



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

«Ανίχνευση στελεχών του ιού SARS-CoV-2 με μοριακές μεθόδους»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ
Ρέτσας Ιπποκράτης

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας

Ιωάννινα 2026



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

«Ανίχνευση στελεχών του ιού SARS-CoV-2 με μοριακές μεθόδους»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Ρέτσας Ιπποκράτης

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας

Ιωάννινα 2026

«Η έγκριση του 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)».

ΟΝΟΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ
Ιπποκράτης Ρέτσας

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:
«Ανίχνευση στελεχών του ιού SARS-CoV-2 με μοριακές μεθόδους»

Κατεύθυνση:

"Εφαρμοσμένη Βιοϊατρική (Κλινική Χημεία, Μικροβιολογία, Φαρμακολογία)"

Ημερομηνία παρουσίασης: **19 / 03 /2026**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Εξεταστική Επιτροπή:

Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η διαδικασία επικυρώνεται από"

- Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ
- Την/ον Πρόεδρο του Τμήματος

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η έμπνευσή της προήλθε κατά τη διάρκεια της δύσκολης περιόδου της πανδημίας COVID-19, η οποία επηρέασε σημαντικά την ακαδημαϊκή κοινότητα τα έτη που ακολούθησαν.

Σε αυτό το σημείο κρίνεται απαραίτητο να εκφραστούν οι ειλικρινείς ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην έναρξη, στην πραγμάτωση και στην τελική μορφή της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλονται στην κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, διδάσκουσα του Π.Μ.Σ. και υπεύθυνη επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας εργασίας για την ουσιαστική συμβολή της. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κ. Γεωργία Βρυώνη, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας ΕΚΠΑ και τον κ. Πέτρο Μποζίδη, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, οι οποίοι αποτελούν την εξεταστική επιτροπή. Η σημαντική καθοδήγηση όλων, η πολύτιμη βοήθεια και η διαρκής υποστήριξή τους σε όλη τη διαδρομή της εκπόνησης αυτού του έργου, καθώς και οι εποικοδομητικές συμβουλές και διορθώσεις τους, υπήρξαν καθοριστικές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους οικείους, φίλους και συναδέλφους και ιδιαίτερα τον Δρ. Πρόδρομο Σακάλογλου (Βιολόγος-Γενετιστής), συνάδελφο και φίλο για την αμέριστη συμπαράσταση, την ποικιλότροπη βοήθεια και την κατανόηση που επέδειξαν καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου, γεγονός που συνέβαλε ουσιαστικά στην επιτυχή ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	9
1. Πανδημία COVID-19.....	9
2. Ιός MERS	10
3. Ιοί SARS	11
3.1. SARS-CoV	11
3.2. SARS-CoV-2	13
3.2.1. Επιδημιολογία, Μετάδοση του ιού και Κλινική σημειολογία της COVID-19	13
3.2.2. Περιγραφή της δομής και του γονιδιώματος του SARS-CoV-2	18
4. Μεταλλάξεις SARS CoV-2.....	25
1. Μετάλλαξη Alpha	26
2. Μετάλλαξη Beta	27
3. Μετάλλαξη Gamma	27
4. Μετάλλαξη Delta	28
5. Μετάλλαξη Omicron	28
5. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του ιού SARS-CoV-2 και των μεταλλάξεων	31
5.1. Συλλογή Δειγμάτων για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2.....	31
5.2. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης	34
5.2.1. PCR Πραγματικού Χρόνου, real time RT-PCR	34
5.2.1.1. Σφάλματα της μεθόδου RT-PCR	44
5.2.1.2. Ψηφιακή PCR -Digital PCR (dPCR).....	46
5.2.1.3. CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	49
5.2.1.4. LAMP-Loop mediated isothermal amplification	52
5.2.1.5. Μέθοδος ARMS (Amplification Refractory Mutation System-Σύστημα Ενίσχυσης Ανθεκτικό στις Μεταλλάξεις)	58
5.2.1.6. Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS).....	62
5.2.1.6.1. Αλληλούχιση NGS μέσω σύνθεσης	70
5.2.1.6.2. Αλληλούχιση με Nanopores	72
6. Συζήτηση – Συμπεράσματα	76
7. Περίληψη	80
8. Abstract.....	81
9. Βιβλιογραφία.....	82
10. Ιστότοποι	97
11. Κατάλογος Πινάκων / Εικόνων.....	98
12. Χρήσιμες Συντομογραφίες	101

Εισαγωγή

1. Πανδημία COVID-19

Στα τέλη του 2019, οι κινεζικές αρχές ενημέρωσαν τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.) για την εμφάνιση πολλαπλών περιπτώσεων πνευμονίας αγνώστου αιτιολογίας στην πόλη Wuhan, πρωτεύουσα της επαρχίας Hubei της Κίνας. Στις 7 Ιανουαρίου 2020, Κινέζοι επιστήμονες ταυτοποίησαν τον υπεύθυνο παράγοντα ως έναν νέο, ιδιαίτερα μεταδοτικό κορονοϊό, ο οποίος αναγνωριζόταν για πρώτη φορά στο ανθρώπινο είδος.

Αρχικά, ο ιός έλαβε την προσωρινή ονομασία «2019-nCoV». Στις 11 Φεβρουαρίου 2020, ορίστηκε η επίσημη ονομασία του ιού ως SARS-CoV-2, ενώ η προκαλούμενη νόσος ονομάστηκε “Coronavirus Disease 2019” (“COVID-19”)

([https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-](https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019ncov#:~:text=Coronaviruses%20(CoV)%20are,%2D19%20virus%E2%80%9D;)

[19/novel-coronavirus-](https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019ncov#:~:text=Coronaviruses%20(CoV)%20are,%2D19%20virus%E2%80%9D;)

[2019ncov#:~:text=Coronaviruses%20\(CoV\)%20are,%2D19%20virus%E2%80%9D;](https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019ncov#:~:text=Coronaviruses%20(CoV)%20are,%2D19%20virus%E2%80%9D;)

https://en.wikipedia.org/wiki/COVID-19_pandemic). Μέχρι τα τέλη του ίδιου μήνα, είχαν αναφερθεί αρκετά κρούσματα του νέου ιού, χωρίς θανατηφόρο έκβαση, σε 18 χώρες. Λόγω αυτού του «ξεσπάσματος», ο Π.Ο.Υ. αντιμετώπισε την κατάσταση ως κίνδυνο για τη διεθνή δημόσια υγεία. Η διαρκώς αυξανόμενη καταγραφή κρουσμάτων και η κατακόρυφη αύξηση των θανάτων λόγω COVID-19 σε περισσότερες από 114 χώρες οδήγησαν τον Π.Ο.Υ. να κηρύξει επισήμως την κατάσταση ως πανδημία στις 11 Μαρτίου 2020, χαρακτηρίζοντάς την μάλιστα ως μία από τις πιο θανατηφόρες στην ιστορία (Ludwig & Zarbock, 2020). Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., στις 5 Μαΐου 2023 ανακοινώθηκε ότι η COVID-19 δεν αποτελεί πλέον Έκτακτη Ανάγκη Δημόσιας Υγείας Διεθνούς Ενδιαφέροντος (Public Health Emergency of International Concern – PHEIC), ωστόσο εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία.

Η νόσος COVID-19 εμφανίζει μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων, που κυμαίνονται από ασυμπτωματική ή ήπια νόσηση έως σοβαρή ιογενή πνευμονία, πολυοργανική δυσλειτουργία, σήψη και θάνατο (Huang et al., 2020). Από τη στιγμή του χαρακτηρισμού της ως πανδημία, θεσπίστηκαν αυστηρά πρωτόκολλα, δοκιμασίες και

μέθοδοι για την ανίχνευση, πρόληψη και αντιμετώπιση των περιστατικών. Με οδηγίες του Π.Ο.Υ., επιβλήθηκαν τοπικοί αποκλεισμοί και μέτρα καραντίνας, τα οποία αφορούσαν όχι μόνο πληθυσμιακές ομάδες και πόλεις, αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις ολόκληρες χώρες. Επιπλέον, οι επιστημονικές κατευθύνσεις πρόληψης περιλάμβαναν την υποχρεωτική χρήση μάσκας, το τακτικό και επιμελές πλύσιμο των χεριών, και την αποτελεσματική καθαριότητα και απολύμανση των επιφανειών. Εφαρμόστηκαν επίσης περιορισμοί και απαγορεύσεις στις μετακινήσεις (αεροπορικές, οδικές, θαλάσσιες) και στα ταξίδια. Η πανδημία COVID-19 και τα μέτρα πρόληψης που εφαρμόστηκαν είχαν ως άμεσο αποτέλεσμα τη διατάραξη της ομαλής λειτουργίας των κοινωνιών παγκοσμίως, συνοδευόμενη από τεράστιες οικονομικές συνέπειες (Nicola et al., 2020).

Με βασικό στόχο την ασφάλεια του πληθυσμού και την επιτυχή αντιμετώπιση της πανδημίας, κινητοποιήθηκαν και συνεργάστηκαν πανεπιστημιακές, κυβερνητικές ομάδες και η φαρμακευτική βιομηχανία, με σκοπό την ταχεία παρασκευή ειδικού εμβολίου. Η επίτευξη αυτού του στόχου σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα κατέστη δυνατή λόγω της προηγούμενης εμπειρίας των συμμετεχόντων ομάδων, η οποία είχε αποκτηθεί από την επιτυχή αντιμετώπιση πανδημιών που προκλήθηκαν από άλλους κορονοϊούς, όπως ο SARS-CoV (προκάτοχος του SARS-CoV-2) και ο MERS-CoV. Τα κύρια ισχυρά «όπλα» στην αντιμετώπιση της νόσου φαίνεται να είναι ο εκτενής εμβολιασμός, σε συνδυασμό με την άμεση διάγνωση και την τήρηση ειδικών μέτρων πρόληψης και αντιμετώπισης (Li et al., 2020; <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>).

Η θανατηφόρα φύση της πανδημίας επιβεβαιώνεται από τα παγκόσμια δεδομένα στα τέλη του 2021, όπου οι νοσήσεις είχαν ανέλθει στις 268.882.298 και οι θάνατοι στα 292.503 περιστατικά. Τα στοιχεία αυτά υπογράμμισαν την απαραίτητη συμβολή των μοριακών τεχνικών τόσο για τις μελέτες και την παρασκευή των εμβολίων όσο και για την ανίχνευση, αλληλούχηση και ταυτοποίηση του ιού (Lee et al., 2021; Pal et al., 2020).

2. Ιός MERS

Η πανδημία της COVID-19 δεν αποτέλεσε το πρώτο περιστατικό εμφάνισης σοβαρής νόσου από κορονοϊό, καθώς στο παρελθόν είχαν καταγραφεί επιδημικά κύματα,

από άλλους κορονοϊούς, μικρότερης γεωγραφικής εξάπλωσης αλλά με σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, όπως το Αναπνευστικό Σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (MERS - Middle East Respiratory Syndrome). Το σύνδρομο αυτό προκαλείται από τον ιό MERS-CoV, έναν κορονοϊό που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Η μετάδοση του ιού είναι κυρίως ζωνοτική, δηλαδή προέρχεται από τα ζώα και μεταδίδεται στον άνθρωπο, ενώ σε πολύ μικρότερο βαθμό παρατηρείται και μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο. Το σύνδρομο πρωτοεμφανίστηκε τον Ιούνιο του 2012 στη δυτική Σαουδική Αραβία. Μέχρι τον Δεκέμβριο του 2015, είχε εξαπλωθεί σε περισσότερες από 27 χώρες, προσβάλλοντας πάνω από 3.000 άτομα και προκαλώντας τον θάνατο σε περισσότερους από 900 ασθενείς (Mohd et al., 2016; Shehata et al., 2016; Zaki et al., 2012).

3. Ιοί SARS

3.1 SARS-CoV

Το Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome) προκαλείται από τον ιό SARS-CoV, έναν RNA ιό που ανήκει στην οικογένεια Coronaviridae και προσβάλλει πρωτίστως το αναπνευστικό σύστημα. Η αρχική μετάδοση του ιού έγινε μέσω ζωικών ξενιστών, ακολουθούμενη από την εξάπλωση της μόλυνσης στον άνθρωπο. Ο ιός πρωτοεμφανίστηκε στην Ασία και αποτέλεσε την αιτία για την έξαρση μιας επιδημίας που διήρκεσε αρκετούς μήνες το 2003 (Cleri et al., 2010).

Από ταξινομική άποψη, ο ιός SARS-CoV ανήκει στην τάξη Nidovirales και στην υποοικογένεια Orthocoronavirinae της οικογένειας Coronaviridae. Η οικογένεια Coronaviridae περιλαμβάνει δύο υποοικογένειες, την Orthocoronavirinae και την Lentovirinae (Huang et al., 2020). Η οικογένεια των κορονοϊών περιλαμβάνει επίσης τέσσερα γένη:

- α. Alphacoronavirus (αCoV)
- β. Betacoronavirus (βCoV)
- γ. Gammacoronavirus (γCoV)
- δ. Deltacoronavirus (δCoV).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα γένη άλφα (α) και βήτα (β) προκαλούν λοιμώξεις σε θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, ενώ τα δύο εναπομείναντα γένη (γ και δ) συνδέονται κυρίως με λοιμώξεις σε πτηνά. Ο SARS-CoV εντάσσεται στο γένος Betacoronavirus (βCoV) (Li et al., 2020; Salajegheh Tazerji et al., 2020).

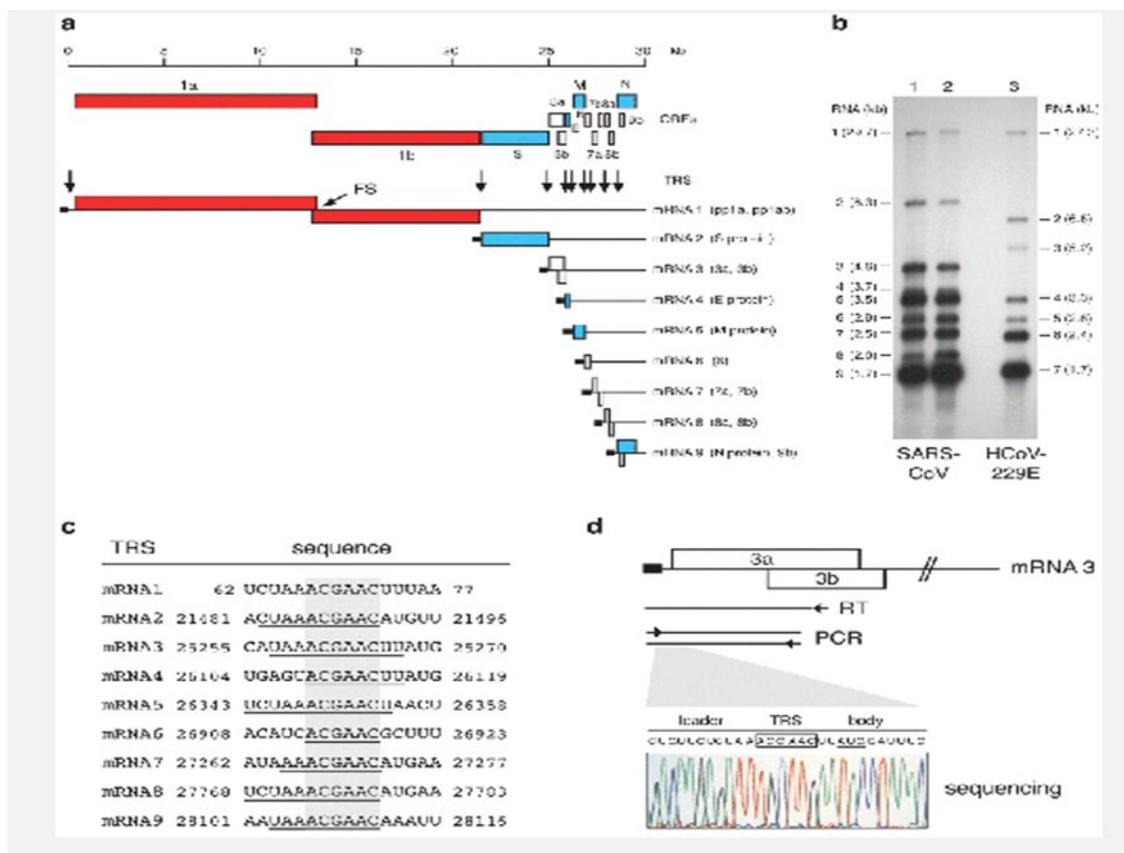
Ο ιός SARS-CoV έχει μέγεθος που κυμαίνεται από 80 έως 160 nm. Το RNA του ιού συνδυάζεται με τη νουκλεοπρωτεΐνη (N), σχηματίζοντας ένα ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιβάλλεται από λιποπρωτεϊνικό φάκελο (Li et al., 2020).

Η νόσηση μπορεί να ξεκινήσει με συνήθη, ήπια αρχικά συμπτώματα, όπως πυρετός (θερμοκρασία σώματος $>38^{\circ}\text{C}$), κεφαλαλγία και κόπωση. Μετά την πάροδο περίπου μιας εβδομάδας, ο ασθενής ενδέχεται να εκδηλώσει ξηρό βήχα, με πιθανή εξέλιξη σε πνευμονία. Η περαιτέρω επιπλοκή μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια, καταλήγοντας στον θάνατο (Cleri et al., 2010; Khater & Moorman et al., 2003).

Η έκφραση του γονιδιώματος του ιού SARS-CoV (βλέπε Εικόνα 1) επιτυγχάνεται μέσω σύνθετων και ποικίλων ρυθμιστικών μηχανισμών.

Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν:

- Τη σύνθεση υπογενωμικών mRNA (subgenomic mRNA).
- Τη μετατόπιση του ριβοσωμικού πλαισίου ανάγνωσης (ribosomal frameshifting) που λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα (Brierley, 1995).
- Τη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων (Ito et al., 2005; Rota et al., 2003; Thiel et al., 2003).



Εικόνα 1. Μηχανισμοί και ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την έκφραση του γονιδιώματος του κορωνοϊού SARS-CoV (Snijder et al., 2003).

3.2 SARS-CoV-2

3.2.1. Επιδημιολογία, Μετάδοση του ιού και Κλινική σημειολογία της COVID-19

Ο ιός SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) ανήκει στο γένος Betacoronavirus (βCoV) της οικογένειας των κορωνοϊών και, όπως υποδηλώνει η ονομασία του, είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου COVID-19. Ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην πόλη Wuhan της Κίνας στα τέλη του 2019 (Salajegheh Tazerji et al., 2020).

Έχει ζωνοτική προέλευση και παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τον ιό SARS-CoV, ο οποίος προσβάλλει τις νυχτερίδες. Παρόλο που και οι δύο ιοί προέρχονται από ζωικούς ξενιστές, επικρατεί η άποψη ότι η μετάδοση του SARS-CoV-2 στον

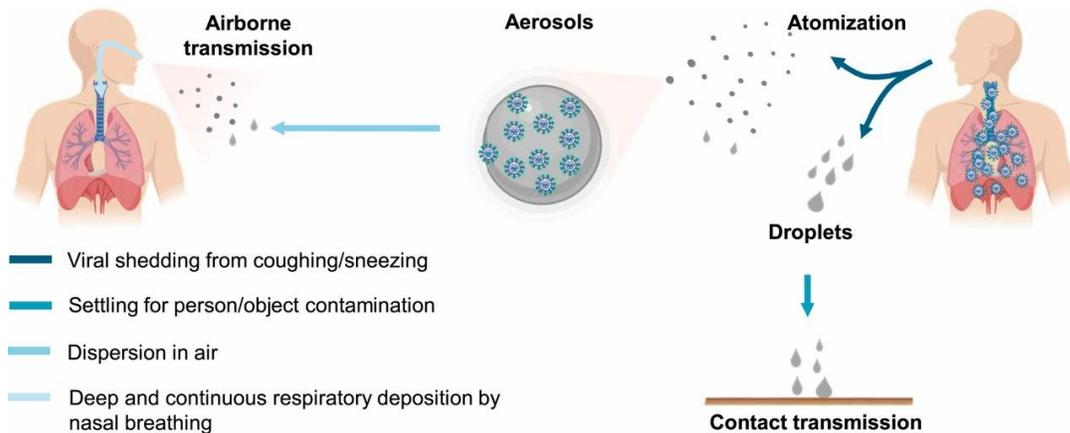
άνθρωπο έγινε μέσω του παγκολίνου (Salajegheh Tazerji et al., 2020; Xiao et al., 2020). Φυλογενετικά, ο SARS-CoV-2 είναι στενά συγγενής με τον SARS-CoV, μοιράζοντας περίπου 79,6% ομολογία στη γονιδιωματική τους αλληλουχία (Jiang et al., 2020). Η αλληλουχία του ιού αναλύθηκε ταχύτατα και κοινοποιήθηκε στις υγειονομικές αρχές τον Ιανουάριο του 2020. Η άμεση διάθεσή της στην ανοιχτής πρόσβασης ιστοσελίδα του ιού υπήρξε κρίσιμη για την ταχεία εξέλιξη της επιστημονικής έρευνας και την αντιμετώπιση της πανδημίας (Zhang & Holmes, 2020).

Στον άνθρωπο, ο ιός προκαλεί οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, προσβάλλοντας τόσο το ανώτερο όσο και το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα (Pal et al., 2020). Ο Π.Ο.Υ. χαρακτήρισε τη νόσο που σχετιζόταν με τον ιό ως πανδημία. Τον Ιανουάριο του 2020 είχαν αναφερθεί περίπου 1.975 επιβεβαιωμένα κρούσματα, ενώ μέχρι το Δεκέμβριο 2020, η νόσος είχε προκαλέσει εκατοντάδες χιλιάδες επιβεβαιωμένους θανάτους παγκοσμίως, με τον συνολικό αριθμό να συνεχίζει να αυξάνεται ραγδαία καθώς η πανδημία εξαπλωνόταν σε περισσότερες χώρες (Wu F. et al., 2020).

Αρχικά, η εμφάνιση του ιού στην Wuhan δημιούργησε την υπόθεση ότι η νόσηση στον άνθρωπο προκλήθηκε από άμεση επαφή με είδος ιχθύος ή άλλη άμεση επαφή ανθρώπου-ζώου, καθώς είχε προηγηθεί εμπειρία μόλυνσης από άλλα είδη του ζωικού βασιλείου (Chen Y. et al., 2020). Ωστόσο, κυριάρχησε η άποψη ότι η μετάδοση πραγματοποιείται κυρίως (Zhang R. et al., 2020):

- Μεταξύ ανθρώπων, μέσω άμεσης επαφής ή στενής εγγύτητας, ιδιαίτερα σε κλειστούς χώρους
- Μέσω σταγονιδίων-αερολυμάτων, τα οποία επιτρέπουν τη μεταφορά του ιού σε απόσταση πέραν του ενός μέτρου (Εικόνα 2)
- Μέσω επαφής με μολυσμένες επιφάνειες (fomites), όπου τα σταγονίδια έχουν εναποτεθεί σε αυτές.

Η πιθανότητα μετάδοσης θεωρήθηκε μικρότερη σε καλά αεριζόμενους ή εξωτερικούς χώρους (Pal et al., 2020). Επιπλέον, αρχικά, οι μελέτες σχετικά με την κάθετη μετάδοση του ιού από κυοφορούσες γυναίκες στο έμβρυο ήταν περιορισμένες και δεν είχαν αποδείξει τη μετάδοση (Rothan & Byrareddy et al., 2020).



Εικόνα 2. Μετάδοση του SARS-CoV 2 (Zhang R. et al., 2020)

Η νόσος COVID-19 εμφανίζει ένα ευρύ κλινικό φάσμα, το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματική λοίμωξη έως πολύ σοβαρή εκδήλωση κυρίως από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Η βαρύτερη μορφή της νόσου φαίνεται να πλήττει συχνότερα, αλλά όχι αποκλειστικά, άτομα με υποκείμενα νοσήματα ή όσους ανήκουν σε ειδικές κατηγορίες κινδύνου.

Οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν:

- Άτομα σε ανοσοκαταστολή
- Ασθενείς με καρκίνο ή σακχαρώδη διαβήτη (οποιοδήποτε τύπου)
- Άτομα με καρδιαγγειακές ή αιματολογικές παθήσεις
- Άτομα με δυσλειτουργία οργάνων ή γενετικές διαταραχές.

Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το ενδεχόμενο ο ασθενής να αγνοεί την ύπαρξη υποκείμενων νοσημάτων που ενδέχεται να επιβαρύνουν την πορεία της COVID-19.

Τα συμπτώματα της νόσου αφορούν κυρίως το αναπνευστικό, γαστρεντερικό και καρδιαγγειακό σύστημα (αρρυθμίες, πόνο στο στήθος, κ.ά) (Li J. et al., 2021). Τα συχνότερα συμπτώματα περιλαμβάνουν:

Αναπνευστικό:

- Δύσπνοια (αναπνευστική δυσφορία)
- Βήχας (ξηρός ή παραγωγικός)
- Θωρακικός πόνος / αίσθηση πίεσης στο στήθος

Γενικά / Συστηματικά:

- Πυρετός
- Κόπωση / κόπωση πολύ έντονη
- Μυαλγίες (πόννοι στους μυς)
- Αρθραλγίες
- Κεφαλαλγία

Γαστρεντερικό:

- Διάρροια
- Ναυτία και εμετός
- Κοιλιακό άλγος

Αισθητήρια όργανα:

- Απώλεια γεύσης (δυσγευσία)
- Απώλεια όσφρησης (ανοσμία)

Άλλα:

- Πονόλαιμος
- Ρινική συμφόρηση / καταρροή
- Αιμόπτυση
- Ναυτία, έμετοι, αρθραλγίες.

