλεσμα (Younes, et al., 2020).

Σε ό,τι αφορά την ορολογική μέθοδο για την ανίχνευση των παραγόμενων αντισωμάτων, το κλινικό δείγμα που απαιτείται είναι ο ορός αίματος. Ωστόσο, είναι μια μέθοδος η οποία συχνά δεν εφαρμόζεται στα αρχικά στάδια της νόσου για την διάγνωση, αλλά μπορεί να διενεργηθεί είτε για να ελεγχθεί το επίπεδο αντισωμάτων ενός ασθενή που νοσεί, είτε για να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η πιθανότητα να νόσησε στο παρελθόν χωρίς να εμφανίσει κλινική συμπτωματολογία (ασυμπτωματικός

ασθενής) (Younes, et al., 2020). Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πάνελ αντιδραστηρίων βασιζόμενα στη μεθοδολογία πλευρικής ροής (LFA), που ανιχνεύουν αντισώματα IgG/IgM και έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας και ευρείας χρήσης (Taleghani and Taghipour, 2021). Αυτές οι μεθοδολογίες είναι ταχείες, έχουν υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος, αλλά ταυτόχρονα είναι και απόλυτα ασφαλείς μέθοδοι ανίχνευσης λοίμωξης από τον SARS-CoV-2. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτού του είδους της ανίχνευσης είναι το γεγονός ότι τα αντισώματα απαιτούν χρόνο για να παραχθούν με αποτέλεσμα οι δοκιμασίες αυτές να υπολείπονται σε ευαισθησία, μη ανιχνεύοντας θετικά αποτελέσματα, εξαιτίας της εφαρμογής τους πριν ακόμη αναπτυχθούν τα αντισώματα στον οργανισμό (Guo, et al., 2020).



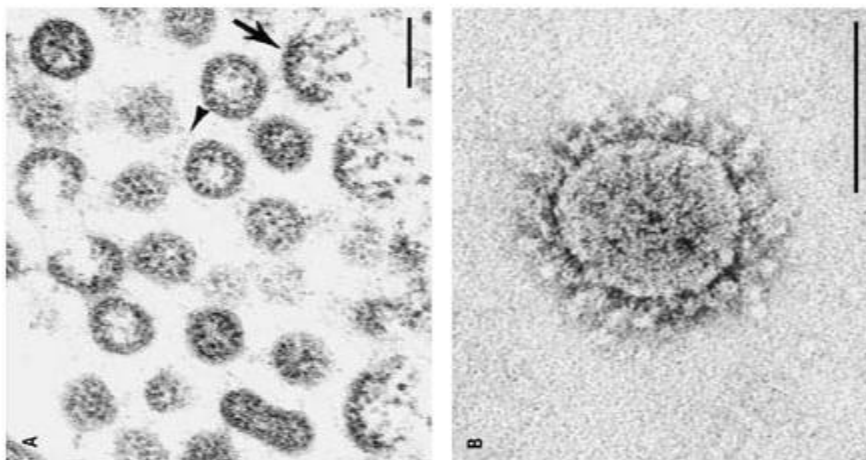
Εικόνα 16 : Γραφική αναπαράσταση διαφόρων διαγνωστικών μεθόδων για τη νόσο COVID-19 (Oishee, et al., 2021).

5.3.1. Κυτταροκαλλιέργεια και μικροσκόπηση

Η κυτταροκαλλιέργεια που ακολουθείται από μικροσκοπική τεχνική (Εικόνα 17) έχει συμβάλει σημαντικά στην ανίχνευση παθογόνων και στον εντοπισμό νέων αναδυόμενων ασθενειών. Στην συνεχιζόμενη πανδημία από τον SARS-CoV-2, ο συνδυασμός αυτών των μεθοδολογιών χρησιμοποιείται τόσο για διαγνωστικούς, όσο και για ερευνητικούς σκοπούς (Chu, et al., 2020). Σε αυτή την εργαστηριακή τεχνική, η ταυτοποίηση του ιού επιβεβαιώνεται μετά από μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, στην οποία χρησιμοποιείται ένα ιικό αντίσωμα με διασταυρούμενη αντίδραση (Oishee, et al., 2021).

Η κυτταροκαλλιέργεια και η μικροσκοπία δίνουν επιπρόσθετα πληροφορίες για τη δομή του ιού, τον τροπισμό, την παθογένεια, τη μεταδοτικότητα και τις διαδικασίες αντιγραφής του, αλλά και την αλληλεπίδραση του με το κύτταρο ξενιστή (Oishee, et al., 2021). Με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου αποκαλύπτεται σαφέστερα και η τυπική μορφολογία ως «στέμμα» του κορωνοϊού (Εικόνα 17) (Ksiazek, et al., 2003).

Ωστόσο, ο Π.Ο.Υ υπαγορεύει ότι αυτές οι διαδικασίες μελέτης του SARS-CoV-2 και ιδιαίτερα η κυτταροκαλλιέργεια πρέπει να διενεργούνται σε βιοασφάλεια επιπέδου 3 και μόνο για εργαστήρια προδιαγραφών υψηλής ασφάλειας, κάνοντας την ευρύτερη χρήση τους μη ρεαλιστική σε άλλα περιβάλλοντα (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>).



Εικόνα 17 : Α. Ηλεκτρονική μικροσκοπία ικών νουκλεοκαψιδίων και Β. Ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης όπου φαίνεται ένα σωματίο κορωνοϊού (Ksiazek, et al., 2003).

5.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφής μεταγραφής (rRT-PCR)

Ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στην εργαστηριακή διάγνωση μικροβιακών λοιμώξεων αποτελεί η μοριακή ανίχνευση του γενετικού υλικού, η οποία μπορεί να βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription, RT), που στην συνέχεια ακολουθείται από το στάδιο του πολλαπλασιασμού με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μεθοδολογία αυτή συμβάλλει τόσο στην ανίχνευση όσο και στην ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού. Αρκετά είναι τα πλεονεκτήματα από την εφαρμογή της, όπως το γεγονός ότι έχει πολύ υψηλή ευαισθησία, πολύ καλή αναπαραγωγική ικανότητα και δυνατότητα για ένα μεγάλο εύρος ποσοτικών προσδιορισμών (Mackay, 2004).

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην μέθοδο της PCR, η οποία αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1980 και δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να ενισχύσουν ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA ή RNA, περισσότερο από ένα δισεκατομμύριο φορές. Η λεγόμενη 5' προσδιορισμός νουκλεάσης, εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1993, και συνδύαζε την συνεχώς αυξανόμενη ενίσχυση του 1ου ειδικού αντιγράφου, με την παρακολούθηση του νεοσυντιθέμενου DNA σε κάθε κύκλο PCR που πραγματοποιήθηκε. Είναι μία μέθοδος πολύ ευαίσθητη για την ανίχνευση γονιδίων, ειδικά στην περίπτωση όπου τα αντίγραφα και η συγκέντρωση του RNA είναι πολύ μικρή, αλλά και στην ερμηνεία μικρών αλλαγών που μπορεί να προκύψουν στο mRNA (Valasek and Repa, 2005).

Η μοριακή βιολογία έθεσε τα θεμέλια για να αντιμετωπιστούν κάποιες προκλήσεις όπως :

1) η ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων υλικού RNA, ώστε να μειωθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα

2) η διάκριση των θετικών σημάτων μεταξύ διαφορετικών παθογόνων, ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ψευδών θετικών

3) η μείωση του χρόνου ανάκτησης των αποτελεσμάτων, δεδομένου ότι οι εξοπλισμοί-αναλυτές που βασίζονται σε μοριακές μεθοδολογίες έχουν πολύ μεγάλη δυναμικότητα και μπορούν να ελέγχουν ταυτόχρονα αλλά και έγκυρα ποικίλα δείγματα από πολλούς ασθενείς και παράλληλα να ελαχιστοποιούν την εμφάνιση ψευδώς αρνητικών αλλά και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Για αυτόν τον λόγο, η rRT-PCR

αποτελεί την πλέον αξιόπιστη μέθοδο για έγκαιρη διάγνωση σε ασθενείς με πιθανή μόλυνση SARS-CoV-2 (Caruana et al., 2020).

Εκτενείς μελέτες έδειξαν ότι για την διάγνωση του ιού SARS-CoV-2 κύριος στόχος αποτελεί το γονίδιο της ακίδας (S) του ιού, η ανίχνευση του οποίου έχει συγκριτικά με τα άλλα γονίδια καλύτερη ειδικότητα, εφόσον επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη ακρίβεια η διαφοροποίηση μεταξύ της μόλυνσης από τον ιό SARS-CoV-1 και τον ιό SARS-CoV-2. Η ευαισθησία της μεθόδου αρχικά ήταν περιορισμένη, ωστόσο μετά την εισαγωγή και ταυτόχρονη ανίχνευση και άλλων ειδικών γονιδιακών στόχων του ιού, όπως του γονιδίου της RdRp/Helicase (Hel), του νουκλεοκαψιδίου (Nucleocapside, N) και του φακέλου (Envelope, E), αυξήθηκε σημαντικά. Μετά την ενσωμάτωσή τους σε διάφορα εμπορικά διαθέσιμα ή μη πάνελ ανίχνευσης έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων που λαμβανόταν για όλα τα γονίδια με καλύτερα αποτελέσματα να δίνονται από την ανίχνευση του γονιδίου της RdRp. Έτσι συστάθηκε από τον Π.Ο.Υ η χρήση των γονιδίων για RdRp, E, N, S σε διάφορους συνδυασμούς (Mathuria, et al., 2020).

Η μεγάλη εξέλιξη στην μεθοδολογία της rRT-PCR αλλά και η πρόοδος στην ταυτοποίηση ποικίλων γονιδίων στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2, έχει οδηγήσει πολλούς επιστήμονες να σχεδιάσουν διαφορετικούς εκκινητές, οι οποίοι στοχεύουν σε ξεχωριστές περιοχές του ιού. Η ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών του ιού αποτελεί και το σημαντικότερο στόχο για την διάγνωση του SARS-CoV-2, αλλά και την διαφοροποίησή του από άλλους corona-ιούς. Πέντε είναι οι περιοχές του γονιδιώματος που χρησιμοποιούνται ευρύτερα για τον σχεδιασμό εκκινητών και σχετίζονται με:

1. το νουκλεοκαψιδίο (N)
2. τον φάκελο (E)
3. την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp)
4. το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF1ab)
5. την ακίδα (S)

Από τους παραπάνω εκκινητές έχει φανεί ότι αυτοί που στοχεύουν το γονίδιο N, την RdRp και την περιοχή ORF1ab λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας και ειδικότητας τους συγκριτικά με τους υπόλοιπους, είναι επικρατέστεροι και χρησιμοποιούνται ευρύτερα (Abduljalil, 2020). Ενδεικτικά, για τις μοριακές μεθόδους που εφαρμόζονται για τον SARS-CoV-2, αναφέρεται αντίστοιχα ευαισθησία και

ειδικότητα 96,6% και 100% για το N γονίδιο και 95,7% και 88,9% για την RdRp (Abduljalil, 2020).

Το πρώτο βήμα πριν την πραγματοποίηση της μεθόδου rRT-PCR είναι η φάση της εκχύλισης, δηλαδή της εξαγωγής του γενετικού υλικού RNA του SARS-CoV-2 από το δείγμα (Mathuria, et al., 2020).

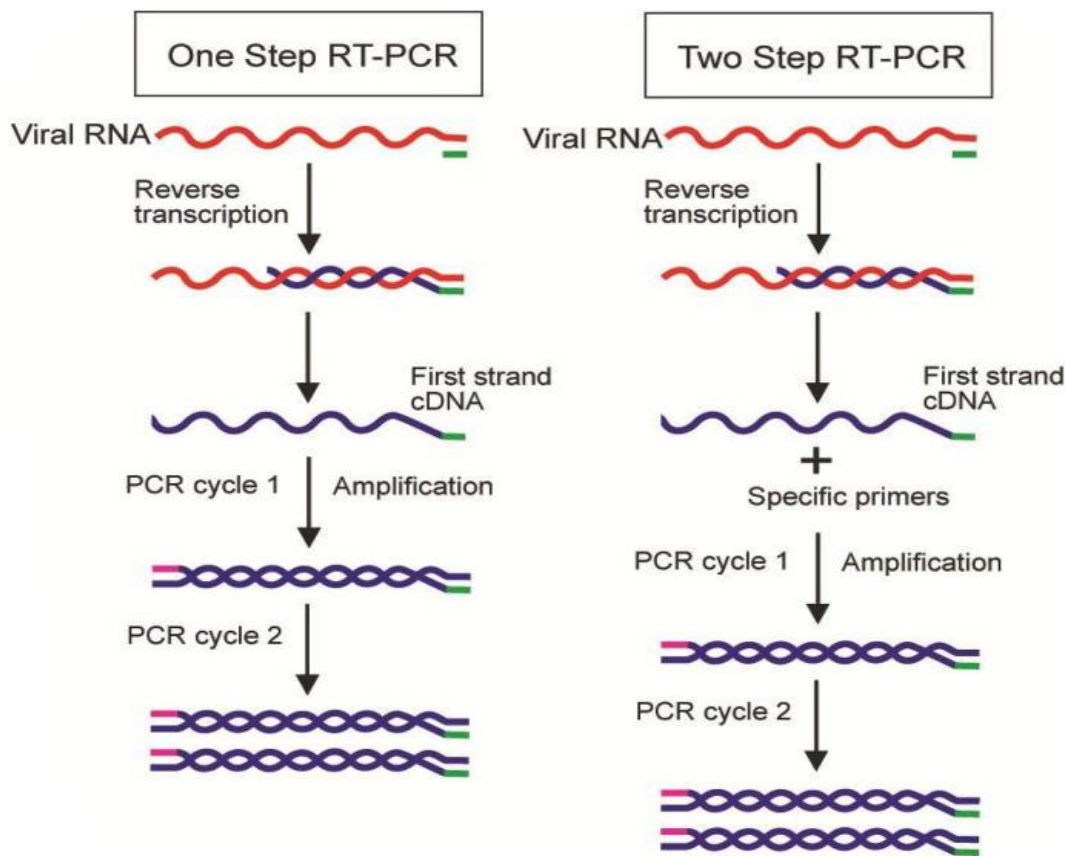
Η σωστή επιλογή της διαδικασίας εξαγωγής και η καθαρότητα του RNA που λαμβάνεται μετά το πέρας της εκχύλισης είναι ένα πολύ σημαντικό και αρχικό βήμα για να έχουμε ένα αξιόπιστο και έγκυρο αποτέλεσμα μετά την εφαρμογή της μοριακής μεθόδου ανίχνευσης (Huggett, et al., 2020). Υπάρχουν διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης, τα οποία είναι η αυτόματη, η μέθοδος μαγνητικών σφαιριδίων, η μέθοδος με βάση την στήλη έκλουσης ή και μη εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα (Ambrosi, et al., 2021). Διαφορές στην απόδοση του RNA στις ποικίλες μεθοδολογίες μπορεί να παρατηρηθούν, επηρεάζοντας πιθανότατα την απόδοση του πολλαπλασιασμού. Έτσι συνιστάται να πραγματοποιείται εκτενής αξιολόγηση της εφαρμοζόμενης rRT-PCR με τα πάνελ εξαγωγής RNA που θα συνδυαστούν (Ambrosi, et al., 2021). Οι διαφορετικές μέθοδοι εξαγωγής του RNA, μπορεί να βελτιώσουν τον χρόνο ολοκλήρωσης (Turn Around Time, TAT), αλλά ταυτόχρονα μπορεί να αυξήσουν το κόστος της διαδικασίας (Mathuria, Yadav and Rajkumar, 2020).

Αφού επιτευχθεί η εξαγωγή του RNA, στην συνέχεια πραγματοποιείται η μεθοδολογία της PCR σε πραγματικό χρόνο. Τα απαιτούμενα συστατικά για τη μέθοδο αυτή περιλαμβάνουν κυρίως το DNA υπόστρωμα, που χρησιμεύει ως μήτρα για την περιοχή που θέλουμε να ενισχυθεί, δύο ζεύγη εκκινητών (primers) που υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους περιοχές στις αλυσίδες του DNA, νουκλεοτίδια (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) και την DNA πολυμεράση (Objective, et al., 2020).

Για την ανίχνευση RNA του SARS-CoV-2 εφαρμόζεται η RT-PCR, όπου σε πρώτο στάδιο απαιτείται η μετατροπή του RNA σε DNA (αντίστροφη μεταγραφή-RT), ώστε να δημιουργηθεί ένα συμπληρωματικό μονόκλωνο μόριο DNA (complementary DNA, cDNA). Στη συνέχεια η DNA πολυμεράση μετατρέπει το μονόκλωνο cDNA σε δίκλωνο, το οποίο πολλαπλασιάζεται μέσα από τα στάδια της αποδιάταξης, ενίσχυσης και επέκτασης με την κλασική μέθοδο της PCR. Αυτή είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για να ανιχνεύσει mRNA, ειδικά στις περιπτώσεις όπου αυτό δεν υπάρχει σε μεγάλη αφθονία (Mackay, 2004).

Η RT-PCR μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα βήμα είτε σε δύο (Εικόνα 18). Στην πρώτη περίπτωση, τοποθετούνται στο ίδιο σωλήνα όλα τα απαραίτητα

αντιδραστήρια ώστε μετά την αντίστροφη μεταγραφή να συνεχιστεί η PCR (Wacker and Godard, 2005). Αυτή είναι και η επικρατέστερη επιλογή καθώς υπάρχει μικρότερη πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος, ψευδώς θετικού αποτελέσματος ή άλλων σφαλμάτων, ενώ έχει μεγαλύτερη ταχύτητα με μικρότερο κόστος. Ωστόσο, το βασικό της μειονέκτημα είναι ότι χρησιμοποιούνται εκκινητές για συγκεκριμένο γονίδιο, γεγονός που δεν επιτρέπει μελλοντική χρήση για την ενίσχυση διαφορετικού γονιδίου (Artika, et al., 2020). Στην δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται αρχικά το πρώτο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής και της δημιουργίας του cDNA και στην συνέχεια πραγματοποιείται ξεχωριστά η ενίσχυσή του. Το πλεονέκτημα αυτής της περίπτωσης είναι ότι δύναται να αποθηκευτεί το εξαγόμενο RNA του ιού (cDNA) και να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για περαιτέρω έλεγχο (Mathuria, et al., 2020), ενώ οι εκκινητές αποτελούν τυχαία επιλογή και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση κάποιου άλλου γονιδίου του SARS-CoV-2, αν απαιτηθεί στο μέλλον (Artika, et al., 2020).



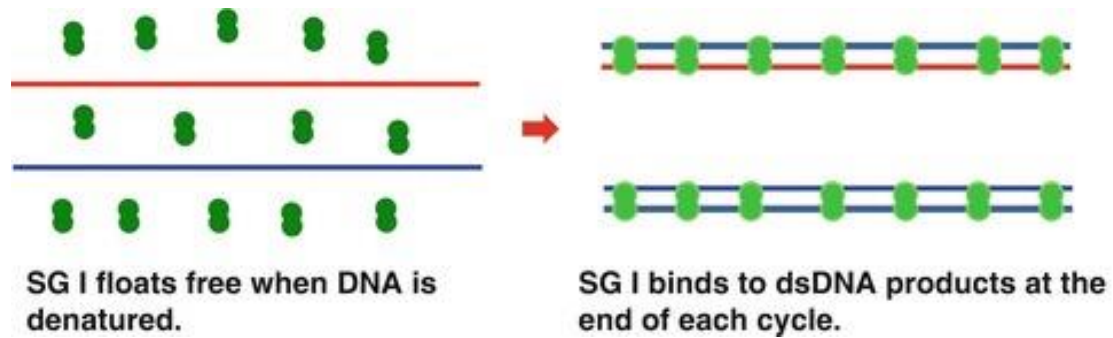
Εικόνα 18 : Σχηματική απεικόνιση της PCR ενός και δύο σταδίων (Artika, et al., 2020).

Αφού πραγματοποιηθεί το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής και η δημιουργία του δίκλωνου DNA (dsDNA), αυτό αποδιατάσσεται (φάση αποδιάταξης, denaturation) σε θερμοκρασία πάνω από 90° C και οι δύο αλυσίδες του απομακρύνονται η μια από την άλλη. Οι δύο νέες αλυσίδες που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως μήτρες για την σύνθεση δύο νέων συμπληρωματικών προς αυτές. Έτσι, αμέσως μετά την αποδιάταξη των δύο αλυσίδων, η θερμοκρασία πέφτει στους 50-60° C, όπου υβριδίζονται οι εκκινητές (φάση υβριδοποίησης, annealing) για να ξεκινήσει η σύνθεση αυτών των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Τέλος, το τελικό στάδιο είναι η επέκταση των εκκινητών (φάση επιμήκυνσης, extension) για την επέκταση της σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας σε κάθε κλώνο σε μία υψηλή θερμοκρασία, 70-78° C (Mosolygó, et al., 2022).

Οι εκκινητές έχουν σημειωθεί με φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες είναι φθορίζουσες χημικές ουσίες με δυνατότητα να απορροφούν φωτεινή ενέργεια σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, να το εκπέμπουν σε μεγαλύτερο μήκος κύματος και κατά την ολοκλήρωση του κάθε κύκλου αντιγραφής, η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με την ποσότητα του ανιχνευθέντος μορίου-στόχου. Επιπρόσθετα, όσο μεγαλύτερη ποσότητα εκκινητή διαθέτουμε αρχικά, τόσο πιο έντονο θα είναι το σήμα του φθορισμού (Objective et al., 2020). Η διαδικασία βασίζεται στην τεχνολογία της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET), που διασπείρει την ενέργεια περισσότερο ως θερμότητα παρά ως φθορισμό (Mackay, 2004).

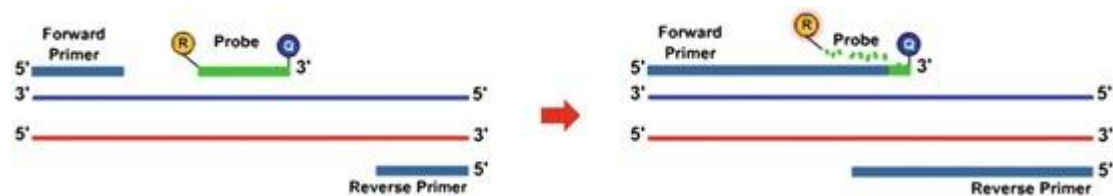
Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες φθορίζουσες χρωστικές χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες με βάση τον χρησιμοποιούμενο παράγοντα φθορισμού και την ειδικότητα ανίχνευσης της PCR. Η πρώτη ομάδα βασίζεται σε δίκλωνους παράγοντες παρεμβολής του DNA, όπως το SYBR Green I και το EVA Green, τα οποία ανιχνεύουν ειδικά και μη ειδικά προϊόντα PCR, ενώ η δεύτερη ομάδα χρησιμοποιεί φθοριοχρώματα συνδεδεμένα με ολιγονουκλεοτίδια, όπως είναι οι TaqMan probes και ανιχνεύουν ειδικά προϊόντα της PCR (Objective, et al., 2020). Από αυτές τις φθορίζουσες χρωστικές, αυτή η οποία χρησιμοποιείται συνήθως είναι η SYBR Green I και πρόκειται για μία χρωστική η οποία συνδέεται με την δευτερεύουσα αλυσίδα δίκλωνου DNA και φθορίζει μόνο όταν παρεμβάλλεται σε δίκλωνο DNA (Εικόνα 19). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ένταση του φθορισμού να είναι ανάλογη με την ποσότητα του δίκλωνου DNA που υπάρχει στην αντίδραση. Έχει χαμηλό κόστος, εύκολη χρήση

και υψηλή ευαισθησία. Εντούτοις, μπορεί να παρεμβάλλεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA ειδικά και μη ειδικά, χωρίς εξειδίκευση αλληλουχίας (Yang and Tan, 2013).