Η COVID-19 θεωρείται ιδιαίτερα επικίνδυνη, καθώς μπορεί να οδηγήσει από μια απλή πνευμονία σε ανεπάρκεια ή ακόμα και καταστροφή λειτουργικών οργάνων, καταλήγοντας στον θάνατο (Rothan & Byrareddy et al., 2020; Li J. et al., 2021).

Ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών εμφανίζει εμμένουσες ή νέες κλινικές εκδηλώσεις μετά την αρχική φάση ανάρρωσης. Το σύνδρομο αυτό, γνωστό ως long COVID, περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, όπως χρόνια κόπωση, προβλήματα συγκέντρωσης και μνήμης, κεφαλαλγίες, διαταραχές ύπνου, δύσπνοια, βήχα, πόνο στο στήθος, διάρροια, μυϊκούς και αρθρικούς πόνους, καθώς και διαταραχές

όσφρησης και γεύσης, που μπορούν να διαρκέσουν εβδομάδες έως μήνες μετά τη νόσο (Natarajan et al., 2023).

Σε αρκετές περιπτώσεις με έντονα συμπτώματα, έχουν παρατηρηθεί εργαστηριακά ευρήματα όπως λεμφοπενία αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών και D-διμερών (D-dimers). Επιπλέον, ο απεικονιστικός έλεγχος μπορεί να εμφανίσει έντονες αλλοιώσεις στην πνευμοθωρακική περιοχή (Huang et al., 2020; Rothan & Byrareddy et al., 2020).

Ο ρόλος της ηλικίας και του φύλου είναι σημαντικός για την πρόβλεψη της έντασης και της έκτασης της νόσου. Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει δημογραφικά στοιχεία ατόμων διαφορετικών ηλικιών, τα οποία μολύνθηκαν από το αρχικό στέλεχος του ιού στην Wuhan και χρειάστηκαν, λόγω COVID-19, νοσηλεία είτε σε απλό, είτε σε θάλαμο αρνητικής πίεσης (Huang et al., 2020).

	Ασθενείς (41)	Ασθενείς ΜΕΘ (13)	Ασθενείς όχι στη ΜΕΘ (28)
Ηλικία	49.0 (41.0-58.0)	49.0 (41.0-61.0)	49.0 (41.0-57.5)
Άνδρες	30 (73%)	11 (85%)	19 (68%)
Γυναίκες	11 (27%)	2 (15%)	9 (32%)

Πίνακας 1. Δημογραφικά στοιχεία (ηλικία, φύλο) 41 ασθενών με COVID-19 που νοσηλεύτηκαν σε απλό θάλαμο ή με αρνητική πίεση (Huang et al., 2020).

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει ενδεικτικές τιμές βιοχημικών και ειδικών εργαστηριακών εξετάσεων που καταγράφηκαν σε ασθενείς με COVID-19 στην επαρχία Ζεγιάνγκ (Zhejiang) της Κίνας (Lian et al., 2020).

Albumin (g/L; normal range 40-55)	Μειωμένα επίπεδα	170 (36.56%)
Alanine aminotransferase (U/L; normal range 9-50)	Αυξημένα επίπεδα	47 (10.11%)

Aspartate aminotransferase (U/L; normal range 15-40)	Αυξημένα επίπεδα	52 (11.18%)
Procalcitonin (ng/mL; normal range 0-0.5)	Αυξημένα επίπεδα	0 (0%)
Creatine kinase (U/L; normal range 50-310)	Αυξημένα επίπεδα	23 (4.95%)

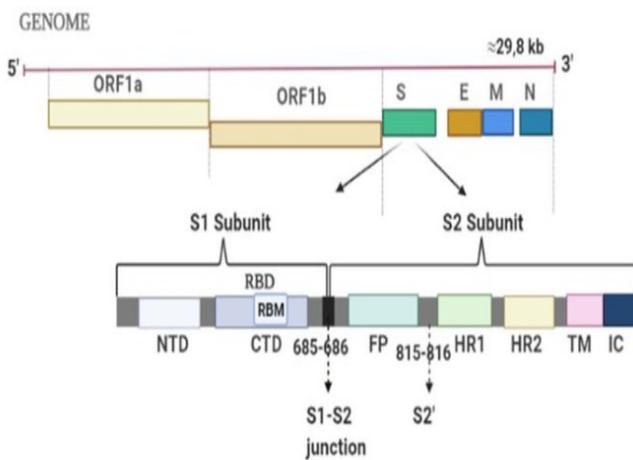
Πίνακας 2. Βιοχημικές και ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις νοσηλευόμενων με COVID-19 (Lian et al., 2020).

3.2.2. Περιγραφή της δομής και του γονιδιώματος του SARS-CoV-2

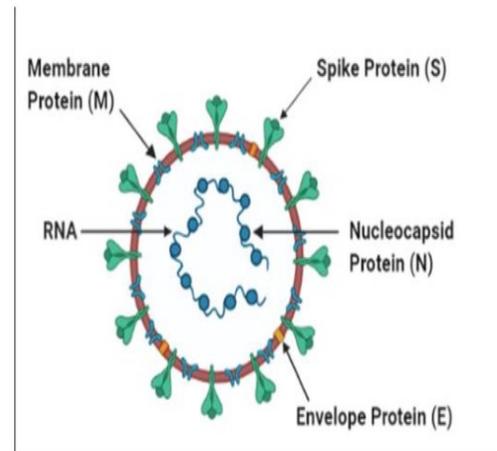
Ο SARS-CoV-2 είναι ένας ιός ssRNA (single-stranded RNA) μονής έλικας, θετικής πολικότητας (+ssRNA), με μέγεθος γονιδιώματος ελαφρώς μεγαλύτερο από 30.000 νουκλεοτίδια (Chen Y. et al., 2020). Το γονιδίωμα κωδικοποιεί τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες. Η χαρακτηριστική λατινική ονομασία του ιού (corona, στέμμα) οφείλεται στην εμφάνιση της επιφανειακής πρωτεΐνης S (Spike). Η πρωτεΐνη αυτή σχηματίζει τριμερή σωμάτια στην επιφάνεια του ιού, προσδίδοντάς του σχήμα «κορώνας» (Εικόνα 3).

Η πρωτεΐνη ακίδας (S) είναι πιθανώς η δομική πρωτεΐνη με τη μεγαλύτερη ζωτική σημασία για τον κύκλο ζωής του ιού. Ο κεντρικός ρόλος της εντοπίζεται στη διείσδυση του ιού στο κύτταρο - ξενιστή, μια διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσής της με τον ειδικό κυτταρικό υποδοχέα ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2 - μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνης 2) (Candido et al., 2022). Πέρα από την πρόσδεση, η πρωτεΐνη S συμμετέχει καθοριστικά στη διαδικασία σύντηξης (fusion) και μεταφοράς του ιού (Jiang et al., 2020; Velavan & Meyer et al., 2020).

A



B



Εικόνα 3. Σχηματική περιγραφή της ακίδας (S) και του ιού SARS-CoV-2 με το γονιδίωμα του (Guler et al., 2021)

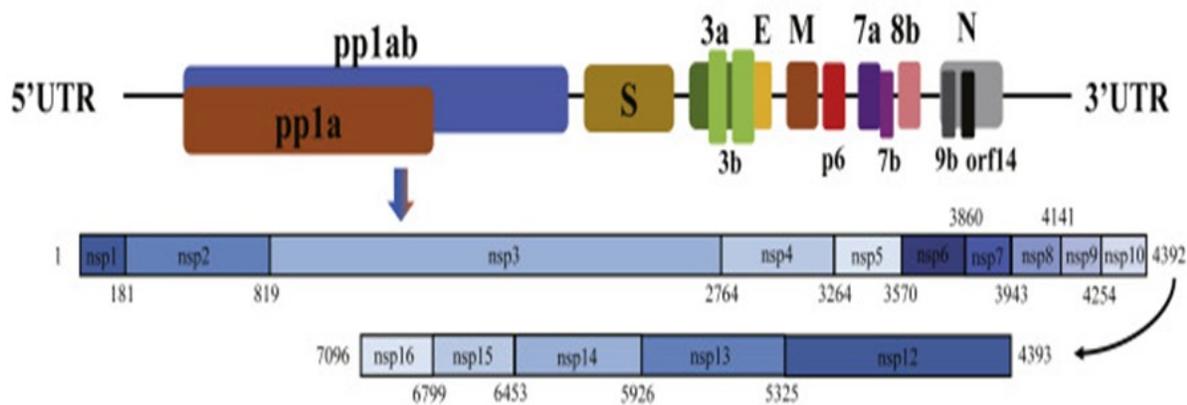
Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο μεγάλων Ανοιχτών Πλαισίων Ανάγνωσης (Open Reading Frames - ORF), των ORF1a και ORF1b (Εικόνα 3). Τα πλαίσια αυτά καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος, βρίσκονται σε σειρά, ακολουθώντας την κατεύθυνση 5' προς 3' και μεταφράζονται σε πολυπρωτεΐνες (pp) μέσω μηχανισμού μετατόπισης πλαισίου (Hu et al., 2021).

Πρόκειται για μακριά μόρια RNA, τα οποία φέρουν:

- “Καλυμμένο” (capped) το 5' άκρο τους και
- Πολυαδενυλιωμένο (polyadenylated) το 3' άκρο τους (Εικόνα 4).

Ακολουθούνται από μη μεταφραζόμενες περιοχές (Untranslated Regions - UTRs), οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της αντιγραφής του ιού (Verma et al., 2021).

IVDC-HB-01/2019 (HB01-29.8 kb)



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της δομής του γονιδιώματος και των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών για την εκδοχή *pp1ab* και *pp1a* του IVDC-HB-01/2019 (HB01). Το μεγαλύτερο γονίδιο της *orf 1* περιοχής που ονομάζεται *orf1ab* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *pp1ab*, η οποία περιλαμβάνει 15 μη δομικές πρωτεΐνες, *nsp*s (*nsp1-nsp10* and *nsp12-nsp16*). Η *pp1a* κωδικοποιείται επίσης από το *orf1a* και περιλαμβάνει 10 *nsp*s (*nsp1-nsp10*).

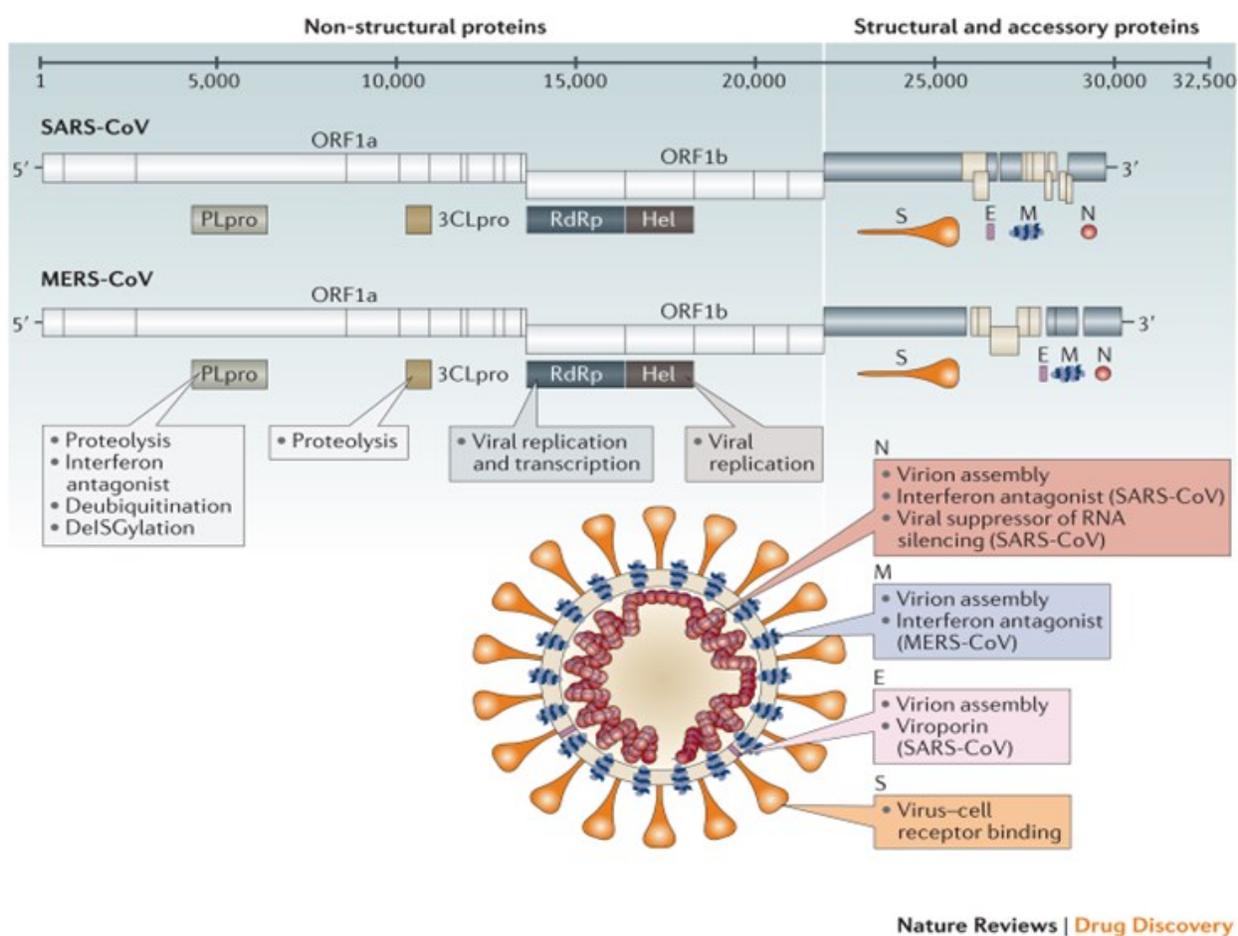
Οι δομικές πρωτεΐνες, κωδικοποιούνται από τα 4 δομικά γονίδια, τα οποία συμπεριλαμβάνουν το γονίδιο για την ακίδα (*S*), τον φάκελο (*E*), τη μεμβράνη (*M*) και το νουκλεοκαψίδιο (*N*). Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του γονιδιώματος του 2019-nCoV βρέθηκαν μέσα από τις διαθέσιμες βιβλιοθήκες GeneMarkS <http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi> και ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) (Wu A. et al., 2020)

Τα Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης (ORFs) των SARS ιών μεταφράζονται σε μεγάλες πολυπρωτεΐνες (Snijder et al., 2003). Στη συνέχεια, οι πολυπρωτεΐνες υφίστανται πρωτεολυτική διάσπαση (Εικόνα 5), η οποία καταλύεται κυρίως από τις πρωτεάσες 3CLpro και PLpro (Hazzen, 1974). Από τη διαδικασία αυτή εκφράζονται οι μη δομικές

πρωτεΐνες (non-structural proteins - nsps), οι οποίες είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Στις σημαντικότερες μη δομικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται:

- Η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-Dependent RNA Polymerase - RdRp), η οποία αποτελείται από τις nsps 7, 8 και 12 και
- Η ελικάση (nsp13).

Ο τελικός στόχος της έκφρασης και δράσης αυτών των πρωτεϊνών είναι η αντιγραφή, η μεταγραφή και η μετάφραση του γονιδιώματος του ιού, διασφαλίζοντας έτσι τον κύκλο ζωής του (Sahebnasagh et al., 2020; Snijder et al., 2003).

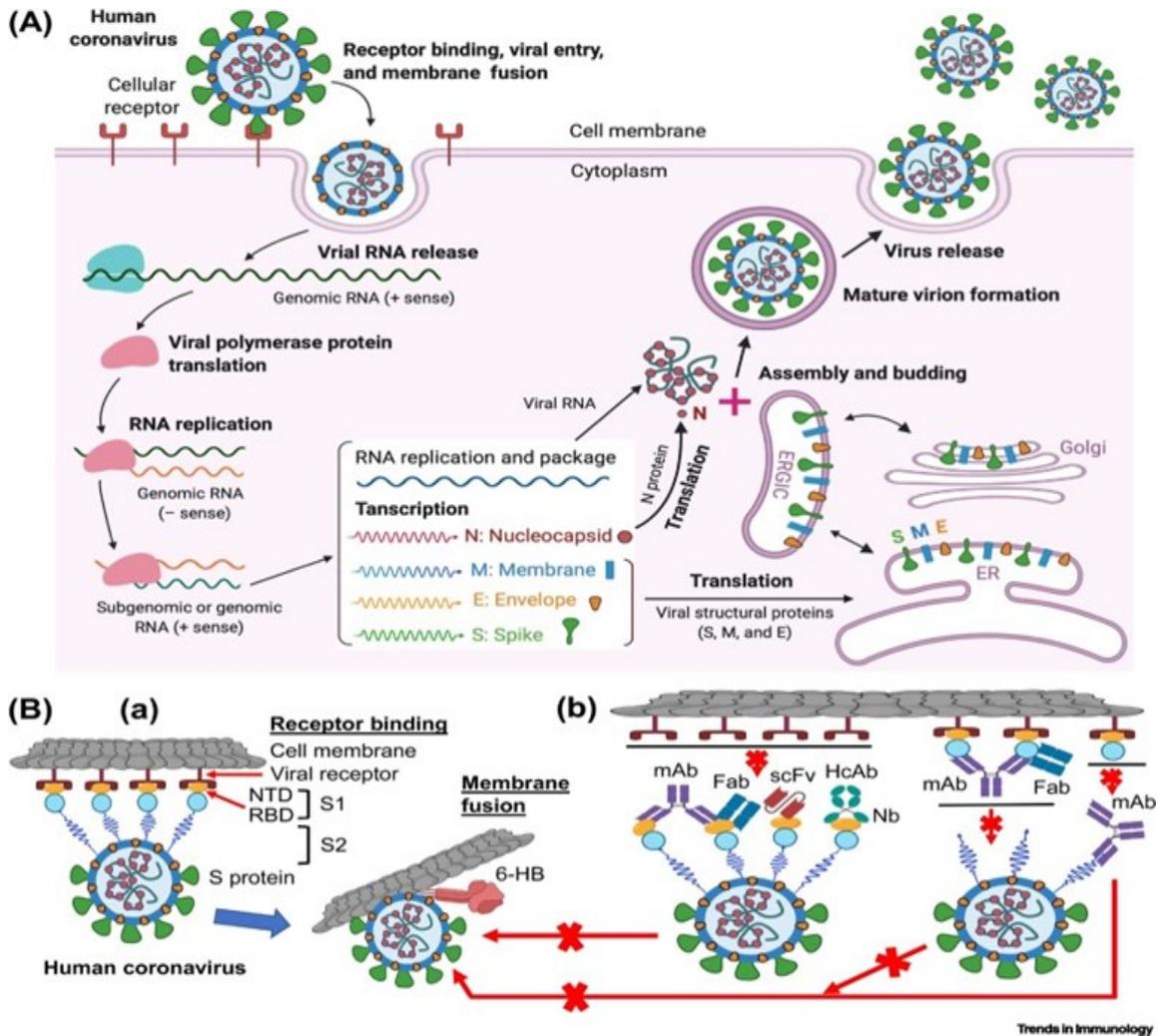


Εικόνα 5. Γονιδιώματα και δομή των ιών SARS-CoV και MERS-CoV (Sahebnasagh et al., 2020)

Το γονιδίωμα των ιών SARS και του SARS-CoV-2 περιλαμβάνει, εκτός από την πρωτεΐνη ακίδας (S), τρεις ακόμη κύριες δομικές πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη E (Envelope), την πρωτεΐνη M (Membrane) και την πρωτεΐνη N (Nucleocapsid), η λειτουργία των οποίων φαίνεται παρακάτω:

Πρωτεΐνη	Βασική Λειτουργία	Αλληλεπιδράσεις & Χαρακτηριστικά
M (Μεμβράνης)	Δρα ως ο κύριος ρυθμιστής της ιικής δομής, διαμορφώνοντας την εξωτερική δομή του ιού και διασφαλίζοντας ότι όλα τα συστατικά του ενώνονται σωστά.	Δρα ως συνδετικός κρίκος ανάμεσα στις πρωτεΐνες S, E και N, διασφαλίζοντας τη σωστή δομή. Είναι υπεύθυνη για την ευκαμψία της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή, διευκολύνοντας έτσι τη διαμόρφωση του ιικού σωματιδίου (Yang et al., 2021; Gorkhali et al., 2021; Dolan et al., 2022)
E (Φακέλου)	Βοηθά στη δημιουργία και την απελευθέρωση των νέων ιών, διασφαλίζοντας ότι ο ιός παραμένει ισχυρός και ικανός να εξαπλωθεί στον οργανισμό.	Συνεργάζεται στενά με την πρωτεΐνη M για τη σωστή δομή και σταθεροποίηση του εξωτερικού περιβλήματος του ιού. Λειτουργεί σαν μικροσκοπική πύλη (κανάλι), ρυθμίζοντας τη ροή σωματιδίων που κάνουν τον ιό πιο ισχυρό και του επιτρέπουν να παρακάμπτει την άμυνα του ξενιστή (Gorkhali et al., 2021; Dolan et al., 2022; Agarwal et al., 2024).
N (Νουκλεοκαψιδίου)	Λειτουργεί ως περίβλημα του γενετικού υλικού. Δεσμεύει το RNA του ιού και το οργανώνει σε μια συμπαγή μορφή, ώστε να χωρέσει με ασφάλεια μέσα στο νέο ιικό σωματίδιο.	Συνεργάζεται με την πρωτεΐνη M για τη σωστή τοποθέτηση του RNA μέσα στο ιικό σωματίδιο. Είναι η πρωτεΐνη που ανιχνεύουν οι περισσότερες διαγνωστικές δοκιμασίες. Βοηθά τον ιό να προστατεύεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού (Gorkhali et al., 2021; Minigulov et al., 2024; Cao et al., 2025).

Επιπλέον, το γονιδίωμα κωδικοποιεί 16 μη δομικές πρωτεΐνες (nsP1-16), οι οποίες είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (Kim et al., 2020).



Εικόνα 6. Ο κύκλος της ζωής των εξαιρετικά παθογόνων κορονοϊών που επηρεάζουν τον άνθρωπο (CoVs) και συγκεκριμένα εξουδετερωτικά αντισώματα (nAbs) κατά των ιών αυτών (Jiang et al., 2020)

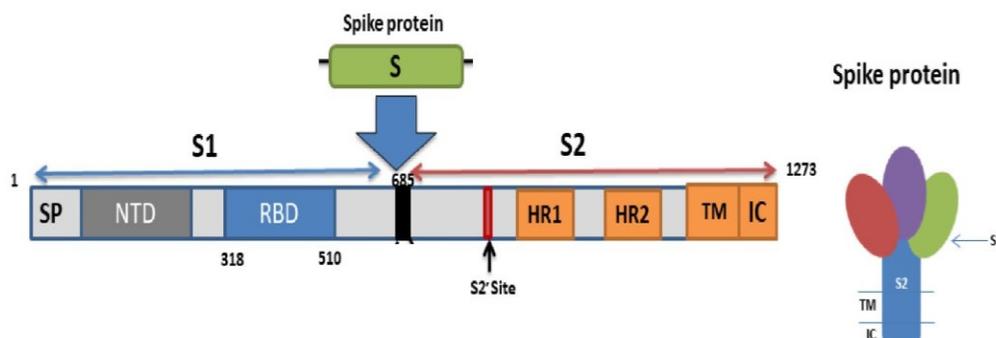
Φυλογενετικά παθογόνοι κορωνοϊοί εισέρχονται στα κύτταρα ξενιστή μέσω σύνδεσης με τους υποδοχείς ACE2 (SARS-CoV-2, SARS-CoV) ή DPP4 (MERS-CoV) μέσω της πρωτεΐνης ακίδας (S), η οποία μεσολαβεί στη σύντηξη ιού-κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 6). Το ιικό γονιδιωματικό RNA απελευθερώνεται και μεταφράζεται σε πρωτεΐνες πολυμεράσης, ενώ το αρνητικό (-)-sense RNA χρησιμοποιείται για την παραγωγή υπογονιδιωματικού ή θετικού (+)-sense RNA. Το RNA και οι πρωτεΐνες νουκλεοκαψιδίου (N) αντιγράφονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι δομικές πρωτεΐνες S, M

και Ε μεταφράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μεταφέρονται στο σύμπλεγμα Golgi. Στο ενδιάμεσο διαμέρισμα ER–Golgi (ERGIC) συναρμολογούνται όλα τα συστατικά για τη δημιουργία ώριμων ιικών σωματιδίων, τα οποία στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα κύτταρα ξενιστή (Jiang et al., 2020).

Η πρωτεΐνη ακίδας (S) είναι μία διαμεμβρανική δομική πρωτεΐνη και ταυτόχρονα μία πρωτεΐνη σύντηξης (fusion protein) πρώτης τάξεως. Αποτελείται από περίπου 1.300 αμινοξέα και σχηματίζει τριμερή δομή. Υποδιαιρείται σε δύο υποομάδες:

- Υποομάδα S1: Περιλαμβάνει την περιοχή RBD (Receptor - Binding Domain), η οποία είναι ο τομέας όπου πραγματοποιείται η σύνδεση με τον υποδοχέα ACE2. Η S1 είναι πιο ευέλικτη ώστε να εντοπίζει την ισχυρότερη θέση δέσμευσης, είναι πιο επιρρεπής σε μεταλλάξεις και συμβάλλει στη σταθεροποίηση της περιοχής S2 (Walls et al., 2020).
- Υποομάδα S2: Συμβάλλει κυρίως στη σύντηξη.