Εικόνα 19 : Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της χρωστικής SYBR Green I (Yang and Tan, 2013).

Σε ότι αφορά, την δεύτερη ομάδα φθοριοχρωμάτων, οι TaqMan είναι ανιχνευτές υδρόλυσης και είναι σχεδιασμένοι να συνδέονται σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Ο μηχανισμός δράσης βασίζεται στην δραστηριότητα 5'-3' εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης Taq, η οποία έχει την ικανότητα να υδρολύει τον δεσμευμένο ανιχνευτή κατά την διάρκεια της ενίσχυσης (Εικόνα 20) (Tajadini, et al., 2014).



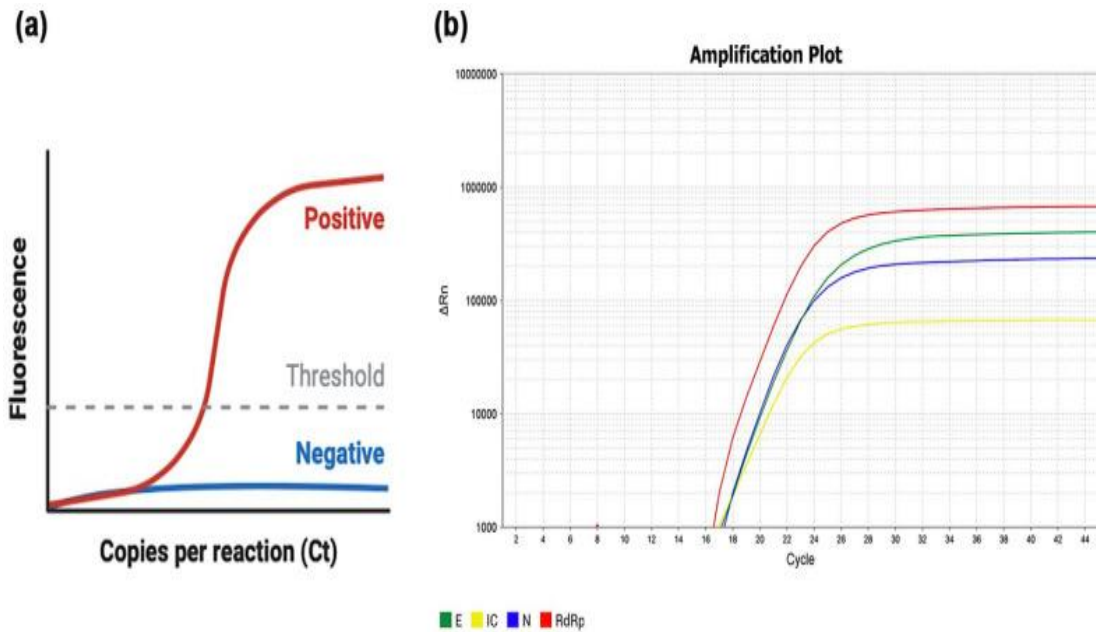
Εικόνα 20 : Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του ενισχυτή TaqMan (Yang and Tan, 2013).

Η θερμοκρασία στην οποία οι εκκινητές υβριδίζονται στην αλυσίδα του DNA αναφέρεται συνήθως ως θερμοκρασία τήξης (Melting temperature, T_m) και αυτή είναι και η θερμοκρασία στην οποία έχει σχηματιστεί το 50% των δίκλωνων μορίων στόχων (Singh, et al., 2014).

Σε κάθε PCR χρησιμοποιείται μάρτυρας (Internal Control, IC) προκειμένου να αποφευχθεί η αναφορά ενός ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος. Αποτελεί σημαντικό ποιοτικό έλεγχο, που όταν προστίθεται εξωγενώς πρόκειται για εξωγενές μάρτυρα (External Control, EC) (Mackay, 2004). Επιπρόσθετα, υπάρχουν και εσωτερικοί μάρτυρες όπως είναι η RNase P, που έχουν ως βασικό ρόλο τον έλεγχο της διαδικασίας της εκχύλισης RNA του SARS-CoV-2 και του πολλαπλασιασμού, αλλά επιπρόσθετα και τον έλεγχο της ποιότητας του δείγματος. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται παράλληλα με την ενίσχυση των γονιδίων στόχων που έχουν επιλεγθεί για τον ιό SARS-CoV-2 (Petrillo, et al., 2020).

Το αποτέλεσμα της PCR είναι μία τυπική καμπύλη ενίσχυσης. Οι κύριες φάσεις αυτής της καμπύλης είναι η εκθετική, η γραμμική φάση και η φάση του πλατώ/κορεσμού. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, αρχικά ξεκινά ο πολλαπλασιασμός, υπάρχει φθορισμός, ωστόσο είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Κατά την εξέλιξη της PCR, προσεγγίζεται η βέλτιστη τιμή ενίσχυσης του μορίου-στόχου και σε αυτή την φάση έχουμε τις ιδανικότερες συνθήκες της αντίδρασης. Η ένταση του φθορισμού είναι εκείνη που θα μας δώσει τα δεδομένα για την αξιολόγηση του αποτελέσματος. Με βάση την μέγιστη τιμή φθορισμού θα καθοριστεί και το όριο ανίχνευσης καθώς υπολογίζεται συνήθως ως το 10% του μέγιστου φθορισμού. Το σημείο φθορισμού το οποίο είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το κατώφλι ανίχνευσης (cut-off) θα μας δώσει και τον κύκλο ανίχνευσης (threshold cycle, Ct). Τέλος, όταν το προϊόν έχει ελαττωθεί αρκετά, η ένταση του φθορισμού μειώνεται και φτάνουμε στο πλατώ, όπου οι τιμές του δεν προσφέρουν στην τελική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Wong and Medrano, 2005). Στην περίπτωση του αρνητικού αποτελέσματος δεν παρατηρείται καμπύλη (Εικόνα 21) (Azzi, et al., 2021).

Μία σημαντική βελτίωση που έφερε η PCR πραγματικού χρόνου είναι ο μειωμένος χρόνος λήψης των αποτελεσμάτων, που οφείλεται στην ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται ο κάθε κύκλος και στην υψηλή ευαισθησία του ανιχνευτή φθορισμού καθώς και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης (Fraiture, et al., 2021).



Εικόνα 21 : Απεικόνιση των αποτελεσμάτων μίας rRT-PCR (Azzi, et al., 2021).

Η PCR εντούτοις έχει σημαντικούς περιορισμούς, όπως η μειωμένη ευαισθησία λόγω εμφάνισης νέων μεταλλάξεων, η ανάγκη σχεδιασμού εκκινητών λίγων νουκλεοτιδίων για μεγαλύτερη ειδικότητα που περιορίζεται από την ακολουθούμενη μειωμένη ευαισθησία (μη ανίχνευση όλων των παραλλαγών), η εμφάνιση ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, λόγω επιμόλυνσης ή ανίχνευσης μικροβίων σε ένα πιθανά «μη παθογόνο» δείγμα και το αυξημένο κόστος που μπορεί να είναι απαγορευτικό, ιδιαίτερα για μικρότερης δυναμικότητας ερευνητικά ή διαγνωστικά εργαστήρια (Kuang, et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τον SARS-CoV-2, φαίνεται να παρουσιάζει μία πολύ γρήγορη εξέλιξη, η οποία οφείλεται είτε στην εισαγωγή νέων μεταλλάξεων, λόγω του μεγάλου αριθμού σφαλμάτων (1/34.000) της ιικής πολυμεράσης RdRp, είτε στον ανασυνδυασμό μέσω της αλλαγής κλώνου από το ίδιο ένζυμο κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Το αποτέλεσμα αυτών των φαινομένων είναι η εμφάνιση μεταλλαγμένων στελεχών-ποικιλιών του ιού, όπου η RT-PCR αδυνατεί να ανιχνεύσει κάποιον από τους επιλεγμένους ιικούς στόχους, ενώ ανιχνεύει τους υπόλοιπους. Το φαινόμενο αυτό καλείται και «dropout» και έχει παρατηρηθεί συχνότερα για τα γονίδια S και N.

Απουσία ενίσχυσης του γονιδίου S μπορεί να βοηθήσει στην άμεση αναγνώριση της παραλλαγής Omicron (B.1.1.529). Η μέθοδος βασίζεται στην ταχεία διαλογή για αποτυχίες πολλαπλασιασμού του στόχου S με διαγνωστικές μεθόδους

βασισμένες στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την επισημάνση πιθανών περιπτώσεων μόλυνσης από παραλλαγή Omicron και επιβεβαίωση στη συνέχεια με γονιδιωματική ανάλυση

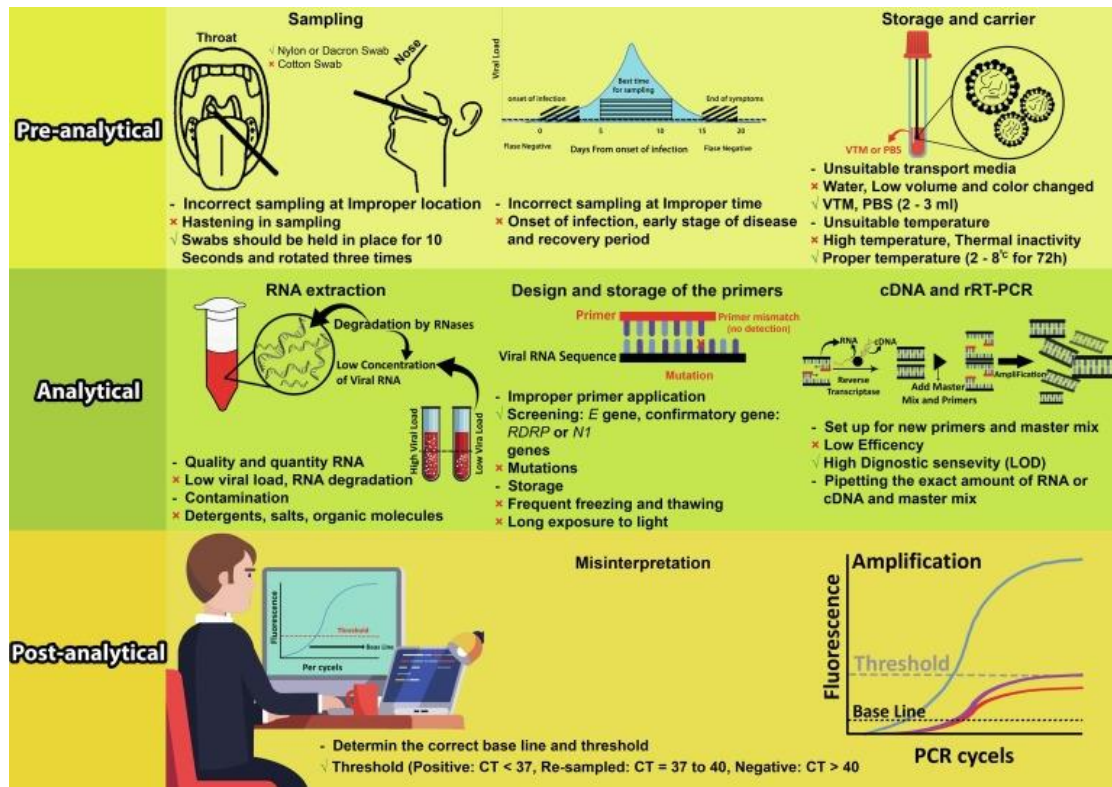
(<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7050e1.htm>). Με βάση τα τρέχοντα επιδημιολογικά δεδομένα, δείγματα με «dropout» του S έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι Omicron λόγω μετάλλαξης που μειώνει την ενίσχυση στόχου του γονιδίου S σε ορισμένες PCR. Σύμφωνα με μία άλλη μελέτη, πλήρης ή μερική απουσία ενίσχυσης του γονιδίου N έχει παρατηρηθεί και σε περιπτώσεις άλλων παραλλαγών, όπως της B.1.1.7 (alpha), P.1 ή B.1.1.318 (Bozidis, et al., 2022).

Μαζί με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γενετικού υλικού (sequencing), η rRT-PCR είναι εκείνη που εφαρμόστηκε ευρέως και με επιτυχία για να ανιχνεύσει και να αναγνωρίσει για πρώτη φορά τον νέο ιό SARS-CoV-2 στη Wuhan, τον Δεκέμβριο του 2019. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά εκκινητές, οι οποίοι είχαν ως στόχο το γονίδιο RdRp. Έκτοτε, ο Π.Ο.Υ έχει υιοθετήσει την rRT-PCR ως μέθοδο αναφοράς για την διάγνωση και επιβεβαίωση της μόλυνσης από τον SARS-CoV-2 (Tahamtan and Ardebili, 2020). Από την αρχή της εφαρμογής της μεθόδου μέχρι σήμερα, έχουν σχεδιαστεί όπως αναφέρθηκε και άλλοι εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην πράξη και έχουν ως στόχο την ανίχνευση εκτός του RdRp και των γονιδίων N, E και S του SARS-CoV-2 (Corman, et al., 2020). Η τιμή του cutoff του Ct, όταν πρόκειται για εμπορικό κιτ, καθορίζεται από την κατασκευάστρια εταιρεία και μια τιμή <40 συνήθως ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα για το κλινικό δείγμα. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι ασθενείς με υψηλό φορτίο (εκφραζόμενο ως χαμηλή τιμή Ct), εκκρίνουν μεγαλύτερες ποσότητες του ιού, με συνέπεια μεγαλύτερη πιθανότητα μετάδοσής του, ενώ ασθενείς με μικρότερο ιικό φορτίο (Ct>31) βρίσκονται σε στάδιο με μικρότερη έκφραση και συγχρόνως ηπιότερη μετάδοση του ιού (Aranha, et al., 2021).

5.3.2.1. Σφάλματα στην εκτέλεση της rRT-PCR

Παρά την πολύ αποτελεσματική φύση της μοριακής μεθόδου rRT-PCR και την έγκρισή της από το CDC και τον Π.Ο.Υ ως την μέθοδο αναφοράς για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2, η εφαρμογή της έχει δείξει ένα αριθμό ψευδών αρνητικών αποτελεσμάτων, τα οποία θα πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψη. Τα αποτελέσματα μπορεί να επηρεαστούν από εργαστηριακά σφάλματα, τα οποία δύναται να συμβούν σε τρία διαφορετικά στάδια, πριν, κατά και μετά την εκτέλεση της rRT-PCR στη διάγνωση της COVID-19 λοίμωξης. Στην προ-αναλυτική φάση, περιλαμβάνονται τα σφάλματα και οι παράγοντες που μπορεί να επιδράσουν πριν την έναρξη της εργαστηριακής τεχνικής και αφορούν τη δειγματοληψία, την συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά του δείγματος, αλλά και την ποιότητα του δείγματος και τον χρόνο λήψης αυτού από την εμφάνιση ή μη των συμπτωμάτων. Δεύτερη κατηγορία σφαλμάτων αφορά αυτά που μπορεί να συμβούν κατά την διάρκεια της εκτέλεσης της μοριακής τεχνικής (αναλυτική φάση), τα οποία αφορούν κυρίως την εκχύλιση του νουκλεϊκού οξέος, το σωστό σχεδιασμό και αποθήκευση των εκκινήτων, τη σύνθεση του cDNA και τη διαδικασία της PCR. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται σφάλματα που μπορούν να συμβούν μετά την επεξεργασία του δείγματος (μετα-αναλυτική φάση), δηλαδή κατά το στάδιο της ερμηνείας, ανάλυσης και αναφοράς των αποτελεσμάτων (Εικόνα 22) (Rahbari, et al., 2021).

Η αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων και η απόλυτη τήρηση των οδηγιών θα οδηγήσει σε καλύτερα, ασφαλέστερα και με μεγαλύτερη ακρίβεια αποτελέσματα.



Εικόνα 22 : Αναφορά και σχηματική απεικόνιση των εργαστηριακών σφαλμάτων σε κάθε μία από τις τρεις φάσεις κατά τη διενέργεια της rRT-PCR SARS-CoV-2 (Rahbari, et al., 2021).

Προ- αναλυτική φάση

Τα προ-αναλυτικά σφάλματα πολλές φορές είναι αναπόφευκτο να συμβούν και δεν μπορούμε να τα ελέγξουμε σε μεγάλο ποσοστό, όμως στην περίπτωση του ιού SARS-CoV-2 αυτοί οι παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί. Ο προσδιορισμός αλλά και η προσπάθεια αποφυγής ή διόρθωσης αυτών των σφαλμάτων μπορούν να οδηγήσουν σε βελτίωση της ίδιας της διαδικασίας ανάλυσης και έχει έναν πολύ βασικό ρόλο στην διάγνωση της λοίμωξης COVID-19 (Lippi and Simundic, 2018 ; Lippi, et al., 2020).

Η δειγματοληψία αποτελεί πηγή σφαλμάτων καθώς η μη σωστή και άσηπτη λήψη του δείγματος θα οδηγήσει σε μη έγκυρα αποτελέσματα. Σύμφωνα με τις οδηγίες που έχουν δοθεί από το CDC (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>), το σημαντικό είναι η κατάλληλη επιλογή της ανατομικής θέσης λήψης του δείγματος, εννοώντας το είδος του βιολογικού υλικού

από το οποίο θα γίνει η λήψη για να προχωρήσει η εξέταση. Τέτοια είδους δείγματα προέρχονται από την ρινική ή στοματική περιοχή (π.χ. πτύελα), το φάρυγγα, τον τραχειακό σωλήνα ή το βρογχικό δέντρο. Μετά την επιλογή της θέσης λήψης, το επόμενο βήμα υψηλής αξίας είναι η επιλογή του υλικού συλλογής του δείγματος με την χρήση συνθετικών άκρων στυλεού για επιχρίσματα από υλικό νάilon ή dacron με αλουμίνιο ή πλαστικό άξονα να αξιολογούνται ως τα καταλληλότερα (Rahbari, et al., 2021). Κατά τη διαδικασία συλλογής του δείγματος, ο στυλεός θα πρέπει να παραμένει για δευτερόλεπτα στο σημείο της συλλογής και να περιστρέφεται ταυτόχρονα, ώστε να συλλεχθεί ικανοποιητική ποσότητα υλικού και κατ' επέκταση αρκετή ποσότητα ιικού φορτίου (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665//331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>).

Επιπρόσθετα, οι συνθήκες συλλογής του δείγματος θα πρέπει να είναι άσηπτες. Τα γάντια του λήπτη θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα και χωρίς πούδρα, διότι ίχνη σωματιδίων ή σκόνης μπορεί να έχουν ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό του γενετικού υλικού και κατ'επέκταση στο αποτέλεσμα του μοριακού ελέγχου (Schrader, et al., 2012). Στην περίπτωση που το δείγμα συλλεχθεί από την στοματική περιοχή, ο ασθενής θα πρέπει να έχει καθαρή στοματική κοιλότητα, ώστε να μην υπάρχουν ίχνη τροφής που θα επηρεάσουν την δειγματοληψία (Younes, et al., 2020).

Το κατάλληλο υλικό μεταφοράς είναι σημαντικό καθώς τα κλασικά υλικά μεταφοράς είναι μη ενδεικνύμενα για μεταφορά δειγμάτων με υποψία μόλυνσης με ιό. Μετά τη δειγματοληψία για έλεγχο για SARS-CoV-2, ο στυλεός θα πρέπει να τοποθετηθεί σε κατάλληλο φιαλίδιο που θα περιέχει περίπου 1-3 ml υλικού μεταφοράς. Υλικά μεταφοράς κατάλληλα για την συντήρηση του ιού SARS-CoV-2 είναι :

- 1) υλικό μεταφοράς ιού (Viral transport media, VTM)
- 2) φωσφορικό ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα (Phosphate-Buffered Saline, PBS)
- 3) διάλυμα ιστοκαλλιέργειας (Mak, et al., 2020)

Εντούτοις, έχει φανεί ότι η διατήρηση του δείγματος σε ένα υλικό μεταφοράς, όπως είναι το PBS, για πολλές ώρες, μπορεί να επηρεάζει αρνητικά το αποτέλεσμα. Το PBS έχει τη δυνατότητα να διατηρεί ένα ρινοφαρυγγικό δείγμα έως και 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Basso, et al., 2020) και συνιστάται από τον FDA (Food & Drug Administration) (FDA, 2022). Απαραίτητες προϋποθέσεις σωστής διαχείρισης του δείγματος αποτελούν η τοποθέτηση του στο κατάλληλο υλικό μεταφοράς και η άμεση μεταφορά και παράδοση στο εργαστήριο. Στις περιπτώσεις που χρειαστεί να

διατηρηθεί το δείγμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αυτό θα πρέπει να γίνεται στους 2-8°C, χωρίς να ξεπερνά τις 72 ώρες. Οι ίδιες συνθήκες θα πρέπει να τηρούνται και κατά την μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο σε περίπτωση που αυτό δεν βρίσκεται σε κοντινή απόσταση. Αν απαιτηθεί διάστημα πέραν των 3 ημερών το δείγμα αποθηκεύεται σε -80 °C (Rahbari, et al., 2020).

Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν ένας ασθενής βρίσκεται στα αρχικά στάδια της COVID-19 λοίμωξης ή προς το τέλος αυτής, όπου το ιικό φορτίο δεν έχει αυξηθεί αρκετά ή έχει αρχίσει να μειώνεται αντίστοιχα, μία μη σωστή δειγματοληψία και μεταφορά του δείγματος μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα. Το ίδιο ακριβώς μπορεί να συμβεί και σε μία πιθανή λήψη φαρυγγικού επιχρίσματος στα πρώτα στάδια του πολλαπλασιασμού του ιού σε ένα νοσοκομείο καθώς αρχικά το ιικό φορτίο είναι υψηλότερο στην ρινοφαρυγγική περιοχή και στην συνέχεια αυξάνει και στην περιοχή του στοματοφάρυγγα (Rahbari, et al., 2020). Καθώς εξελίσσεται η πανδημία, μαθαίνουμε όλο και περισσότερα και κατανοούμε καλύτερα το προφίλ του ιού και αυτό μας οδηγεί σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ότι αφορά την διαχείρισή μας αλλά και την ευθύνη μας σε κάθε στάδιο που σχετίζεται με την διάγνωση του ιού (Rahbari, et al., 2020).