Οι υποομάδες της πρωτεΐνης ακίδας S διαφοροποιούνται δομικά έτσι ώστε η υποομάδα S1 να διαθέτει σχήμα V, συμβάλλοντας καθοριστικά στην τελική τριμερή δομή της πρωτεΐνης S και η υποομάδα S2 να χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων α -ελίκων (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Δομή πρωτεΐνης Spike (Walls et al., 2020)

Η πρωτεΐνη S είναι η κρίσιμη πρωτεΐνη με την οποία συνδέεται ο υποδοχέας ACE2, σηματοδοτώντας έτσι την έναρξη της παθογένειας του ιού. Αυτή η σύνδεση οδηγεί στην εισαγωγή του ιού στο κύτταρο-ξενιστή (Candido et al., 2022; Velavan & Meyer et al.,

2020; Zeng et al., 2020). Το σημείο πρόσδεσης και ο βαθμός ισχύος της σύνδεσης (ισχυρή ή χαλαρή) της πρωτεΐνης S με τον υποδοχέα ACE2 είναι καθοριστικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η φύση της δέσμευσης προσδιορίζει:

- Την επιθετικότητα του ιού (Walls et al., 2020),
- Τον βαθμό μεταδοτικότητας (infectivity),
- Τον τρόπο έκφρασης και την κλινική πορεία της νόσου (Tang et al., 2020).

4. Μεταλλάξεις SARS-CoV-2

Ο ιός SARS-CoV-2, ο οποίος προκαλεί τη νόσο COVID-19, αναπτύσσεται και μεταλλάσσεται συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της πανδημίας. Οι τυχαίες μεταβολές που προκαλούνται στο γενετικό υλικό του κορονοϊού κατά τη διαδικασία της αντιγραφής αφορούν αλλαγές στη σειρά των νουκλεοτιδίων του γονιδιώματος (Akkiz, 2022). Οι μεταλλάξεις μπορεί να προκύψουν από νουκλεοτίδια που υφίστανται:

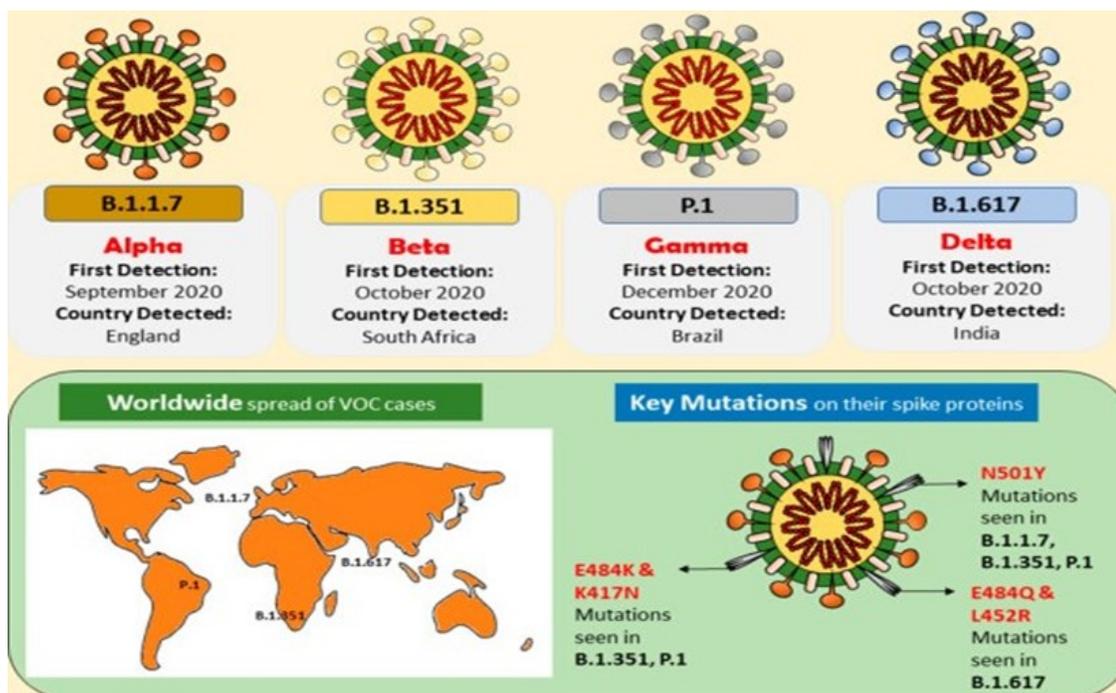
- Αντιστροφή (Inversions)
- Αναστολή (Inhibitions)
- Διαγραφή (Deletions)
- Εισαγωγή (Insertions)

Τέτοιες μεταλλάξεις παρατηρούνται κυρίως στο γονίδιο της πρωτεΐνης ακίδας (Spike) (Aleem et al., 2021). Ορισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν καθοριστικά την πορεία της νόσου και την αντιμετώπισή της. Συγκεκριμένα, δύνανται: να επηρεάσουν την κλινική εικόνα του ασθενούς, να οδηγήσουν σε ανεπαρκή απάντηση του οργανισμού στη θεραπεία, προσδίδοντας ανθεκτικότητα στη θεραπευτική αγωγή, να επηρεάσουν τον ρυθμό μετάδοσης του ιού και να μειώσουν την αποδοτικότητα των διαθέσιμων εμβολίων (Boehm et al., 2021).

Αυτές οι επιπτώσεις κατέστησαν αναγκαία τη συστηματική μελέτη των νέων στελεχών και τη διαρκή επαγρύπνηση του επιστημονικού κόσμου για την ταχύτερη ανακάλυψή τους.

Οι πλέον γνωστές και κρίσιμες παγκοσμίως παραλλαγές (Variants of Concern, VOCs) του ιού, οι οποίες απασχόλησαν έντονα την επιστημονική κοινότητα κατά τη

διάρκεια της πανδημίας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 είναι οι: Alpha, Beta, Gamma, Delta, καθώς και η Omicron (Akkiz, 2022). Αυτές οι παραλλαγές φέρουν ένα σύνολο γενετικών μεταλλάξεων, οι οποίες εντοπίζονται, μεταξύ άλλων, στην περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD) της πρωτεΐνης S. Η μετάλλαξη στην RBD είναι κρίσιμη, καθώς, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, αυτή η περιοχή είναι απαραίτητη για τη σύνδεση με τον υποδοχέα ACE2 του κυττάρου ξενιστή και τη διευκόλυνση της εισόδου του ιού εντός του κυττάρου (Galloway et al., 2021).



Εικόνα 8. Απεικόνιση των παραλλαγών ανησυχίας (VOCs): B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.617/B.1.617.2 (Delta), και P.1 (Gamma) και οι μεταλλάξεις κλειδιά που τις χαρακτηρίζουν (Thye et al., 2021).

1. Μετάλλαξη Alpha

Η παραλλαγή B.1.1.7, γνωστή και ως 20I/501Y.V1 ή Alpha, εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Μεγάλη Βρετανία προς τα τέλη Δεκεμβρίου του 2020. Η συγκεκριμένη

παραλλαγή χαρακτηρίζεται από συνολικά 17 μεταλλάξεις στο γονιδίωμα. Από αυτές, οκτώ εντοπίζονται στην κρίσιμη πρωτεΐνη ακίδας. Οι μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνουν τις: ΔΗ69/70, Δ 144, Ν501Υ, Α570D, Ρ681Η, Τ716Ι, S982Α, D1118Η (Aleem et al., 2021).

Η παραλλαγή Β.1.1.7 ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον 118 χώρες και αποδείχθηκε σημαντικά πιο μεταδοτική και λοιμογόνος συγκριτικά με το αρχικό στέλεχος του ιού. Συγκεκριμένα, εμφάνισε διπλάσιο ρυθμό μετάδοσης ενώ καταγράφηκαν και περισσότερα θανατηφόρα περιστατικά (Aleem et al., 2021; Volz et al., 2021). Τα αποτελέσματα μοντελοποίησης ανέδειξαν ότι μια τόσο μεταδοτική παραλλαγή, όπως η Β.1.1.7, είχε τη δυνατότητα να επιδεινώσει την εξέλιξη της πανδημίας παγκοσμίως και ιδιαίτερα στις ΗΠΑ και να καθυστερήσει περαιτέρω τον έλεγχο της νόσου (Galloway et al., 2021).

2. Μετάλλαξη Beta

Η παραλλαγή Β.1.351, γνωστή και ως 501Υ.V2 ή Beta, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά τον Οκτώβριο του 2020 στη Νότια Αφρική και έκτοτε έχει ανιχνευθεί σε πολλές επιπλέον χώρες. Η Β.1.351 παρουσιάζει πολλαπλές αλλαγές στο γονιδίωμα, με συνολικά 23 μεταλλάξεις, εκ των οποίων οι 17 αφορούν αλλαγές σε αμινοξέα. Οι τρεις πλέον αξιοσημείωτες μεταλλάξεις εντοπίζονται στην πρωτεΐνη ακίδας (S) και είναι οι K417N, E484K, Ν501Υ και αυξάνουν τη συγγένεια δέσμευσης για τους υποδοχείς ACE (Aleem et al., 2021; Cascella et al., 2024).

Η παραλλαγή Β.1.351 είναι αξιοσημείωτη λόγω της μεγάλης μεταδοτικότητάς της και της μειωμένης ευαισθησίας που επιδεικνύει στα εξουδετερωτικά αντισώματα. Αυτή η ιδιότητα οδηγεί σε μεγαλύτερη πιθανότητα επαναμόλυνσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που χρήζουν νοσοκομειακής φροντίδας λόγω αυτής της παραλλαγής είναι ηλικίας μικρότερης των 60 ετών (Thye et al., 2021).

3. Μετάλλαξη Gamma

Η παραλλαγή Gamma (γενεαλογία Ρ.1) σχετιζόταν άμεσα με ασθενείς που είχαν ταξιδέψει στις περιοχές της Ιαπωνίας και της Βραζιλίας. Η πρώτη καταγεγραμμένη μόλυνση ασθενούς με αυτή τη μετάλλαξη εντοπίστηκε στη Βραζιλία τον Δεκέμβριο του

2020, με την παρουσία της να επεκτείνεται σε τουλάχιστον 36 επιπλέον χώρες μέχρι τις αρχές του επόμενου έτους (Cascella et al., 2024).

Η παραλλαγή P.1 παρουσιάζει συνολικά 17 διαφοροποιήσεις, μη συνώνυμες, στο γονιδίωμά της (Faria et al., 2021). Από αυτές, 10 μεταλλάξεις αμινοξέων εντοπίζονται στην πρωτεΐνη ακίδας S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K και N501Y) με τις τρεις μεταλλάξεις N501Y, K417T και E484K που εντοπίζονται στην περιοχή RBD να είναι παρόμοιες με την παραλλαγή B.1.351 (Faria et al., 2021; Aleem et al., 2021; Villas-Boas et al., 2022).

Η P.1 παρουσιάζει υψηλό ποσοστό επαναμόλυνσης και μειωμένη ευαισθησία σε αντισώματα, είτε αυτά προέρχονται από φυσική νόσηση είτε από εμβολιασμό (Thye et al., 2021). Με βάση ένα δυναμικό μοντέλο δύο κατηγοριών που ενσωματώνει γονιδιωματικά δεδομένα και στοιχεία θνησιμότητας, εκτιμάται ότι η P.1 είναι περίπου 1,7–2,4 φορές πιο μεταδοτική και προηγηθείσα μόλυνση με άλλο στέλεχος παρέχει μόνο 54–79% προστασία έναντι μόλυνσης με P.1 (Faria et al., 2021). Αυτά τα χαρακτηριστικά υποδηλώνουν αυξημένη ικανότητα διαφυγής από την ανοσολογική απάντηση του οργανισμού.

4. Μετάλλαξη Delta

Η παραλλαγή B.1.617.2, γνωστή ως Delta, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ινδία στα τέλη του 2020, κατά τη διάρκεια της αυξανόμενης μετάδοσης στις περιοχές Maharashtra και Delhi (Dhar et al., 2021). Αποτελεί παρακλάδι του ευρύτερου συμπλέγματος B.1.617, από το οποίο προέκυψαν επίσης οι B.1.617.1 (Kappa) και B.1.617.3. Στη συνέχεια, η Delta εξελίχθηκε σε μεγάλο αριθμό υποπαραλλαγών AY., οι οποίες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για την επιτήρηση της γενετικής διαφοροποίησης του στελέχους (Aleem et al., 2021).

Η B.1.617.2 φέρει πολλαπλές μεταλλάξεις στο γονιδίωμά της, με ιδιαίτερη σημασία σε αυτές που εντοπίζονται στην πρωτεΐνη Spike. Μεταξύ των πιο κρίσιμων είναι οι L452R, T478K, P681R και οι διαγραφές στα αμινοξέα 157–158, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένη μεταδοτικότητα, μεγαλύτερη συγγένεια με τον υποδοχέα ACE2 και εν μέρει μειωμένη ευαισθησία σε εξουδετερωτικά αντισώματα (Mlcochova et al., 2021). Αντίθετα με την

ευρέως διαδεδομένη παρανόηση, η Delta δεν διαθέτει τη μετάλλαξη E484Q, η οποία είναι χαρακτηριστική άλλης υπογραμμής του συμπλέγματος B.1.617, της B.1.617.1 (Akkiz, 2022).

Η ραγδαία εξάπλωση της παραλλαγής παρατηρήθηκε κατά το δεύτερο σημαντικό κύμα της πανδημίας στην Ινδία την άνοιξη του 2021, το οποίο συνδέθηκε με δραματική αύξηση κρουσμάτων, νοσηλειών και θανάτων (Dhar et al., 2021). Η αυξημένη βαρύτητα της νόσου καταγράφηκε κυρίως σε ανεμβολίαστους ενήλικες, ενώ δεν τεκμηριώθηκε ότι η Delta προκαλούσε σοβαρότερη νόσηση κυρίως σε παιδιά, γεγονός που είχε αρχικά διατυπωθεί χωρίς επαρκή επιστημονική βάση (Thye et al., 2021).

Επιπλέον, η παραλλαγή Delta παρουσίασε μειωμένη ευαισθησία σε ορισμένες θεραπείες μονοκλωνικών αντισωμάτων και έδειξε μερική ανοσολογική διαφυγή, μειώνοντας την εξουδετέρωση από ορούς ατόμων που είχαν νοσήσει ή εμβολιαστεί (Micochona et al., 2021). Παρ' όλα αυτά, τα διαθέσιμα εμβόλια εξακολούθησαν να παρέχουν ισχυρή προστασία έναντι σοβαρής νόσησης και θανάτου, ακόμα και μετά την επικράτηση της Delta (Lopez Bernal et al., 2021).

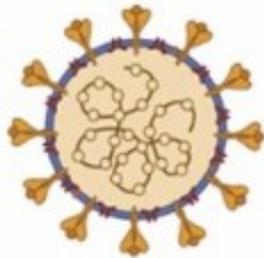
5. Μετάλλαξη Omicron

Η παραλλαγή B.1.1.529, γνωστή ως Omicron, ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στη Νότια Αφρική και τη Μποτσουάνα τον Νοέμβριο του 2021, και ταξινομήθηκε άμεσα από τον Π.Ο.Υ. στην ομάδα των VOCs λόγω της ταχείας εξάπλωσης και του μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων (Zhang J. et al., 2022). Παρότι έχει προταθεί η υπόθεση ότι η Omicron ενδέχεται να εξελίχθηκε σε άτομο με χρόνια λοίμωξη, η θεωρία ότι «προϋπήρχε αδρανής στον ξενιστή» παραμένει ανεπιβεβαίωτη (Rahmani & Rezaei, 2022).

Η Omicron αντικατέστησε γρήγορα την παραλλαγή Delta και έγινε υπεύθυνη για το μεγαλύτερο κύμα λοιμώξεων που καταγράφηκε σε παγκόσμιο επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της πανδημίας, κυρίως λόγω της εξαιρετικά υψηλής μεταδοτικότητάς της (Li Q. et al., 2021). Η παραλλαγή αυτή φέρει πολύ μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων, με περισσότερες από 30 μόνο στην πρωτεΐνη Spike (S), υπερδιπλάσιες σε σύγκριση με την Delta (Kandeel et al., 2022).

Μεταξύ των πιο σημαντικών μεταλλάξεων της πρωτεΐνης S συγκαταλέγονται οι Δ69/70, K417N, N501Y, T478K, P681H, καθώς και οι αλλαγές G339D, S371L, S373P και S375F, οι οποίες επηρεάζουν την προσκόλληση στον υποδοχέα ACE2 και συμβάλλουν στη σημαντική ανοσολογική διαφυγή της παραλλαγής (Zhang J. et al., 2022).

Παρά την υψηλή μεταδοτικότητα και τον μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων (Εικόνα 9), η Omicron συσχετίστηκε με μικρότερη βαρύτητα νόσησης και μειωμένο κίνδυνο νοσηλείας σε σχέση με τις προηγούμενες παραλλαγές, ιδιαίτερα την Delta, πιθανόν λόγω χαμηλότερης ικανότητας προσβολής του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (Ren et al., 2022).



Omicron (B.1.1.529)

*Μεταλλάξεις χαρακτηριστικές της παραλλαγής Omicron:
S371L, S373P, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K,
E484A, Q493R, G496S, N501Y, Y505H*

Εικόνα 9. Απεικόνιση της παραλλαγής Omicron (B.1.1.529) (Dhama et al., 2023)

5. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του ιού SARS-CoV-2 και των μεταλλάξεων

5.1 Συλλογή Δειγμάτων για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2

Τα δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος συνιστάται να συλλέγονται κατά την οξεία φάση της λοίμωξης, ιδανικά εντός επτά ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων. Αντίθετα, δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό λαμβάνονται σε ασθενείς που παραμένουν συμπτωματικοί πέραν της πρώτης εβδομάδας της νόσου (Giri et al., 2021).

Παρόλο που τα κύρια δείγματα για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 προέρχονται από το αναπνευστικό σύστημα, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και άλλα βιολογικά υλικά, όπως ολικό αίμα και ορός αίματος, οφθαλμικές εκκρίσεις και δείγμα κοπράνων, τα οποία δύνανται να συμβάλουν συμπληρωματικά στη διάγνωση ή την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της λοίμωξης (Xia et al., 2020; Carter et al., 2020).

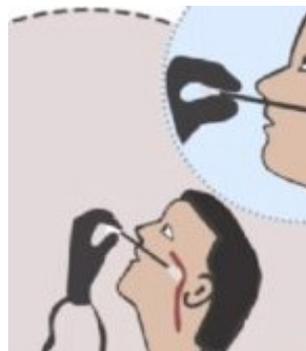
Μετά τη συλλογή, τα δείγματα πρέπει να συσκευάζονται και να συντηρούνται σωστά, σε θερμοκρασία 2–8°C, για χρονικό διάστημα έως 72 ώρες, μέχρι να παραληφθούν και να επεξεργαστούν από το διαγνωστικό εργαστήριο. Ωστόσο, για αποθήκευση άνω των 72 ωρών, τα δείγματα θα πρέπει να καταψύχονται στους -70 °C το συντομότερο δυνατό μετά τη συλλογή. Συνιστάται να αποφεύγεται η επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη του δείγματος (Giri et al., 2021). Η τήρηση αυτών των συνθηκών είναι απαραίτητη προκειμένου να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του δείγματος και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Lee et al., 2021).

Κύρια είδη δειγμάτων

- **Ρινοφαρυγγικό** επίχρισμα (nasopharyngeal swab) / **Στοματοφαρυγγικό** επίχρισμα (oropharyngeal swab)

Τα ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα αποτελούν δείγματα που προέρχονται από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και λαμβάνονται μέσω λιγότερο επεμβατικών μεθόδων, γεγονός που τα καθιστά ευρέως χρησιμοποιούμενα στον γενικό πληθυσμό. Η διαδικασία συλλογής πραγματοποιείται με τη χρήση στυλεού

δειγματοληψίας, ο οποίος φέρει συνθετική άκρη και σώμα κατασκευασμένο από αλουμίνιο ή πλαστικό. Δεν χρησιμοποιούνται στυλεοί αλγινικού ασβεστίου ή με ξύλινους άξονες, καθώς ενδέχεται να περιέχουν ουσίες που απενεργοποιούν ορισμένους ιούς και ενδέχεται να αναστείλουν τις μοριακές εξετάσεις. Η λήψη των δειγμάτων πρέπει να διενεργείται, για μεγαλύτερη αξιοπιστία και απόδοση, από εξειδικευμένο επαγγελματία υγείας (<https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/clinical-specimen-guidelines.html>).



Αναφορικά με τη διαγνωστική αξία των διαφορετικών τύπων δειγμάτων, έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα που συλλέγονται από τη ρινική κοιλότητα παρουσιάζουν υψηλότερα ιικά φορτία SARS-CoV-2 σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνονται από τον φάρυγγα. Παράλληλα, τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά θετικών αποτελεσμάτων ανίχνευσης σε σχέση με τα στοματοφαρυγγικά. Εάν συλλεχθούν δείγματα ρινοφαρυγγικού και στοματοφαρυγγικού επιχρίσματος, πρέπει να συνδυαστούν σε ένα μόνο σωληνάριο για να μεγιστοποιηθεί η ευαισθησία της εξέτασης και να περιοριστεί η χρήση των πόρων εξέτασης (<https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/clinical-specimen-guidelines.html>).

Ειδικότερα, η ευαισθησία των ρινικών, ρινοφαρυγγικών και φαρυγγικών επιχρισμάτων έχει υπολογιστεί σε 80%, 90% και 87% αντίστοιχα. Η διαφορά στην ευαισθησία των διαφορετικών τύπων επιχρισμάτων μπορεί να εξαρτάται από την εξέλιξη της νόσου (Giri et al., 2021).

➤ **Βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (bronchoalveolar lavage fluid, BAL)**

Το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα αποτελεί δείγμα που προέρχεται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα και η συλλογή του πραγματοποιείται αποκλειστικά από εξειδικευμένο ιατρικό ή νοσηλευτικό προσωπικό. Γίνεται συλλογή 2-3 mL σε ένα αποστειρωμένο, στεγανό, κύπελλο συλλογής πτυέλων με βιδωτό καπάκι ή σε ένα αποστειρωμένο ξηρό δοχείο. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται κυρίως για ασθενείς που νοσηλεύονται με σοβαρή λοίμωξη του αναπνευστικού και βρίσκονται σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, γεγονός που καθιστά αδύνατη τη λήψη άλλου τύπου δείγματος (Feng et al., 2020).

➤ **Σίελος (saliva)**

Η λήψη δειγμάτων σιέλου μπορεί να πραγματοποιηθεί από τον ίδιο τον ασθενή, είτε υπό την επίβλεψη εξειδικευμένου προσωπικού είτε και χωρίς αυτήν, μειώνοντας έτσι ή και μηδενίζοντας τον κίνδυνο έκθεσης του υγειονομικού προσωπικού σε μόλυνση μέσω άμεσης επαφής (Feng et al., 2020). Το γεγονός αυτό καθιστά τη χρήση του δείγματος σιέλου ιδιαίτερα πρακτική και ασφαλή επιλογή, ειδικά σε μαζικούς ελέγχους ή σε περιπτώσεις περιορισμένων πόρων, η απόδοση εντούτοις της εξέτασης αυτού του δείγματος είναι πιο περιορισμένη.

➤ **Πτύελα (sputum):**

Για τους ασθενείς που εμφανίζουν παραγωγικό βήχα, μπορούν να συλλεχθούν πτύελα και να εξεταστούν για τον SARS-CoV-2, όταν είναι διαθέσιμα. Η συλλογή πτυέλων πραγματοποιείται από τον ίδιο τον ασθενή, υπό την καθοδήγηση εξειδικευμένου επαγγελματία υγείας, και προέρχεται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Ενημερώνουμε τον ασθενή σχετικά με τη διαφορά μεταξύ των πτυέλων (βαθύς βήχας) και των στοματικών εκκρίσεων (σάλιο/σάλιο). Η παραγωγή του δείγματος γίνεται είτε μετά από παραγωγικό βήχα του ασθενούς είτε μέσω τεχνητής πρόκλησης από εκπαιδευμένο προσωπικό. Ωστόσο, δεν συνιστάται η πρόκληση πτυέλων (<https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/clinical-specimen-guidelines.html>).

Η διαδικασία αυτή ενέχει αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης του προσωπικού, λόγω της πιθανής εκτίναξης αερολυμάτων και σταγονιδίων κατά τη συλλογή (Feng et al., 2020).



5.2 Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης

5.2.1. PCR Πραγματικού Χρόνου, real time RT-PCR

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (real-time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction, real time RT-PCR) αποτελεί μία εξειδικευμένη παραλλαγή της κλασικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Πρόκειται για την πλέον διαδεδομένη και αξιόπιστη μέθοδο πολλαπλασιασμού και ανίχνευσης ιικού RNA, η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε προηγούμενες επιδημίες, όπως εκείνες του MERS-CoV και του SARS-CoV, επιτυγχάνοντας σημαντικά διαγνωστικά αποτελέσματα (Shen et al., 2020).