Αναλυτική φάση

Ένα από τα σημαντικότερα σφάλματα μπορεί να εμφανιστεί στο στάδιο της εξαγωγής του νουκλεϊκού οξέος και έχει αρνητικό αντίκτυπο στην ποσότητα αλλά και την ποιότητα του RNA που θα εκχυλιστεί για το επόμενο στάδιο της PCR. Η παρουσία πρωτεϊνών, οι οποίες δεσμεύουν νουκλεϊκό οξύ, μπορεί να υπάρξουν στο εκχυλισμένο προϊόν και να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της PCR (Das Mukhopadhyay, et al., 2021).

Τα πρωτόκολλα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή του RNA του SARS-CoV-2 (Ali, et al., 2017 ; Younes, et al., 2020 ; Ambrosi, et al., 2021) είναι:

- 1) Εξαγωγή με αυτόματη μέθοδο. Πρόκειται για την ασφαλέστερη μέθοδο και ταυτόχρονα με μεγάλη ταχύτητα λήψης του προϊόντος. Η εκχύλιση πραγματοποιείται με τη χρήση αυτόματων αναλυτών με κύριο μειονέκτημα το υψηλό κόστος τους, ώστε να μην είναι εύκολα διαθέσιμο σε όλες τις χώρες και για όλα τα διαγνωστικά εργαστήρια.

- 2) Εξαγωγή με μαγνητική μέθοδο. Χρησιμοποιείται ευρέως στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες καθώς δεν απαιτεί τη χρήση φυγοκέντρου και η λειτουργία της είναι εξαιρετικά απλή. Μειονέκτημά της αποτελεί η πιθανότητα παραμονής στο δείγμα μαγνητικών σφαιριδίων και κατ'επέκταση επηρεασμός της ίδιας της PCR.
- 3) Εξαγωγή με βάση τη στήλη έκλουσης. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται το ίδιο με την προηγούμενη, ωστόσο απαιτεί τη χρήση μικροφυγοκέντρου. Είναι σχετικά γρήγορη μέθοδος, αλλά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα επιμόλυνσης του δείγματος από σωματίδια του αέρα, καθώς η διαδικασία απαιτεί συχνό άνοιγμα και κλείσιμο των φιαλιδίων.

Ακόμη το εκχυλισμένο RNA μπορεί να επηρεαστεί από RNA-άσες, οι οποίες είναι ενδογενή ή εξωγενή ένζυμα ριβονουκλεάσης. Οι ενδογενείς ριβονουκλεάσες προέρχονται κυρίως από τη λύση των κυττάρων, ενώ οι εξωγενείς κυρίως από μολυσμένες επιφάνειες ή συσκευές και δίνουν συνήθως ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα, λόγω διάσπασης του RNA (Rahbari, et al., 2021).

Όπως και στην προαναλυτική έτσι και στην αναλυτική φάση, η PCR μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από την παρουσία σκόνης ή πούδρας των γαντιών, αλάτων, απορρυπαντικών και οργανικών μορίων. Οι συνθήκες εκχύλισης και πραγματοποίησης της PCR θα πρέπει να είναι άσηπτες και τα διάφορα στάδια να εκτελούνται με απόλυτη προσοχή από το ιατρικό και επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου. Τέλος, η υπερϊώδης ακτινοβολία μπορεί να μειώσει την ευαισθησία της διαδικασίας, οπότε το εκχυλισμένο RNA δεν θα πρέπει να εκτίθεται σε τέτοιου είδους ακτινοβολία, που συχνά χρησιμοποιείται για αποστείρωση του θαλάμου εργασίας (Younes, et al., 2020).

Είναι σημαντικό η κάθε φάση της μεθοδολογίας να εκτελείται με μεγάλη προσοχή και οι απαιτούμενοι αναλυτές να βρίσκονται σε διαφορετικούς χώρους για την αποφυγή επιμόλυνσης κατά τη διενέργεια του κάθε σταδίου. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία εκχύλισης, όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε φυγόκεντρος, είτε αναλυτής για εκχύλιση με χρήση μαγνητικών σφαιριδίων, να βρίσκεται σε διαφορετικό χώρο από αυτόν στον οποίο διενεργείται ο πολλαπλασιασμός και βρίσκεται ο αναλυτής της PCR <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.

Σε ότι αφορά τα αντιδραστήρια, όπως είναι οι εκκινητές και οι ανιχνευτές, τα οποία διατηρούνται σε θερμοκρασία των -20°C , διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην εμφάνιση σφαλμάτων. Η επαναλαμβανόμενη ψύξη και απόψυξη επηρεάζει την

αποτελεσματικότητα των αντιδραστηρίων, ειδικά αυτών που απαιτούν συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες και μειώνει την σταθερότητά τους. Το ίδιο ισχύει και για τα φθοριοχρώματα, τα οποία με λαθεμένη διαχείριση και αποθήκευση μπορεί να καταστραφούν και να συμβεί διάχυση του χρώματός τους και ως τελικό αποτέλεσμα να υπάρχει μειωμένο σήμα. Έτσι κάθε είδος αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείται στην διαδικασία αυτή θα πρέπει να διαχειρίζεται σωστά και σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας, ώστε να μην εκτίθεται σε συνθήκες φωτός ή συχνής απόψυξης (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>)

Επιπρόσθετα, η μη σωστή χρήση της πιπέτας μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία σφαλμάτων. Η επιμόλυνσή της αλλά και η λανθασμένη βαθμονόμησή της έχει μεγάλες πιθανότητες να οδηγήσει σε κακής ποιότητας εκχυλισμένο προϊόν με χαμηλής περιεκτικότητας ή καθαρότητας γενετικό υλικό. Οι πιπέτες που χρησιμοποιούνται για την διαδικασία εκχύλισης θα πρέπει να είναι διαφορετικές από εκείνες που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία της PCR (Younes, et al., 2020).

Έχει αναφερθεί πως δείγματα με χαμηλό ιικό φορτίο μπορεί να ερμηνευτούν ως ψευδώς αρνητικά στην rRT-PCR. Επιστήμονες όπως οι Falzone και οι συνεργάτες του, υποστηρίζουν πως το ιδανικότερο θα ήταν τα δείγματα να ελέγχονται με την μέθοδο της ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR), η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα. Έτσι για να βελτιωθεί η διάγνωση του ασθενών με COVID-19 και για να επιβεβαιωθεί η πλήρης ανάρρωσή τους συνίσταται περαιτέρω έλεγχος με την ψηφιακή PCR. Ωστόσο αυτό δεν καθίσταται εφικτό στα περισσότερα εργαστήρια και λόγω φόρτου εργασίας και λόγω υψηλού κόστους (Falzone, et al., 2020).

Μετα-αναλυτική φάση

Η COVID-19 είναι μία λοίμωξη πολύ πρόσφατη στην εμφάνισή της και το επιστημονικό και ιατρικό προσωπικό καθημερινά εξοικειώνεται και εμπλουτίζει όλο και περισσότερα τις γνώσεις του σχετικά με τη νόσο, τη διάγνωση και τη διαχείρισή της. Εντούτοις, υπάρχει έλλειψη σαφών πληροφοριών σε ό,τι αφορά τα μετα-αναλυτικά σφάλματα, τα οποία αποτελούν μία από τις πιο κοινές πηγές σφαλμάτων. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από το επιστημονικό προσωπικό είναι το συνηθέστερο σημείο πιθανού σφάλματος. Με βάση τα περισσότερα πρωτόκολλα

ερμηνείας των αποτελεσμάτων, θετικά για τον ιό SARS-CoV-2 δείγματα ορίζονται αυτά που έχουν $Ct < 40$. Δείγματα στα οποία το Ct κυμαίνεται από 37 έως 40 θα πρέπει οπωσδήποτε να επανελέγχονται ή και να συνιστάται έλεγχος νέου δείγματος. Δείγματα με $Ct > 40$ θα πρέπει να θεωρούνται αρνητικά και επί ισχυρής κλινικής υποψίας συνιστάται επανέλεγχος (Tang, et al., 2020).

Στην περίπτωση που ο εσωτερικός μάρτυρας των δειγμάτων δεν δώσει την κλασική αναμενόμενη καμπύλη σχήματος S, τόσο για τα θετικά όσο και για τα αρνητικά δείγματα, τότε θα πρέπει να επαναληφθεί η διαδικασία της PCR για τα συγκεκριμένα δείγματα. Πρόκειται για μία εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο και έτσι η διαχείριση των δειγμάτων, η ποιότητα των αναλυτών, η βαθμονόμηση του εξοπλισμού και η θερμοκρασία μπορεί να ευθύνονται για μη αξιόπιστα αποτελέσματα και για αυτό τον λόγο είναι εξαιρετικής σημασίας η χρήση των εσωτερικών ελέγχων-μαρτύρων και σε περίπτωση μη σωστής λειτουργίας τους πρέπει να επαναληφθεί η διαδικασία από την αρχή (Rahbari, et al., 2021).

Η βέλτιστη αποτελεσματικότητα της μεθόδου rRT-PCR αντιστοιχεί σε 90-110%, ενώ αν αυτό ξεπεραστεί τότε επηρεάζεται η αποδοτικότητά της, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων. Από την άλλη αν η αποδοτικότητα είναι κάτω από το 90% τότε αυτό μπορεί να οφείλεται σε μη σωστές συγκεντρώσεις των εκκινητών ή συντήρηση σε ακατάλληλες θερμοκρασίες. Συμπερασματικά για να λαμβάνονται σωστά αποτελέσματα, η αποδοτικότητα θα πρέπει να κυμαίνεται εντός των φυσιολογικών ορίων και μην τα ξεπερνάει τα προς τα κάτω ή προς τα πάνω όρια (Rahbari, et al., 2021).

5.3.3. Μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων

Οι μοριακές μέθοδοι ισοθερμικού πολλαπλασιασμού των νουκλεϊκών οξέων προσφέρουν πολλά στην ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2. Μπορούν να χαρακτηριστούν ως δοκιμασίες POC (point-of-care) και να αντικαταστήσουν σε κάποιες περιπτώσεις τις συμβατικές μεθόδους PCR, κυρίως επιτυγχάνοντας ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση του SARS-CoV-2 με οικονομικό, εύκολο και φιλικό προς τον χρήστη τρόπο.

5.3.3.1 : Ισοθερμική ενίσχυση αντίστροφης μεταγραφής με την μεσολάβηση βρόγχου (loop-mediated isothermal amplification LAMP, RT-LAMP)

Η μέθοδος ισοθερμικής ενίσχυσης LAMP έχει να προσφέρει μία λιγότερο χρονοβόρα και πιο οικονομική ανίχνευση σε σύγκριση με τη RT-PCR. Η αντίστροφη μεταγραφή σε συνδυασμό με την ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόγχου (RT-LAMP) συνιστούν μία μέθοδο ταχείας ανίχνευσης ριβονουκλεϊκού οξέος που μπορεί να ενισχύσει το παραγόμενο cDNA σε 13-20 λεπτά χρησιμοποιώντας μετατόπιση κλώνου πολυμεράσης DNA σε μία σταθερή θερμοκρασία 60-65 °C, γεγονός που την καθιστά εύκολη στη χρήση με μία μόνο απλή συσκευή, παρόλο που χρησιμοποιεί 4-8 ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές. Το τελικό στάδιο της αντίδρασης μπορεί να γίνει ορατό και να παρατηρηθεί μέσω φωτομετρίας, όπου η θολερότητα που προκαλείται οφείλεται στην καθίζηση πυροφωσφορικού μαγνησίου ή κάποιας φοριζουσας χρωστικής (Wang, et al., 2020).

Επιπλέον, αρκετές μελέτες, που συνέκριναν την RT-LAMP με την rRT-PCR έδειξαν υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους rRT-PCR (Kashir and Yaqinuddin, 2020). Οι παραπάνω δυνατότητες έχουν καταστήσει τη συγκεκριμένη μέθοδο ως ισχυρό εναλλακτικό εργαλείο για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 (Huang, et al., 2020).

5.3.3.2. Άλλες μέθοδοι ισοθερμικές ενίσχυσης

Άλλες διαθέσιμες τεχνικές ισοθερμικής ενίσχυσης περιλαμβάνουν αλληλουχοεξαρτώμενη ενίσχυση νουκλεϊκού οξέος (nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), ενίσχυση πολυμεράσης ανασυνδυασμού (recombinase polymerase amplification, RPA), ενίσχυση με μεσολάβηση μεταγραφής (transcription-mediated amplification, TMA), ενίσχυση μέσω εκτόπισης αλυσίδας (strand displacement amplification, SDA) και ενίσχυση εξαρτώμενη από ελικάση (helicase-dependent amplification HDA). Όλα τα παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων (Oishee, et al., 2021). Όλες αυτές οι ποικίλες δοκιμασίες είναι εύκολες στη χρήση απαιτώντας μόνο ένα σύστημα διατήρησης σταθερής θερμοκρασίας, όπως ένα θερμομπλόκ σωληναρίων ή ένα υδατόλουτρο. Έχουν ήδη αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφορετικών βακτηριών, παρασίτων και ιών συμπεριλαμβανομένου και του SARS-CoV-2 (Oishee, et al., 2021).

Έχει προταθεί μία δοκιμασία με την ονομασία INSIGHT (Isothermal NASBA-Sequencing based HIGH-throughout Test) για ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 και περιλαμβάνει δοκιμές σε δύο στάδια. Ενίσχυση με βάση την τεχνική NASBA, η οποία επιτυγχάνεται στους 41°C και τεχνολογίες αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS). Η παρακολούθηση της ενίσχυσης και η ταχεία απόδοση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω ανίχνευσης φθορισμού ή πλευρικής ροής, ειδικά για την αλληλουχία στο πρώτο στάδιο, που εξακριβώνεται περαιτέρω από την αλληλούχιση NGS. Παρέχει υψηλή ακρίβεια ανιχνεύοντας 10-100 αντίγραφα ανά αντίδραση σε δείγμα σιέλου που δεν έχει υποστεί εκχύλιση νουκλεϊκών (Wu, et al., 2020).

Σχετικά πρόσφατα, η δοκιμή TMA έδειξε υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία, γύρω στο 98%, και ειδικότητα (περίπου 100%), για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ρινοφαρυγγικά δείγματα σε σύγκριση με την RT-PCR (Gorzalski, et al., 2020).

Επιπρόσθετα, ένα διαγνωστικό τεστ το οποίο είναι βασισμένο στη δοκιμή RPA, το οποίο έχει λάβει την ονομασία Fast Isothermal Nucleic Acid Detection (FIND) έχει σχεδιαστεί αποκλειστικά για την ανίχνευση της νόσου COVID-19 (Qian, et al., 2020). Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί και χρησιμοποιούνται στη μέθοδο αυτή αφορούν τόσο το γονίδιο N, όσο και το S του SARS-CoV-2 και έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν ιικό RNA σε εξαιρετικά χαμηλό αριθμό αντιγράφων ιικού γονιδιώματος όπως είναι τα δύο αντίγραφα ανά μL . Χρησιμοποιώντας ως βάση τη μέθοδο RPA

αναπτύχθηκε και η ενίσχυση αντίστροφης μεταγραφής ενζυμικού ανασυνδυασμού (reverse transcription–enzymatic recombinaise amplification, RT-ERA) που πρόκειται για μία πολύ ευαίσθητη προσέγγιση για τον SARS-CoV-2, σε χαμηλό όριο ανίχνευσης (Xia and Chen, 2020).

5.3.3.3. Μέθοδος CRISPR (clustered regularly interspaced palindromic repeats)

Η ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων με βάση τις παρεμβαλλόμενες παλίνδρομες επαναλήψεις, που εμφανίζονται ομαδοποιημένες με κανονικότητα στο γονιδίωμα (CRISPR), έχει τη δυνατότητα να προσφέρει ένα γρήγορο, οικονομικό και εξαιρετικά ευαίσθητο εργαλείο για την ανίχνευση διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών.

Για τον ιό SARS-CoV-2 έχουν προταθεί συστήματα CRISPR που χρησιμοποιούν παράπλευρη καταλυτική δραστηριότητα διαφορετικών ενζύμων Cas, όπως είναι τα Cas 12, Cas-12a, Cas 13 και Cas 9 για την ανίχνευση του στόχου RNA. (Oishee, et al., 2021). Η εργαστηριακή αυτή δοκιμασία λειτουργεί με την χρήση ενός σημασμένου νουκλεϊκού οξέος, το οποίο έχει ειδικά ενισχυθεί με μία συμβατική PCR ή με κάποια ισοθερμική μέθοδο ενίσχυσης και το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα δραστικά μόρια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα σήματα που παράγονται μπορούν να ανιχνευτούν με φθορισμό ή με μέθοδο πλευρικής ροής (Nouri, et al., 2021).

Πρόσφατα, κυκλοφόρησαν δύο εμπορικά διαθέσιμα κιτ, το SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking) και το DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter), τα οποία είναι αποκλειστικά για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 ιού (Ding, et al., 2020).

Το SHERLOCK στοχεύει στους ιικούς γενετικούς τόπους S και ORF1ab για να εντοπίσει την παρουσία του ιού. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί το ένζυμο Cas 13 που συνδυάζεται με δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ομόλογες προς τους δύο γενετικούς τόπους που στοχεύει. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει 100% ειδικότητα και ευαισθησία 97 και 100%, ανάλογα της ανάγνωσης με φθορισμό ή σύστημα πλευρικής ροής (Patchesung, et al., 2020).

Το σύστημα DETECTR περιλαμβάνει δοκιμασία, η οποία αρχικά εκτελεί ταυτόχρονα αντίστροφη μεταγραφή και ενίσχυση με τη ισοθερμική μέθοδο RT-LAMP για RNA σε ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά δείγματα και στη συνέχεια η ανίχνευση γίνεται με χρήση του ενζύμου Cas 12 για προκαθορισμένες αλληλουχίες του κορωνοϊού. Οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί έχουν ως στόχο τα γονίδια E και N για τον SARS-CoV-2 (για άλλους ιούς SARS στόχος είναι μόνο η περιοχή E). Όλη η διαδικασία μπορεί να εκτελεστεί σε περίπου 30-40 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται οι διασταυρούμενες αντιδράσεις και μπορεί να ανιχνεύσει δέκα

αντίγραφα RNA ανά μL και αυτό επιτυγχάνεται με ευαισθησία 95% και ειδικότητα 100% (Broughton, et al., 2020).

5.3.4. Μεταγονιδιωματικός προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς (mNGS)

Ο μεταγονιδιωματικός προσδιορισμός αλληλουχίας επόμενης γενιάς (metagenomic Next-Generation Sequencing, mNGS) είναι η πιο σύγχρονη μέθοδος αλληλούχισης, με την οποία πραγματοποιείται η ανάγνωση μια αλληλουχίας DNA ή RNA με την μέγιστη δυνατή ακρίβεια και επαναληψιμότητα και αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στα κλινικά ή ερευνητικά εργαστήρια, ανεξάρτητα από την εφαρμογή των κλασικών μεθόδων. Μελέτες σε περισσότερες από 20 χώρες από το 2008 και μετά, έχουν αποδείξει την πρακτικότητα αλλά και την αποτελεσματικότητα του mNGS στη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών (Grada and Weinbrecht, 2013). Πρόκειται για μεθοδολογία που αναγνωρίζει και ταυτοποιεί σπάνια, νέα, δύσκολα ανιχνεύσιμα και μολυσματικά παθογόνα, απευθείας από κλινικά δείγματα. Οι τεχνολογίες NGS αποτελούν την εξέλιξη μιας αρκετά παλαιότερης τεχνολογίας, γνωστής ως μέθοδο προσδιορισμού Sanger, που ανακαλύφθηκε το 1975 από τον Edward Sanger (Sanger, et al., 1977). Ωστόσο, η χρήση της Sanger για την πραγματοποίηση αλληλούχισης ενός ολόκληρου γονιδιώματος ήταν αρκετά δαπανηρή, επίπονη και χρονοβόρα (π.χ. η αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδιώματος διήρκησε 13 ολόκληρα χρόνια) και για αυτό αντικαταστάθηκε (Behjati and Tarpey, 2013). Η τεχνολογία NGS πρωτοστάτησε στις αρχές του 21ου αιώνα και έδωσε την δυνατότητα στους επιστήμονες να εντοπίσουν την αλληλουχία χιλιάδων έως και εκατομμυρίων μορίων DNA. Έκτοτε, οι τεχνολογίες NGS έχουν αλλάξει και έχουν εμφανιστεί καινούργιες και βελτιωμένες με τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες την Life Technologies Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) και την Illumina MiSeq (Grada and Weinbrecht, 2013).

Για την εφαρμογή μιας NGS τεχνολογίας είναι απαραίτητα 1-5 μg καθαρού DNA ή RNA (Berglund, et al., 2011). Στη συνέχεια, αυτό το γονιδίωμα περνάει στη φάση όπου κατακερματίζεται και δημιουργούνται βιβλιοθήκες (DNA ή συμπληρωματικού DNA (cDNA), οι οποίες στη συνέχεια ενισχύονται περαιτέρω (Quail, et al., 2012). Μετά τη δημιουργία των βιβλιοθηκών, τα θραύσματα που έχουν στοχευθεί, ενισχύονται μέσα από μια διαδικασία διαδοχικών κύκλων πολυμερισμού με την ενσωμάτωση ελεύθερων νουκλεοτιδίων, ώστε να δημιουργηθούν νέα θραύσματα. Καθώς τα νουκλεοτίδια ενσωματώνονται στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA,

ταυτόχρονα καταγράφονται ψηφιακά ως αλληλουχία. Η PGM τεχνολογία, για την ανίχνευση πληροφοριών, βασίζεται στην ανίχνευση των αλλαγών του pH που πραγματοποιούνται κατά την απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου κατά την διάρκεια της ενσωμάτωσης του κάθε νουκλεοτιδίου στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA. Από την άλλη, η τεχνολογία MiSeq βασίζεται στην ανίχνευση του φθορισμού που δημιουργείται κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων που είναι σημασμένα με φθορισμό. Αφού ολοκληρωθεί η δημιουργία της αλληλούχισης, τα δεδομένα αναλύονται σε διάφορα στάδια. Η ανάλυση αυτή, μπορεί να προσφέρει μία μεγάλη ποικιλία δεδομένων, όπως είναι η γενετική παραλλαγή, η ανίχνευση νέων γονιδίων ή ρυθμιστικών στοιχείων, η αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης της μεταγραφής, η ταυτοποίηση είτε σωματικής, είτε βλαστικής μετάλλαξης καθώς και δεδομένων που μπορεί να συμβάλουν στη διάγνωση μιας ασθένειας, όπως της COVID-19 (Safiabadi Tali, et al., 2021).