Η τεχνική αυτή είναι ποσοτική, μπορεί εντούτοις να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική ανίχνευση και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, καθώς είναι σε θέση να ενισχύσει και να ανιχνεύσει ακόμη και ένα μόνο αντίγραφο συγκεκριμένης αλληλουχίας του ιικού γονιδιώματος (Artika et al., 2020). Εξαιτίας αυτής της ικανότητας, η real-time RT-PCR προσαρμόστηκε ταχύτατα και εφαρμόστηκε ευρέως από τα διαγνωστικά εργαστήρια ως μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 (Amrane et al., 2020; Carobianchi et al., 2020; Chu et al., 2020).

Για την ανάπτυξη και παραμετροποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν πρωτόκολλα και οδηγίες που εκδόθηκαν από διεθνείς φορείς, όπως τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Centre for Disease

Control and Prevention, ECDC) καθώς και από άλλα Εθνικά Κέντρα ανάλογων αρμοδιοτήτων καθώς και υγειονομικές αρχές (Corman et al., 2020; Niu et al., 2020; Nao et al., 2020).

Για την PCR χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως, εκκινητές (primers) που στοχεύουν στα γονίδια 2019-nCoV-N1 (N1), 2019-nCoV-N2 (N2) και RNase P (RP) (Πίνακας 3). Οι δύο πρώτοι γενετικοί στόχοι, N1 και N2, αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του SARS-CoV-2 που κωδικοποιούν το γονίδιο της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης (N) και χρησιμοποιούνται για την ειδική ανίχνευση του ιού στο δείγμα. Το RNase P λειτουργεί ως εσωτερικός δείκτης-μάρτυρας ελέγχου (internal control), επιβεβαιώνοντας την εγκυρότητα και σωστή λήψη του δείγματος καθώς και τη σωστή εκτέλεση της διαδικασίας. Η παρουσία του στο δείγμα διασφαλίζει ότι υπάρχει ανιχνεύσιμο ανθρώπινο γενετικό υλικό και ότι η ανάλυση μπορεί να προχωρήσει με αξιοπιστία, επιτρέποντας την ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Corman et al., 2020; Niu et al., 2020; Nao et al., 2020).

Gene target	Description	Oligonucleotide Sequence (5'>3')
2019-nCoV_N1	2019-nCoV_N1 Forward Primer	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'
	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'
	2019-nCoV_N1 Probe	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3'
2019-nCoV_N2	2019-nCoV_N2 Forward Primer	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'
	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'

Gene target	Description	Oligonucleotide Sequence (5'>3')
	2019-nCoV_N2 Probe	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3'
RNAse P	RNAse P Forward Primer	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'
	RNAse P Reverse Primer	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'
	RNAse P Probe	5'-FAM—TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG—BHQ-1-3

Πίνακας 3: Εκκινητές και ιχνηθέτες που προτάθηκαν προς χρήση για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης νοσημάτων (CDC) της Αμερικής (Dhamad & Abdal Rhida, 2020)

Όταν ανιχνεύονται και τα δύο γονίδια N1 και N2, το δείγμα θεωρείται θετικό για την παρουσία του ιού SARS-CoV-2. Η ταυτόχρονη ανίχνευση αυτών των δύο γονιδιακών στόχων επιβεβαιώνει την ύπαρξη ιικού RNA στο εξεταζόμενο δείγμα, χωρίς ωστόσο να αποδεικνύει τη βιωσιμότητα ή μεταδοτικότητα του ιού (Sethuraman et al., 2020).

Πέραν του εσωτερικού μάρτυρα (RNAse P, RP) που χρησιμοποιείται στη μέθοδο για τον έλεγχο της εγκυρότητας του δείγματος, το CDC έχει προτείνει τη χρήση επιπρόσθετων δεικτών ελέγχου (controls) για την αξιολόγηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνονται:

- 2019-nCoV θετικό control (Positive Control, nCoV PC),
- δείγμα (ανθρώπινο) θετικό για SARS-CoV-2, και
- αρνητικό control (No Template Control, NTC), το οποίο διασφαλίζει ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση των αντιδραστηρίων ή του εξοπλισμού.

Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και δείκτης ελέγχου εξαγωγής-εκχύλισης (HSC) του γενετικού υλικού (extraction control), το οποίο εισάγεται στο δείγμα πριν από τη

διαδικασία εξαγωγής RNA/DNA και σκοπός του είναι να επιβεβαιώσει ότι η εξαγωγή του νουκλεϊκού οξέος και η αντίδραση PCR διενεργήθηκαν σωστά, καθώς η ανίχνευσή του στην PCR υποδεικνύει επιτυχή διαδικασία.

Με βάση τα παραπάνω, τα αποτελέσματα της RT-PCR χαρακτηρίζονται ως έγκυρα ή μη έγκυρα, και εφόσον είναι έγκυρα, ως θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με την ανίχνευση ή μη των γονιδίων-στόχων και των μαρτύρων ελέγχου. Ο Πίνακας 4 (α, β) παρουσιάζει συνοπτικά τον τρόπο χαρακτηρισμού των αποτελεσμάτων, σύμφωνα με τα κριτήρια του CDC (Dhamad & Abdal Rhida, 2020).

2019nCoV-N1	2019nCoV-N2	RNaseP	Result (SARS-CoV-2)
+	+	+/-	Positive (Θετικό)
If only 1 of the 2 targets is positive		+/-	Inconclusive (Αδιευκρίνιστο)
-	-	+	Negative (Αρνητικό)
-	-	-	Invalid (Μη έγκυρο)

rRT-PCR control name	rRT-PCR control type	Expected cq values	Expected			Interpretation
			N1	N2	RP	
nCoVPC	Positive	<40	+	+	+	Αστοχία αντιδραστηρίου (π.χ. μη λειτουργικότητα εκκινητή και ανιχνευτή μάρτυρα)
NTC	Negative	None detected	-	-	-	Επιμόλυνση αντιδραστηρίου ή /και του περιβάλλοντος
HSC	Extraction	<40	-	-	+	Πρόβλημα διαδικασίας εκχύλισης

Πίνακας 4 (α, β). Χαρακτηρισμός του αποτελέσματος ως αρνητικό ή θετικό (4α) σε συνδυασμό με το αποτέλεσμα των μαρτύρων (4β) (Dhamad & Abdal Rhida, 2020)

Η μέθοδος real-time RT-PCR βασίζεται στη χρήση του ιικού RNA ως αρχικού γενετικού υλικού, το οποίο με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA). Το RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο (template) για τη σύνθεση του cDNA, ενώ με τη βοήθεια ειδικών εκκινητών (primers) πραγματοποιείται η ενίσχυσή του. Οι εκκινητές μπορεί να είναι είτε oligo (dT), που συνδέονται με τις ουρές πολυαδενίνης (poly-A) του mRNA, είτε γενικοί εκκινητές που στοχεύουν σε ευρύτερες περιοχές αλληλουχιών (Jayamohan et al., 2021). Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με μία ή δύο φάσεις. Στη μέθοδο του ενός σταδίου (one-step RT-PCR), η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση πραγματοποιούνται στο ίδιο σωληνάριο, μειώνοντας τον χρόνο και τον κίνδυνο επιμόλυνσης. Αντίθετα, στη μέθοδο των δύο σταδίων (two-step RT-PCR), το cDNA παράγεται πρώτα και χρησιμοποιείται στη συνέχεια σε ξεχωριστή αντίδραση PCR. Αν και η δεύτερη προσέγγιση μπορεί να παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία ανίχνευσης, είναι πιο χρονοβόρα και επιρρεπής σε σφάλματα, είτε λόγω επιμόλυνσης είτε λόγω παρεμβολής του ανθρώπινου παράγοντα (Al-Shanti et al., 2009; Carter et al., 2020).

Η RT-qPCR (quantitative RT-PCR ή qPCR) χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανίχνευση και ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών του ιικού γονιδιώματος (Arya et al., 2005). Ως πρότυπο (template) χρησιμοποιείται το ιικό RNA, το οποίο λαμβάνεται μετά από τη διαδικασία εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος του δείγματος, συνήθως μέσω εμπορικών κιτ εγκεκριμένων από τον FDA. Το δείγμα προέρχεται κατά κανόνα από ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, λόγω της ευκολίας λήψης και της υψηλής διαγνωστικής αξίας του. Μετά την εκχύλιση και τον καθαρισμό του RNA (με απομάκρυνση υπολειμμάτων DNA μέσω χρήσης DNase), η μέθοδος RT-PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια (Arya et al., 2005; Jayamohan et al., 2021), όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 10 που ακολουθεί.

1ο Στάδιο: Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription)

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Ένας εκκινητής προσδένεται στο RNA, και το ένζυμο καταλύει τη σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA, το οποίο αποτελεί το αντίγραφο του ιικού RNA (Carter et al., 2020; Feng et al., 2020).

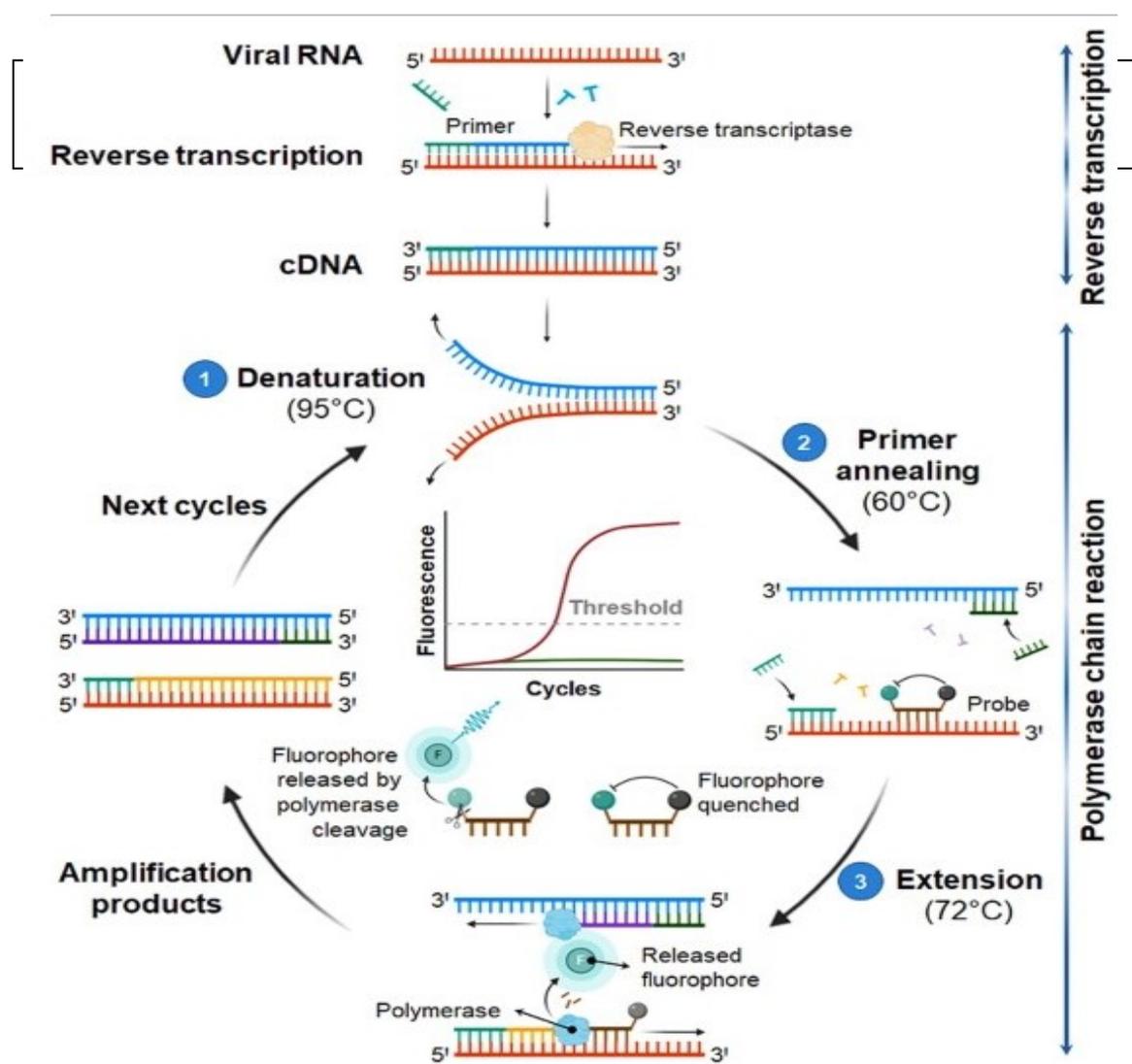
2ο Στάδιο: Ενίσχυση DNA μέσω πολλαπλασιασμού με PCR (Amplification)

Το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη διενέργεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διαδοχικά θερμοκρασιακά στάδια: της αποδιάταξης (denaturation) με θέρμανση στους 94-98°C για διάσπαση των δεσμών του δίκλωνου DNA, του υβριδισμού (annealing) με μεταβολή της θερμοκρασίας στους 50-65°C, ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν στα συμπληρωματικά τμήματα της αλληλουχίας-στόχου και το στάδιο της επιμήκυνσης (extension) στους 72°C, όπου η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους υβριδισμένους εκκινητές, συνθέτοντας νέο δίκλωνο DNA. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 20-40 κύκλους, οδηγώντας σε εκθετική αύξηση του επιθυμητού τμήματος DNA (Carter et al., 2020; Feng et al., 2020).

3ο Στάδιο: Ανίχνευση και ανάλυση του σήματος (Detection)

Στο τελικό στάδιο, πραγματοποιείται η ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο μέσω καταγραφής του σήματος φθορισμού, το οποίο απελευθερώνεται κατά την αποικοδόμηση των ειδικών ιχνηθετημένων εκκινητών ή ανιχνευτών. Η ένταση του φθορισμού συσχετίζεται με το ποσό του παραγόμενου DNA και αποτυπώνεται γραφικά σε καμπύλη ενίσχυσης σε σχέση με τους κύκλους της αντίδρασης (Holland et al., 1991).

Η real-time RT-PCR συνδυάζει την αντίστροφη μεταγραφή RNA σε cDNA με την ποσοτική ενίσχυση του DNA σε πραγματικό χρόνο, προσφέροντας ταχεία, ευαίσθητη και εξαιρετικά ειδική ανίχνευση του SARS-CoV-2, γεγονός που την καθιστά τη μέθοδο αναφοράς για τη μοριακή διάγνωση της COVID-19.



Εικόνα 10. Απεικόνιση της αρχής της μοριακής μεθόδου *rt RT-PCR* (Afzal, 2020)

Η ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος στη μέθοδο real-time RT-PCR βασίζεται στη μέτρηση του φθορισμού, ο οποίος σχετίζεται με την ποσότητα του παραγόμενου DNA σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Για τον φθορισμό χρησιμοποιούνται συνήθως δύο τύποι ουσιών: μη ειδικές χρωστικές, όπως η SYBR GREEN, η οποία συνδέεται με το δίκλωνο DNA και φθορίζει μόνο όταν βρίσκεται ενσωματωμένη σε δίκλινη αλυσίδα και ειδικοί ανιχνευτές, όπως οι TaqMan probes, οι οποίοι είναι φθοριοχρώματα συνδεδεμένα με

ολιγονουκλεοτίδια. Η SYBR GREEN παρέχει γενική ένδειξη ενίσχυσης του DNA, χωρίς να στοχεύει συγκεκριμένες αλληλουχίες (Drosten et al., 2002), ενώ οι ανιχνευτές TaqMan αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες της PCR και κατά την υδρόλυσή τους απελευθερώνεται φθορισμός, επιτρέποντας ακριβή και εξειδικευμένη ανίχνευση του στόχου (Drosten et al., 2002).

Η μέθοδος RT-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και άλλων διαφορετικών γονιδιακών περιοχών του SARS-CoV-2, όπως ORF1b / ORF8 / Νουκλεοκαψιδικό γονίδιο (N) / Ακίδα (S) / Φάκελος (E) / RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) (Carter et al., 2020).

Για μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών γονιδίων, όπως ORF1ab, N και S (Warsi et al., 2021; van Kasteren et al., 2020; Chu et al., 2020).

Η ανάγκη για ταχύτερη, ασφαλέστερη και πιο έγκυρη διάγνωση της COVID-19 οδήγησε στην ανάπτυξη εμπορικών αντιδραστηρίων real-time RT-PCR, τα οποία έχουν λάβει έγκριση από τον Π.Ο.Υ. Τα προϊόντα αυτά βελτιστοποιούν την ανίχνευση και την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, στοχεύοντας σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές περιοχές του ιού. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται ενδεικτικά εμπορικά προϊόντα, οι εταιρείες που τα παρέχουν και οι γονιδιακές περιοχές που στοχεύουν και ενισχύουν.

Εταιρεία	Όνομασία εμπορικού κιτ	Γονίδια-στόχοι	Έγκριση
Abbott Diagnostics, Inc.	Abbott RealTime SARS-CoV-2	RdRp, N	WHO EUL; US FDA EUA; CE-IVD
Advanced Biological Laboratories SA	UltraGene Combo2Screen SARS-CoV-2 Assay	E, N	CE-IVD
Altona Diagnostics GmbH	RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kits	E, S	US FDA EUA; CE-IVD
Anatolia Geneworks	Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit	ORF1ab, E	CE-IVD
Atila BioSystems, Inc.	iAMP COVID-19 Detection Kit (isothermal amplification)	ORF1ab, N	US FDA EUA
Becton, Dickinson & Company (BD)	BioGX SARS-CoV-2 Reagents (for BD MAX™ System)	N1 & N2	US FDA EUA; Health Canada; Singapore HSA
BGI Genomics Co. Ltd.	Real-Time Fluorescent RT-PCR Kit for Detecting SARS-CoV-2	ORF1ab	US FDA EUA; CE-IVD; NMPA EUA (China); Singapore HSA
Cepheid	Xpert® Xpress SARS-CoV-2	E, N2	US FDA EUA; Health Canada
Eurobio Scientific	EurobioPlex SARS-CoV-2 Multiplex	RdRp, N	CE-IVD
EUROIMMUN AG (A PerkinElmer Company)	EURORealTime SARS-CoV-2	ORF1ab, N	CE-IVD

GenMark Diagnostics, Inc.	ePlex® SARS-CoV-2 Test	N	US FDA EUA
Hologic, Inc.	Panther Fusion® SARS-CoV-2 Assay	ORF1ab	US FDA EUA
Life Technologies (part of Thermo Fisher Scientific, Inc.)	TaqPath™ COVID-19 Combo Kit	ORF1ab, N, S	US FDA EUA; CE-IVD
OPTI Medical Systems, Inc.	OPTI® SARS-CoV-2 RT PCR Test	N1, N2	US FDA EUA
Primerdesign Ltd. (part of Novacyt Group)	COVID-19 genesig® Real-Time PCR assay	RdRp	WHO EUL; US FDA EUA; CE-IVD
Quidel Corporation	Lyra® SARS-CoV-2 Assay	Pp1ab	US FDA EUA
Roche Molecular Systems, Inc.	Cobas® SARS-CoV-2 Test (for Cobas® 6800/8800 system)	ORF1ab, E	WHO EUL; US FDA EUA
Sansure Biotech, Inc.	Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)	ORF1ab, N	US FDA EUA; CE-IVD; NMPA (China)
SD Biosensor Inc.	STANDARD M nCoV Real-Time Detection kit	ORF1ab, E	US FDA EUA; CE-IVD; MFDS EUA (Korea)
Seegene, Inc.	Allplex™ 2019-nCoV Assay	RdRp, E, N	US FDA EUA; CE-IVD; Health Canada; MFDS EUA (Korea); Singapore HSA

Shanghai Fosun Long March Medical Science Co., Ltd.	2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) RT-PCR Detection Kit	ORF1ab, E, N	RUO
TIB Molbiol Berlin GmbH/Roche Diagnostics	LightMix® Modular SARS-CoV (COVID19)	E	RUO
YouSeq Ltd.	YouSeq Multiplex Covid19 qPCR Kit	RdRp, E, N	

Πίνακας 5 : Διαθέσιμα εμπορικά κιτ ανίχνευσης (ανά εταιρεία) καθώς και τα γονίδια που ανιχνεύουν. Αναφέρεται επίσης και ο φορέας έγκρισης για διαγνωστική χρήση (Kubina & Dziedzic et al., 2020; Lieberman et al., 2020; Loeffelholz et al., 2020; Ortiz-Prado et al., 2020; Poljak et al., 2020; van Kasteren et al., 2020; Zhen et al., 2020).

5.2.1.1. Σφάλματα της μεθόδου RT-PCR

Η μοριακή διάγνωση με τη μέθοδο RT-PCR εξελίχθηκε ταχύτατα και αποτέλεσε ιδιαίτερα ευαίσθητο εργαλείο για την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς:

1. Χρόνος ανάλυσης και κόστος

Η διαδικασία για την ανάλυση ενός δείγματος απαιτεί 4–6 ώρες, ενώ η απόδοση του αποτελέσματος στον ασθενή μπορεί να καθυστερήσει έως και 48 ώρες από τη στιγμή της δειγματοληψίας. Ο απαιτούμενος εξοπλισμός και η εξειδικευμένη υποδομή των εργαστηρίων, σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Π.Ο.Υ., είναι ιδιαίτερα κοστοβόρες. Στα αρχικά στάδια εφαρμογής της μοριακής διάγνωσης του SARS-CoV-2, η τιμή ενός τεστ έφτανε έως και 100 ευρώ (Ramdas et al., 2020; Sheridan et al., 2020), γεγονός που έχει αλλάξει σημαντικά τα επόμενα έτη, καθώς το κόστος των τεστ έχει μειωθεί αισθητά.

2. Απαιτήσεις προσωπικού και εργαστηριακές προδιαγραφές

Η μέθοδος απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και διεξάγεται αποκλειστικά σε εργαστήρια βιοασφάλειας τύπου 2 (BSL-2/Επίπεδο II), τα οποία πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές.

3. Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα

Μελέτες βασιζόμενες σε μοριακές μεθοδολογίες έχουν δείξει ότι η RT-PCR ενδέχεται να παρουσιάσει κάποιο σχετικά υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Chen N, et al., 2020; Huang et al., 2020; R. Liu et al., 2020). Οι κύριοι παράγοντες περιλαμβάνουν (Sethuraman et al., 2020; Kinloch et al., 2021):

- ✓ Λάθη κατά τη δειγματοληψία, όπως μη ενδεδειγμένη τεχνική λήψης ή ακατάλληλη χρονική στιγμή συλλογής του δείγματος σε σχέση με την έναρξη της νόσου
- ✓ Σφάλματα κατά τη συντήρηση ή μεταφορά του δείγματος.
- ✓ Σφάλματα κατά τη διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού του RNA
- ✓ Αποδόμηση του RNA
- ✓ Παρουσία αναστολέων της PCR ή μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του ιού

4. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα

Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από:

- ✓ Λανθασμένη ταυτοποίηση ή καταγραφή των δειγμάτων κατά τη συλλογή τους
- ✓ Επιμόλυνση κατά τη μεταφορά του δείγματος ή των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται (Sethuraman et al., 2020)
- ✓ Τεχνικά λάθη κατά την εκτέλεση της διαδικασίας.

Παρά τα παραπάνω, η RT-PCR παραμένει η πιο αξιόπιστη, ειδική και ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, επιτρέποντας ταυτόχρονο έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Στον τομέα της έρευνας και ανάπτυξης, οι εταιρείες συνέχισαν να βελτιώνουν τα παραγόμενα προϊόντα για αύξηση της ευαισθησίας και ευκολότερη χρήση τους (Chan et al., 2020; Jayamohan et al., 2021).

5.2.2 Ψηφιακή PCR -Digital PCR (dPCR)

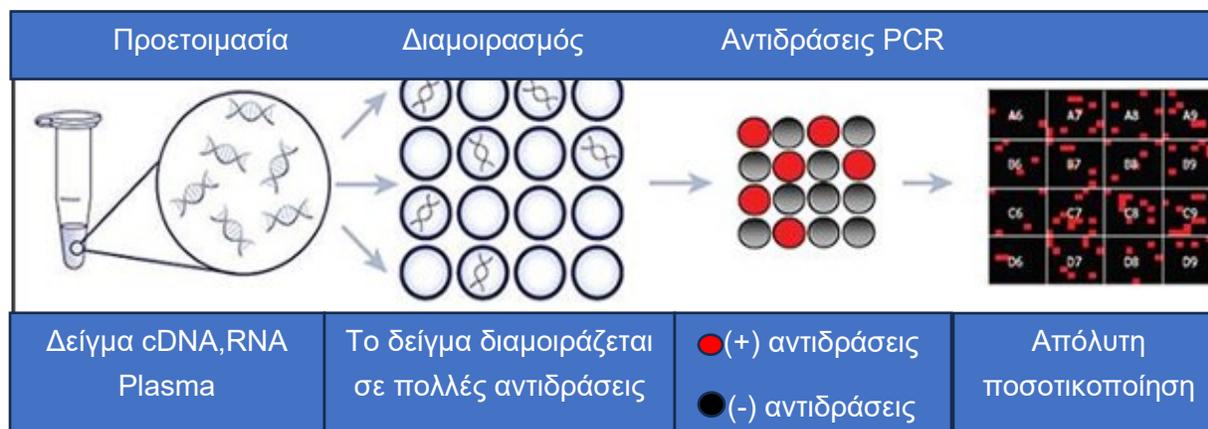
Η ψηφιακή PCR (dPCR) αποτελεί μια πιο ευαίσθητη και απόλυτα ποσοτική παραλλαγή της κλασικής real time-PCR. Σε αντίθεση με την qPCR, όπου η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο όγκο, στη dPCR το δείγμα διαιρείται σε χιλιάδες έως εκατομμύρια μικροσκοπικά διαμερίσματα ή «κελιά» (Εικόνα 11), και η ενίσχυση του κάθε στόχου πραγματοποιείται ξεχωριστά σε κάθε διαμέρισμα (Morley et al., 2014). Με αυτόν τον τρόπο, η PCR εκτελείται για κάθε μόριο στόχου ανεξάρτητα, επιτρέποντας ακριβέστερη ποσοτικοποίηση σύμφωνα με τα παρακάτω:

- ✓ Τα διαμερίσματα που περιέχουν τουλάχιστον ένα μόριο στόχου εμφανίζουν φθορισμό, καταγράφοντας θετικό σήμα
- ✓ Τα διαμερίσματα που δεν περιέχουν στόχο παραμένουν αρνητικά.

Η τεχνική αυτή και οι παραλλαγές της προσφέρουν ένα εξαιρετικά χαμηλό όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LoD), το οποίο μπορεί να φτάσει έως ~ 0.1 αντίγραφα ανά αντίδραση, ανάλογα με το σύστημα και το εφαρμόσιμο πρωτόκολλο, καθιστώντας την έως και 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από την παραδοσιακή RT-qPCR (Suo et al., 2020).

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ανιχνευτές σχεδόν ίδιους με αυτούς της PCR πραγματικού χρόνου, αλλά η ανάπτυξη του φθορισμού παρακολουθείται μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, σε αντίθεση με την real time-PCR, όπου η μέτρηση καταγράφεται κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης. Ενώ η RT-qPCR βασίζεται στην εκθετική φάση της ενίσχυσης και είναι ευάλωτη σε διακυμάνσεις της αποδοτικότητας της PCR, η dPCR παρέχει απόλυτη ποσοτικοποίηση χωρίς την ανάγκη πρότυπης καμπύλης (standard curve), εξαλείφοντας το σφάλμα που προκύπτει από τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Dong et al., 2021).

Για την ακριβή ποσοτικοποίηση των στόχων, τα αποτελέσματα υπόκεινται σε στατιστική επεξεργασία, αξιοποιώντας τη συχνότητα εμφάνισης θετικών και αρνητικών διαμερισμάτων (Kojabad et al., 2021). Λόγω αυτού, η dPCR χαρακτηρίζεται και ως PCR τελικού σημείου, καθώς η ανάλυση βασίζεται στο τελικό σήμα φθορισμού και όχι στην πορεία της αντίδρασης (Morley et al., 2014).



Εικόνα 11: Οι βασικές αρχές της ψηφιακής PCR (Lin et al., 2017). Το δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα διαμοιράζεται σε σταγονίδια ή κελιά, με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε κελί να περιέχεται κατά προτίμηση ένα αντίγραφο DNA. Ο φθορισμός που παράγεται μετρείται ανά σταγόνα ή κελί και αντιπροσωπεύει τον απόλυτο αριθμό αντιγράφων DNA στο δείγμα που εξετάζεται.

Η droplet digital PCR (ddPCR) αποτελεί μια παραλλαγή της ψηφιακής PCR, όπου το υπό ανάλυση δείγμα διαμοιράζεται σε χιλιάδες έως εκατομμύρια μικροσκοπικά σταγονίδια υγρού, τα οποία δεν αναμιγνύονται με το λάδι (Hatch et al., 2011). Εναλλακτικά, η διασπορά του δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με μικροσυστοιχίες κελιών χρησιμοποιώντας πεπιεσμένο αέρα (Boonham et al., 2014).

Η ddPCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδικότητα και αυξημένη ευαισθησία, ακόμα και σε πολύ χαμηλά ιικά φορτία, καθιστώντας την ιδανική για πρώιμα στάδια της νόσου ή ασυμπτωματικούς φορείς (Zhu & Wang, 2017). Συγκεκριμένα, σε χαμηλά ιικά φορτία του SARS-CoV-2 και σε δείγματα με τιμές Ct > 35 στην RT-qPCR, όπου η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων αυξάνεται δραματικά, η ddPCR διατηρεί διαγνωστική ευαισθησία άνω του 94%, μειώνοντας το ποσοστό των αποτελεσμάτων της «γκρι ζώνης» (Suo et al., 2020). Επίσης, παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε αναστολείς PCR που μπορεί να υπάρχουν σε κλινικά δείγματα, γιατί οι αναστολείς αραιώνονται μέσα στα σταγονίδια ενώ παρατηρείται μικρότερη πιθανότητα λάθους, καθώς το αποτέλεσμα κάθε σταγονιδίου χαρακτηρίζεται θετικό ή αρνητικό μέσω φθορισμού, επιτρέποντας ακριβή διάκριση ιικού φορτίου (Shembekar et al., 2016).

Υπάρχουν πολλές πλατφόρμες ddPCR που έχουν αναπτυχθεί για διαγνωστική χρήση, όπως BioMark (Fluidigm), RainDrop (Raindance), QX200 (Bio-Rad), QuantStudio 3D (Life Technologies) (Bohn et al., 2021; Pomari et al., 2019). Η ddPCR έχει ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς για την ανίχνευση του ιού Ζίκα, του ιού του έρπητα και του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (Kojabad et al., 2021), καθώς και σε φαρμακευτικές εφαρμογές για την παρακολούθηση της θεραπευτικής επιτυχίας, τη διάγνωση και την αγωγή ασθενών (Zhang L. et al., 2022).

Για την ανάπτυξη μεθόδου ανίχνευσης του SARS-CoV-2 με ddPCR απαιτείται ο σχεδιασμός κατάλληλου ζεύγους εκκινητή-ανιχνευτή και η χρήση Taq πολυμεράσης, όπως στην PCR πραγματικού χρόνου. Σε μελέτη κατά τη διάρκεια της πανδημίας, σε 18 ασθενείς που εμφάνισαν αρνητικό αποτέλεσμα με κλασική PCR κατά την αποθεραπεία, η ddPCR ανίχνευσε ιικό φορτίο στους 12 από αυτούς (Liu C et al., 2020). Η κλινική ειδικότητα της ddPCR για τον SARS-CoV-2 έχει τεκμηριωθεί στο 100% σε επιμέρους μελέτες, καθώς ο διαχωρισμός του δείγματος σε σταγονίδια ελαχιστοποιεί τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των primers και του μη-στοχευμένου DNA/RNA (Vandenberg et al., 2021).

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η ddPCR απαιτεί εξειδικευμένο και ακριβό εξοπλισμό (Kojabad et al., 2021). Χρησιμοποιείται κυρίως για υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μεταλλάξεων του SARS-CoV-2, την ταυτοποίηση νέων παραλλαγών, και σε ερευνητικά περιβάλλοντα, για επικύρωση αποτελεσμάτων RT-PCR ή παρακολούθηση ιικού φορτίου σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως λύματα (Mirabile et al., 2024; Vandenberg et al., 2021).

5.2.3 CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

Η μέθοδος CRISPR αποτελεί γενικότερα μια καινοτόμο μοριακή προσέγγιση για τη διάγνωση, με πλεονεκτήματα όπως δυνητικά χαμηλότερο κόστος και ταχύτερη απόδοση αποτελεσμάτων σε σχέση με κλασικές μεθόδους PCR. Βασίζεται σε αλληλουχίες DNA ή RNA που αναγνωρίζονται και διασπώνται από βακτηριακά ένζυμα, γνωστά ως CRISPR-associated (Cas) ένζυμα, τα οποία αποτελούν μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος των βακτηρίων (Chertow et al., 2018; Li et al., 2019). Η

μέθοδος CRISPR επιτρέπει γρήγορη, αξιόπιστη και στοχευμένη ποιοτική ανίχνευση του SARS-CoV-2, αποτελώντας μια πολλά υποσχόμενη συμπληρωματική ή εναλλακτική προσέγγιση σε συγκεκριμένα διαγνωστικά πλαίσια των παραδοσιακών μεθοδολογιών PCR.

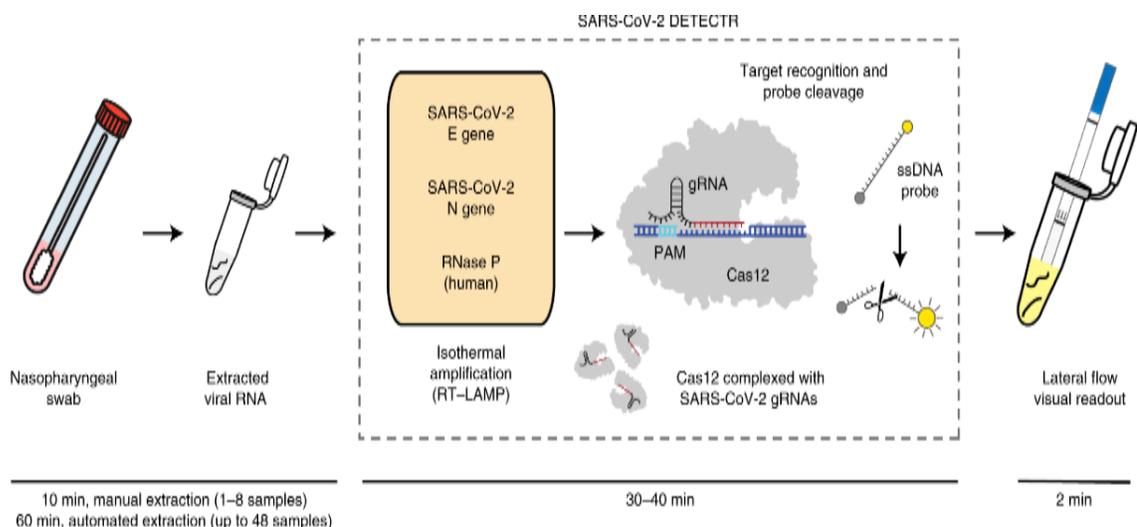
Το σύστημα CRISPR αποτελείται από δύο κύρια στοιχεία:

1. Αλληλουχίες CRISPR
2. CRISPR-associated (Cas) ένζυμα, όπως Cas9, Cas12 και Cas13:
 - ✓ Cas9: στοχεύει μόρια DNA
 - ✓ Cas12 και Cas13: μπορούν να προγραμματιστούν για την ανίχνευση RNA (άμεσα ή έμμεσα)
 - ✓ Cas13 (τύπου VI): αναγνωρίζει και διασπά συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA (O'Connell et al., 2019; Chiu et al., 2018).

Δύο εταιρείες πρωτοπόροι στην ανάπτυξη της CRISPR εφάρμοσαν τις παρακάτω μεθοδολογίες για τη διάγνωση του SARS-CoV-2:

- ✓ DETECTR (Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter) – Mammoth Biosciences: χρησιμοποιεί το ένζυμο Cas12 για ανίχνευση αλληλουχιών των γονιδίων E, N2 και RNase P (Broughton et al., 2020).
- ✓ SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzyme Reporter Unlocking) – Sherlock Biosciences: χρησιμοποιεί το ένζυμο Cas13 για ανίχνευση RNA του SARS-CoV-2 (Zhang F, et al., 2020).

Και οι δύο μέθοδοι αξιοποιούν ειδικούς ανιχνευτές τροποποιημένους για RT-RPA, με ταυτόχρονη αντίστροφη μεταγραφή και ισοθερμική ενίσχυση του στόχου (Εικόνα 12). Η οπτικοποίηση της αντίδρασης ανίχνευσης Cas12 στη μέθοδο DETECTR (Σχήμα 1) επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ένα μόριο αναφοράς FAM-βιοτίνης και ταινίες πλευρικής ροής σχεδιασμένες να συλλαμβάνουν σημασμένα νουκλεϊκά οξέα (Broughton et al., 2020). Το κατώτερο όριο ανίχνευσης (LoD) ήταν ≈ 10 αντίγραφα/μl αντίδρασης και ο χρόνος διενέργειας της εξέτασης 30-40 λεπτά. Η θετική προγνωστική συμφωνία (PPA) και η αρνητική προγνωστική συμφωνία (NPA) του SARS-CoV-2 DETECTR σε σχέση με τη δοκιμασία qRT-PCR του CDC ήταν 95% και 100%, αντίστοιχα, για την ανίχνευση του κορονοϊού σε 83 συνολικά δείγματα αναπνευστικού επιχρίσματος στα οποία εφαρμόστηκε (Broughton et al., 2020).



Σχήμα 1. Σχηματική ροή μεθόδου εργασίας SARS-CoV-2 DETECTR (Broughton et al., 2020). Η συμβατική εκχύλιση RNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί αρχικά για το DETECTR (προενίσχυση LAMP και ανίχνευση βάση Cas12 για γονίδιο E, γονίδιο N και RNase P), το σήμα του οποίου οπτικοποιείται με συσκευή ανάγνωσης φθορισμού ή ταινία πλευρικής ροής.

Στη μέθοδο DETECTR (Mammoth Biosciences), το αποτέλεσμα θεωρείται πιθανώς θετικό ή θετικό όταν ανιχνεύεται τουλάχιστον ένας από τους στόχους γονιδίων του SARS-CoV-2 ή και οι δύο, αντίστοιχα (Broughton et al., 2020), Πίνακας 6. Οι στόχοι περιλαμβάνουν τα γονίδια E και N, ενώ η παρουσία RNase P χρησιμοποιείται ως εσωτερικός έλεγχος για την ποιότητα του δείγματος.

N gene	E gene	RNaseP	Result (SARS-CoV-2)
+	+	+/-	Positive
+	-	+/-	Presumptive Positive
-	+	+/-	Presumptive Positive
-	-	+	Negative
-	-	-	Invalid

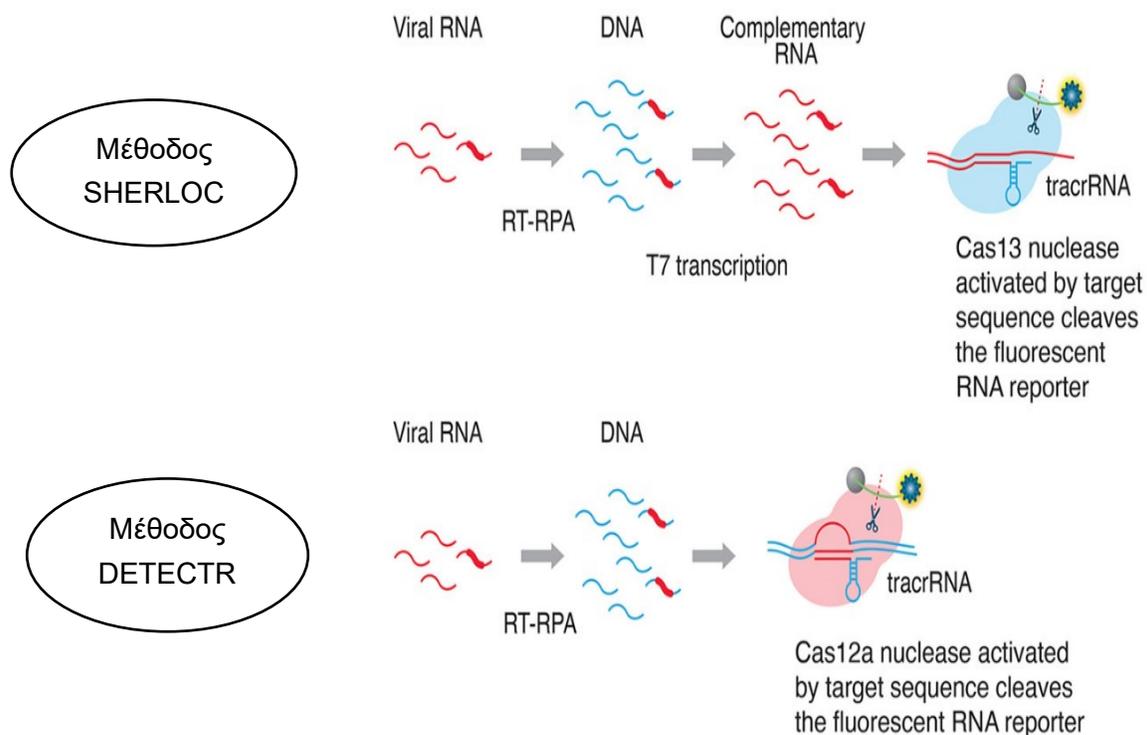
Πίνακας 6. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με τη μέθοδο DETECTR (Broughton et al., 2020).

Η μέθοδος SHERLOCK (Sherlock Biosciences) στοχεύει τμήματα των γονιδίων S και ORF1ab του SARS-CoV-2. Μπορεί να ανιχνεύσει συνθετική αλληλουχία RNA σε εύρος 10–100 αντιγράφων/μL και ολοκληρώνεται εντός 1 ώρας (Giri et al., 2021).

Βασικά στάδια της μεθόδου:

- Εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από το δείγμα
- Ενίσχυση αλληλουχίας στόχου με ισοθερμική μέθοδο LAMP ή RPA (Recombinase Polymerase Amplification) για να αυξηθούν τα μόρια στόχου σε ανιχνεύσιμο επίπεδο
- Χρήση του CRISPR-Cas13 με RNA οδηγό (gRNA) που είναι συμπληρωματικός προς τον στόχο, οδηγώντας το Cas13 στην αλληλουχία του RNA
- Δέσμευση και ενεργοποίηση Cas13, το οποίο διασπά τον RNA στόχο σε συγκεκριμένα σημεία
- Μη στοχευμένη διάσπαση γειτονικών RNA ανιχνευτών, απελευθερώνοντας φθορίζον σήμα, ανιχνεύσιμο μέσω ταινίας πλευρικής ροής ή με αλλαγή χρώματος.

Το σύστημα αυτό παρέχει γρήγορη, ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση του SARS-CoV-2, ακόμη και σε χαμηλά ιικά φορτία, καθιστώντας το χρήσιμο για πρώιμη διάγνωση (Giri et al., 2021).



Εικόνα 12. Στην μέθοδο SHERLOCK με την RPA μετατρέπεται το ιικό RNA σε dsDNA και στη συνέχεια με τη βοήθεια της πολυμεράσης T7 δημιουργείται μια συμπληρωματική αλυσίδα RNA από DNA εκμαγείο. Έπειτα το σύμπλοκο Cas13–tracrRNA προσδένεται στον στόχο και απελευθερώνεται η φθορίζουσα ουσία. Στη μέθοδο DETECTR με την RPA μετατρέπεται το ιικό RNA σε dsDNA και στη συνέχεια με τη βοήθεια του συμπλόκου Cas12a–tracrRNA ενεργοποιείται το ένζυμο και απελευθερώνεται το μόριο με τη φθορίζον ουσία (Carter et al., 2020).

5.2.4 LAMP-Loop mediated isothermal amplification

Η τεχνική RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification) αποτελεί μια σχετικά πρόσφατη μέθοδο, η οποία αναπτύχθηκε το 2000 και έχει ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση του ιού της ηπατίτιδας Β. Πρόκειται για μια ισοθερμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA ή cDNA, η οποία έχει εφαρμοστεί και στη διάγνωση της COVID-19. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα μόνο σωληνάριο και σε σταθερή θερμοκρασία (60°C–65°C), χρησιμοποιώντας ένα απλό θερμομπλόκ. Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την διαγνωστική τεχνική

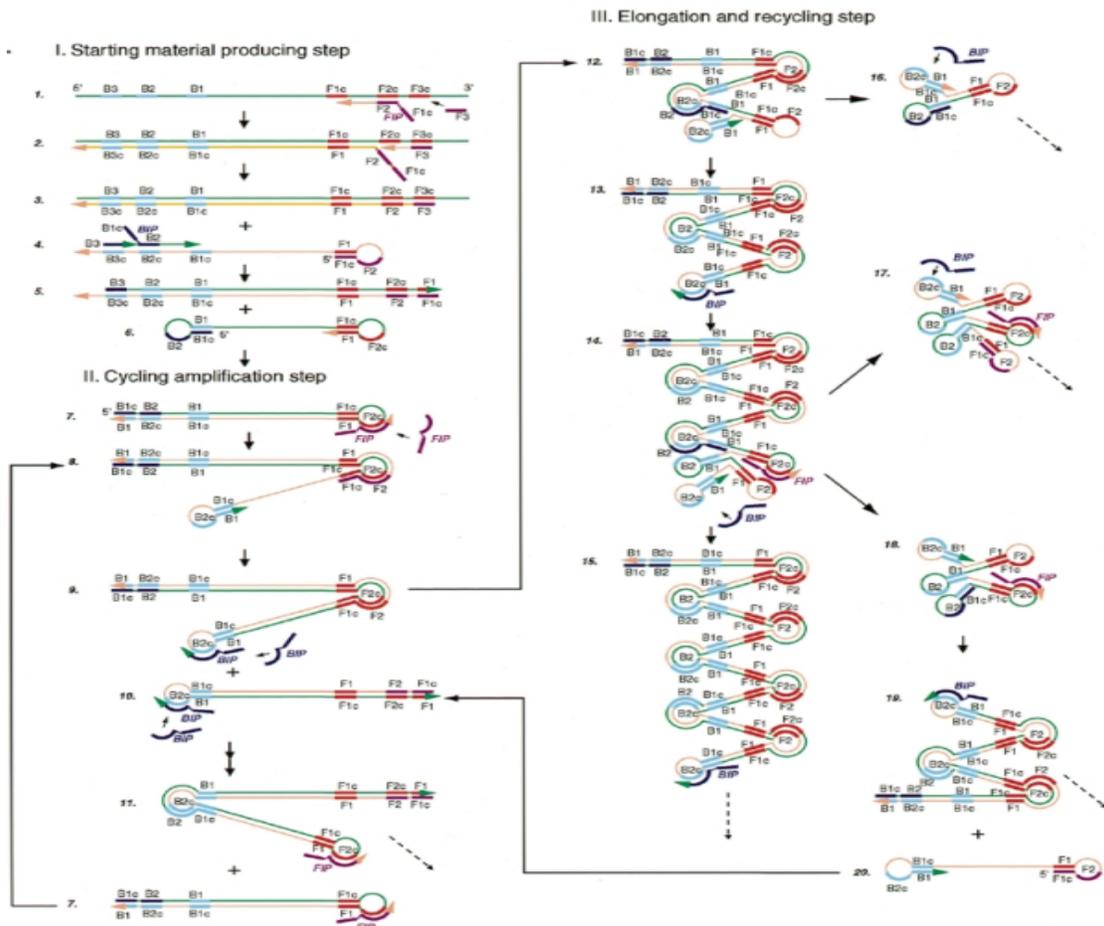
LAMP (RT-LAMP) επιτρέπει την άμεση ανίχνευση του RNA του SARS-CoV-2 (Islam & Iqbal et al., 2020). Σε αντίθεση με την RT-PCR, η οποία απαιτεί συνεχείς μεταβολές της θερμοκρασίας κατά τη μετάβαση από το στάδιο της αποδιάταξης στον υβριδισμό και, τελικά, στην επιμήκυνση, η RT-LAMP χαρακτηρίζεται ως απλούστερη ισοθερμική τεχνική πολλαπλασιασμού, απαιτώντας λιγότερο χρόνο και χωρίς την ανάγκη ειδικού θερμοκυκλοποιητή (Notomi et al., 2000).

Η RT-LAMP έχει αναπτυχθεί ως εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης του SARS-CoV-2, με κύριο στόχο τη μείωση του χρόνου και του κόστους σε σύγκριση με την RT-PCR (Natoli et al., 2021). Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η RT-LAMP μπορεί να παρουσιάσει δέκα φορές μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με την κλασική RT-PCR σε εφαρμογές ανίχνευσης ορισμένων ιών, όπως του ιού Δυτικού Νείλου (West Nile), χωρίς την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Parida et al., 2004).

Στην κλασική τεχνική LAMP χρησιμοποιούνται τέσσερις έως έξι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές, οι οποίοι αναγνωρίζουν οκτώ διακριτά σημεία της αλληλουχίας στόχου. Μία θερμοανθεκτική πολυμεράση εισάγεται για να ξεκινήσει τη σύνθεση των νέων αλυσίδων DNA, ενώ δύο εκκινητές σχηματίζουν δομές βρόγχων, διευκολύνοντας και επιταχύνοντας τη διαδικασία ενίσχυσης. Συγκεκριμένα, οι εσωτερικοί εκκινητές FIP (Forward Inner Primer) και BIP (Backward Inner Primer) αποτελούν ζεύγη εκκινητών, όπου ο FIP περιλαμβάνει τα τμήματα F2 και F1c (συμπληρωματικά του F2 και F1c στο DNA στόχο) και ο BIP περιλαμβάνει τα τμήματα B2 και B1c (συμπληρωματικά του B2 και B1c στο DNA στόχο αντίστοιχα). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται οι εξωτερικοί εκκινητές F3 (Forward Outer Primer) και B3 (Backward Outer Primer), οι οποίοι συνδέονται στις αντίστοιχες περιοχές του DNA στόχου και αναγνωρίζουν έως και έξι διακριτές περιοχές της αλληλουχίας. Τέλος, οι εκκινητές βρόχου LF (Forward Loop Primer) και LB (Backward Loop Primer) επιταχύνουν τη διαδικασία ενίσχυσης, συνδέοντας τις περιοχές της διπλής έλικας που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και αυξάνοντας την παραγωγή νέων αλυσίδων DNA (Gallas-Lindemann et al., 2017; Mori et al., 2012; Nagamine et al., 2002).