Για γονιδιώματα SARS-CoV-2 < 30 kb, αλληλουχίες υψηλής ποιότητας μπορούν εύκολα να ληφθούν με NGS απευθείας από κλινικά δείγματα χρησιμοποιώντας π.χ. στρατηγικές εμπλουτισμού, για να ευνοηθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των ιικών στόχων (Nasir, et al., 2020). Η κατανόηση μέσω του mNGS της γονιδιωματικής αλληλουχίας του SARS-CoV-2 που λαμβάνεται από κλινικά δείγματα, μπορεί να βοηθήσει στη διάγνωση, στον εντοπισμό της προέλευσης της πανδημίας COVID-19, στην οριοθέτηση περιστατικών μετάδοσης, στην αποκάλυψη ενδείξεων για την παθογένεση και στην παρακολούθηση της εξέλιξης του ιού με την πάροδο του χρόνου μέσω της ανίχνευσης των μεταλλάξεών του (Safiabadi Tali, et al., 2021). Η mNGS τεχνολογία αποτελεί αξιόπιστη λύση για ανίχνευση και ανάλυση μεταλλάξεων σε επιδημιολογικές μελέτες, μελέτες επιτήρησης και κατανόησης της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή έναντι στον SARS-CoV-2 (Oishee, et al., 2021). Παρά τις δυνατότητες για το NGS ως διαγνωστικό εργαλείο, θα πρέπει επίσης να αναγνωριστούν οι περιορισμοί της αλληλουχίας γονιδιώματος SARS-CoV-2 με χρήση τεχνολογιών NGS. Για παράδειγμα, οι τεχνολογίες NGS αμφισβητούνται για δείγματα με χαμηλό ιικό φορτίο, καθώς λαμβάνονται ανεπαρκή δεδομένα ή κακής ποιότητας για μεταγενέστερες αναλύσεις, ενώ γίνονται προσπάθειες περιορισμού της παραμέτρου αυτής με διαδικασίες εμπλουτισμού του στόχου (Nasir, et al., 2020). Επιπρόσθετα, το κόστος της τεχνολογίας NGS είναι ακόμη εξαιρετικά υψηλό και αν σε αυτά προστεθεί η πολυπλοκότητα της ροής εργασιών NGS και η δυσκολία ανάλυσης του μεγάλου όγκου δεδομένων που παράγονται, καθιστούν την τεχνολογία NGS σχεδόν απαγορευτική, προς το παρόν, για την πλειοψηφία των διαγνωστικών εργαστηρίων,

ενώ συνίσταται η διενέργειά της από κεντρικά εργαστήρια αναφοράς (Safiabadi Tali, et al., 2021).

5.3.5. Ορολογικές μέθοδοι

Οι ορολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων που παράγονται από την ανοσοαπόκριση του ανθρώπινου ξενιστή κατά τη μόλυνση από τον SARS-CoV-2, ενώ εναλλακτικά μπορεί να προσδιορίσουν πρωτεΐνες-αντιγόνα του ιού που υπάρχουν στα δείγματα του αναπνευστικού συστήματος.

Με την είσοδο του ιού στο ανθρώπινο σώμα προκαλείται ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος για την παραγωγή αντισωμάτων κατά του ιού. Αυτή η ανίχνευση των αντισωμάτων είναι σημαντική, είτε σε συμπτωματικό, είτε σε ασυμπτωματικό άτομο. Ωστόσο, παρά την εγκυρότητα αυτής της εξέτασης δεν αποτελεί διαγνωστική μέθοδο που μπορεί να ανιχνεύσει την ενεργότητα ενός περιστατικού με μόλυνση από τον SARS-CoV-2 (Brigger, et al., 2021).

Οι ορολογικές μέθοδοι προσδιορισμού αντισωμάτων έχουν ως βασικό μειονέκτημα την περιορισμένη ευαισθησία τους, ειδικά όταν πρόκειται για τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, όπου ο ξενιστής δεν έχει αναπτύξει, σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, ειδικά αντισώματα για τον ιό. Τα αντισώματα που αναπτύσσονται σε μόλυνση από SARS-CoV-2 είναι της τάξης των IgM, IgA και IgG με τα δύο πρώτα να ανιχνεύονται νωρίτερα. Η παραγωγή των αντισωμάτων ξεκινά μετά την πρώτη εβδομάδα της μόλυνσης και η ανίχνευσή τους είναι συνήθως δυνατή από τη δεύτερη εβδομάδα. Αυτή η χρονική καθυστέρηση παραγωγής και ανίχνευσης των αντισωμάτων επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και περιορίζει την εφαρμογή της κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης (Emmerich, et al., 2021). Ο κατάλληλος χρόνος για τη συλλογή του δείγματος και τον προσδιορισμό των αντισωμάτων είναι περίπου 14-15 μέρες μετά την μόλυνση, αλλά μία αρχική εκτίμηση μπορεί να γίνει μετά από 5-7 μέρες, όπου μπορεί σπάνια να παρατηρηθεί πρώιμα ορομετατροπή. Τα IgM παραμένουν ενεργά για μικρότερο χρονικό διάστημα, εντούτοις χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθεί το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η μόλυνση του ασθενούς (Caruana, et al., 2020).

Επιπρόσθετα, η ειδικότητα αυτής της εξέτασης επηρεάζεται από το φαινόμενο των διασταυρούμενων αντιδράσεων, όπου ανιχνεύονται αντισώματα, τα οποία δεν αφορούν τον SARS-CoV-2, αλλά είναι ειδικά έναντι άλλων ιών που ανήκουν ή όχι στην ίδια οικογένεια. Οι περισσότεροι από τους κορωνοϊούς, που προσβάλλουν τον άνθρωπο σχετίζονται στενά αντιγονικά, με κίνδυνο εμφάνισης τέτοιων αντιδράσεων.

Ωστόσο, αυτό το πρόβλημα μπορεί να υπερκεραστεί με δοκιμασίες εξουδετέρωσης, κάτι που είχε προταθεί από τον Π.Ο.Υ κατά την πρώτη πανδημία από τον ιό SARS το 2003. Η πλειοψηφία των ορολογικών εξετάσεων παρουσιάζουν ειδικότητα μεγαλύτερη από 98% (Robert and Arkadiusz, 2020).

Εύλογο ήταν να υπάρξει ανησυχία για την συσχέτιση του ιού SARS-CoV-1 και SARS-CoV-2 και κατά πόσο μια ορολογική μέθοδος θα μπορούσε να ανιχνεύσει και να διαφοροδιαγνώσει με υψηλή ειδικότητα την προέλευση των αντισωμάτων. Ωστόσο, η υψηλή ειδικότητα που σχετίζεται με την πρωτεΐνη S επιβεβαιώθηκε από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στους επιτόπους της πρωτεΐνης της ακίδας του ιού SARS-CoV-2, η οποία έδειξε ότι παρόλες τις ομοιότητες των δύο ιών, ο SARS-CoV-2 της COVID-19 λοίμωξης εμφανίζει νέους επιτόπους αντισωμάτων. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αντισώματα έναντι του SARS-CoV-1 δεν είναι αποτελεσματικά για τον SARS-CoV-2, ενώ ταυτόχρονα ενισχύεται η ειδικότητα της ορολογικής εξέτασης, όταν χρησιμοποιεί ως στόχο την πρωτεΐνη S της ακίδας (Caruana, et al., 2020).

Μετά από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κίνα από τους Xiang, et al, διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή μεθόδου ELISA για την ανίχνευση των IgM και IgG αντισωμάτων σε COVID-19 λοίμωξη, ήταν πολύ ειδική. Μερικά από τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι :

→ σε επιβεβαιωμένα θετικούς ασθενείς, η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανίχνευσης των IgM αντισωμάτων ήταν 77,3 % και 100% και της ανίχνευσης των IgG αντισωμάτων ήταν 83,3% και 95,0% αντίστοιχα, και

→ σε ασθενείς με υποψία αλλά όχι επιβεβαιωμένη νόσο, η ευαισθησία για τα IgM ήταν 87,5% και η ειδικότητα 100%, ενώ για τα IgG ήταν 70,8% και 96,6% αντίστοιχα (Xiang, et al., 2020).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα των ορολογικών δοκιμασιών μπορεί να επηρεαστεί επίσης από το αντιγόνο-στόχο. Οι μέθοδοι ανοσοπροσρόφησης (ELISA) χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα δέσμησης σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος για την ανίχνευση ειδικών IgA, IgM και/ή IgG έναντι πρωτεϊνών S (κυρίως RBD) ή/και N ικών πρωτεϊνών του SARS-CoV-2, καθώς αυτές είναι άκρως ανοσογόνες και αποτελούν στόχο πολλών εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Σύμφωνα με όσα επισημάνθηκαν από τους Meyer, et al, η ανίχνευση της πρωτεΐνης S, μιας σημαντικής πρωτεΐνης του ιού, η οποία ανιχνεύεται σε πιο προχωρημένο στάδιο της λοίμωξης, έχει χαμηλότερα επίπεδα ευαισθησίας και υψηλότερα ειδικότητας (ειδικά για την

υπομονάδα S1), συγκριτικά με την πρωτεΐνη N (Meyer, et al., 2014 , (Chansaenroj, et al., 2021). Άλλες μελέτες εντούτοις έδειξαν ότι τα αντισώματα κατά της πρωτεΐνης N μειώνονται νωρίτερα από τα αντίστοιχα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης S. Έτσι, όταν η ορολογική μέθοδος αποσκοπεί αποκλειστικά στην πρωτεΐνη N, η ευαισθησία της μπορεί να μειώνεται ανάλογα με τον χρόνο της μόλυνσης. Αυτοί είναι και οι λόγοι που προτείνεται ο συνδυασμός ταυτόχρονης ανίχνευσης με στόχο την πρωτεΐνη S και την N για την διάγνωση, ενώ για οροεπιδημιολογικές μελέτες, συστήνεται η χρήση μεθόδων με στόχο την πρωτεΐνη S (Chansaenroj, et al., 2021).

Υπάρχουν διαφορετικές ορολογικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων, υψηλής ποιότητας, με ευαισθησία και ειδικότητα που πλησιάζουν ή και ξεπερνούν το 95% και 98% αντίστοιχα . Ενδεικτικά αναφέρονται:

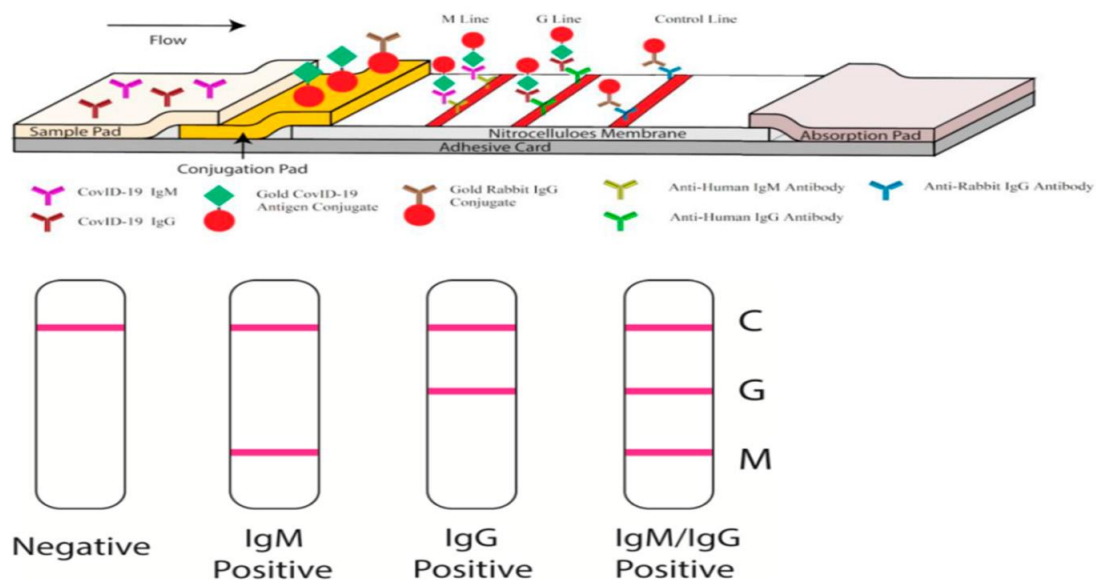
1. Ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (Lateral Flow Immuno Assay, LFIA), η οποία συχνά παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία συγκριτικά με τις άλλες προτεινόμενες μεθόδους (Εικόνα 23)
2. Ενζυμική ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays, ELISA)
3. Μέθοδος χημειοφωταύγειας (Chemi Luminescent Immuno Assays, CLIA) (Coste, et al., 2021)
4. Μέθοδοι ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων (neutralizing Antibodies, nAbs) (Oishee, et al., 2021)

Η ELISA και η CLIA αποτελούν τις κύριες ορολογικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται ευρέως στα διαγνωστικά εργαστήρια, καθώς επιτρέπουν ταυτόχρονα έλεγχο σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και απαιτούν λιγότερο προσωπικό για την πραγματοποίησή τους (Sidiq, et al., 2020). Στην ELISA έχουν χρησιμοποιηθεί αντιγόνα S, S1, RdRp και πρωτεΐνη N, με επικρατέστερο το S1, το οποίο είναι πιο ειδικό στην ανίχνευση αντισωμάτων για τον SARS-CoV-2. Εντούτοις, μελέτη με στόχο την πρωτεΐνη N, έδειξε 96% ευαισθησία και 100% ειδικότητα της μεθόδου για δείγματα ασθενών, τα οποία συλλέχθηκαν 15-30 μέρες μετά την μόλυνση με τον ιό SARS-CoV-2 (Caruana, et al., 2020).

Ο έλεγχος ορού αίματος για προσδιορισμό αντισωμάτων με ELISA παρέχει αξιόπιστα δεδομένα σχετικά με τα επίπεδα της νοσηρότητας, αλλά και της μόλυνσης του πληθυσμού. Επιπλέον, τα αξιόπιστα, γρήγορα και εξαιρετικά ευαίσθητα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση της κινητικής των αντισωμάτων κατά του SARS-CoV-2. Παρά το

πλεονέκτημα του ελέγχου ταυτόχρονα πολλών δειγμάτων, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ειδικής δέσμησης του αντισώματος και η μη δυνατότητα χρήσης της ELISA ως POCT περιορίζουν την ευρύτερη εφαρμογή της (Oishee, et al., 2021).

Η μεθοδολογία πλευρικής ροής (LFIA) είναι ένα διαγνωστικό εργαλείο ευρέως εφαρμόσιμο και αποδεκτό για το χαμηλό κόστος, το χαμηλό όριο ανίχνευσης, την ταχύτητα, την καλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα που τη χαρακτηρίζουν (Hellou, et al., 2021). Τέτοιες τεχνικές αναπτύχθηκαν για την ποιοτική ανίχνευση αντισωμάτων IgM και IgG σε πλήρες αίμα/ορό/πλάσμα έναντι του ιού SARS-CoV-2 με ευαισθησία και ειδικότητα 88,66% και 90,63%, αντίστοιχα (Oishee, et al., 2021). Άλλες δοκιμασίες πλευρικής ροής βασίστηκαν στη χρήση νανοσωματιδίων κολλοειδούς χρυσού για την ανίχνευση IgM αντισωμάτων έναντι της νουκλεοπροτεΐνης N του SARS-CoV-2 και συγκριτικά με την rRT-PCR έδειξαν ευαισθησία 100% και ειδικότητα 93,3% (Huang et al., 2020). Παρόλ' αυτά, η χρήση τους είναι σχετικά περιορισμένη, καθώς ως POC, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που δίνουν εγκυμονούν αύξηση του κινδύνου περαιτέρω διασποράς του ιού (Oishee, et al., 2021).



Εικόνα 23 : Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου προσδιορισμού αντισωμάτων πλευρικής ροής (LFIA) (Hellou, et al., 2021).

Οι ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι αναφοράς για την άμεση και έγκαιρη ανίχνευση της λοίμωξης από τον SARS-CoV-2. Πρόκειται για μία πανδημία, γρήγορα εξελισσόμενη και στόχος αποτελεί η ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση των κρουσμάτων μόλυνσης από τον ιό, στόχος που επιτυγχάνεται με τη rRT-PCR, που αποτελεί και μέθοδο αναφοράς για τη διάγνωση (Ernst, et al., 2021). Παρόλ' αυτά, οι ορολογικές μέθοδοι μπορούν να φανούν πολύ χρήσιμες ως μια εξέταση σε ασθενή με θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο αναφοράς, όπου δύναται επιπλέον να προσδιοριστεί το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η μόλυνση. Η χρησιμότητά τους μπορεί να αποδειχθεί σημαντική σε νοσούντα ασθενή, στον οποίο ο έλεγχος RT-PCR δεν διενεργήθηκε τη στιγμή της οξείας νόσου ή απέβη αρνητικός και ο ασθενής παρουσιάζει επίμονα, ήπια ή μη, συμπτώματα, όπως επίσης και στην ανίχνευση πρόσφατων ή παρελθόντων λοιμώξεων σε ασυμπτωματικά άτομα (Sethuraman, et al., 2020).

Τέλος, αποκρίσεις αντισωμάτων IgG μπορούν να ανιχνευθούν σε παιδιά με πολυσυστηματικό φλεγμονώδες σύνδρομο (Paediatric Inflammatory Multisystem Syndrome, PIMS ή Multisystem Inflammatory Syndrome in Children, MIS-C), τα οποία έχουν αρνητικό έλεγχο στην PCR. Το χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης IgM σε αυτούς τους ασθενείς είναι σύμφωνο με τη μόλυνση που έχει εμφανιστεί εβδομάδες πριν και με τη φάση ανάρρωσης που έχει επέλθει καθώς και με το γεγονός ότι η έναρξη του συνδρόμου εμφανίζεται πολύ μετά τον έλεγχο του ιικού φορτίου SARS-CoV-2. Αυτό υποδηλώνει ότι η ασθένεια σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος των παιδιών. Μεταξύ των αποκρίσεων IgG, κυριαρχεί κυρίως το IgG1, ενώ οι τίτλοι IgA στο MIS-C προσεγγίζουν συνήθως τα επίπεδα IgA οξείας μόλυνσης (Gruber, et al., 2020).

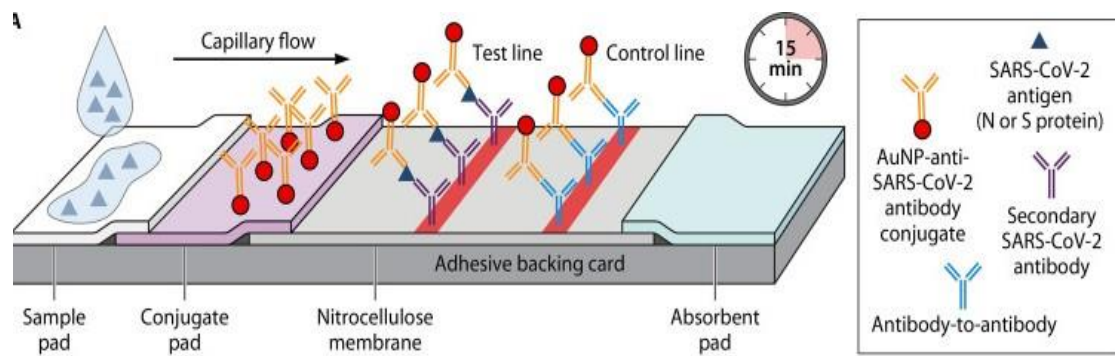
Οι ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης αντισωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο για διαγνωστικούς αλλά κυρίως για επιδημιολογικούς σκοπούς, προκειμένου να αξιολογηθεί το μέγεθος της πανδημίας, ο ρυθμός με τον οποίο αυτή εξαπλώνεται, καθώς και η ανοσολογική απάντηση μετά από τον εμβολιασμό. Ένας τέτοιος ορολογικός έλεγχος και ιδιαίτερα με χαρακτηριστικά POCT, θα είναι οικονομικός και απλός στην εκτέλεσή του, άρα προσιτός και εφαρμόσιμος από δομές υγείας ή νοσοκομεία και θα μπορούσε να διευκολύνει τη διερεύνηση μη συμπτωματικών ασθενών και να βοηθήσει στην πορεία της πανδημίας και στην αντιμετώπισή της (Caruana, et al., 2020).

Η ταχέως αναδύομενη και εξελισσόμενη πανδημία δημιούργησε τεράστια ανάγκη γρήγορης, αποτελεσματικής και ιδανικά οικονομικής μεθόδου ανίχνευσης των θετικών κρουσμάτων. Έχουν διατεθεί εμπορικά αντιδραστήρια ανίχνευσης αντιγόνου του ιού (Antigen-detecting rapid diagnostic tests, Ag-RDTs), τα οποία είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, οικονομικά και δίνουν αποτελέσματα άμεσα, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (Oishee, et al., 2021). Πραγματοποιούνται σε ρινικά ή ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα, καθώς και άλλα δείγματα αναπνευστικού και βασίζονται κυρίως σε μεθόδους ανοσοχρωματογραφίας πλευρικής ροής (Εικόνα 21) (Safiabadi Tali, et al., 2021). Μελέτες έχουν δείξει ότι δοκιμασίες Ag-RDTs που εφαρμόστηκαν αρκετές μέρες μετά την έκθεση, σε ασυμπτωματικές επαφές επιβεβαιωμένων κρουσμάτων, είχαν απόδοση συγκρίσιμη με αυτή που παρατηρείται σε συμπτωματικές περιπτώσεις, αλλά χαμηλότερη από αυτή των μοριακών μεθόδων (Schuit, et al., 2021). Τα Ag-RDTs έχουν καλύτερα αποτελέσματα σε άτομα με υψηλό ιικό φορτίο (τιμές Ct $\leq 25-30$, $\sim 10^5/6$ αντίγραφα RNA/mL), 1-3 ημέρες πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων και κατά τη διάρκεια των πρώτων 5-7 ημερών νόσου (Jones, et al., 2021). Σύμφωνα με την μετα-ανάλυση των Brummer et al., η υψηλότερη ευαισθησία των Ag-RDT σημειώθηκε για δείγματα επιχρίσματος ανώτερου αναπνευστικού (75,5% για πρόσθιο ρινικό και 71,6% για ρινοφαρυγγικό επίχρισμα) σε σύγκριση με άλλες τύπους δειγμάτων και η ευαισθησία και ειδικότητα των Ag-RDT ήταν 71,2% (95% CI 68,2% έως 74,0%) και 98,9% (95% CI 98,6% έως 99,1%), αντίστοιχα (Brümmer, et al., 2021).

Η εφαρμογή των Ag-RDTs έχει συμβάλει ουσιαστικά στην ταχύτερη διάγνωση των ύποπτων περιστατικών, στη σωστή διαχείρισή τους και στη μείωση της διασποράς του ιού και εξάπλωσης της πανδημίας. Πρόσφατα, ο FDA ενέκρινε κιτ ανίχνευσης αντιγόνου SARS-CoV-2 για ταχεία ανίχνευση COVID-19 (<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas>).

Ιδανικό σενάριο είναι να χρησιμοποιούνται τα POC τεστ ανίχνευσης αντιγόνου πρωταρχικά για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 και η μοριακή ανίχνευση να χρησιμοποιείται σαν κύρια επιβεβαιωτική επιλογή. Με αυτό τον τρόπο, θα επιτευχθεί μείωση των πόρων που απαιτούνται, συγκριτικά με τον μοριακό έλεγχο και άμεση ανίχνευση των ασθενών που νοσούν για τον περιορισμό της διασποράς. Το σημαντικότερο είναι να εξελίσσεται και να βελτιώνεται η τεχνική και η μεθοδολογία αυτών των τεστ, ώστε η ευαισθησία και η ειδικότητά τους, σε συνδυασμό με την

ταχύτητά τους να τα καθιστά απολύτως κατάλληλα και αξιόπιστα προς χρήση (La Marca, et al., 2020).



Εικόνα 24 : Σχηματική απεικόνιση ενός αντιγονικού Rapid Test με τη μέθοδο LFIA (Safiabadi Tali, et al., 2021).

Σε ό,τι αφορά τα αντισώματα εξουδετέρωσης, πρόκειται για αντισώματα τα οποία είναι αποτελεσματικά τόσο προφυλακτικά, όσο και θεραπευτικά με την χρήση του πλάσματος ανάρρωσης και μακροπρόθεσμα και στην ανάπτυξη εμβολίων. Εξουδετερώνουν τη δράση της πρωτεΐνης S της ακίδας και έχουν αναφερθεί δύο τύποι μεθοδολογιών εξουδετέρωσης, που βασίζονται στην εξουδετέρωση ψευδοϊού (Pseudovirus-Bases Neutralization Assays, PBNA) ή στην μικρο-εξουδετέρωση (Microneutralization Assays) του SARS-CoV-2 (Oishee, et al., 2021).

5.4. Βιοδείκτες που συμβάλουν στην διάγνωση της νόσου COVID-19

Εκτός από τις εργαστηριακές δοκιμασίες που είναι ειδικές για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2, υπάρχουν βιοδείκτες, που αποτελούν χρήσιμο εργαλείο, η παρακολούθηση ή αλλαγή των οποίων κατά την διάρκεια της νόσου είναι σημαντική για την αξιολόγηση της κλινικής πορείας του ασθενούς (Yusof and Haque, 2022). Τέτοιοι είναι ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), δείκτες ένδειξης φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP), η προκαλσιτονίνη (PCT), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η ταχύτητα καθίζησης ερυθροκυττάρων, το αμυλοειδές Α ορού, η φεριττίνη ορού, αντιπηκτικός έλεγχος (π.χ. d-dimers), βιοχημικός έλεγχος για τον προσδιορισμό της αμινοτρασφεράσης αλανίνης (ALT), της ασπαρτικής αμινοτρασφεράσης (AST), της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και της κινάσης κρεατινίνης (CK) (Zhang and Guo, 2020).

Όλοι αυτοί οι βιοδείκτες δεν έχουν υψηλή ευαισθησία ή ειδικότητα για την νόσο COVID-19. Κάποιες έρευνες έχουν δείξει ότι μόνο τρεις από αυτούς έχουν ειδικότητα και ευαισθησία πάνω από το 50% σε νοσούντες ασθενείς και αφορούν την μείωση των WBC και την αύξηση των δεικτών φλεγμονής CRP και IL-6 (Fajnzylber, et al., 2020). Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι βιοδείκτες δεν μπορεί να χρησιμοποιηθούν απόλυτα και μοναδικά για την αξιολόγηση της νόσου COVID-19, αλλά έχουν μεγάλη αξία στην διαχείριση των ασθενών καθώς μπορούν να συμβάλλουν στην αξιολόγηση της σοβαρότητας μίας κατάστασης αλλά και να αποτελέσουν παράγοντες κινδύνου για την έκβαση του ασθενούς. Σύμφωνα με τις οδηγίες, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δίνεται στην εμφάνιση λεμφοπενίας, ουδετεροπενίας και αυξημένων επιπέδων ALT, AST, LDH CRP και φεριττίνης ορού (Zheng, et al., 2020). Ασθενείς οι οποίοι έχουν νοσήσει σοβαρά έχουν πολύ αυξημένα επίπεδα των δεικτών φλεγμονής, ενώ πολύ αυξημένα d-dimers και λεμφοπενία έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θανάτου (Ceci, et al., 2022).

6. Συμπεράσματα

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια κατά της νόσου COVID-19, η συνεχιζόμενη εξάπλωση του ιού SARS-CoV-2 σε παγκόσμιο επίπεδο θέτει τις εργαστηριακές τεχνικές ανίχνευσής του ως το σημαντικότερο μέσο για το περιορισμό της διάδοσής του και την προάσπιση της δημόσιας υγείας. Η αξιολόγηση ενός αποτελέσματος και η διάγνωση θα πρέπει να γίνονται πάντα σε ένα ενιαίο πλαίσιο και σε συνδυασμό με μία πλήρη εκτίμηση της κατάστασης του ασθενούς. Η συμπτωματολογία, οι εργαστηριακοί έλεγχοι για κλινικούς βιοδείκτες και η διαγνωστική απεικονιστική προσέγγιση είναι πολύ σημαντικά στοιχεία που συμβάλλουν στη διάγνωση της λοίμωξης από τον SARS-CoV-2, αλλά δεν μπορούν να δώσουν από μόνα τους μία τελική επιβεβαιωμένη διάγνωση. Ο βασικός κρίκος που συνδέει όλα τα επιμέρους δεδομένα και οδηγεί σε ένα σαφέστερο αποτέλεσμα είναι ειδικές και συγκεκριμένες εργαστηριακές δοκιμασίες που θα οδηγήσουν σε μια σαφέστερη και ξεκάθαρη εικόνα.

Η πρόοδος στις εργαστηριακές μεθόδους διάγνωσης της λοίμωξης COVID-19 είναι μεγάλη και περιλαμβάνει κυρίως τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης του νουκλεϊκού οξέος του ιού και τις ορολογικές, με ανοσοενζυμικές ή ανοσοχρωματογραφικές δοκιμασίες πλευρικής ροής, που ανιχνεύουν είτε ειδικά ιικά αντιγόνα, είτε ειδικά IgM, IgG ή ολικά αντισώματα που παράγονται από τον ανοσοποιητικό σύστημα ως απάντηση στην μόλυνση από τον SARS-CoV-2.

Υπάρχει πλέον αξιοσημείωτος αριθμός διαθέσιμων μεθόδων ανίχνευσης του SARS-CoV-2, οι οποίες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να εκτιμούνται πάντα σε συνδυασμό με μία αξιολόγηση του γενικότερου πλαισίου μέσα στο οποίο γίνεται η επιβεβαίωση ή μη της μόλυνσης από τον ιό. Το πλαίσιο αυτό περιλαμβάνει, πλην της εκτίμησης του αποτελέσματος, δεδομένα που αφορούν την σωστή λήψη του δείγματος, τον χρόνο και τον τόπο της λήψης, την επιλογή της κατάλληλης ανατομικής θέσης λήψης του δείγματος, τη σωστή συντήρηση και μεταφορά του, αλλά και την εκτίμηση του ασθενούς με την ύπαρξη ή μη συμπτωμάτων ή το ιστορικό ύποπτης επαφής. Κλινικά δείγματα που λαμβάνονται από το κατώτερο αναπνευστικό θεωρείται ότι έχουν υψηλότερη διαγνωστική αξία από δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού, στα οποία εντούτοις το ρινοφαρυγγικό επίχρισμα φαίνεται να δίνει πολύ αξιόπιστα αποτελέσματα. Σε περιπτώσεις όπου ο αρχικός εργαστηριακός έλεγχος ασθενούς, για τον οποίον υπάρχει ισχυρή υποψία, είτε λόγω συμπτωμάτων συμβατών με COVID-19,

είτε λόγω ιστορικού στενής επαφής, είναι αρνητικός, πρέπει να επαναλαμβάνεται ο έλεγχος με κλινικά δείγματα από πολλαπλές θέσεις του αναπνευστικού συστήματος.

Η πανδημία του SARS-CoV-2 και η συνεχής ανάγκη για εξελισσόμενες, μεγαλύτερης ευαισθησίας και ειδικότητας, διαγνωστικές τεχνικές, οδήγησε στην εφαρμογή των μοριακών μεθόδων, όπως της real time RT-PCR, η οποία αποτελεί και την ευρύτερα αποδεκτή και εφαρμοζόμενη μέθοδο πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης. Καθώς ο ιός συνεχίζει να συνυπάρχει με άλλες λοιμογόνους ιούς, ύψιστης προτεραιότητας αποτέλεσε η εφαρμογή μιας πλήρους αυτοματοποιημένης μεθόδου διάγνωσης του ιού SARS-CoV-2 με ταυτόχρονη ανίχνευση και άλλων ιογενών αιτιολογικών παραγόντων, όπως του ιού της γρίπης και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού, που προσβάλλουν το αναπνευστικό σύστημα. Η συνεχιζόμενη ταχεία εξάπλωση του ιού, οδήγησε στην δημιουργία διαγνωστικών δοκιμασιών, που μειώνουν τον συνολικό χρόνο ανίχνευσης και τον τρόπο εξαγωγής αποτελεσμάτων. Παρόλο που ενός τέτοιου είδους αυτοματοποιημένη μοριακή τεχνική, που πραγματοποιεί PCR χωρίς να απαιτείται η εξαγωγή RNA, μείωσε τον χρόνο και το κόστος της εξέτασης, τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περιπτώσεις χαμηλού ιικού φορτίου κατά τα πρώτα στάδια της λοίμωξης, έθεσε αρκετά ερωτήματα και κριτήρια εφαρμογής της.

Η πρόβλεψη των εργαστηριακών σφαλμάτων που αφορούν τη διενέργεια της μοριακής εξέτασης, με την αποφυγή ιδιαίτερα των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αποτέλεσε κύρια προτεραιότητα στην βελτίωση των τεχνικών μοριακής ανίχνευσης. Η χρήση περισσότερων γονιδίων στόχων του ιού, έδωσε τη δυνατότητα ανίχνευσης του SARS-CoV-2, στις περιπτώσεις που λόγω μετάλλαξης στην περιοχή-στόχο δεν επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός ενός γονιδίου. Επιπρόσθετα, οι τεχνολογίες αλληλούχησης, όπως η mNGS θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εκτενέστερα καθώς αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την χαρτογράφηση της επιδημιολογίας της νόσου COVID-19, αλλά και την παρακολούθηση αλλαγών στην αλληλουχία του γονιδιώματος του SARS-CoV-2, ο οποίος εμφανίζει συχνά νέες μεταλλάξεις, που μπορεί να διαφεύγουν της ανίχνευσης με τις κλασικές μοριακές τεχνικές.

Καθώς η πανδημία εξελίσσεται, η συνεχής ανάγκη ταχέων και έγκαιρων αποτελεσμάτων οδήγησε στη δημιουργία και διάθεση γρήγορων εργαστηριακών τεχνικών και εφαρμογών POCT (point of care tests), που μπορεί να υπολείπονται ευαισθησίας συγκριτικά με τις μεθόδους αναφοράς, είναι εντούτοις χρήσιμες και αξιόπιστες με πολλές δυνατότητες εξέλιξης. Η ταχεία ανίχνευση, με μεθόδους ανοσοχρωματογραφίας, του SARS-CoV-2, όπου επιτυγχάνεται ποιοτική ανίχνευση

των πρωτεϊνών του ιικού σωματιδίου του SARS-CoV-2 σε δείγματα από το ανώτερο αναπνευστικό, χρησιμοποιείται ως μια πρωταρχική, γρήγορη εξέταση για την αναζήτηση της οξείας λοίμωξης ή μόλυνσης από τον ιό, για την παρακολούθηση της εξέλιξης της ιοφορίας των φορέων και για επιδημιολογικούς λόγους.

Η χρησιμότητα των υπόλοιπων ορολογικών μεθόδων αφορά την παρακολούθηση της ανοσιακής ανταπόκρισης του μολυσμένου από τον ιό ατόμου καθώς και της πορείας των αντισωμάτων του κατά τη διάρκεια και κυρίως μετά την πάροδο την νόσησης. Επιπρόσθετα, συμβάλλουν στη διάγνωση ασυμπτωματικών περιπτώσεων και σε όψιμες κλινικές οντότητες, χρονικά σχετιζόμενες με τον SARS-CoV-2, όπου λόγω μη μη διενέργειας ή αρνητικού αποτελέσματος ενός μοριακού ελέγχου, η ανοσιακή απάντηση αποτελεί τη μόνη ένδειξη πρόσφατης επαφής με τον ιό. Όλα τα παραπάνω, μπορούν εντούτοις να αξιολογηθούν τουλάχιστον δύο εβδομάδες από την έναρξη της μόλυνσης. Ο ορολογικός έλεγχος που στοχεύει στην ανίχνευση της ανοσιακής απάντησης, θα μπορούσε να γίνει ένα ενεργό εργαλείο στον έλεγχο της πανδημίας με τη βοήθεια του οποίου να δοθούν απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα, όπως πόσο διάστημα διαρκεί η ανοσία μετά από μία μόλυνση, αλλά και για τον ρόλο που έχουν τα T-κύτταρα μνήμης στην παθογένεια της λοίμωξης και την άμυνα του ανθρώπινου ξενιστή.

Η λοίμωξη COVID-19 και ο ιός SARS-CoV-2 εισήλθαν απότομα στη ζωή μας και όλες οι ενδείξεις συνηγορούν για την παραμονή τους για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, είτε συνεχόμενα, είτε σποραδικά. Οι θάνατοι που έχουν προκληθεί από τη λοίμωξη αγγίζουν έναν τεράστιο αριθμό και συνεχίζουν μέχρι και σήμερα να υπάρχουν καθημερινά απώλειες. Ωστόσο, η ανίχνευση του ιού είναι επιβεβλημένη και η ανάγκη για βελτίωση των μεθόδων διάγνωσης μια ανάγκη που πάντα θα στοχεύει στην ταχύτητα και ταυτόχρονα στην ποιότητα και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

7. Περίληψη

Ο SARS-CoV-2 είναι ένα ιός που ανήκει στην οικογένεια των βήτα κορονοϊών. Πρόκειται για έναν αρκετά μολυσματικό και εξαιρετικά μεταδοτικό ιό ο οποίος μπορεί να προκαλέσει από ήπια συμπτώματα έως σοβαρή νόσηση και θάνατο. Η επιστήμη ήρθε αντιμέτωπη με αυτό τον ιό στα τέλη του 2019 στην Κίνα και μέσα σε λίγους μήνες εξαπλώθηκε παγκοσμίως και έτσι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κήρυξε μία νέα πανδημία. Ο ιός αυτός προκαλεί λοίμωξη του αναπνευστικού γνωστή με την ονομασία COVID-19 και η αντιμετώπισή της βρίσκεται σε εξέλιξη έως και σήμερα. Με την εμφάνιση αυτής της πανδημίας, την πολύ εύκολη μετάδοση αλλά και την τεράστια διασπορά ήρθε αντιμέτωπο το ιατρικό και το επιστημονικό προσωπικό παγκοσμίως.

Τα αποτελεσματικά διαγνωστικά εργαλεία βρίσκονται στο επίκεντρο της προσοχής καθώς η γρήγορη και αξιόπιστη διεξαγωγή αποτελεσμάτων παίζουν πολύ βασικό ρόλο στη διαχείριση των ασθενών αλλά και στην προστασία της δημόσιας υγείας. Αυτή η εργασία εξετάζει τις τρέχουσες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 στα εργαστήρια και την πρόοδο που έχει γίνει. Καταγράφεται αναλυτικά η χρήση τους σε κάθε στάδιο της πανδημίας καθώς επίσης καλύπτει και θέματα που αφορούν τους κλινικούς βιοδείκτες, τον τόπο και το χρόνο δειγματοληψίας τα οποία συνδυαστικά οδηγούν σε καλύτερη φροντίδα των ασθενών. Η ικανότητα του ιού να προσαρμόζεται και να εξαπλώνεται ταχύτατα τον καθιστά ανθεκτικό γεγονός που εξηγεί την ικανότητα του να μεταλλάσσεται και να επιβιώνει σε όλα τα περιβάλλοντα.

Όσο η πανδημία προχωράει οι τεχνολογίες εξελίσσονται ταχέως καθώς και το βιβλιογραφικό υλικό που αφορούν τον ιό SARS-CoV-2. Αυτή η σύνοψη τονίζει θέματα κρίσιμα και ενδιαφέροντα που έχουν προκύψει κατά την πορεία της πανδημίας και όλα όσα έχει αυτή διδάξει. Η σωστή και άμεση διάγνωση θα οδηγήσει στην ευκολότερη υποστήριξη των κλινικών ιατρών και στην διαχείριση της πανδημίας.

8. Abstract

SARS-CoV-2 is a virus belonging to the beta coronavirus family. It is a highly infectious and highly contagious virus that can cause from mild symptoms to severe illness and death. Science came face to face with this virus at the end of 2019 in China and within a few months it spread worldwide and thus the World Health Organization declared a new pandemic. This virus causes a respiratory infection known as COVID-19 and its treatment is still ongoing. With the emergence of this pandemic, the very easy transmission but also the enormous dispersion, the medical and scientific staff worldwide came face to face.

Effective diagnostic tools are at the center of attention as fast and reliable results have a very key role in the management of patient but also in the protection of public health. This paper reviews the current technologies used to detect SARS0CoV-2 in laboratories and the progress that has been made. Their use at each stage of the pandemic is recorded in detail, as well as covering issues related to clinical biomarker, the place and time of sampling, which combined lead to better patient care. The ability of the virus to adapt and spread rapidly makes it resistant which explains its ability to mutate and survive in every environment.

As the pandemic progresses, technologies are evolving rapidly as well as the bibliographic material related to the SARS-CoV-2 virus. This summary highlights critical and interesting issues that have emerged over the course of the pandemic and all that it has taught. Correct immediate diagnosis will lead to easier support for clinicians and the management of the pandemic.

9. Βιβλιογραφία

1. Abduljalil, J. M. (2020) 'Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations', *New Microbes and New Infections*, 36(June), p. 100713. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100713.
2. Abduljalil, J. M. and Abduljalil, B. M. (2020) 'Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view', *New Microbes and New Infections*, 35, p. 100672. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100672.
3. Ali, N.Rampazzo, R. Costa, A. and Krieger, M. (2017) 'Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics', *BioMed Research International*, 2017. doi: 10.1155/2017/9306564.
4. Ambrosi, C. Prezioso, C. Checconi, P. Scribano, D. Sarshar, M. Capannari, M. Tomino, C. Fini, M. Garaci, E. Palamara, A.T. De Chiara, G. and Limongi, D. (2021) 'SARS-CoV-2: Comparative analysis of different RNA extraction methods', *Journal of Virological Methods*, 287, p. 114008. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114008.
5. Aranha, C. Patel, V. Bhor, V. and Gogoi, D. (2021) 'Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients', *Journal of Medical Virology*, 93(12), pp. 6794–6797. doi: 10.1002/jmv.27206.
6. Artika, I. M., Wiyatno, A. and Ma'roef, C. N. (2020) 'Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization', *Infection, Genetics and Evolution*, 81(September 2019). doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215.
7. Azzi, L. Maurino, V. Baj, A. Dani, M. d'Aiuto, A. Fasano, M. Lauldi, M. Sessa, F. and Alberio, T. (2021) 'Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2', *Journal of Dental Research*, 100(2), pp. 115–123. doi: 10.1177/0022034520969670.

8. Bartak, M. Slonska, A. Banbura, M.W. and Cymerys, J. (2021) 'SDAV, the rat coronavirus—How much do we know about it in the light of potential zoonoses', *Viruses*, 13(10). doi: 10.3390/v13101995.
9. Barthold, S. W. and Smith, A. L. (2007) 'Mouse Hepatitis Virus', *The Mouse in Biomedical Research*, 2, pp. 141–178. doi: 10.1016/B978-012369454-6/50034-0.
10. Basso, D. Aita, A. Navaglia, F. Franchin, E. Fioretto, P. Moz, S. Bozzato, D. Zambon, C.F. Martin, B. Dal Pra, C. Crisanti, A. and Plebani, M.(2020) 'SARS-CoV-2 RNA identification in nasopharyngeal swabs : issues in pre-analytics', 58(9), pp. 1579–1586.
11. Battilani, M. Coradin, T. Scagliarini, A. Ciulli, S. Ostanello, F. Prosperi, S. and Morganti, L. (2003) 'Quasispecies composition and phylogenetic analysis of feline coronaviruses (FCoVs) in naturally infected cats', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39(2), pp. 141–147. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00237-2.
12. Behjati, S. and Tarpey, P. S. (2013) 'What is next generation sequencing?', *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), pp. 236–238. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340.
13. Berglund, E. C., Kiiialainen, A. and Syvänen, A. C. (2011) 'Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics', *Investigative Genetics*, 2(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/2041-2223-2-23.
14. Bozidis, P. Tsaousi, T. E. Kostoulas, C. Sakaloglou, P. Gouni, A. Koumpouli, D. Sakkas, H. Georgiou, I. and Gartzonika, K. (2022) 'Unusual N Gene Dropout and Ct Value Shift in Commercial Multiplex PCR Assays Caused by Mutated SARS-CoV-2 Strain', *Diagnostics*, 12(4), pp. 1–9. doi: 10.3390/diagnostics12040973.
15. Brigger, D. Horn, M.P. and Pennington, L.F. (2021) 'Accuracy of serological testing for SARS-CoV-2 antibodies: First results of a large mixed-method evaluation study', *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(3), pp. 853–865. doi: 10.1111/all.14608.