Η αντίδραση LAMP ξεκινά με τη σύνθεση DNA, κατά την οποία οι εξωτερικοί εκκινητές F3 και B3 συνδέονται στις αντίστοιχες περιοχές της αλληλουχίας στόχου. Στη συνέχεια, οι εσωτερικοί εκκινητές FIP και BIP συνδέονται στις περιοχές F2 και B2,

επιτρέποντας τη δημιουργία νέας αλυσίδας DNA (Εικόνα 13). Η θερμοάντοχη πολυμεράση επεκτείνει τη νέα αλυσίδα, εκτοπίζοντας το αρχικό μονόκλωνο DNA και δημιουργώντας νέο διπλόκλωνο DNA με ελεύθερα 3' άκρα, στα οποία προσδένονται νέοι εκκινητές μέσω των βρόχων. Οι βρόγχοι αυτοί διευκολύνουν τη συνεχιζόμενη αναπαραγωγή DNA χωρίς την ανάγκη εκ νέου υβριδισμού ή επιμήκυνσης, όπως συμβαίνει στην κλασική PCR, επιτυγχάνοντας ενίσχυση DNA έως και 10^9 φορές σε λιγότερο από μία ώρα (Parida et al., 2008; Sahoo et al., 2016).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μέθοδο LAMP. Τα βέλη μας υποδείχνουν την σειρά των βημάτων με την οποία πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA. Η αλληλουχία στόχος είναι σημαδεμένη με το κόκκινο χρώμα. Στην αρχή βλέπουμε τα αρχικά βήματα για την δημιουργία των δομών βρόχων και στην συνέχεια την συνεχόμενη κυκλική ενίσχυση που πραγματοποιείται (Notomi et al., 2000).

Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης εντείνεται περαιτέρω με τη χρήση των εκκινητών βρόχου LF και LB, οι οποίοι αυξάνουν την παραγωγή νέων αλυσίδων DNA μέσω συνεχούς επιμήκυνσης και εκτόπισης. Η διαδικασία συνεχίζεται κυκλικά, με τον σχηματισμό νέων δομών βρόχου και τη συνεχή σύνθεση DNA (Sahoo et al., 2016).

Για την εφαρμογή της τεχνικής LAMP στη διάγνωση των RNA ιών, έχουν αναπτυχθεί τροποποιημένες μέθοδοι, όπως αναφέρθηκε η RT-LAMP (LAMP αντίστροφης μεταγραφής) και η multiplex LAMP. Στην RT-LAMP είναι δυνατή η ανίχνευση αλληλουχιών RNA αντί DNA, μέσω της προσθήκης του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης στα αντιδραστήρια, το οποίο μετατρέπει το ιικό RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την ενίσχυση (Sahoo et al., 2016). Η multiplex LAMP αναπτύχθηκε με σκοπό την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων σε ένα μόνο σωληνάριο, χρησιμοποιώντας πολλούς εκκινητές, καθένας από τους οποίους φέρει διαφορετικό φθοριόχρωμα για την ταυτοποίηση των προϊόντων (Foo et al., 2017; Mahony et al., 2013).

Δοκιμασία βασισμένη στην RT-LAMP που στοχεύει το γονίδιο S του SARS-CoV-2 έδειξε ευαισθησία 88,89% και υψηλή συμφωνία αποτελεσμάτων σε σύγκριση με τις διαγνωστικές μεθόδους που βασίζονται στην RT-PCR (Islam & Iqbal et al., 2020).

Επιπρόσθετα, πλην της RT-LAMP, η Abbott ID NOW Point-of-Care πλατφόρμα χρησιμοποιεί μια ισοθερμική νουκλεϊκή ενίσχυση (NEAR) για την ταχεία ανίχνευση του SARS-CoV-2 RNA σε σταθερή θερμοκρασία, παρέχοντας μοριακά αποτελέσματα σε λίγα λεπτά. Αυτή η τεχνολογία διαφέρει από την κλασική RT-LAMP καθώς δεν βασίζεται στους πολλαπλούς LAMP εκκινητές και στο σχηματισμό βρόγχων DNA, αλλά στην ενζυμική δράση nicking και στη μετατόπιση αλυσίδας για ταχεία ενίσχυση (Khan et al., 2020). Χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Abbott ID NOW-POC (Point of Care) για τη διάγνωση της COVID-19, η RT-LAMP παρέχει τον συντομότερο χρόνο απόδοσης αποτελέσματος σε σχέση με άλλες εγκεκριμένες από τον FDA μεθόδους, όπως οι Hologic Panther Fusion, GenMark ePlex, Abbott ID NOW και Cepheid Xpert Xpress (Zhen et al., 2020).

Περαιτέρω παραλλαγές της RT-LAMP έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση διαφορετικών περιοχών του γονιδίου του SARS-CoV-2, με την ανάγνωση του αποτελέσματος είτε μέσω φθορισμού είτε μέσω χρωματομετρικής ανάγνωσης (Baek et al., 2020; Yan et al., 2020; Yu et al., 2020).

Μία από τις τεχνικές παραγωγής φθορισμού βασίζεται στη χρήση συμπλόκου φλουροσκεΐνης (Calcein), το οποίο παραμένει αδρανές όταν δεσμεύεται σε ιόντα μαγγανίου. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τα πυροφωσφορικά άλατα που παράγονται κατά τον πολυμερισμό δεσμεύουν το μαγγάνιο, απελευθερώνοντας το σύμπλοκο. Η απελευθέρωση της καλσεΐνης οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού μετά τη σύνδεσή της με ιόντα μαγνησίου (Yan et al., 2020).

Για την απόδοση του αποτελέσματος μέσω χρωματομετρικών μετρήσεων σε τεχνικές ενίσχυσης που βασίζονται στον πολυμερισμό ενζύμων, χρησιμοποιούνται δείκτες αλλαγής pH. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, κάθε προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου dNTP (deoxyribonucleoside triphosphate) απελευθερώνει ένα ιόν υδρογόνου, προκαλώντας μείωση του pH του διαλύματος. Οι δείκτες pH, όπως η υδροξυνεφθόλη (hydroxynepthol blue, HNB) ή το ερυθρό φαινόλης (phenol red), επιτρέπουν την οπτική ανίχνευση των προϊόντων. Το phenol red εμφανίζει ροζ χρώμα σε pH 8,8 και μεταβάλλεται σε κίτρινο όταν το pH μειώνεται κάτω από 8 (Baek et al., 2020; Malik et al., 2019).

Παράδειγμα αυτής της χρωματομετρικής ανίχνευσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

SARS-CoV-2 (copies)	500	50	5	0
RT-LAMP				
Penn-Ramp				

Πίνακας 7. Παρακολούθηση μεταβολής του χρώματος σε χρωματομετρική μέθοδο, αναλόγως με το στάδιο της αντίδρασης. Χρήση *Leucocrystal Violet* (LCV) (Song et al., 2021).

Η χρήση τεχνικών ανίχνευσης που βασίζονται σε φθορισμό ή σε χρωματομετρική αλλαγή pH ενδέχεται να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω του σήματος που μπορεί να προκύψει από την ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, η ανίχνευση εστιάζει σε συγκεκριμένες ακολουθίες των προϊόντων που έχουν ενισχυθεί, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη ειδικότητα (Feng et al., 2020).

Μια ακόμη εξελιγμένη μέθοδος για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 είναι το πρωτόκολλο Penn-RAMP (Primers with Enhanced Nucleotide Nucleobases for Rapid Amplification of Minimal Pathogens) (Kashir & Yaqinuddin et al., 2020). Πρόκειται για μια τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου LAMP, η οποία περιλαμβάνει δύο στάδια ισοθερμικής ενίσχυσης. Στο αρχικό στάδιο εφαρμόζεται ισοθερμική ενίσχυση με βάση τη δράση της πολυμεράσης ανασυνδυασμού (Recombinase Polymerase Amplification, RPA), χρησιμοποιώντας τους εξωτερικούς εκκινητές F3 και B3, με στόχο την ταυτόχρονη ενίσχυση όλων των επιλεγμένων στόχων. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία.

Primer	Sequence (5' – 3')
F3	TGCTTCAGTCAGCTGATG
B3	TTAAATTGTCATCTTCGTCCTT
FIP	TCAGTACTAGTGCCCTGTGCCCAACAATCGTTTTTAAACGGGT
BIP	TCGTATACAGGGCTTTTGACATCTATCTTGGAAGCGACAACAA
Loop F	CTGCACTTACACCGCAA
Loop B	GTAGCTGGTTTTGCTAAATTCC

Πίνακας 8. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Penn-RAMP για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 (Kashir & Yaqinuddin, 2020).

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια δεύτερη αντίδραση LAMP, στην οποία χρησιμοποιούνται τέσσερις εκκινητές RAMP. Η τεχνική αυτή, γνωστή ως «nested» ή φωλιάς, συνίσταται στην εκτέλεση μιας αντίδρασης μέσα σε μια άλλη αντίδραση και επιτυγχάνει περίπου δεκαπλάσια ευαισθησία σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο

LAMP (Song et al., 2017). Ειδικότερα για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, η αποτελεσματικότητα της Penn-RAMP αποδίδεται στην ικανότητά της να γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ της ταχύτητας των ισοθερμικών μεθόδων και της υψηλής αναλυτικής ευαισθησίας που παρουσιάζει η RT-qPCR. Σύμφωνα με μελέτες εφαρμογής του πρωτοκόλλου στον ιό, η μέθοδος επιτυγχάνει όριο ανίχνευσης (LoD) έως και 5 ιικά σωματίδια ανά αντίδραση, παρουσιάζοντας ευαισθησία >10 φορές μεγαλύτερη από την απλή RT-LAMP (Song et al., 2021).

Η απόδοση αυτή κρίνεται ιδιαίτερα κρίσιμη για τη διάγνωση ασθενών με χαμηλό ιικό φορτίο, όπου οι συμβατικές μέθοδοι συχνά δίνουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητά της ενισχύεται από την υψηλή ανθεκτικότητα της πολυμεράσης RPA σε αναστολείς του δείγματος. Αυτό επιτρέπει την επιτυχή ανίχνευση του SARS-CoV-2 απευθείας από ρινικά επιχρίσματα ή σίελο χωρίς να έχει προηγηθεί εξαγωγή και καθαρισμός του γενετικού υλικού, μειώνοντας τον συνολικό χρόνο διάγνωσης σε λιγότερο από 60 λεπτά (Song et al., 2021).

5.2.5 Μέθοδος ARMS (Amplification Refractory Mutation System-Σύστημα Ενίσχυσης Ανθεκτικό στις Μεταλλάξεις)

Η μέθοδος ARMS (Amplification Refractory Mutation System - Σύστημα Ενίσχυσης Ανθεκτικό στις Μεταλλάξεις) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και αναγνώριση σημειακών μεταλλάξεων και βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να μην καταλύει την επιμήκυνση ενός εκκινητή όταν το νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του εκκινητή δεν είναι συμπληρωματικό του αντίστοιχου νουκλεοτιδίου στο DNA στόχο.

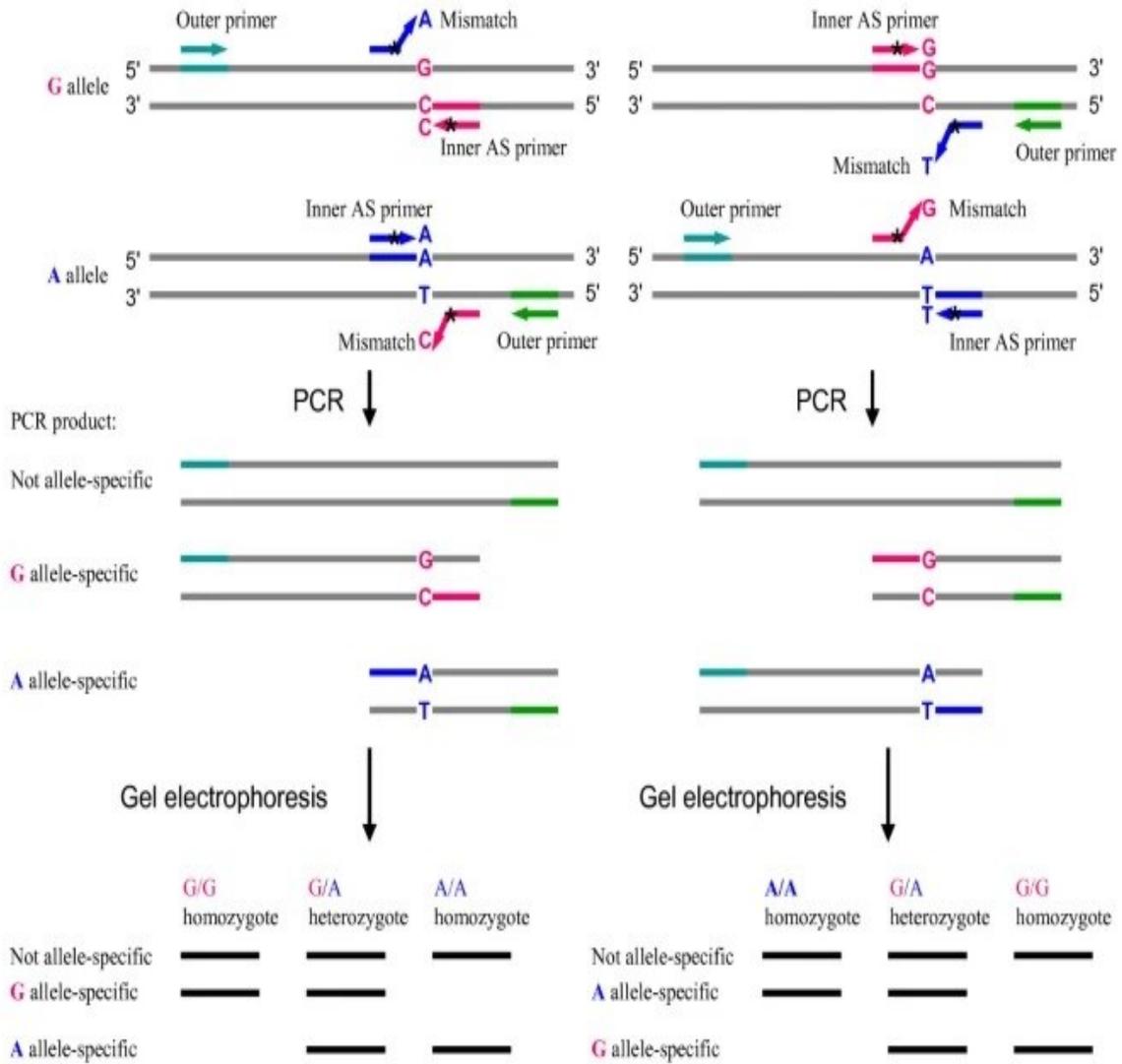
Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται DNA πολυμεράση χωρίς 3'→5' εξωνουκλεασική (proofreading) δράση, όπως η Taq πολυμεράση, καθώς η επιλογή αυτή δεν επιτρέπει στο ένζυμο να απομακρύνει το μη συμπληρωματικό νουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του μη ειδικού εκκινητή, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η επιμήκυνση της αλυσίδας DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε η αλληλουχία τους να είναι κοινή εκτός από το 3' άκρο, το οποίο είναι συμπληρωματικό μόνο σε ένα από τα δύο νουκλεοτίδια της στοχευόμενης θέσης. Με αυτόν τον τρόπο, οι δύο εσωτερικοί εκκινητές αποκτούν ειδικότητα για κάθε νουκλεοτίδιο της συγκεκριμένης θέσης (Εικόνα 14). Για την

ενίσχυση του DNA στόχου χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών: ένας ειδικός εκκινητής, σχεδιασμένος ως πρόσθιος (Forward), και ένας εκκινητής με αλληλουχία κοινή προς τον στόχο, ο οποίος λειτουργεί ως ανάστροφος (Reverse). Με την εκτέλεση δύο ξεχωριστών αντιδράσεων είναι δυνατός ο προσδιορισμός της παρουσίας ή απουσίας συγκεκριμένης μετάλλαξης, προσδιορίζοντας με ακρίβεια τα νουκλεοτίδια στη θέση ενδιαφέροντος της DNA ακολουθίας, ενώ τα αποτελέσματα μπορούν να επιβεβαιωθούν με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (Newton et al., 1989; Eaker et al., 2005).

Στο πλαίσιο της πανδημίας της COVID-19, η ανάγκη για ταχεία και οικονομική επιτήρηση των μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2 οδήγησε στην αυξανόμενη χρήση της μεθόδου ARMS ως εναλλακτικής λύσης έναντι της δαπανηρής και χρονοβόρας αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) (Bozidis et al., 2023).

Η εφαρμογή της μεθόδου στον SARS-CoV-2 βασίζεται συνήθως σε ένα σχήμα RT-ARMS-PCR, όπου το ιικό RNA μετατρέπεται αρχικά σε cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Οι εκκινητές σχεδιάζονται με στόχο τον εντοπισμό κρίσιμων σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο της ακίδας S, οι οποίες χαρακτηρίζουν τις διάφορες παραλλαγές ανησυχίας. Για παράδειγμα, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για τον διαχωρισμό στελεχών που φέρουν μεταλλάξεις όπως η N501Y, η E484K ή η L452R, επιτρέποντας στους ερευνητές να ταυτοποιούν την παρουσία συγκεκριμένων στελεχών (όπως των Alpha, Delta και Omicron) σε κλινικά δείγματα μέσα σε λίγες μόνο ώρες, οδηγώντας έτσι στην άμεση και σωστή λήψη αποφάσεων με άμεσο σκοπό την διαφύλαξη της δημόσιας υγείας (Harper et al., 2021; Islam et al., 2021). Η απόδοση της μεθόδου ARMS στην ανίχνευση του SARS-CoV-2 χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική εξειδίκευση και επαναληψιμότητα, στοιχεία σημαντικά για τη διαγνωστική αξιοπιστία.

Η ειδικότητα της μεθόδου μπορεί να ενισχυθεί με τη σκόπιμη εισαγωγή μιας επιπλέον ασυμφωνίας στη δεύτερη ή τρίτη θέση από το 3' άκρο των εκκινητών. Η στρατηγική αυτή αυξάνει την αποσταθεροποίηση του συμπλόκου εκκινητή-στόχου όταν ο εκκινητής υβριδίζεται με μη συμπληρωματικό αλληλόμορφο, περιορίζοντας την επιμήκυνση από την DNA πολυμεράση και μειώνοντας έτσι την πιθανότητα μη ειδικής ενίσχυσης και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Little, 1995).



Εικόνα 14. Σχηματική περιγραφή των εκκινητών που χρησιμοποιούμε στη μέθοδο ARMS. Ένα ζεύγος εσωτερικών ειδικών εκκινητών και ένα ζεύγος κοινών εκκινητών χρησιμοποιούνται για κάθε αντίδραση. Αναφέρεται επίσης και μια μη αναγνώριση για να αυξηθεί η ειδικότητα. Οι δυο κοινοί εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε τα προϊόντα τους να ξεχωρίζουν ως προς το μέγεθος τους κατά την απεικόνιση της γέλης ηλεκτροφόρησης (Ye et al., 2001)

Η ικανοποιητική αναλυτική ευαισθησία της καθιστά δυνατή την αξιόπιστη ανίχνευση ακόμη και σε δείγματα με χαμηλό τίτλο (με υψηλό Ct), ενώ η δυνατότητα εκτέλεσης Multiplex εφαρμογής επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση πολλαπλών μεταλλάξεων σε μία μόνο αντίδραση. Αυτό καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα αποδοτική για τη μαζική διαλογή δειγμάτων, καθώς συνδυάζει το χαμηλό λειτουργικό κόστος καθώς είναι πιο απλό να ερμηνευτούν τα αποτελέσματα, χωρίς τη χρήση πολύ ειδικών βιοπληροφορικών αναλύσεων που απαιτούνται από τις μεθόδους αλληλούχισης (Velu et al., 2022). Στη μελέτη των Bozidis et al., η μέθοδος ARMS-multiplex PCR εφαρμόστηκε επιτυχώς για την ταχεία διάκριση υποπαραλλαγών Omicron του SARS-CoV-2 (BA.1, BA.2, BA.4 και BA.5), μέσω στοχευμένης ανίχνευσης χαρακτηριστικών σημειακών μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του ιού. Η μέθοδος παρουσίασε υψηλή ειδικότητα και επαναληψιμότητα, καθιστώντας την αξιόπιστο εργαλείο για γρήγορη γονοτυπική επιτήρηση σε εργαστηριακό επίπεδο (Bozidis et al., 2023).

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, η απόδοση της μεθόδου ARMS περιορίζεται από την φύση της να ανιχνεύει μόνο προκαθορισμένους στόχους, γεγονός που την καθιστά αδύναμη απέναντι σε νέες, πρωτοεμφανιζόμενες μεταλλάξεις. Σε περιπτώσεις όπου ο SARS-CoV-2 αναπτύσσει δευτερογενείς μεταλλάξεις εντός των περιοχών πρόσδεσης των εκκινητών, η κινητική της αντίδρασης μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά, οδηγώντας σε μείωση της απόδοσης ή ακόμη και σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα για συγκεκριμένα στελέχη. Έτσι, συνολικά, η αποτελεσματικότητά της περιορίζεται στην ανίχνευση προκαθορισμένων μεταλλάξεων, γεγονός που απαιτεί συνεχή επικαιροποίηση των εκκινητών για ευρύτερη εφαρμογή (Bozidis et al., 2023).

Επιπλέον, ενώ η ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης παραμένει η κλασική μέθοδος ανάλυσης των προϊόντων της ARMS-PCR, η ενσωμάτωση της ARMS μεθοδολογίας σε πλατφόρμες Real-Time PCR με χρήση φθορίζουσών χρωστικών ή ανιχνευτών έχει βελτιώσει περαιτέρω τον χρόνο απόκρισης και την ευαισθησία της.

Συμπερασματικά, η ARMS-PCR αποτελεί ένα ισχυρό και αξιόπιστο εργαλείο ταχείας γονοτύπησης, το οποίο όμως πρέπει να λειτουργεί συμπληρωματικά και παράλληλα με τη χρήση NGS για επιτήρηση, ώστε να διασφαλίζεται η εγκυρότητα διάγνωσης έναντι του συνεχώς εξελισσόμενου γονιδιώματος του ιού SARS-CoV-2. Ειδικά μπορεί να αποτελέσει μέθοδο προκαταρκτικού ελέγχου για τη διάκριση διακριτών ομάδων

παραλλαγών, ειδικά όταν δεν είναι διαθέσιμες ούτε εμπορικές λύσεις ούτε εξελιγμένη γονιδιωματική παρακολούθηση (Bozidis et al., 2023).

5.2.6 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς - Next Generation Sequencing (NGS)

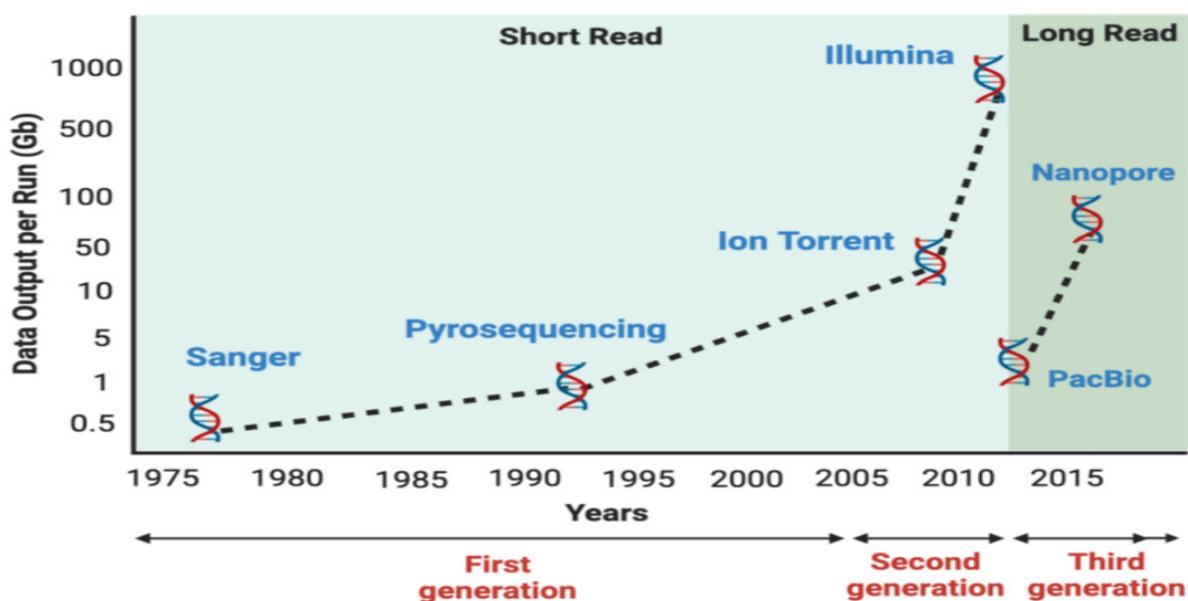
Η αυξημένη ανάγκη για ταχείες και αξιόπιστες διαγνωστικές απαντήσεις, η οποία αναδείχθηκε ιδιαίτερα κατά την πρόσφατη πανδημία, κατέστησε επιτακτική τη χρήση και περαιτέρω ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχισης στη διάγνωση λοιμωδών νοσημάτων. Η αλληλούχιση νεότερης γενιάς (Next-Generation Sequencing, NGS) επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού μορίων νουκλεϊκού οξέος, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο και το κόστος της διαδικασίας (Candido et al., 2022). Η προσέγγιση αυτή συμβάλλει στον άμεσο εντοπισμό του παθογόνου χωρίς να απαιτείται καλλιέργεια του παθογόνου ή προηγούμενη απομόνωση, ούτε εξάρτηση από την κλινική συμπτωματολογία του ασθενούς. Έτσι, η τεχνολογία NGS προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης ιών, βακτηρίων και μυκήτων που ενδέχεται να συνυπάρχουν σε ένα δείγμα (Udugama et al., 2020).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς αποτελεί τεχνολογία που επιτρέπει την ανάλυση των αλληλουχιών ενός συνόλου γονιδίων σχετιζόμενων με συγκεκριμένους φαινότυπους. Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς από εργαστήρια παγκοσμίως για τη μελέτη του γενετικού υλικού όλων των ζωντανών οργανισμών και έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο σε πολλούς ερευνητικούς και εφαρμοσμένους τομείς, ενώ η εφαρμογή της στη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών παραμένει σχετικά περιορισμένη. Στον τομέα της διάγνωσης, υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις: η πρώτη βασίζεται στην ανάλυση γενετικά συνδεδεμένων πολυμορφικών νουκλεοτιδικών παραλλαγών (haplotype analysis), κυρίως για γονιδιωματική επιτήρηση, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει την απευθείας αλληλούχιση και τον εντοπισμό μεταλλάξεων στο γονίδιο που σχετίζεται με τη νόσο. Η λήψη ολόκληρης της γενετικής αλληλουχίας ενός παθογόνου παρέχει σημαντικά περισσότερες πληροφορίες σε σύγκριση με ένα απλό διαγνωστικό τεστ, καθιστώντας τα αποτελέσματα ιδιαίτερα πολύτιμα για την κατανόηση και αντιμετώπιση της νόσου (Levy & Myers, 2016).