16. Broughton, J. P. Deng, X. Yu, G. Fasching, C. L. Servellita, V. Singh, J. Miao, X. Streithorst, J. A. Granados, A. Sotomayor-Gonzalez, A. Zorn, K. Gopez, A. Hsu, E. Gu, W. Miller, S. Pan, C-Y. Guevara, H. Wadford, D. A. Chen, J. S. and Chiu, C. Y. (2020) 'CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2', *Nature Biotechnology*, 38(7), pp. 870–874. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4.
17. Cao, Y. Yang, R. Imshik, L. Wenwen, Z. Jiana, S. Wei, W. and Xiangfei, M. (2021) 'Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroprolin, and Inhibitors', *Protein Science*, 30(6), pp. 1114–1130. doi: 10.1002/pro.4075.
18. Caruana, G. Croxatto, A, Coste, A.T. Opota, O. Lamoth, F. Jatton, K. and Greub, G. (2020) 'Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results', *Clinical Microbiology and Infection*, 26(9), pp. 1178–1182. doi: 10.1016/j.cmi.2020.06.019.
19. Cavanagh, D. (1983) 'Coronavirus IBV: Structural characterization of the spike protein', *Journal of General Virology*, 64(12), pp. 2577–2583. doi: 10.1099/0022-1317-64-12-2577.
20. Ceci, F. M. Fiore, M. Gavaruzzi, F. Angeloni, A. Lucarelli, M. Scangolari, C. Bonci, E. Gabanella, F. Di Certo, M. G. Barbato, C. Petrella, C. Greco, A. De Vincentiis, M. Ralli, M. Passananti, C. Poscia, R. Minni, A. Ceccanti, M. Tarani, L. and Ferraguti, G. (2022) 'Early Routine Biomarkers of SARS-CoV-2 Morbidity and Mortality: Outcomes from an Emergency Section', *Diagnostics*, 12(1), pp. 1–11. doi: 10.3390/diagnostics12010176.
21. Cevik, M. Kuppalli, K. Kindrachuk, J. and Peiris, M. (2020) 'Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2', *The BMJ*, 371, pp. 1–6. doi: 10.1136/bmj.m3862.
22. Chang, C-K. Hsu, Y-L. Chang, Y-H. Chao, F-A. Wu, M-C. Huang, Y-S. Hu, C-K. and Huang T-H. (2009) 'Multiple Nucleic Acid Binding Sites and Intrinsic Disorder of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein:

Implications for Ribonucleocapsid Protein Packaging’, *Journal of Virology*, 83(5), pp. 2255–2264. doi: 10.1128/jvi.02001-08.

23. Chang, C- K. Hou, M-H. Chang, C-F. Hsiao, C-D. and Huang, T-H (2014) ‘The SARS coronavirus nucleocapsid protein - Forms and functions’, *Antiviral Research*, 103(1), pp. 39–50. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.12.009.

24. Chang, T. J. Yang, D-M. Wang, M-L. Liang, K-H. Tsai, P-H. Chiou, S-H. Lin, T-H. and Wang, C-T. (2020) ‘Genomic analysis and comparative multiple sequences of SARS-CoV2’, *Journal of the Chinese Medical Association*, 83(6), pp. 537–543. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000335.

25. Cherry, J. D. (2004) ‘The chronology of the 2002-2003 SARS mini pandemic’, *Paediatric Respiratory Reviews*, 5(4), pp. 262–269. doi: 10.1016/j.prrv.2004.07.009.

26. Choi, J. Y. and Smith, D. M. (2021) ‘SARS-CoV-2 variants of concern’, *Yonsei Medical Journal*, 62(11), pp. 961–968. doi: 10.3349/ymj.2021.62.11.961.

27. Chu H, Chan JF, Yuen TT, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARSCoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microb.* 2020;1(1):e14–e23. doi:10.1016/S2666-5247(20) 30004-5

28. Chu, D. K. W. Peiri, J.S.M. Chen, H. Guan, Y. and Poon, L.L.M. (2008) ‘Genomic characterizations of bat coronaviruses (1A, 1B and HKU8) and evidence for co-infections in *Miniopterus* bats’, *Journal of General Virology*, 89(5), pp. 1282–1287. doi: 10.1099/vir.0.83605-0.

29. Corman, V. Landt, O. Kaiser, M. Molenkamp, R. Meijer, A. Chu, D. KW. Bleicker, T. Brunink, S. Schneider, J. Schmidt, M.L. Mulders, D. GJC. Haagmans, B.L. Van der Veer, B. Van den Brink, S. Wijsman, L. Goderski, G. Romette, J-L. Ellis, J. Zambon, M. Peiris, M. Goossens, H. Reusken, C. Koopmans, M.PG. and Drosten, C. (2020) ‘Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR’, *Euro Surveill*, 25(3), pp. 1–8.

30. Coste, A. T. Jatton, K. Papadimitriou-Olivgeris, M. Greub, G. and Groxatto, A. (2021) 'Comparison of SARS-CoV-2 serological tests with different antigen targets', *Journal of Clinical Virology*, 134(October 2020), p. 104690. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104690.
31. Cunningham, J. D. A. D. M. B. C. H., McIntosh, D. H. M. S. H. L. M. K. and Tyrrell, D. A. J. (1968) 'Histones-Animal and Vegetable', *Nature*, 220, p. 1968.
32. Ding, X. Kun, Y. Li, Z. Lalla, R. V. Ballesteros, E. Sfeir, M. M. and Liu, C. (2020) 'Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay', *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41467-020-18575-6.
33. El-Sayed, A. and Kamel, M. (2021) 'Coronaviruses in humans and animals: the role of bats in viral evolution', *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), pp. 19589–19600. doi: 10.1007/s11356-021-12553-1.
34. Emmerich, P. von Possel, R. Hemmer, C.J. Fritzsche, C. Geerdes-Fenge, H. Menge, B. Messing, C. Borchardt-Loholter, V. Deschermeier, C. and Steinhagen, K. (2021) 'Longitudinal detection of SARS-CoV-2-specific antibody responses with different serological methods', *Journal of Medical Virology*, 93(10), pp. 5816–5824. doi: 10.1002/jmv.27113.
35. Ernst, E. Wolfe, P. Stahura, C. and Edwards, K.A. (2021) 'Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2', *Talanta*, 224(July 2020), p. 121883. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121883.
36. Fajnzylber, J. Regan, J. Coxen, K. Corry, H. Wong, C. Rosenthal, A. Worrall, D. Giguel, F. Piechocka-Trocha, A. Atyeo, C. Fischinger, S. Chan, A. Flaherty, K.T. Hall, K. Dougan, M. Ryan, E.T. Gillespie, E. Chishti, R. Li, Y. Jilg, N. Hanidziar, D. Baron, R.M. Baden, L. Tsibris, A.M. Armstrong, K.A. Kuritzkes, D.R. Alter, G. Walker, B.D. Yu, X. Li, J.Z. Abayneh, B.A. Allen, P. Antille, D. Balazs, A. Bals, J. Barbash, M. Bartsch, Y. Boucau, J. Boyce, S. Braley, J. Branch, K. Broderick, K. Carney, J. Chevalier, J. Choudhary, M.C. Chowdhury, N. Cordwell, T. Daley, G.

Davidron, S. Desjardins, M. Donahue, L. Drew, D. Einkauf, K. Elizabeth, S. Elliman, A. Etemad, B. Fallon, J. Fedirko, L. Finn, K. Flannery, J. Forde, P. Garcia-Broncano, P. Gettings, E. Golan, D. Goodman, K. Griffin, A. Grimmel, S. Grinke, K. Hartana, C. A. Healy, M. Heller, H. Henault, D. Holland, G. Jiang, C. Jordan, H. Kaplonek, P. Karlson, E.W. Karpell, M. Kayitesi, C. La., E. C. LaValle, V. Lefteri, K. Lian, X. Lichterfeld, M. Lingwood, D. Liu, H. Liu, J. Lopez, K. Lu, Y. Luthern, S. Ly, N. L. MacGowan, M. Magispoc, K. Marchewka, J. Martino, B. McNamara, R. Michell, A. Millstrom, I. Miranda, N. Nambu, C. Nelson, S. Noone, M. Novack, L. O'Callaghan, C. Ommerborn, C. Osborn, M. Pacheco, L.C. Phan, N. Pillai, S. Porto, F. A. Rassadkina, Y. Reissis, A. Ruzicka, F. Seiger, K. Selleck, K. Sessa, L. Sharpe, A. Sharr, C. Shin, S. Singh, N. Slaughenhaupt, S. Sheppard, K. S. Sun, W. Sun, X. Suschana, E. Talabi, O. Ticheli, H. Weiss, S. T. and Wilson, V. (2020) 'SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality', *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41467-020-19057-5.

37. Falzone, L. Musso, N. Gattuso, G. Bongiorno, D. Palermo, C.I. Scalia, G. Libra, M. and Stefani, S. (2020) 'Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection', *International Journal of Molecular Medicine*, 46(3), pp. 957–964. doi: 10.3892/ijmm.2020.4673.

38. Fan, Y. Zhao, K. Shi, Z-L. and Zhou, P. (2019) 'Bat coronaviruses in China', *Viruses*, 11(3), pp. 27–32. doi: 10.3390/v11030210.

39. Fig, W. Sparholt, T. Blin, K. Kuntke, F. Salling, H.K. Albertsen, M. Larsen, H. Novo, T. Foundation, N. Lyngby, K. Technology, H. Nordisk, N. Genscript. Gig, B. Tang, Y. Schmitz, J.E. Persing, D.H. Stratton, C.W. Chong, Y.M. Sam, I. Ponnampalavanar, S. Syed, F. Kamarulzaman, A. Malik, Y.A. Meredith, L.W. Hamilton, W.L. Warne, B. Houldcroft, C.J. Hosmilo, M. Jahun, A.S. Curran, M.D. Parmar, S. Caller, L.G. Caddy, S.L.Khokhar, F.A. Yakovleva, A. Hall, G. Feltwell, T. Forrest, S. Sridhar, S. Weekes, M.P. Baker, S. Brown, N. Moore, E. Popay, A. Roddick, I. Reacher, M. Gouliouris, T. Peacock, S.J. Dougan, G. Torok, M.E. Goodfellow, I. and Devi, S. (2020) 'Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study', *The Lancet Infectious Diseases*, 20(11), pp. 1–9. Available

at:[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30802-](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30802-1)

[1%0Ahttps://www.genscript.com/cpass-sars-cov-2-neutralization-antibody-detection-Kit.html](https://www.genscript.com/cpass-sars-cov-2-neutralization-antibody-detection-Kit.html).

40. Fraiture, M. A. Gobbo, A. Marchesi, U. Verginelli, D. Nina, P. and Roosens, N.H.C. (2021) ‘Development of a real-time PCR marker targeting a new unauthorized genetically modified microorganism producing protease identified by DNA walking’, *International Journal of Food Microbiology*, 354, p. 109330. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109330.
41. Goldsmith, C. S. Tatti, K.M. Ksiazek, T.G. Rollin, P.E. Comer, J.A. Lee, W.W. Rota, P.A. Bankamp, B. Bellini, W.J. and Zaki, S.R. (2004) ‘Ultrastructural Characterization of SARS Coronavirus’, *Emerging Infectious Diseases*, 10(2), pp. 320–326. doi: 10.3201/eid1002.030913.
42. Gorbalenya, A. E. Baker, S.C. Baric, R.S. De Groot, R.J. Drosten, C. Gulyaeva, A.A. Haagmans, B.L. Lauber, C. Leontovich, A. M. Neuman, B.W. Penzar, D. Perlman, S. Poon, L.L.M. Samborskiy, D.V. Sidorov, I.A. Sola, I. and Ziebuhr, J. (2020) ‘The species Severe acute respiratory syndrome - related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2’, *Nature Microbiology*, 5(4), pp. 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
43. Gorzalski AJ, Tian H, Laverdure C, et al. High-throughput transcription-mediated amplification on the Hologic Panther is a highly sensitive method of detection for SARS-CoV-2. *J Clin Virol*. 2020; 129:104501. doi: 10.1016/j.jcv.2020.10450
44. Grada, A. and Weinbrecht, K. (2013) ‘Next-generation sequencing: Methodology and application’, *Journal of Investigative Dermatology*, 133(8), pp. e11-4. doi: 10.1038/jid.2013.248.
45. Guo, G. Ye, L. Pan, K. Chen, Y. Xing, D. Yan, K. Chen, Z. Ding, N. Li, W. Huang, H. Zhang, L. Li, X. and Xue, X. (2020) ‘New Insights of Emerging SARS-CoV-2: Epidemiology, Etiology, Clinical Features, Clinical Treatment, and

Prevention', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(May), pp. 1–22. doi: 10.3389/fcell.2020.00410.

46. Harrison, A. G., Lin, T. and Wang, P. (2020) 'Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis', *Trends in Immunology*, 41(12), pp. 1100–1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004.

47. Hasöksüz, M., Kiliç, S. and Saraç, F. (2020) 'Coronaviruses and sars-cov-2', *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(SI-1), pp. 549–556. doi: 10.3906/sag-2004-127.

48. He, H. J. Zhang, W. Liang, J. Lu, M. Wang, R. Li, G. He, J.W. Chen, J. Chen, J. Xing, G. and Chen, Y. (2020) 'Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018–2019', *Microbial Pathogenesis*, 145(March), p. 104209. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104209.

49. Henry, R. and T (2019) 'Strain Infecting Cattle Tick', p. 30329.

50. Van Der Hoek, L. Pyrc, K. Jebbink, M.F. Vermeulen-Oost, W. Berkhout, R.J.M. Wolthers, K.C. Wertheim-van Dillen, P.M.E. Kaandorp, J. Spaargaren, J. and Berkhout, B. (2004) 'Identification of a new human coronavirus', *Nature Medicine*, 10(4), pp. 368–373. doi: 10.1038/nm1024.

51. Huang, W. E. Lim, B. Hsu, C. C. Xiong, D. Wu, W. Yu, Y. Jia, H. Wang, Y. Zeng, Y. Ji, M. Chang, H. Zhang, X. Wang, H. and Cui, Z. (2020) 'RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2', *Microbial Biotechnology*, 13(4), pp. 950–961. doi: 10.1111/1751-7915.13586.

52. Huang, Y. W. Dickerman, A.W. Piñeyro, P. Li, L. Fang, L. Kiehne, R. Opriessnig, T. and Meng, X.J. (2013) 'Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the united states', *mBio*, 4(5). doi: 10.1128/mBio.00737-13.

53. Huggett, J. F. Benes, V. Bustin, S.A. Garson, J.A. Harris, K. Kammel, M. Kubista, M. McHugh, T.D. Moran-Gilad, J. Nolan, T. Plaffl, M.W. Salit, M. Shipley, G. Vallone, P.M. Vandesompele, J. Wittwer, C. and Zeichhardt, H. (2020) 'Cautionary Note on Contamination of Reagents Used for Molecular Detection of SARS-CoV-2', *Clinical chemistry*, 66(11), pp. 1369–1372. doi: 10.1093/clinchem/hvaa214.
54. Jagtar Singh, Niti Birbian, S. S. and A. G. (2014) 'A critical review on PCR, its types and applications', *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1(7), pp. 65–80. Available at: <http://www.ijarbs.com/pdfcopy/oct2014/ijarbs11.pdf>.
55. Jain, A. Rophina, M. Mahajan, S. Krishnan, B.B. Sharma, M. Mandal, S. Fernandez, T. Sultanji, S. Jolly, B. Mathew, S. Sivasubbu, S. and Scaria, V. (2021) 'Analysis of the potential impact of genomic variants in global SARS-CoV-2 genomes on molecular diagnostic assays', *International Journal of Infectious Diseases*, 102, pp. 460–462. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.086.
56. Janik, E. Niemcewicz, M. Podogrocki, M. Majsterek, I. and Bijak, M. (2021) 'The emerging concern and interest sars-cov-2 variants', *Pathogens*, 10(6), pp. 1–13. doi: 10.3390/pathogens10060633.
57. Johansson, M. A. Quandelacy, T.M. Kada, S. Prasad, P.V. Steele, M. Brooks, J.T. Slayton, R.B. Biggerstaff, M. and Butler, J. (2021) 'SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms', *JAMA Network Open*, 4(1), pp. 1–8. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35057.
58. Jung, C. Kmiec, D. Koepke, L. Zech, F. Jacob, T. Sparrer, K.M.J. and Kirchhoff, F. (2022) 'Omicron: What Makes the Latest SARS-CoV-2 Variant of Concern So Concerning?', *Journal of Virology*, 96(6). doi: 10.1128/jvi.02077-21.
59. Kashir, J. and Yaqinuddin, A. (2020) 'Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19', *Medical Hypotheses*, 141(March), p. 109786. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.

60. Kim, D. Lee, J.Y. Yang, J.S. Kim, J.W. Kim, V.N. and Chang, H. (2020) ‘The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome’, *Cell*, 181(4), pp. 914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
61. Kim, L. Hayes, J. Lewis, P. Parwani, A.V. Chang, K.O. and Saif, L.J. (2000) ‘Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd’, *Archives of Virology*, 145(6), pp. 1133–1147. doi: 10.1007/s007050070114.
62. Kin, N. Mischczak, F. Lin, W. Gouilh, M. A. Vabret, A. and Consortium, E. (2015) ‘Genomic analysis of 15 human coronaviruses OC43 (HCoV-OC43s) circulating in France from 2001 to 2013 reveals a high intra-specific diversity with new recombinant genotypes’, *Viruses*, 7(5), pp. 2358–2377. doi: 10.3390/v7052358.
63. Kuang, J. Yan, X. Genders, A.J. Granata, C. and Bishop, D.J. (2018) ‘An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research’, *PLoS ONE*, 13(5), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pone.0196438.
64. Kumar, S. Thambiraja, T.S. Karuppanan, K. and Subramanian, G. (2022) ‘Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein’, *Journal of Medical Virology*, 94(4), pp. 1641–1649. doi: 10.1002/jmv.27526.
65. Lalchhandama, K. (2020) ‘The chronicles of coronaviruses: the bronchitis, the hepatitis and the common cold’, *Science Vision*, 20(1), pp. 43–53. doi: 10.33493/scivis.20.01.04.
66. Lalchhandama, K. (2020) ‘The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike’, *Science Vision*, 20(2), pp. 78–92. doi: 10.33493/scivis.20.02.03.

67. Lamers, M. M. Smits, S.L. Hundie, G.B. Provacia, L.B. Koopmans, M. Osterhaus, A.D.M.E, Haagmans, B.L. and Raj, V.S. (2016) 'Naturally occurring recombination in ferret coronaviruses revealed by complete genome characterization', *Journal of General Virology*, 97(9), pp. 2180–2186. doi: 10.1099/jgv.0.000520.
68. Lau, S. K. P. Li, K.S.M. Tsang, A.K.L. Shek, C.T.Wang, M. Choi, G.K.Y. Guo, R. Wong, B.H.L. Poon, R.W.S. Lam, C.S.F. Wang, S.Y.H. Fan, R.Y.Y. Chan, K.H.C. Zheng, B.J. Woo, P.C.Y. and Yuen, K.Y. (2012) 'Recent Transmission of a Novel Alphacoronavirus, Bat Coronavirus HKU10, from Leschenault's Rousettes to Pomona Leaf-Nosed Bats: First Evidence of Interspecies Transmission of Coronavirus between Bats of Different Suborders', *Journal of Virology*, 86(21), pp. 11906–11918. doi: 10.1128/jvi.01305-12.
69. Lau, S. K. P. Wong, E.Y.M. Tsang, C.C. Ahmed, S.S. Au-Yeung, R.K.H. Yuen, K.Y. Wernery, U. and Woo, P.C.Y. (2018) 'Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal Interspecies Jumping with Recombination as a Potential Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission', *Journal of Virology*, 92(15). doi: 10.1128/jvi.00265-18.
70. Lawrence, C. M. Menon, S. Eilers, B. Bothner, B. Khayat, R. Douglas, T. and Young, M.J. (2009) 'Structural and functional studies of archaeal viruses', *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), pp. 12599–12603. doi: 10.1074/jbc.R800078200.
71. Li, F. (2016) 'Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins', *Annual Review of Virology*, 3, pp. 237–261. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-042301.
72. Lippi, G. and Simundic, A. M. (2018) 'The EFLM strategy for harmonization of the preanalytical phase', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56(10), pp. 1660–1666. doi: 10.1515/cclm-2017-0277.
73. Lippi, G., Simundic, A. M. and Plebani, M. (2020) 'Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019

(COVID-19)', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(7), pp. 1070–1076. doi: 10.1515/cclm-2020-0285.

74. Machhi, J. Herskovitz, J. Senan, A.M. Dutta, D. Nath, B. Oleynikov, M.D. Blomberg, W.R. Meigs, D.D. Hasan, M. Patel, M. Kline, P. Chuen-Chung Chang, R. Chang, L. Gendelman, H.E. and Kevadiya, B.D. (2020) 'The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), pp. 359–386. doi: 10.1007/s11481-020-09944-5.

75. Mackay, I. M. (2004) 'Real-time PCR in the microbiology laboratory', *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), pp. 190–212. doi: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.

76. Mackay, I. M., Arden, K. E. and Nitsche, A. (2002) 'Real-time PCR in virology', *Nucleic Acids Research*, 30(6), pp. 1292–1305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292.

77. Mak, G. C. Cheng, P.KC. Lau, S.SY. Wong, K.KY. Lau, CS. Lam, E.TK. Chan, R.CW. and Tsang, D.NC. (2020) 'Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus', *Journal of Clinical Virology*, 129(June), p. 104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500.

78. La Marca, A. Capuzzo, M. Paglia, T. Roli, L. Trenti, T. and Nelson, S.M. (2020) 'Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays', *Reproductive BioMedicine Online*, 41(3), pp. 483–499. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.001.

79. Martines, R. B. Ritter, J.M. Matkovic, E. Gary, J. Bollweg, B.C. Bullock, H. Goldsmith, C.S. Silva-Flannery, L. Seixas, J.N. Reagan-Steiner, S. Uyeki, T. Denison, A. Bhatnagar, J. Shieh W.J. Zaki, S.R. Cole, R. Lewis, A. Fair, P. and Estetter, L. (2020) 'Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, united states', *Emerging Infectious Diseases*, 26(9), pp. 2005–2015. doi: 10.3201/eid2609.202095.

80. Masters, P. S. (2006) 'The Molecular Biology of Coronaviruses', *Advances in Virus Research*, 65(January), pp. 193–292. doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
81. Mathuria, J. P., Yadav, R. and Rajkumar (2020) 'Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods', *Journal of Infection and Public Health*, 13(7), pp. 901–905. doi: 10.1016/j.jiph.2020.06.005.
82. Meo, S. A. Meo, A.S. Al-Jassir, F.F. and Klonoff, D.C. (2021) 'Omicron SARS-CoV-2 new variant: Global prevalence and biological and clinical characteristics', *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(24), pp. 8012–8018. doi: 10.26355/eurrev_202112_27652.
83. Meyer, B., Drosten, C. and Müller, M. A. (2014) 'Serological assays for emerging coronaviruses: Challenges and pitfalls', *Virus Research*, 194, pp. 175–183. doi: 10.1016/j.virusres.2014.03.018.
84. Mistry, P. Barmania, F. Mellet, J. Peta, K. Strydom, A. Viljoen, I.M. James, W. Gordon, S. and Pepper, M.S. (2022) 'SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity', *Frontiers in Immunology*, 12(January), pp. 1–21. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244.
85. Miura, T. A. Wang, J. Mason, R.J. and Holmes, K.V. (2006) 'RAT coronavirus infection of primary RAT alveolar epithelial cells', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 581, pp. 351–356. doi: 10.1007/978-0-387-33012-9_62.
86. Mlcochova, P. Kemp, S.A. Dhar, M.S. Papa, G. Meng, B. Ferreira, I.A.T.M. Datir, R. Collier, D.A. Albecka, A. Singh, S. Pandey, R. Brown, J. Zhou, J. Goonawardane, N. Mishra, S. Whittaker, C. Mellan, T. Marwal, R. Datta, M. Sengupta, S. Ponnusamy, K. Radhakrishnan, V.S. Abdullahi, A. Charles, O. Chattopadhyay, P. Devi, P. Caputo, D. Peacock, T. Wattal, C. Goel, N. Satwik, A. Vaishya, R. Agarwal, M. Chauhan, H. Dikid, T. Gogia, H. Lall, H. Verma, K. Dhar, M.S. Singh, M.K. Soni, N. Meena, N. Madan, P. Singh, P. Sharma, R. Sharma, R. Kabra, S. Kumar, S. Kumari, S. Sharma, U. Chaudhary, U. Sivasubbu, S. Scaria, V. Oberoi, J.K. Raveendran, R. Datta, S. Das, S. Maitra, A. Chinnaswamy, S. Biswas, N.K. Parida, A. Raghav, S.K.