Η τεχνολογία NGS αναπτύχθηκε στις αρχές του 21ου αιώνα ως εξέλιξη της μεθόδου αλληλούχισης κατά Sanger, η οποία, παρά τη συμβολή της στην ολοκλήρωση

του Human Genome Project, παρουσίαζε σημαντικούς περιορισμούς, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους και του εκτεταμένου χρόνου ανάλυσης μεγάλων γονιδιωμάτων. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν στην ανάπτυξη τεχνολογιών που επιτρέπουν την ταχεία αλληλούχιση στοχευμένων γονιδίων, εξονίων ή ολόκληρων γονιδιωμάτων οδηγώντας ακόμη και στην ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχισης τρίτης γενιάς (Εικόνα 15) (Satam et al., 2023; Udugama et al., 2020).

Οι προσεγγίσεις της NGS βασίζονται κυρίως σε δύο τεχνολογίες: την αλληλούχιση βραχέων αναγνωσμάτων (short-read sequencing) και την αλληλούχιση μακρών αναγνωσμάτων (long-read sequencing) (Levy & Myers, 2016). Για την ανάλυση του SARS-CoV-2 χρησιμοποιούνται και οι δύο τεχνολογίες, με τα short-reads (π.χ. Illumina) να κυριαρχούν λόγω υψηλής ακρίβειας στην ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων.



Εικόνα 15. Εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχισης κατά τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες και κατηγοριοποίηση σε 3 γενεές. Η πρώτη γενιά αλληλούχιση με τη μέθοδο κατά Sanger, έβαλε τα θεμέλια για την ανάπτυξη της αλληλούχισης. Η μαζική παράλληλη αλληλούχιση έκανε την εμφάνιση της με τις πλατφόρμες της Illumina και Ion Torrent. Η Τρίτη γενιά περιλαμβάνει τις πλατφόρμες PacBio και Nanopore, παρέχοντάς μας την τεχνολογία των βραχέων και μακρών αναγνωσμάτων (Satam et al., 2023).

Η αλληλούχιση βραχέων αναγνωσμάτων αναλύει μικρά τμήματα γενετικού υλικού, συνήθως 50–300 βάσεις, προσφέροντας υψηλή ταχύτητα και ακρίβεια, αλλά αντιμετωπίζει δυσκολίες σε περιοχές με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή μεγάλες διαγραφές και αναδιατάξεις. Αντίθετα, η αλληλούχιση μακρών αναγνωσμάτων επιτρέπει την ανάλυση μεγαλύτερων τμημάτων γενετικού υλικού, από περίπου 10.000 έως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες βάσεις, καθιστώντας δυνατή την ακριβή αλληλούχιση περιοχών με σύνθετες δομές, όπως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή μεγάλες αναδιατάξεις, οι οποίες αποτελούν πρόκληση για την τεχνολογία βραχέων αναγνωσμάτων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από διάφορα εργαστήρια και επιστημονικές ομάδες, μετά την εκτενή χρήση των μεθόδων NGS, καθώς και την αξιοποίηση πλατφορμών που αναπτύχθηκαν από διαφορετικές εταιρείες, παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις (Zhang & Holmes, 2020). Μερικές από τις εμπορικά διαθέσιμες πλατφόρμες, οι οποίες χρησιμοποιούνται συχνότερα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ	ΜΗΚΟΣ ΑΝΑΓΝΩΣΜΑΤΟΣ	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΣ ΧΡΟΝΟΣ
Roche/454	GS FLX	Pyrosequencing	Μέχρι και 1,000 bp	700 mol/L/23 hr
Thermo Fisher/Ion Torrent	PGM	Detection of hydrogen Ion	Μέχρι και 400 bp	Up to 4 Gb/day (PGM318)
Illumina	MiSeq HiSeq 2500 HiSeq 4000 Novate	Reversible terminator	Μέχρι και 300 bp Ίσως μέχρι 250 bp Ίσως μέχρι 150 bp 150 bp	Up to 15 Gb/56 hr 60 hrs για μέχρι και 300 Gb (γρήγορη μέθοδος) Μέχρι και 1.5 Tb/3 days Μέχρι και 3,000 Gb/44 hr
Pacific Biosciences	Sequel	Real-time	10–15 kb (μέσος όρος)	20 Gb/day

Oxford Nanopore	MinION	Real-time	Longest read >2 Mb	Up to 30 Gb/48 hr
-----------------	--------	-----------	--------------------	-------------------

Πίνακας 9. Παρουσίαση των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων πλατφορμών εμπορικών εταιριών, καθώς και αναφορά της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται. Παρουσιάζεται επίσης και το φάσμα αναγνώσματος, όπως και ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η κάθε εκτέλεση (Zhong et al., 2021).

Η τεχνολογία αλληλούχισης, παρά τις διαφορές μεταξύ των συστημάτων, περιλαμβάνει κυρίως τέσσερα βασικά στάδια:

1. Κατακερματισμός και Ενίσχυση του DNA

Στο πρώτο βήμα, η περιοχή του DNA που ενδιαφέρει κατακερματίζεται σε μικρά θραύσματα (fragments) μήκους 100–300 bp. Ο κατακερματισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με μηχανικές είτε με μοριακές μεθόδους. Στη μηχανική προσέγγιση, το DNA θρυμματίζεται με υπερήχους σε πολύ μικρά τμήματα, ενώ οι αλληλουχίες στόχου εξαγονται με χρήση ειδικών συμπληρωματικών ανιχνευτών, διαδικασία γνωστή ως μέθοδος σύλληψης με υβριδισμό (hybrid capture-based). Μία ακόμη μοριακή μέθοδος που εφαρμόζεται στην αλληλούχιση του RNA του SARS-CoV-2 είναι η ενίσχυση μέσω PCR με πολλαπλά ζεύγη εκκινήτων. Τα τελικά προϊόντα της διαδικασίας συνιστούν τα μικρά θραύσματα DNA που απαιτούνται για την αλληλούχιση και η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως Amplicon Assay και επιτρέπει την επιλεκτική ενίσχυση ολόκληρου του ιικού γονιδιώματος (περίπου 30.000 βάσεις) σε μικρά, επικαλυπτόμενα τμήματα, εξασφαλίζοντας πλήρη κάλυψη ακόμη και από δείγματα με χαμηλή συγκέντρωση του ιού (Hess et al., 2020; Gladkikh et al., 2023). Τα fragments αυτά χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την προετοιμασία της βιβλιοθήκης.

2. Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη δημιουργία της βιβλιοθήκης. Η τεχνολογία NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών δειγμάτων σε μία αντίδραση. Κατά την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, στα άκρα κάθε θραύσματος προστίθενται προσαρμογείς (adaptors) συγκεκριμένης αλληλουχίας μέσω αντίδρασης λιγάσης ολιγονουκλεοτιδίων. Οι προσαρμογείς λειτουργούν ως αναγνωριστικά των δειγμάτων και επιτρέπουν την

αναγνώρισή τους ανάλογα με το σύστημα που χρησιμοποιείται, είτε μέσω των flowcells είτε μέσω των beads. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει στους ειδικούς εκκινητές να προσδένονται σε όλα τα τμήματα DNA, προετοιμάζοντας τα δείγματα για μαζική παράλληλη αλληλούχιση (Hess et al., 2020; Gladkikh et al., 2023).

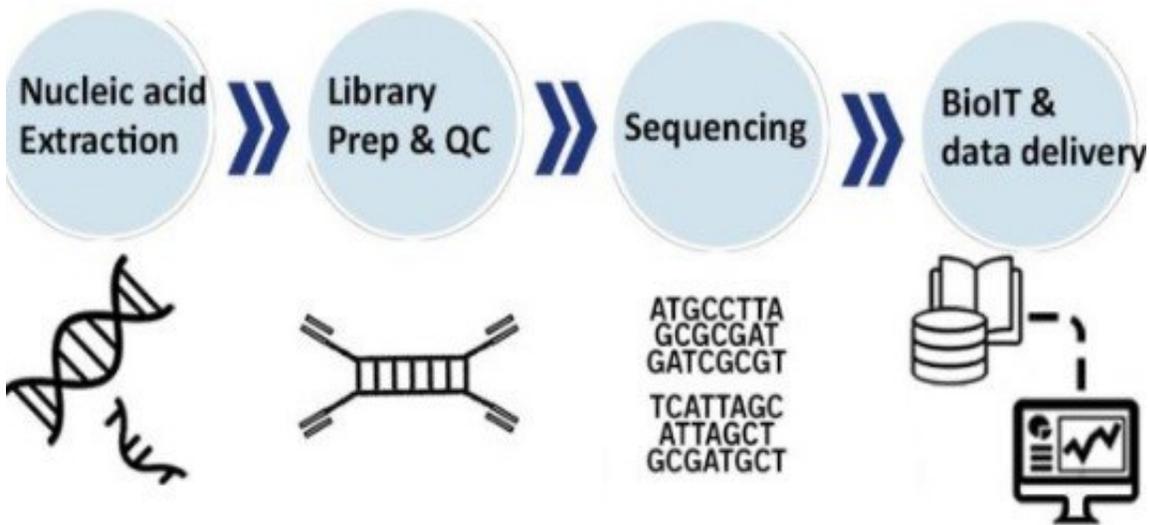
3. Μαζική παράλληλη αλληλούχιση (clonal amplification)

Στο τρίτο στάδιο, οι βιβλιοθήκες που έχουν δημιουργηθεί φορτώνονται στην αντίστοιχη πλατφόρμα αλληλούχισης NGS (αλληλουχητή). Ανάλογα με τον κατασκευαστή, οι βιβλιοθήκες τοποθετούνται είτε σε ειδικό πλακάκι με κελιά ροής (Illumina NGS), είτε σε chip αλληλούχισης (Ion Torrent NGS). Παρά τις διαφορές στις πλατφόρμες και στους πίνακες αλληλουχίας, ο στόχος είναι κοινός: η ταυτόχρονη αλληλούχιση όλων των τμημάτων DNA. Οι προκύπτουσες αλληλουχίες, μαζί με τις πληροφορίες που αυτές παρέχουν, υπόκεινται σε ανάλυση μέσω βιοπληροφορικής, επιτρέποντας την αξιολόγηση των μεταλλάξεων και παραλλαγών.

4. Βιοπληροφορική ανάλυση και παρουσίαση δεδομένων

Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αφορά την βιοπληροφορική ανάλυση και την ερμηνεία των δεδομένων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αλληλούχιση επεξεργάζονται με τη χρήση στατιστικών πακέτων και εξειδικευμένων εργαλείων ανάλυσης δεδομένων. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων για να στοιχιστούν οι αλληλουχίες που προέκυψαν με την αλληλουχία αναφοράς του ανθρώπινου γονιδιώματος, προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές παραλλαγές ή μεταλλάξεις. Στη συνέχεια, όλα τα δεδομένα συγκεντρώνονται και παρουσιάζονται στον χρήστη, ο οποίος αξιολογεί και προσδιορίζει τις παραλλαγές ή μεταλλάξεις που υφίσταται το υπό μελέτη DNA (Qin, 2019).

Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται σύντομα και σχηματικά η ροή διεργασιών για την ολοκλήρωση του NGS:



Εικόνα 16. Σύνοψη απεικόνιση των τεσσάρων σταδίων NGS (Hess et al., 2020)

Η εφαρμογή της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) στον ιό SARS-CoV-2 περιλαμβάνει τόσο την ανίχνευση του ιού σε δείγματα ασθενών όσο και την πλήρη γονιδιωματική ανάλυση για την τυποποίησή του και την αναζήτηση μεταλλαγμένων ποικιλιών. Επιπλέον, η NGS διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην παρακολούθηση των αναδυόμενων παραλλαγών του ιού και στη μελέτη της δυναμικής εξέλιξής τους (John et al., 2021).

Για τη διαγνωστική χρήση της NGS στην COVID-19 απαιτούνται, όπως αναφέρθηκε, συγκεκριμένα εργαστηριακά πρωτόκολλα, τα οποία περιλαμβάνουν την απομόνωση RNA, την προετοιμασία βιβλιοθηκών (library preparation), τη χρήση κατάλληλων στρατηγικών (amplicon-based, capture-based ή metagenomic) και την εφαρμογή βιοπληροφορικής ανάλυσης με ποιοτικό έλεγχο (QC) των δεδομένων (Grimaldi et al., 2022).

Παρόλο που οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες διαγνωστικές μέθοδοι για τον SARS-CoV-2 βασίζονται στην RT-qPCR, η τεχνολογία NGS έχει αποδειχθεί αποτελεσματική και ως διαγνωστικό εργαλείο, όπως σε περιπτώσεις χαμηλού ιικού φορτίου ή όταν απαιτείται λεπτομερής ανάλυση των παραλλαγών (Dong et al., 2023). Για παράδειγμα, σε μελέτη με 175 θετικά δείγματα με Ct \geq 32 (χαμηλό ιικό φορτίο), η αλληλούχιση NGS εμφάνισε

ποσοστό επιτυχούς ανάλυσης 91 % (Ilié et al., 2023). Έτσι η μέθοδος αυτή επιτρέπει την ανίχνευση του ιού σε επίπεδα όπου η RT-qPCR μπορεί να δώσει ασαφή αποτελέσματα ή να αποτύχει να ανιχνεύσει τον ιό (Dong et al., 2023).

Αντίστοιχα, δεδομένα από το CDC υποδεικνύουν ότι η επιλογή δειγμάτων με χαμηλό Ct είναι κρίσιμη για επαρκή κάλυψη της αλληλούχισης στην NGS (Goswami et al., 2022). Οι κύριες προκλήσεις περιλαμβάνουν την ανάγκη για υψηλό ιικό φορτίο (χαμηλό Ct) για αξιόπιστη ανάλυση (Ilié et al., 2023; Goswami et al., 2022) και την παρουσία μικροβιακού γενετικού υλικού που μπορεί να μειώσει την αναλογία ανθρώπινων / ιογενών reads (John et al., 2021). Επιπλέον, η NGS αποτελεί το θεμέλιο για την ακριβή τυποποίηση (typing) του ιού. Ενώ η PCR απλώς επιβεβαιώνει την παρουσία του ιού, η NGS επιτρέπει την ταξινόμηση του στελέχους σε συγκεκριμένες γενετικές γραμμές (lineages). Χρησιμοποιώντας το διεθνές σύστημα ονοματολογίας Pango (Rambaut et al., 2020), οι ερευνητές μπορούν να αποδώσουν μια ακριβή "γενετική ταυτότητα" σε κάθε δείγμα. Αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της συμβατότητας των δεδομένων με διεθνή αποθετήρια όπως το GISAID και το Nextstrain σύμφωνα με τις οδηγίες του ECDC. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η λήψη αξιόπιστων και υψηλής ποιότητας αποτελεσμάτων, ενώ διασφαλίζεται η συμβατότητα των δεδομένων με δημόσια διαθέσιμα αποθετήρια, διευκολύνοντας έτσι τη σύγκριση με άλλες μελέτες (Grimaldi et al., 2022; Goswami et al., 2022).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με απόλυτη επιτυχία στην ανίχνευση κρίσιμων μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη της ακίδας (Spike protein), οι οποίες καθορίζουν τη μεταδοτικότητα και τη διαφυγή από την ανοσία (John et al., 2021; Grimaldi et al., 2022).

Σύμφωνα με τους Goswami et al. (2022), η γονιδιωματική επιτήρηση (genomic surveillance) μέσω NGS επέτρεψε τον έγκαιρο εντοπισμό των Παραλλαγών Ανησυχίας - VOCs, όπως οι Alpha, Delta και Omicron. Η ικανότητα της NGS να ανιχνεύει ταυτόχρονα σημειακές μεταλλάξεις (SNVs) και σύνθετες δομικές αλλαγές, όπως οι ελλείψεις (deletions), μικρές εισαγωγές ή διαγραφές (INDELS), καθώς και μεγαλύτερες δομικές μεταβολές, επέτρεψε στους επιστήμονες να προβλέψουν την εξάπλωση των παραλλαγών και να κατανοήσουν τους μηχανισμούς μετάδοσης πριν αυτές γίνουν κυρίαρχες στον πληθυσμό. Η τήρηση αυστηρών πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής και ποιοτικού ελέγχου (QC) διασφαλίζει ότι οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται ταχύτατα ακόμα και

αν είναι αποτέλεσμα σύνθετων δομικών αναδιατάξεων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση μιας νέας παραλλαγής σε λιγότερο από 24 ώρες από τη λήψη του δείγματος (Chiara et al., 2021) καθώς και την άμεση προσαρμογή των εμβολίων και των θεραπευτικών πρωτοκόλλων (Grimaldi et al., 2022).

Η εφαρμογή της τεχνολογίας NGS για την ανίχνευση των παραλλαγών του SARS-CoV-2 βασίζεται σε εξειδικευμένα πρωτόκολλα που επιτρέπουν την υψηλή διακριτική ικανότητα και την ταχύτητα ανάλυσης του γονιδιώματος του SARS-CoV-2. Η κύρια μεθοδολογία που υιοθετήθηκε παγκοσμίως είναι η στοχευμένη αλληλούχιση μέσω αμπλικονίων (Amplicon-based Sequencing). Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιεί προκαθορισμένα πάνελ εκκινητών (όπως το διεθνές πρωτόκολλο ARTIC) που καλύπτουν ολόκληρο το ιικό γονιδίωμα. Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την αποτελεσματική αλληλούχιση ακόμη και όταν ο ιός φέρει πολλαπλές μεταλλάξεις, καθώς οι επικαλυπτόμενοι εκκινητές διασφαλίζουν ότι η απώλεια ενός τμήματος (λόγω μετάλλαξης στη θέση πρόσδεσης) δεν θα οδηγήσει σε πλήρη αποτυχία της ανάλυσης (Charre et al., 2020). Η μελέτη επιπρόσθετα αξιολόγησε τέσσερις NGS προσεγγίσεις για την πλήρη γονιδιωματική αλληλούχιση του SARS-CoV-2, δείχνοντας ότι όλες απέδωσαν αυξημένη κάλυψη σε δείγματα με υψηλό ιικό φορτίο, ενώ οι στοχευμένες μέθοδοι αμπλικονίου εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία σε χαμηλά φορτία. Η ανάλυση αποκάλυψε υψηλή συμφωνία στην αλληλουχία συναίνεσης, με μικρές αποκλίσεις λόγω βιοπληροφορικών παραμέτρων. Τονίζεται η ανάγκη επικύρωσης σε περιοχές με μειωμένη κάλυψη ή πιθανές αναδιατάξεις για ακριβή ανίχνευση μεταλλάξεων (Charre et al., 2020).

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται εξειδικευμένα υπολογιστικά εργαλεία βιοπληροφορικής (Roy et al., 2018). Παράλληλα, η συνεχής επικαιροποίηση των γονιδιωματικών δεδομένων είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση και, εφόσον απαιτείται, την τροποποίηση των εκκινητών που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους RT-PCR για τον SARS-CoV-2 (Forster et al., 2020). Διεθνείς βάσεις δεδομένων, όπως η GISAID, το China National Center for Bioinformatics (CNCB) και η Κινεζική Ακαδημία Επιστημών, έχουν διαθέσει δεκάδες χιλιάδες αλληλουχίες του γονιδιώματος του SARS-CoV-2, ενισχύοντας σημαντικά τις παγκόσμιες προσπάθειες επιτήρησης και ανίχνευσης του ιού (John et al., 2021; Giri et al., 2021).

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς έχει αποδειχθεί καθοριστική για τον SARS-CoV-2, ιδιαίτερα στον εντοπισμό και την παρακολούθηση των παραλλαγών και των «variants of concern» (VOCs), στον έλεγχο της μετάδοσης και της διαφυγής από την ανοσία, καθώς και στην υποστήριξη της επιδημιολογικής επιτήρησης μέσω γονιδιωματικής ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μεγάλη κλίμακα (Grimaldi et al., 2022).

Παρά τις δυνατότητες και τα πολυάριθμα οφέλη που προσφέρει η μέθοδος NGS, είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη ορισμένοι περιορισμοί. Η ανάγκη για επαρκές ιικό φορτίο (χαμηλό Ct) για πλήρη κάλυψη του γονιδιώματος (Goswami et al., 2022) και ο χρόνος που απαιτείται από τη λήψη του δείγματος έως την απόδοση των αποτελεσμάτων είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με την κλασική μέθοδο RT-qPCR εφόσον απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό για τη διαχείριση και ανάλυση του τεράστιου όγκου βιοπληροφορικών δεδομένων (John et al., 2021), γεγονός που καθιστά την εφαρμογή της περιορισμένη σε καταστάσεις που απαιτούν επείγουσα διάγνωση (Dong et al., 2023; John et al., 2021).

Επιπλέον, οι απαιτούμενες υποδομές και το εξειδικευμένο αυτό προσωπικό αυξάνουν το κόστος και περιορίζουν τη διαθεσιμότητα της τεχνικής. Η ταχεία εμφάνιση νέων παραλλαγών καθιστά επίσης απαραίτητη τη συνεχή ενημέρωση των πρωτοκόλλων και των σχετικών βάσεων δεδομένων (Dong et al., 2023). Για την πλήρη ενσωμάτωση της μεθόδου στη διαγνωστική διαδικασία, απαιτείται βελτιστοποίηση και προσαρμογή των πρωτοκόλλων, ώστε να μειωθεί το κόστος και να επιτευχθεί ταχύτερη απόδοση των αποτελεσμάτων.

Εν κατακλείδι, η μέθοδος NGS μπορεί να θεωρηθεί συμπληρωματική της κλασικής RT-qPCR για τη διάγνωση του SARS-CoV-2, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί θεμελιώδη πυλώνα για την επιτήρηση του ιού σε επίπεδο πληθυσμού και για την παρακολούθηση της εξέλιξής του.

5.2.6.1 Αλληλούχιση NGS μέσω σύνθεσης

Οι πλατφόρμες NGS που βασίζονται στην αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis) περιλαμβάνουν κυρίως το σύστημα Illumina (Illumina Genome Analyzer, GA), το οποίο αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνολογία, ενώ άλλες

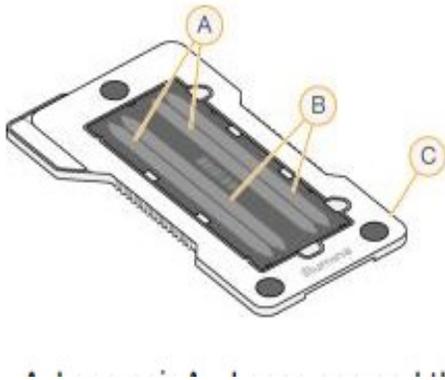
πλατφόρμες, όπως το Ion Torrent, χρησιμοποιούν διαφορετικές αρχές ανίχνευσης (Goodwin et al., 2016). Η Illumina εξαγόρασε τη Solexa το 2007, εταιρεία που είχε παρουσιάσει το Genome Analyzer (GA), ένα από τα πρώτα συστήματα NGS βασισμένα στην τεχνολογία αυτή (Bentley et al., 2008).