Prasad, P. Sarin, A. Mayor, S. Ramakrishnan, U. Palakodeti, D. Seshasayee, A.S.N. Thangaraj K. Bashyam, M.D. Dala, A. Bhat, M. Shouche, Y. Pilai, A. Abraham, P. Potdra, V.a. Cheiran, S.S. Desai, A.S. Pattabiraman, C. Manjunatha, M.V. Mani, R.S. Udupi, G.A. Nandicoori, V. Tallapaka, K.B. Sowpati, D.T. Kawabata, R. Morizako, N. Sadamasu, K. Asakura, H. Nagashima, M. Yoshimura, K. Ito, J. Kimura, I. Uriu, K. Kosugi, Y. Suganami, M. Oide, A. Yokoyama, M. Chiba, M. Saito, A. Butlertanaka, E.P. Tanaka, Y. L. Ikeda, T. Motozono, C. Nasser, H. Shimizu, R. Yuan, Y. Kitazato, K. Hasebe, H. Nakagawa, S. Wu, J. Takahashi, M. Fukuhara, T. Shimizu, K. Tsushima, K. Kubo, H. Shirakawa, K. Kazuma, Y. Nomura, R. M. Horisawa, Y. Takaori-Kondo, A. Tokunaga, K. Ozono, S. Baker, S. Dougan, G. Hess, C. Kingston, N. Lehner, P. J. Lyons, P.A. Matheson, N. J. Owehand, W. H. Saunders, C. Summers, C. Thaventhiran, J. E. D. Toshner, M. Weekes, M. P. Maxwell, P. Shaw, A. Bucke, A. Calder, J. Canna, L. Domingo, J. Elmer, A. Fuller, S. Harris, J. Hewitt, S. Kennet, J. Jose, S. Kourampa, A. Meadows, A. O'Brien, C. Price, J. Publico, C. Rastall, R. Ribeiro, C. Rowlands, J. Ruffolo, V. Tordesillas, H. Bullman, B. Dunmore, B. J. Fawke, S.Gräf, S. Hodgson, J. Huang, C. Hunter, K. Jones, E. Legchenko, E. Matara, C. Martin, J. Mescia, F. O'Donnell, C. Pointon, L. Pond, N. Shih, J. Sutcliffe, R. Tilly, T. Treacy, C. Tong, Z. Wood, J. Wylot, M. Bergamaschi, L. Betancourt, A. Bower, G. Cossetti, C. De Sa, A. Epping, M. Fawke, S. Gleadall, N. Grenfell, R. Hinch, A. Huhn, O. Jackson, S. Jarvis, I. Krishna, B. Lewis, D. Marsden, J. Nice, F. Okecha, G. Omarjee, O. Perera, M. Potts, M. Richoz, N. Romashova, V. Yarkoni, N. S. Sharma, R. Stefanucci, L. Stephens, J. Strezlecki, M. Turnel, L. De Bie, E. M. D. D. Bunclark, K. Josipovic, M. Mackay, M. Rossi, S. Selvan, M. Spencer, S. Yong, C. Allison, J. Butcher, H. Caputo, D. Clapham-Riley, D. Dewhurst, E. Furlong, A. Graves, B. Gray, J. Ivers, T. Ksanicki, M. Le Gresley, E. Linger, R. Meloy, S. Muldoon, F. Ovingtom, N. Papadia, S. Phelan, I. Stark, H. Stirrups, K. E. Townsend, P. Walker, N. Webster, J. Scholtes, I. Hein, S. King, R. Mavousian, A. Lee, J. H. Bassi, J. Silacci,-Fegni, C. Saliba, C. Pinto, D. Irie, T. Yoshida, I. Hamilton, W.L. Sato, K. Bhatt, S. Flaxman, S. James. L. C. Corti, D. Piccoli, L. Barclay, W. S. Rakshit, P. Agrawal, A. Gupta, R. K. (2021) 'SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion', *Nature*, 599(7883), pp. 114–119. doi: 10.1038/s41586-021-03944-y.

87. Monto, A. S. (1974) 'Coronaviruses', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 47(4), pp. 234–251.

88. Mora-Díaz, J. C. Piñeyro, P.E. Houston, E. Zimmerman, J. and Giménez-Lirola, L.G. (2019) 'Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus: A review', *Frontiers in Veterinary Science*, 6(FEB), pp. 1–12. doi: 10.3389/fvets.2019.00053.
89. Morfopoulou, S. Brown, J.R. Davies, E.G. Anderson, G. Virasami, A. Qasim, W. Chong, W.K. Hubank, M. Plagnol, V. Desforges, M. Jacques, T.S. Talbot, P.J. and Breuer J. (2016) 'Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal Encephalitis', *New England Journal of Medicine*, 375(5), pp. 497–498. doi: 10.1056/nejmc1509458.
90. Mosolygó, T. Laczi, K. Spengler, G. and Burián, K. (2022) 'A Practical Approach for Quantitative Polymerase Chain Reaction, the Gold Standard in Microbiological Diagnosis', *Sci*, 4(1), p. 4. doi: 10.3390/sci4010004.
91. Das Mukhopadhyay, C. Sharma, P. Sinha, K. and Rajarshi, K. (2021) 'Recent trends in analytical and digital techniques for the detection of the SARS-Cov-2', *Biophysical Chemistry*, 270(September 2020), p. 106538. doi: 10.1016/j.bpc.2020.106538.
92. Mustafa Hellou, M. Gorska, A. Mazzaferri, F. Gremonini, E. Gentilotti, E. De Nardo, P. Poran, I. Leeftang, M.M. Tacconelli, E. and Paul, M. (2020) 'Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis', *Clinical Microbiology and Infection*, 27(3), pp. 341–351. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.002.
93. Nasir, J. A. Kozak, R.A. Aftanas, P. Raphenya, A.R. Smith, K.M. Maguire, F. Maan, H. Alruwaili, M. Banerjee, A. Mbareche, H. Alcock, B.P. Knox, N.C. Mossman, K. Wang, B. Hiscox, J.A. McArthur, A.G. and Mubareka, S. (2020) 'A comparison of whole genome sequencing of sars-cov-2 using amplicon-based sequencing, random hexamers, and bait capture', *Viruses*, 12(8). doi: 10.3390/v12080895.
94. Narayanan, K. Maeda, A. Maeda, J. and Makino, S. (2000) 'Characterization of the Coronavirus M Protein and Nucleocapsid Interaction in Infected Cells', *Journal of Virology*, 74(17), pp. 8127–8134. doi: 10.1128/jvi.74.17.8127-8134.2000.

95. Nemoto, M., Schofield, W. and Cullinane, A. (2019) 'The first detection of equine coronavirus in adult horses and foals in Ireland', *Viruses*, 11(10), pp. 1–7. doi: 10.3390/v11100946.
96. Neuman, B. W. Kiss, G. Kunding, A.H. Bhella, D. Baksh, M.F. Connelly, S. Droese, B. Klaus, J.P. Makino, S. Sawicki, S.G. Siddell, S.G. Stamou, D.G. Wilson, I.A. Kuhn, P. and Buchmeier, M.J. (2010) 'A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology', *Journal of Structural Biology*, 174(1), pp. 11–22. doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
97. Jones TC, Biele G, Mühlemann B, Veith T, Schneider J, Beheim-Schwarzbach J, Bleicker T, Tesch J, Schmodt ML, Sander, LE, Kurth F, Menzel P, Schwarzer R, Zuchowski M, Hofmann J, Krumbholz A, Stein A, Edelmann A, Corman VM and Drosten C. Estimating infectiousness throughout SARS-CoV-2 infection course. *Science*. 2021 May 25;eabi5273.
98. Nouri, R. Tang, Z. Dong, M. Liu, T. Kshirsagar, A. and Guan, W. (2021) 'CRISPR-based detection of SARS-CoV-2: A review from sample to result', *Biosensors and Bioelectronics*, 178(January), p. 113012. doi: 10.1016/j.bios.2021.113012.
99. Objective, P., The, O. F. and Review, L. (2020) 'Corresponding author Pr ep rin t n ot pe er re vie d Pr t n ot pe er ed', 1(3394), pp. 1–30.
100. Oboho, I. K. Tomczyk, S.M. Al-Asmari, A.M. Banjar, A.A. Al-Mugti, H.A. Aloraini, M.S. Alkhaldi, K.Z. Almohammadi, E.L. Alraddadi, B.M. Gerber, S.I. Swerdlow, D.L. Watson, J.T. and Madani, T.A. (2015) '2014 MERS-CoV Outbreak in Jeddah — A Link to Health Care Facilities', *New England Journal of Medicine*, 372(9), pp. 846–854. doi: 10.1056/nejmoa1408636.
101. Oishee, M. J. Ali, T. Jahan, N. Khandker, S.S. Haq, M.A. Khondoker, M.U. Sil, B.K. Lugova, H. Krishnapillai, A. Abubakar, A.R. Kumar, S. Haque, M. Jamiruddin, M.R. and Adnan, N. (2021) 'Covid-19 pandemic: Review of contemporary and

forthcoming detection tools’, *Infection and Drug Resistance*, 14, pp. 1049–1082. doi: 10.2147/IDR.S289629.

102. Ou, J. Lan, W. Wu, X. Zhao, T. Duan, B. Yang, P. Ren, Y. Quan, L. Zhao, W. Seto, W. Chodosh, J. Luo, Z. Wu, J. and Zhang, Q. (2022) ‘Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events’, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). doi: 10.1038/s41392-022-00992-2.

103. Papineau, A. Berhane, Y. Wylie, T.N. Wylie, K.M. Sharpe, S. and Lung, O. (2019) ‘Genome Organization of Canada Goose Coronavirus, A Novel Species Identified in a Mass Die-off of Canada Geese’, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-019-42355-y.

104. Park, S. J. Kim, H.K. Song, D.S. Moon, H.J. and Park, B.K. (2011) ‘Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field isolates in Korea’, *Archives of Virology*, 156(4), pp. 577–585. doi: 10.1007/s00705-010-0892-9.

105. Patchsung, M. Jantarug, K. Pattama, A. Aphicho, K. Suraritdechachai, S. Meesawat, P. Sappakhaw, K. Leelahakorn, N. Ruenkam, T. Wongsatit, T. Athipanyasilp, N. Eiamthong, B. Lakkanasirotat, B. Phoodokmai, T. Niljianskul, N. Pakotiprapha, D. Chanarat, S. Homchan, A. Tinikul, R. Kamutira, P. Phiwkaow, K. Soithongcharoen, S. Kantiwiriyanitch, C. Pongsupasa, V. Trisrivirat, D. Jaroensuk, J. Wongnate, T. Maenpuen, S. Chaiyen, P. Kamnerdnakta, S. Swangsri, J. Chuthapisith, S. Sirivatanauksorn, Y. Chaimayo, C. Sutthent, R. Kantakamalakul, W. Joung, J. Ladha, A. Jin, X. Gootenberg, J. S. Abudayyeh, O. O. Zhang, F. Horthongkham, N. and Uttamapinant, C. (2020) ‘Clinical validation of a Cas13-based assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA’, *Nature Biomedical Engineering*, 4(12), pp. 1140–1149. doi: 10.1038/s41551-020-00603-x.

106. Peng, R. Wu, L.A. Wang, Q. Qi, J. and Gao, G.F. (2021) ‘Cell entry by SARS-CoV-2’, *Trends in Biochemical Sciences*, 46(10), pp. 848–860. doi: 10.1016/j.tibs.2021.06.001.

107. Ksiazek, T. G. Erdman, D. Goldsmith, C. S. Zaki, S. R. Peret, T. Emery, S. Tong, S. Urbani, C. Comer, J. A. Lim, W. Rollin, P. E. Dowell, S. F. Ling, A. Humphrey, C. D. Sheih, W. Guarner, J. Paddock, C. D. Rota, P. Fields, B. DeRisi, J. Yang, J. Cox, N. Hughes, J. M. LeDuc, J. W. Bellini, W. J. Anderson, L. and SARS Working Group (2003) 'A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome', *The New England Journal of Medicine*, pp. 1953–1966.
108. Petrillo, S. Carra, G. Bottino, P. Zanotto, E. De Santis, M.C. Margaria, J.P. Giorgio, A. Mandili, G. Martini, M. Cavallo, R. Barberio, D. and Altruda, F. (2020) 'A novel multiplex qrt-pcr assay to detect sars-cov-2 infection: High sensitivity and increased testing capacity', *Microorganisms*, 8(7), pp. 1–10. doi: 10.3390/microorganisms8071064.
109. Quail, M. A. Smith, M. Coupland, P. Otto, T.D. Harris, S.R. Connor, T.R. Bertoni, A. Swerdlow, H.P. Gu, Y. (2012) 'A tale of three NGS sequencing platforms', *BMC Genomics*, 13(341), p. 13.
110. Qian, J. Boswell, S.A. Chidley, C. Lu, Z X. Pettit, M. E. Gaudio, B. L. Fajnzylber, J. M. Ingram, R. T. Ward, R.H. Li, J. Z. and Springer, M. (2020) 'An enhanced isothermal amplification assay for viral detection', *Nature Communications*, 11(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41467-020-19258-y.
111. Rahbari, R., Moradi, N. and Abdi, M. (2021) 'rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations' , *Clinica Chimica Acta*, pp. 1-7.doi: 10.1016/j.cca.2021.01.011
112. Richmond, C. (2008) 'Christine Margaret Puxon', *Bmj*, 336(7659), pp. 1510–1510. doi: 10.1136/bmj.a476.
113. Robert, K. and Arkadiusz, D. (2020) 'Molecular and Serological Tests for COVID-19 . A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics', *Diagnostics*, 10(6).

114. Safiabadi Tali, S. H. LeBlanc, J.J. Sadiq, Z. Oyewunmi, O.D. Camargo, C. Nikpour, B. Armanfard, N. Sagan, S.M. and Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021) 'Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection', *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), pp. 1–63. doi: 10.1128/CMR.00228-20.
115. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
116. Satarker, S. and Nampoothiri, M. (2020) 'Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2', *Archives of Medical Research*, 51(6), pp. 482–491. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.05.012.
117. Scheel., D. P. (2020) 'Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-', *Ann Oncol*, (January), pp. 19–20.
118. Schrader, C. Schielke, A. Ellerbroek, L. and Johne, R. (2012) 'PCR inhibitors - occurrence, properties and removal', *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp. 1014–1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
119. Scialo, F. Daniele, A. Amato, F. Pastore, L. Matera, M.G. Cazzola, M. Castaldo, G. and Bianco, A. (2020) 'ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2', *Lung*, 198(6), pp. 867–877. doi: 10.1007/s00408-020-00408-4.
120. Sehnal, D. Sebastian, B. Mandar, D. Svobodova, R. Berka, K. Bazgier, V. Velankar, S. Burley, S.K. Koca, J. and Rose, A.S. (2021) 'Mol*Viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures', *Nucleic Acids Research*, 49(W1), pp. W431–W437. doi: 10.1093/nar/gkab314.
121. Sethuraman, N., Jeremiah, S. S. and Ryo, A. (2020) 'Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(22), pp. 2249–2251. doi: 10.1001/jama.2020.8259.

122. Setiawan, F. Puspitasari, H. Sunariani, J. and Yudianto, A. (2020) 'Molecular Review Covid19 from the Pathogenesis and Transmission Aspect', *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 12(1si), p. 93. doi: 10.20473/jkl.v12i1si.2020.93-103.
123. Shi, A. C. and Ren, P. (2021) 'SARS-CoV-2 serology testing: Progress and challenges', *Journal of Immunological Methods*, 494(January), p. 113060. doi: 10.1016/j.jim.2021.113060.
124. Sidiq, Z. Hanif, M. Dwivedi, K.K and Chopra, K.K (2020) 'Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection', *Indian Journal of Tuberculosis*, 67(4), pp. S163–S166. doi: 10.1016/j.ijtb.2020.07.034.
125. Da Silva, S. J. R. Da Silva, C.T.A. Guarines, K.M. Mendes, R.P.G. Pardee, K. Kohl, A. and Pena, L. (2020) 'Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19', *ACS Infectious Diseases*, 6(9), pp. 2319–2336. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00274.
126. Silva, S. J. R. da and Pena, L. J. (2021) 'A word of caution in interpreting COVID-19 diagnostics tests', *Journal of Medical Virology*, 93(2), pp. 717–718. doi: 10.1002/jmv.26531.
127. Siu, K. L. Chan, C.P. Kok, K.H. Woo, P.C.Y and Jin, D.Y. (2014) 'Comparative analysis of the activation of unfolded protein response by spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus HKU1', *Cell and Bioscience*, 4(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/2045-3701-4-3.
128. Smith, R. D. (2006) 'Responding to global infectious disease outbreaks: Lessons from SARS on the role of risk perception, communication and management', *Social Science and Medicine*, 63(12), pp. 3113–3123. doi: 10.1016/j.socscimed.2006.08.004.
129. Tahamtan, A. and Ardebili, A. (2020) 'Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(5), pp. 453–454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.

130. Tajadini, M., Panjehpour, M. and Javanmard, S. (2014) 'Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes', *Advanced Biomedical Research*, 3(1), p. 85. doi: 10.4103/2277-9175.127998.
131. Taleghani, N. and Taghipour, F. (2021) 'Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art', *Biosensors and Bioelectronics*, 174, p. 112830. doi: 10.1016/j.bios.2020.112830.
132. Tang, Y. Schmitz, J.E. Persing, D.H. and Stratton, C.W. (2020) 'Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2 : Current Issues and Challenges', *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6), pp. 1–9.
133. Tapari, A. Braliou, G.G. Papaefthimiou, M. Mavriki, H. Kontou, P.I. Nikolopoulos, G.K. and Bagos, P.G. (2022) 'Performance of Antigen Detection Tests for SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis', *Diagnostics*, 12(6), p. 1388. doi: 10.3390/diagnostics12061388.
134. Thakur, V. and Ratho, R. K. (2022) 'OMICRON (B.1.1.529): A new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear', *Journal of Medical Virology*, 94(5), pp. 1821–1824. doi: 10.1002/jmv.27541.
135. Tyrrell, D. A. J. and Bynoe, M. L. (1965) 'Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures', *British Medical Journal*, 1(5448), pp. 1467–1470. doi: 10.1136/bmj.1.5448.1467.
136. V'kovski, P. Kratzel, A. Steiner, S. Stalder, H. and Thiel, V. (2021) 'Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2', *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), pp. 155–170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
137. Valasek, M. A. and Repa, J. J. (2005) 'The power of real-time PCR', *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 29(3), pp. 151–159. doi: 10.1152/advan.00019.2005.

138. Variant, S.-B. O. and States, U. (2021) 'MMWR, SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant — United States, December 1–8, 2021', 70(50), pp. 2019–2022.
139. Verdiá-Báguena, C. Nieto-Torres, J.L. Alcazar, A. DeDiego, M.L. Enjuanes, L. and Aguilera, V.M. (2013) 'Analysis of SARS-CoV e protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(9), pp. 2026–2031. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.008.
140. Vlasova, A. N. and Saif, L. J. (2021) 'Bovine Coronavirus and the Associated Diseases', *Frontiers in Veterinary Science*, 8(March). doi: 10.3389/fvets.2021.643220.
141. Volz, E. Mishra, S. Chand, M. Barrett, J.C. Johnson, R. Geidelberg, L. Hinsley, W.R. Laydon, D.J. Dabrera, G. O'Toole, A. Amato, R. Ragonnet-Cronin, M. Harrison, I. Jackson, B. Ariani, C.V. Boyd, O. Loman, N.J. McCrone, J.T. Goncalves, S. Jorgensen, D. Myers, R. Hill, V. Jackson, D.K. Gaythorpe, K. Groves, N. Sillitoe, J. Kwiatkowski, D.P. Koshy, C. Ash, A. Wise, E. Moore, N. Mori, M. Cortes, N. Lynch, J. Kidd, S. Fairley, D.J. Curran, T. McKenna, J.P. Adams, H. Fraser, C. Golubchik, T. Bonsall, D. Hassan-Ibrahim, M.O. Malone, C.S. Cogger, B.J. Wantoch, M. Reynolds, N. Warne, B. Maksimovic, J. Spellman, K. McCluggage, K. John, M. Beer, R. Afifi, S. Morgan, S. Marchbank, A. Price, A. Kitchen, C. Gulliver, H. Merrick, I. Southgate, J. Guest, M. Munn, R. Workman, T. Connor, T. R. Fuller, W. Bresner, C. Snell, L. B. Patel, A. Charalampous, T. Nebbia, G. Batra, R. Edgeworth, J. Robson, S. C. Beckett, A. H. Aanensen, D. M. Underwood, A. P. Yeats, C. A. Abudahab, K. Taylor, B. E. W. Menegazzo, M. Clark, G. Smith, W. Khakh, M. Fleming, V. M. Lister, M. M. Howson-Wells, H. C. Berry, L. Boswell, T. Joseph, A. Willingham, I. Jones, C. Holmes, C. Bird, P. Helmer, T. Fallon, K. Tang, J. Raviprakash, V. Campbell, S. Sheriff, N. Blakey, V. Williams, L. A. Loose, M. W. Holmes, N. Moore, C. Carlile, M. Wright, V. Sang, F. Debebe, J. Coll, F. Signell, A. W. Betancor, G. Wilson, H. D. Eldirdiri, S. Kenyon, A. Davis, T. Pybus, O. G. du Plessis, L. Zarebski, A. E. Raghwani, J. Kraemer, M. U. G. Francois, S. Attwood, S. W. Vasylyeva, T. I. Zamudio, M. E. Gutierrez, B. Torok, M. E. Hamilton, W. L. Goodfellow, I. G. Hall, G. Jahun, A. S. Chaudhry, Y. Hosmillo, M. Pinckert, M. L. Georgana, I. Moses, S. Lowe, H. Bedford, L. Moore, J. Stonehouse, S. Fisher, C. L. Awan, A. R. BoYes, J. Breuer, J. Harris, K. A. Brown, J. R. Shah, D. Atkinson, L. Lee, J. C. D. Storey, N. Flaviani, F. Alcolea-Medina, A. Williams, R.

Vernet, G. Chapman, M. R. Levett, L. J. Heaney, J. Chatterton, W. Pusok, M. Xu-McCrae, L. Smith, D. L. Bashton, M. Young, G. R. Holmes, A. Randell, P. A. Cox, A. Madona, P. Bolt, F. Price, J. Mookerjee, S. Ragonnet-Cronin, M. Nascimento, F. F. Jorgensen, D. Siveroni, I. Johnson, R. Boyd, O. Geidelberg, L. Volz, E. M. Rowan, A. Taylor, G. P. Smollett, K. L. Loman, N. J. Quick, J. McMurray, C. Stockton, J. Nicholls, S. Rowe, W. Poplawski, R. McNally, A. Nunez, R. T. M. Mason, J. Robinson, T. I. O'Toole, E. Watts, J. Breen, C. Cowell, A. Sluga, G. Machin, N. W. Ahmad, S.S. Y. George, R. P. Halstead, F. Sivaprakasam, V. Hogsden, W. Illingworth, C. J. Jackson, C. Thomson, E. C. Shepherd, J. G. Asamaphan, P. Niebel, M. O. Li, K. K. Shah, R. N. Jesudason, N. G. Tong, L. Broos, A. Mair, D. Nichols, J. Carmichael, S. N. Nomikou, K. Aranday,-Cortes, E. Johnson, N. Starinskij, I. da Silva Filipe, A. Robertson, D. L. Orton, R. J. Hughes, J. Vattipally, S. Singer, J. B. Nickbakhsh, S. Hale, A. D. Macfarlane-Smith, L. R. Harper, K. L. Carden, H. Taha, Y. Payne, B. A. I. Burton-Fanning, S. Waugh, S. Collins, J. Eltringham, G. Rushton, S. O'Brein, S. Bradley, A. Maclean, A. Mollett, G. Blacow, R. Templeton, K. E. McHugh, M. P. Dewar, R. Wastenge, E. Dervisevic, S. Stanley, R. Meader, E. J. Coupland, L. Smith, L. Graham, C. Barton, E. Padgett, D. Scott, G. Swindells, E. Greenaway, J. Nelson, A. McCann, C. M. Yew, W. C. Andersson, M. Peto, T. Justice, A. Eyre, D. Crook, D. Sloan, T. J. Duckworth, N. Walsh, S. Chauhan, A. J. Glaysher, Bicknell, K. Wyllie, S. Elliott, S. Lloyd, A. Impey, R. Levene, N. Monaghan, L. Bradley, D. T. Wyatt, T. Allara, E. Pearson, C. Osman, H. Bosworth, A. Robinson, E. Muir, P. Vipond, I. B. Hopes, R. Pymont, H. M. Hutchings, S. Curran, M. D. Parmar, S. Lackenby, A. Mbisa, T. Platt, S. Miah, S. Bibby, D. Manson, C. Hubb, J. Ramsay, M. Bradshaw, D. Thornton, A. Schaefer, U. Gallagher, E. Lee, D. Williams, D. Ellaby, N. Hartman, H. Manesis, N. Patel, V. Bishop, C. Chalker, V. Ledesma, J. Twohig, K. A. Holden, M. T. G. Shaaban, S. Birchley, A. Adams, A. Davies, A. Gaskin, A. Plimmer, A. Gatica-Wilcox, B. McKerr, C. Moore, C. Williams, C. Heyburn, D. Lacy, E. Hilvers, E. Downing, F. Shankar, G. Jones, H. Asad, H. Coombes, J. Watkins, J. Evans, J. M. Fina, L. Gifford, L. Gilbert, L. Graham, L. Perry, M. Morgan, M. Bull, M. Cronin, M. Pacchiarini, N. Craine, N. Jones, R. Howe, R. Corden, S. Rey, S. Kumziene-Summerhayes, S. Taylor, S. Cottrell, S. Jones, S. Edwards, S. O'Grady, J. Page, A. J. Mather, A. E. Baker, D. J. Rudder, S. Aydin, A. Kay, G. L. Trotter, A. J. Alikhan, N. F. de Oliveira Matyins, L. Le-Viet, T. Meadows, L. Casey, A. Ratcliffe, L. Simpson, D. A. Molnar, Z. Thompson, T. Acheson, E. Masoli, J. A. H. Knight, B. A. Ellard, S. Auckland, C. Jones, C. R.

Manhungu, t. W. Irish-Tavares, D. Haque, T. Hart, J. Witele, E. Fenton, M. L. Dadrah, A. Symmonds, A. Saluja, T. Bourgeois, Y. Scarlett, G. P. Loveson, K. F. Goudarzi, S. Fearn, C. Cook, K. Dent, H. Paul, H. Partridge, D. G. Raza, M. Evans, C. Johnson, K. Liggett, S. Baker, P. Bonner, S. Essex, S. Lyons, R. A. Saeed, K. Mahanama, A. I. K. Samaraweera, B. Silveira, S. Pelosi, E. Wilson-Davies, E. Williams, R. J. Kristiansen, M. Roy, S. Williams, C. A. Cotic, M. Bayzid, N. Westhorpe, A. P. Hartley, J. A. Jannoo, R. Lowe, H. L. Karamani, A. Ensell, L. Prieto, J. A. Jeramiah, S. Grammatopoulos, D. Pandey, S. Berry, L. Jones, K. Richter, A. Beggs, A. Best, A. Percival, B. Mirza, J. Megram, O. Mayhew, M. Crawford, L. Ashcroft, F. Moles-Garcia, E. Cumpley, N. Smith, C. P. Bucca, G. Hesketh, A. R. Blane, B. Girgis, S. T. Leek, D. Sridhar, S. Forrest, S. Cormie, C. Gill, H. K. Dias, J. Higginson, E. E. Maes, M. Young, J. Kermack, L. M. Gupta, R. K. Ludden, C. Peacock, S. J. Palmer, S. Churcher, C. M. Hadjirin, N. F. Carabelli, A. M. Brooks, E. Smith, K. S. Galai, K. McManus, G. M. Ruis, C. Davidson, R. K. Rambaut, A. Williams, T. Balcazar, C. E. Gallagher, M. D. O'Tool, A. Rooke, S. Hill, V. Williamson, K. A. Stanton, T. D. Michell, S. L. Bewshea, C. M. Temperton, B. Michelsen, M. L. Warwick-Dugdale, J. Manley, R. Farbos, A. Harrison, J. W. Sambles, C. M. Studholme, D. J. Jeffries, A. R. Darby, A. C. Hiscox, J.A. Paterson, S. Iturriza-Gomara, M. Jackson, K. A. Lucaci, A. O. Vamos, E. E. Hughes, M. Rainbow, L. Eccles, R. Nelson, C. Whitehead, M. Turtle, L. Haldenby, S. T. Gregory, R. Gemmeli, M. Wierzbicki, C. Webster, H. J. de Siliva, T. I. Smith, N. Angyal, A. Lindsey, B. B. Groves, D.C. Green, L. R. Wang, D. Freeman, T. M. Parker, M. D. Keeley, A. J. Parsons, P. J. Tucker, R. M. Brown, R. Wyles, M. Whiteley, M. Zhang, P. Gallis, M. Louka, S. F. Costantinidou, C. Unnikrishnan, M. Ott, S. Cheng, J. K. J. Bridgwater, H. E. Frost, L. R. Taylor-Joyce, G. Stark, R. Baxter, L. Ala., M. T. Brown, P. E. Aggarwal, D. Cerda, A. C. Merrill, T. V. Wilson, R. E. McClure, P. C. Chappell, J. G. Tsoleridis, T. Ball, J. Buck, D. Todd, J. A. Green, A. Trebes, A. MacIntyre-Cockett, G. de Cesare, M. Alderton, A. Amato, R. Beale, M. A. Beaver, C. Bellis, K. L. Betteridge, E. Bonfield, J. Danesh, J. Dorman, M. J. Drury, E. Farr, B. W. Foulser, L. Goncalves, S. Goodwin, S. Gourtovaia, M. Harrison, E. M. Jamrozy, D. Johnston, I. Kane, L. Kay, S. Keatley, J. P. Langford, C. F. Lawniczak, M. Letchford, L. Livett, R. Lo, S. Martincorena, I. McGuigan, S. Nelson, R. Palmer, S. Park, N. R. Patel, M. Prestwood, L. Puethe, C. Quail, M. A. Rajatileka, S. Scott, C. Shirley, L. Chapman, M. H. S. Thurston, S. A. J. Tonkin-Hill, G. Weldon, D. Rajan, D. Bronner, I. F. Aigrain, L. Redshaw, N. M. Lensing, S. V. Davies, R. Whitwham, A. Liddle, J.

Lewis, K. Tovar-Corona, J. M. Leonard, S. Durham, J. Bassett, A. R. McCarthy, S. Moll, R. J. James, K. Oliver, K. Makunin, A. Gunson, R. N. Flaxman, S. Ratmann, O. Bhatt, S. Hopkins, S. Gandy, A. Ferguson, N. M. (2021) 'Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England', *Nature*, 593(7858), pp. 266–269. doi: 10.1038/s41586-021-03470-x.

142. Wacker, M. J. and Godard, M. P. (2005) 'Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using superscript III', *Journal of Biomolecular Techniques*, 16(3), pp. 266–271.

143. Wang, C. Horby, P.W. Hayden, F. G. Gao, G. F. (2020) 'A novel coronavirus outbreak of global health concern', *The Lancet*, 395(10223), pp. 470–473. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30185-9.

144. Wang, L., Hu, W. and Fan, C. (2020) 'Structural and biochemical characterization of SARS-CoV papain-like protease 2', *Protein Science*, 29(5), pp. 1228–1241. doi: 10.1002/pro.3857.

145. Wang, L. and Xiang, Y. (2020) 'Spike glycoprotein-mediated entry of SARS coronaviruses', *Viruses*, 12(11). doi: 10.3390/v12111289.

146. Wang, N. Luo, C.M. Yang, X.L. Liu, H.Z. Zhang, L.B. Zhang, W. Li, B. Zhu, Y. Peng, C. Shi, Z.L. and Hu, B. (2021) 'Genomic characterization of diverse bat coronavirus hku10 in hipposideros bats', *Viruses*, 13(10), pp. 1–20. doi: 10.3390/v13101962.

147. Wang, Q. Qi, J. Yuan, Y. Xuan, Y. Han, P. Wan, Y. Ji, W. Li, Y. Wu, Y. Wang, J. Iwamoto, A. Woo, P.C.Y. Yuen, K.Y. Yan, J. Lu, G. and Gao, G. F. (2014) 'Bat origins of MERS-CoV supported by bat Coronavirus HKU4 usage of human receptor CD26', *Cell Host and Microbe*, 16(3), pp. 328–337. doi: 10.1016/j.chom.2014.08.009.

148. Weis, S. Scherag, A. Baier, M. Kiehntopf, M. Kamradt, T. Kolanos, S. Ankert, J. Glockner, S. Makarewicz, O. Hagel, S. Bahrs, C. Kimmig, A. Proquitte, H. Guerra, J. Rimek, D. Löffler, B. Pletz, M.W. Hotz, T. The CoNAN Study Group. (2021)

‘Antibody response using six different serological assays in a completely PCR-tested community after a coronavirus disease 2019 outbreak—the CoNAN study’, *Clinical Microbiology and Infection*, 27(3), pp. 470.e1–470.e9. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.009.

149. Whittaker, G. R., Daniel, S. and Millet, J. K. (2021) ‘Coronavirus entry: how we arrived at SARS-CoV-2’, *Current Opinion in Virology*, 47, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.coviro.2021.02.006.

150. Wimmer, E. Mueller, S. Tumpey, T.M. and Taubenberger, J.K. (2009) ‘Synthetic viruses: A new opportunity to understand and prevent viral disease’, *Nature Biotechnology*, 27(12), pp. 1163–1172. doi: 10.1038/nbt.1593.

151. Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005) ‘One-Step Versus Two-Step Real- Time PCR’, 39(1), pp. 75–85. doi: 10.2144/05391RV01.

152. Woo, P. C. Y. Lau, S.K.P. Huang, Y. and Yuen, K.Y. (2009) ‘Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping’, *Experimental Biology and Medicine*, 234(10), pp. 1117–1127. doi: 10.3181/0903-MR-94.

153. Woo, P. C. Y. Huang, Y, Lau, S.K.P. Yuen, K.Y. (2010) ‘Coronavirus genomics and bioinformatics analysis’, *Viruses*, 2(8), pp. 1805–1820. doi: 10.3390/v2081803.

154. Woo, P. C. Y. Lau, S.K.P. Lam, C.S..F. Lau, C.C.Y. Tsang, A.K.L. Lau, J. H. N. Bai, R. Teng, J.L.L. Tsang, C.C.C. Wang, M. Zheng, B.J. Chan, K.H. and Yuen, K.Y. (2012) ‘Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi’, *Journal of Virology*, 86(7), pp. 3995–4008. doi: 10.1128/jvi.06540-11.

155. Woodby, B., Arnold, M. M. and Valacchi, G. (2021) ‘SARS-CoV-2 infection, COVID-19 pathogenesis, and exposure to air pollution: What is the connection?’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1486(1), pp. 15–38. doi: 10.1111/nyas.14512.

156. Wu, Q. Suo, C. Brown, T. Wang, T. Teichmann, S. A. and Bassett, A. R. (2020) 'INSIGHT a scalable isothermal NASBA-based platform for COVID-19 diagnosis', *Biorxiv*, pp. 1–24. Available at: <http://biorxiv.org/cgi/content/short/2020.06.01.127019>.
157. Xiang, F. Wang, X. He, X. Peng, Z. Yang, B. Zhang, J. Zhou, Q. Ye, H. Ma, Y. Li, H. Wei, X. Cai, P. and Ma, W.L. (2020) 'Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with Coronavirus Disease 2019', *Clinical Infectious Diseases*, 71(8), pp. 1930–1934. doi: 10.1093/cid/ciaa461.
158. Xia, S. and Chen, X. (2020) 'Single-copy sensitive, field-deployable, and simultaneous dual-gene detection of SARS-CoV-2 RNA via modified RT-RPA', *Cell Discovery*, 6(1), pp. 4–7. doi: 10.1038/s41421-020-0175-x.
159. Yadav, R. Chaudhary, J.K. Jain, N. Chaudhary, P.K. Khanra, S. Dhamija, P. Sharma, A. Kumar, A. and Handu, S. (2021) 'Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19', *Cells*, 10(4), pp. 1–16. doi: 10.3390/cells10040821.
160. Yang, C. J. and Tan, W. (2013) 'Molecular beacons', *Molecular Beacons*, 9783642391, pp. 1–194. doi: 10.1007/978-3-642-39109-5.
161. Yin, C. (2020) 'Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications', *Genomics*, 112(5), pp. 3588–3596. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.016.
162. Younes, N. Al-Sadeq, D.W. Al-Jighefee, H. Younes, S. Al-Jamal, O. Daas, H.I. Yassine, H.M. and Nasrallah, G.K. (2020) 'Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel', *Viruses*, 12(6), p. 582.
163. Yusof, Y. A. M. and Haque, M. (2022) 'Biomarkers for The Recognition of SARS-CoV2-Virus and in the Prediction of COVID-19 Infection Severity', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 12(2). doi: 10.7324/JAPS.2022.1202ed.
164. Zella, D. Giovanetti, M. Cella, E. Borsetti, A. Ciotti, M. Ceccarelli, G. D'Ettoire, G. Pezzuto, A. Tambone, V. Campanozzi. L. Magheri, M. Unali, F. Bianchi,

M. Benedetti, F. Pascarella, S. Angeletti, S. and Ciccozzi, M. (2021) ‘The importance of genomic analysis in cracking the coronavirus pandemic’, *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(6), pp. 547–562. doi: 10.1080/14737159.2021.1917998.

165. Zeng, W. Liu, G. Ma, H. Zhao, D. Yang, Y. Liu, M. Mohammed, A. Zhao, C. Yang, Y. Xie, J. Ding, C. Ma, X. Weng, J. Gao, Y. He, H. and Jin, T. (2020) ‘Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527(3), pp. 618–623. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.04.136.

166. Zhang, L. and Guo, H. (2020) ‘Biomarkers of COVID-19 and technologies to combat SARS-CoV-2’, *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 2, pp. 1–23. doi: 10.1016/j.abst.2020.08.001.

167. Zheng, Y. Zhang, Y. Chi, H. Chen, S. Peng, M. Luo, L. Chen, L. Li, J. Shen, and B. Wang, D. (2020) ‘The hemocyte counts as a potential biomarker for predicting disease progression in COVID-19: A retrospective study’, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(7), pp. 1106–1115. doi: 10.1515/cclm-2020-0377.

168. Zhou, P. Yang, X.L. Wang, X.G. Hu, B. Zhang, L. Zhang, W. Si, H.R. Zhu, Y. Li, B. Huang, C.L. Chen, H.D. Chen, J. Luo, Y. Guo, H. Jiang, R.D. Liu, M.Q. Chen, Y. Shen, X.R. Wang, X. Zheng, X.S. Zhao, K. Chen, Q.J. Deng, F. Liu, L.L. Yan, B. Zhan, F.X. Wang, Y.Y. Xiao, G.F. and Shi, Z.L. (2020) ‘A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin’, *Nature*, 579(7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

169. Zhou, Z., Qiu, Y. and Ge, X. (2021) ‘The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order’, *Animal Diseases*, 1(1), pp. 1–28. doi: 10.1186/s44149-021-00005-9.

170. Zhu, N. Zhang, D. Wang, W. Li, X. Yang, B. Song, J. Zhao, X. Huang, B. Shi, W. Lu, R. Niu, P. Zhan, F. Ma, X. Wang, D. Xu, W. Wu, G. Gao, G.F. and Tan, W. (2020) ‘A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019’, *New England Journal of Medicine*, 382(8), pp. 727–733. doi: 10.1056/nejmoa2001017.

171. Zou, J. Li, L. Zheng, P. Liang, W. Hu, S. Zhou, S. Wang, Y. Zhao, J. Yuan, D. Liu, L. Wu, D. Xu, M. Zhang, F. Zhu, M. Wu, Z. Cao, X. Ni, M. Ling, X. Wu, Y. Kuang, Z. Hu, M. Li, J. Li, X. Guo, X. Xu, T. Jiang, H. Gao, C. Yu, M. Liu, J. Zhong, N. Zhou, J. Huang, J.A. Jin, T. and He, J. (2022) ‘Ultrapotent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 with a high degree of mutation resistance’, *Journal of Clinical Investigation*, 132(4). doi: 10.1172/JCI154987.
172. Huang C, Wen T, Shi FJ, Zeng XY, Jiao YJ. Rapid detection of IgM antibodies against the SARS-CoV-2 virus via colloidal gold nanoparticle-based lateral-flow assay. *ACS Omega*. 2020;5 (21):12550–12556. doi:10.1021/acsomega.0c01554.
173. Schuit E, Veldhuijzen I, Venekamp R, van den Bijllaardt W, Pas S, Lodder E, Molekamp R, GeurtsvanKessel EB, Velzing J, Huisman RC, Brouwer L, Boelsums TL, Sips, GJ, Benschop KSM, Hooft L, van deWijgert JHHM, van de Hof S and Moons KGM. Diagnostic accuracy of rapid antigen tests in pre-/asymptomatic close contacts of individuals with a confirmed SARSCoV-2 infection. medRxiv. 2021 Jan 1;2021.03.18.21253874.
174. Brümmer LE, Katzenschlager S, Gaeddert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, Grilli M, Larmann J, Weigand MA, Pollock NR, Mace A, Carmona S, Ongarello S, Sacks JA, and Denkinge CM. The accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: a living systematic review and meta-analysis. medRxiv. 2021 Jan 1;2021.02.26.21252546.

10. Ιστοσελίδες

1. Centers of Disease Control and Prevention.(2022). Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for Covid-19 Testing. Ανασύρθηκε στις 15 Μαρτίου 2021 από:
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
2. Centers of Disease Control and Prevention. (2020). Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19. Ανασύρθηκε στις 25 Μαρτίου 2021 από: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>
3. Emergency Use Authorization (EUA) F. Emergency use authorization (EUA) information, and list of all current EUAs. (2020). Ανασύρθηκε στις 15 Φεβρουαρίου 2021 από: <https://www.fda.gov/emergency-preparednessand-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>.
4. Centers of Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant — United States. .Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR).Ανασύρθηκεστις 2 Δεκεμβρίου 2021 από:
<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7050e1.htm>.
5. World Health Organizatio. Guidance for laboratories shipping specimens to WHO reference laboratories that provide confirmatory testing for COVID-19 virus. (2020). Ανασύρθηκε στις 2 Μαρτίου 2020 από:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331337/WHO-COVID-19-laboratoryshipment-2020.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
6. World Health Organization. Archived: WHO Timeline-COVID-19. (2020). Ανασύρθηκε στις 27 Απριλίου 2021 από:<https://www.who.int/news/item/27-04-2020-who-timeline---covid-19>.

7. World Health Organization. WHO announces simple, easy-to-say labels for SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern. (2021). Ανασύρθηκε στις 20 Μαρτίου 2021 από: <https://www.who.int/news/item/31-05-2021-who-announces-simple-easy-to-say-labels-for-sars-cov-2-variants-of-interest-and-concern>.
8. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. (2022). Ανασύρθηκε στις 10 Σεπτεμβρίου 2022 από: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
9. World Health Organization. (2020). Country & Technical Guidance- Coronavirus disease (COVID-19). Ανασύρθηκε στις 15 Φεβρουαρίου 2021 από: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guida>
10. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. (2020). Ανασύρθηκε στις 20 Μαΐου 2021 από: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665//331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
11. Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data. Tracking of hCoV-19 Variants. (2022). Ανασύρθηκε στις 21 Οκτωβρίου 2022 από: <https://gisaid.org/hcov19-variants>
12. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Οδηγίες εφαρμογής και αφαίρεσης (ένδυσης) του ατομικού εξοπλισμού προστασίας(2020). Ανασύρθηκε στις 20 Μαΐου 2021 από: <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/PPE-donning-doffing.pdf>.
13. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it (2020). Ανασύρθηκε στις 28 Νοεμβρίου του 2020 από : [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).

14. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Weekly Epidemiological Update and Weekly Operational Update. (2022). Ανασύρθηκε στις 25 Οκτωβρίου 2022 από:
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
15. Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας. Οδηγίες για την εργαστηριακή διερεύνηση για τον νέο κορωνοϊό SARS-CoV-2. (2020). Ανασύρθηκε στις 14 Δεκεμβρίου 2021 από: <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/covid-19-ergastiriaki-diagnosi.pdf>
16. British Broadcasting Corporation. The woman who discovered the first coronavirus. (2020). Ανασύρθηκε στις 18 Νοεμβρίου 2020 από :
<https://www.bbc.com/news/uk-scotland-52278716>
17. Food and Drug Administration. In vitro diagnostics EUAs. (2022). Ανασύρθηκε στις 17 Νοεμβρίου 2022 από: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas>

11. Βιβλία

1. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J. and Barer, M. 2011. Corona-ιοί: Λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Στο Τσακρής, Α., Ιατρική Μικροβιολογία: Μικροβιακές Λοιμώξεις παθογένεια, ανοσία, εργαστηριακή διάγνωση και θεραπεία. Κύπρος: Π.Χ Πασχαλίδης, pp. 715-719.