Κατά τη μεθοδολογία του αλληλουχητή Illumina, απομονώνεται το DNA και κατασκευάζεται βιβλιοθήκη μέσω κατακερματισμού και προσθήκης προσαρμογέων (adapters) με περιοχές πρόσδεσης P5 και P7, επιτρέποντας την υβριδοποίηση στο flow cell (Head et al., 2014). Τα μονόκλιωνα μόρια προσδένονται στη γυάλινη επιφάνεια του θαλάμου ροής (Εικόνα 17) και υφίστανται ενίσχυση μέσω bridge amplification, σχηματίζοντας clusters περίπου 1.000 αντιγράφων ανά αρχικό μόριο (Bentley et al., 2008; Fedurco et al., 2006). Ο αριθμός των αντιγράφων είναι κρίσιμος, καθώς ανεπαρκής ή υπερβολική ενίσχυση επηρεάζει την ποιότητα της αλληλούχισης (Besser et al., 2017).

Στην πανδημία COVID-19, η τεχνολογία Illumina υπήρξε καθοριστική. Η πρώτη πλήρης γονιδιωματική χαρτογράφηση του SARS-CoV-2 επιτεύχθηκε μέσω πλατφορμών MiSeq, επιτρέποντας την κατανόηση της φυλογενετικής προέλευσης του ιού και της δομής της πρωτεΐνης-ακίδας (Spike) (Lu et al., 2020). Λόγω της υψηλής ακρίβειάς της, η Illumina αναδείχθηκε σε "χρυσό πρότυπο" για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (SNPs) που χαρακτηρίζουν τις Παραλλαγές Ανησυχίας (VOCs). Για την επιτάχυνση της επιτήρησης, αναπτύχθηκαν εξειδικευμένα πρωτόκολλα, όπως αναφέρθηκε ήδη το ARTIC, τα οποία επιτρέπουν την αλληλούχιση ολόκληρου του ιικού γονιδιώματος απευθείας από κλινικά δείγματα με υψηλή ευαισθησία (Paden et al., 2020).

Σε μια μελέτη που κάλυψε την περίοδο από τον Μάρτιο του 2020 έως τον Φεβρουάριο του 2022, καταγράφηκε ότι η επιδημία του SARS-CoV-2 στη βορειοδυτική Ελλάδα εκδηλώθηκε σε τέσσερα κύματα, με σταδιακά αυξανόμενη θετικότητα, ιδιαίτερα σε περιοχές με έντονη τουριστική δραστηριότητα και υψηλή γεωργική πυκνότητα. Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης με χρήση NGS, αναγνωρίστηκαν συνολικά 34 διαφορετικές γραμμές του ιού, με κυρίαρχες τις B.1, B.1.1, B.1.1.7, B.1.617.2 και BA.1. Αν και πολλές γραμμές κυκλοφορούσαν ταυτόχρονα, κάθε κύμα χαρακτηριζόταν από την κυριαρχία μιας συγκεκριμένης γραμμής, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία των νέων εισαγωγών στη δυναμική της επιδημίας. Η εφαρμογή της NGS επέτρεψε την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση των παραλλαγών, προσφέροντας κρίσιμες πληροφορίες για την

παρακολούθηση της διάδοσης του ιού και τη λήψη στοχευμένων μέτρων δημόσιας υγείας (Sakaloglou et al., 2024). Παράλληλα, η εφαρμογή μεταγονιδιωμιακής αλληλούχισης (mNGS) διευκόλυνε την ταχεία ταυτοποίηση του SARS-CoV-2 χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας, ενισχύοντας την άμεση διάγνωση και την παρακολούθηση της διασποράς του ιού στον πληθυσμό (Paden et al., 2020).



A : Ζεύγος γραμμών A – Γραμμή 1 και 3

B : Ζεύγος γραμμών B – Γραμμή 2 και 4

Εικόνα 17. Απεικόνιση του ρευστού θαλάμου (flow cell) της Illumina. https://support-docs.illumina.com/IN/NextSeq_550-500/Content/IN/NextSeq/FlowCell_Overview_fNS.html

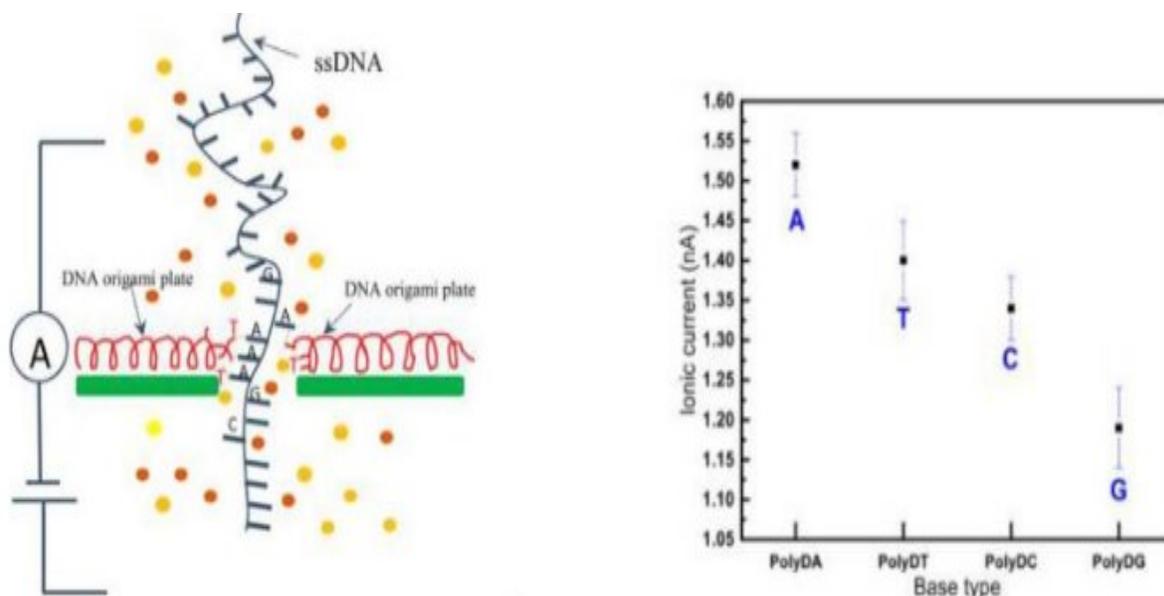
5.2.6.2 Αλληλούχιση με Nanopores

Η αλληλούχιση στόχου με τεχνολογία nanopore (Nanopore Targeted Sequencing, NTS) επιτρέπει την αλληλούχιση «πολύ μεγάλης ανάγνωσης», η οποία απλοποιεί σημαντικά τη διαδικασία συναρμολόγησης και παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς απαιτεί πολύ μικρή ποσότητα δείγματος και χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και ευελιξία. Πρόκειται για τεχνική στην οποία δεν είναι απαραίτητη η ενίσχυση του στόχου ούτε η χημική σήμανση για την ανίχνευση των νουκλεοτιδίων, αν και σε ορισμένες κλινικές εφαρμογές μπορεί να προηγείται ενίσχυση για αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου (Akhtarian et al., 2021).

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι nanopores:

- (α) βιολογικοί νανοπόροι, οι οποίοι σχηματίζονται από πρωτεϊνικά κανάλια που ενσωματώνονται σε τεχνητή λιπιδική διπλοστιβάδα και
- (β) συνθετικοί νανοπόροι στερεάς φάσης, οι οποίοι κατασκευάζονται σε τεχνητές μεμβράνες στερεών υλικών (Akhtarian et al., 2021).

Κατά τη διέλευση του DNA από τον πόρο, μεταβολές στο ηλεκτρικό ρεύμα — που αντιστοιχούν σε k-mers και όχι σε μεμονωμένες βάσεις — καταγράφονται και αναλύονται βιοπληροφορικά για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Συγκεκριμένα, κατά τη διέλευση ενός τμήματος DNA μέσω ενός πρωτεϊνικού πόρου, ένα ένζυμο που συνδέεται με τον πόρο προκαλεί το ξετύλιγμα της διπλής έλικας, επιτρέποντας τη διέλευση της μίας αλυσίδας από το εσωτερικό του πόρου. Η εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού στα άκρα της μεμβράνης οδηγεί στη μετακίνηση ιόντων μέσω του πόρου, ενώ ταυτόχρονα η αλυσίδα DNA παρεμβάλλεται στη ροή των ιόντων, προκαλώντας μεταβολές στο ηλεκτρικό ρεύμα. Οι μεταβολές αυτές δεν αντιστοιχούν αποκλειστικά σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια, αλλά σε μικρές ομάδες διαδοχικών βάσεων (k-mers). Κάθε μία από τις τέσσερις βάσεις του DNA παρουσιάζει διαφορετικό μέγεθος και, κατά συνέπεια, απαιτεί διαφορετική ποσότητα ρεύματος για τη διέλευσή της, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18. Τα χαρακτηριστικά πρότυπα μεταβολών του ρεύματος χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση της αλληλουχίας του DNA σε πραγματικό χρόνο και καταγράφονται για περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση (Akhtarian et al., 2021).



Εικόνα 18. Σχηματική περιγραφή του ιοντικού ρεύματος και θεωρητικός υπολογισμός του ιοντικού ρεύματος, κατά τη διάρκεια μετατόπισης των διαφορετικών βάσεων (Farimani et al., 2017).

Η απευθείας αλληλούχιση μέσω nanopores αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα τεχνολογίας τρίτης γενιάς και έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση πολλαπλών ιικών γονιδιωμάτων σε κλινικά δείγματα, επιτρέποντας ακόμη και την άμεση ανάλυση μορίων RNA χωρίς μετατροπή τους σε cDNA (Cozzuto et al., 2020; Kim et al., 2020).

Η αλληλούχιση στόχου με τεχνολογία nanopore εφαρμόστηκε εκτενώς κατά την πανδημία COVID-19, προσφέροντας ταχεία και υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση του SARS-CoV-2. Σύμφωνα με τον Wang et al., η NTS που στοχεύει πολλαπλές (έως 11) ιικές περιοχές δύναται να ανιχνεύσει ακόμη και 10 ιικά αντίγραφα/mL εντός περίπου μίας ώρας αλληλούχισης, επιτρέποντας ακριβή και ταυτόχρονη ανίχνευση του SARS-CoV-2 και άλλων αναπνευστικών ιών (Wang et al., 2020). Η συμβολή της τεχνολογίας στην επιδημιολογική επιτήρηση αναδείχθηκε σε προοπτική μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο, όπου η ταχεία εφαρμογή αλληλούχισης SARS-CoV-2 επέτρεψε τη μείωση του χρόνου από τη λήψη του δείγματος έως την έκδοση της αναφοράς σε λιγότερο από 24 ώρες, καθιστώντας εφικτή τη γονιδιωματική επιτήρηση σε σχεδόν πραγματικό χρόνο (Meredith et al., 2020).

Πέραν της διάγνωσης και της επιτήρησης, η τεχνολογία nanopore συνέβαλε και στην κατανόηση παθογενετικών μηχανισμών. Μελέτες που βασίστηκαν σε amplicon-based αλληλούχιση ανέδειξαν την παρουσία διαγραφών σε γονιδιακές περιοχές του SARS-CoV-2, όπως τα ORF3a και ORF7a. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μηχανισμούς διαφυγής του ιού από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, ιδιαίτερα μέσω παρεμβολής στη σηματοδότηση της ιντερφερόνης. Οι μεταβολές αυτές ενδέχεται να επηρεάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ ιού και ξενιστή (Moore et al., 2020).

Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές πλατφόρμες αλληλούχισης, οι φορητές nanopore τεχνολογίες χαρακτηρίζονται από χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού, ταχύτερο χρόνο απόκρισης και δυνατότητα εφαρμογής σε συνθήκες επιδημιολογικής πίεσης.

6. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η διάγνωση του SARS-CoV-2 πραγματοποιείται κυρίως σε δείγματα από το αναπνευστικό σύστημα. Τα ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα είναι ιδιαίτερα αξιόπιστα δείγματα και χρησιμοποιούνται κυρίως στην οξεία φάση της λοίμωξης, ενώ δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό, όπως βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή πτύελα, συλλέγονται σε σοβαρά κλινικά περιστατικά. Το δείγμα σιέλου προσφέρει μια πρακτική και ασφαλή εναλλακτική, αν και με αρκετά περιορισμένη απόδοση. Ιδιαίτερη προσοχή στη σωστή συλλογή και στη συντήρηση των δειγμάτων που είναι κρίσιμη για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Η real-time RT-PCR αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για τη διάγνωση της COVID-19, συνδυάζοντας την αντίστροφη μεταγραφή του ιικού RNA σε cDNA με την ενίσχυση στοχευμένων γονιδιακών στόχων σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος παρέχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, επιτρέποντας την ανίχνευση ακόμη και χαμηλών ιικών φορτίων, ενώ η χρήση εσωτερικών και εξωτερικών δεικτών ελέγχου διασφαλίζει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Οι παραλλαγές της, όπως η ψηφιακή PCR (dPCR) και η droplet digital PCR (ddPCR), παρέχουν μεγαλύτερη ακρίβεια και απόλυτη ποσοτικοποίηση του ιού SARS-CoV-2, επιτρέποντας την ανίχνευση ιικού φορτίου σε δείγματα όπου η RT-PCR μπορεί να δώσει αρνητικά ή ασαφή αποτελέσματα, όπως σε πρώιμα στάδια λοίμωξης ή ασυμπτωματικούς φορείς.

Οι μοριακές μέθοδοι CRISPR-Cas και RT-LAMP προσφέρουν ταχεία, αξιόπιστη και οικονομική ανίχνευση σε σύγκριση με την παραδοσιακή RT-PCR. Οι μέθοδοι CRISPR (DETECTR με Cas12 και SHERLOCK με Cas13) που εφαρμόστηκαν στην διερεύνηση περιστατικών COVID-19 βασίζονται σε στοχευμένα ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες RNA ή DNA, επιτρέποντας ανίχνευση χαμηλού ιικού φορτίου εντός 30–60 λεπτών με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία. Η RT-LAMP είναι ισοθερμική μέθοδος ενίσχυσης που πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία, πολλαπλασιάζοντας τον στόχο σε λιγότερο από μία ώρα, και μπορεί να συνδυαστεί με φθορισμό ή χρωματομετρική ανίχνευση. Προηγμένες παραλλαγές που βρήκαν εφαρμογή στον SARS-CoV-2, όπως η Penn-RAMP και Multiplex LAMP, ενισχύουν την ευαισθησία και επιτρέπουν ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων ή σημειακών μεταλλάξεων.

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού μορίων νουκλεϊκού οξέος, μειώνοντας χρόνο και κόστος σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους, όπως η αλληλούχιση Sanger. Η διαδικασία περιλαμβάνει κατακερματισμό DNA/RNA, προετοιμασία βιβλιοθήκης, μαζική παράλληλη αλληλούχιση (short-read ή long-read sequencing) και βιοπληροφορική ανάλυση, που επιτρέπει τον εντοπισμό μεταλλάξεων, μικρών εισαγωγών/διαγραφών (INDELs) και μεγαλύτερων δομικών παραλλαγών.

Στην COVID-19, η NGS χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 και την πλήρη γονιδιωματική του ανάλυση, παρέχοντας δυνατότητα παρακολούθησης της γεωγραφικής και χρονικής διασποράς του, καθώς και της εξέλιξης του ιού και των παραλλαγών ενδιαφέροντος (VOCs). Σε δείγματα με χαμηλό ιικό φορτίο, η NGS πέτυχε 91% ποσοστό επιτυχούς ανάλυσης, υπερβαίνοντας πολλές φορές την ευαισθησία της RT-qPCR. Η μέθοδος συμβάλλει στην ταυτοποίηση σημειακών μεταλλάξεων (SNVs), μικρών εισαγωγών/διαγραφών και μεγάλων δομικών αλλαγών, ενώ η συνεχής ενημέρωση βάσεων δεδομένων όπως των GISAID, CNCB και Nextstrain είναι απαραίτητη για την επικαιροποίηση των πρωτοκόλλων και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Η NGS χρησιμοποιεί διαφορετικές τεχνολογίες ανάλυσης DNA/RNA, με τις κυριότερες να είναι η αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (Illumina) και η απευθείας αλληλούχιση με nanopores. Το Illumina βασίζεται στη διαδικασία bridge amplification, όπου τα δίκλινα μόρια DNA μετατρέπονται σε μονόκλινα και πολλαπλασιάζονται, δημιουργώντας clusters που αλληλουχούνται ταυτόχρονα. Η ποιότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων ανά cluster, ενώ η μέθοδος προσφέρει υψηλή ακρίβεια και δυνατότητα μαζικής ανάλυσης δειγμάτων, με συνέπεια να αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων (SNPs) του SARS-CoV-2 που χαρακτηρίζουν τις Παραλλαγές Ανησυχίας. Η τεχνολογία Nanopore αποτελεί μέθοδο τρίτης γενιάς, επιτρέποντας άμεση ανάλυση DNA ή RNA χωρίς ανάγκη ενίσχυσης ή σήμανσης, βασισμένη στη μέτρηση μεταβολών του ηλεκτρικού ρεύματος κατά τη διέλευση μορίων μέσα από βιολογικούς ή συνθετικούς πόρους. Η μέθοδος παρέχει ευελιξία, ταχύτητα και δυνατότητα παρακολούθησης πολλαπλών ιικών γονιδιωμάτων σε πραγματικό χρόνο, συμπεριλαμβανομένων και μορίων RNA. Η

συστηματική εφαρμογή πρωτοκόλλων, όπως το ARTIC, σε συνδυασμό με πλατφόρμες Illumina και nanopore, επέτρεψε την ταχεία φυλογενετική ανάλυση και την κατανόηση της εξελικτικής δυναμικής του SARS-CoV-2. Παρότι η RT-PCR αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για την πρωτογενή διάγνωση της λοίμωξης, η NGS αποτελεί το χρυσό πρότυπο για τον μοριακό χαρακτηρισμό και την επιδημιολογική επιτήρηση των παραλλαγών του SARS-CoV-2.

Συμπερασματικά, η επιλογή του δείγματος πρέπει να προσαρμόζεται στη φάση της λοίμωξης και στη σοβαρότητα της νόσου, με τα ρινοφαρυγγικά δείγματα να παραμένουν η πιο αξιόπιστη επιλογή, ενώ τα δείγματα του κατώτερου αναπνευστικού και του σιέλου παρέχουν συμπληρωματική πληροφορία σε ειδικές περιπτώσεις. Η RT-PCR παραμένει η βασική μέθοδος διάγνωσης, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ενώ οι τεχνικές dPCR και ddPCR ενισχύουν την ακρίβεια και την ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου. Οι μέθοδοι CRISPR-Cas και RT-LAMP αποτελούν ταχεία και οικονομική εναλλακτική, υποστηρίζοντας πρώιμη ανίχνευση και διαχείριση της νόσου. Η NGS παρέχει πλήρη γονιδιωματική ανάλυση, δυνατότητα παρακολούθησης μεταλλάξεων και παραλλαγών, και λειτουργεί συμπληρωματικά στην RT-qPCR για διαγνωστική υποστήριξη, επιδημιολογική επιτήρηση και παρακολούθηση νέων παραλλαγών σε μεγάλη κλίμακα.

Η παρούσα εργασία καταλήγει σε τέσσερα βασικά συμπεράσματα σχετικά με τις μοριακές διαγνωστικές μεθόδους κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19:

1. Η Ιεραρχία των Διαγνωστικών Μεθόδων

Η RT-qPCR καθιερώθηκε ως ο «χρυσός κανόνας» λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητάς της, παρά τους περιορισμούς της σε δείγματα με χαμηλό ιικό φορτίο. Ωστόσο, η αποτελεσματικότερη διαχείριση της πανδημίας απαιτούσε τη συμπληρωματική χρήση προηγμένων τεχνικών.

2. Ακριβής Ποσοτικοποίηση και Ευαισθησία

Η Ψηφιακή PCR (ddPCR) επέδειξε σημαντικά ανώτερη ευαισθησία και παρείχε απόλυτη ποσοτικοποίηση του SARS-CoV-2 RNA, καθιστώντας την ιδανική για την ανίχνευση του ιού σε αρχικά ή μετέπειτα στάδια της λοίμωξης. Παράλληλα, μέθοδοι όπως η CRISPR και η RT-LAMP προσέφεραν λύσεις για ταχεία διάγνωση (POC), αν και με πιθανώς χαμηλότερη συνολική ευαισθησία σε σχέση με την RT-qPCR.

3. Μοριακή Εξέλιξη ως Κεντρική Πρόκληση

Οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη Spike (S), κυρίως στην περιοχή RBD, ήταν ο κύριος παράγοντας της εξέλιξης του ιού. Οι μεταλλάξεις αυτές ενίσχυσαν τη συγγένεια δέσμευσης με τον υποδοχέα ACE2 και προκάλεσαν ανοσολογική διαφυγή, οδηγώντας στην εμφάνιση των VOCs (Alpha, Delta, Omicron) με αυξημένη μεταδοτικότητα.

4. Η Επιτακτική Ανάγκη για Γονιδιωματική Επιτήρηση

Η Αλληλούχηση Επόμενης Γενιάς (NGS) κρίνεται απαραίτητη για την κατανόηση της εξελικτικής δυναμικής του ιού. Η τεχνολογία NGS είναι η μόνη που επιτρέπει την έγκαιρη και πλήρη ταυτοποίηση νέων παραλλαγών, καθοδηγώντας τη δημόσια υγεία και την προσαρμογή των διαγνωστικών στόχων.

7. Περίληψη

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε με σκοπό τη συστηματική ανασκόπηση των μοριακών διαγνωστικών τεχνικών που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια της πανδημίας της νόσου COVID-19, η οποία προκλήθηκε από τον ιό SARS-CoV-2. Η μελέτη εστιάζει στην ανάλυση της δομής, του γονιδιώματος και της παθογένειας του ιού, με έμφαση στις κρίσιμες μεταλλάξεις της πρωτεΐνης ακίδας (Spike, S) που οδήγησαν στην εμφάνιση των Variants of Concern (VOCs) (όπως Alpha, Delta και Omicron).

Η μεθοδολογία βασίστηκε σε εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση των επιστημονικών δεδομένων και των κλινικών πρωτοκόλλων. Αναλύθηκαν κριτικά οι κυριότερες διαγνωστικές πλατφόρμες, συμπεριλαμβανομένης της PCR αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), η οποία αναδείχθηκε ως η μέθοδος αναφοράς λόγω της υψηλής της ευαισθησίας και ειδικότητας. Παράλληλα, εξετάστηκαν εξελιγμένες μοριακές τεχνικές όπως η ψηφιακή PCR (ddPCR), η οποία προσφέρει απόλυτη ποσοτικοποίηση και ανίχνευση χαμηλών ιικών φορτίων, η ισοθερμική ενίσχυση (RT-LAMP), για ταχεία διάγνωση σε σταθερή θερμοκρασία, και οι καινοτόμες μέθοδοι βασισμένες στο σύστημα CRISPR.

Η εργασία υπογραμμίζει την καθοριστική συμβολή της Αλληλούχισης Επόμενης Γενιάς (NGS) στην πλήρη γονιδιωματική ανάλυση, την ταυτοποίηση νέων παραλλαγών και την επιδημιολογική επιτήρηση σε μεγάλη κλίμακα, παρά τον υψηλότερο χρόνο και κόστος της.

Συμπερασματικά, η διαχείριση της πανδημίας βασίστηκε σε μια πολυδιάστατη διαγνωστική στρατηγική. Η ενσωμάτωση της RT-PCR με τις προηγμένες μοριακές τεχνικές (όπως NGS και ddPCR) είναι κρίσιμη για την κατανόηση της εξελικτικής δυναμικής του ιού και τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας έναντι μελλοντικών αναδυόμενων παθογόνων.

8. Abstract

This postgraduate thesis provides a systematic review of the molecular diagnostic techniques implemented during the COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus. The study examines the structural components, genomic organization, and pathogenicity of the virus, focusing on critical mutations in the Spike (S) protein that led to the emergence of Variants of Concern (VOCs), such as Alpha, Delta, and Omicron. Through an extensive literature review of scientific data and clinical protocols, the research critically evaluates primary diagnostic platforms and the necessity of specialized sampling depending on the stage of infection.

The analysis identifies real-time RT-PCR as the diagnostic gold standard due to its high sensitivity and specificity. However, the study demonstrates that for samples with low viral loads or the need for absolute quantification, droplet digital PCR (ddPCR) provides superior precision. Furthermore, rapid point-of-care solutions, such as RT-LAMP and CRISPR-based assays like DETECTR and SHERLOCK, are evaluated as cost-effective and time-efficient alternatives that support early detection and disease management.

A significant finding of this work is the indispensable role of Next-Generation Sequencing (NGS) in full genomic characterization. NGS platforms, including Illumina and Oxford Nanopore, achieved a 91% success rate in characterizing samples with low viral concentrations ($C_t \geq 32$), where traditional methods often prove insufficient. This technology is highlighted as the only method capable of timely and complete identification of new variants, guiding public health responses and the adaptation of diagnostic targets.

Ultimately, the management of the pandemic relied on a multi-dimensional strategy where the integration of RT-qPCR with advanced molecular techniques like NGS and ddPCR proved crucial. Such an integrated diagnostic approach is essential for understanding viral evolutionary dynamics, identifying emerging mutations, and ensuring global public health preparedness against future emerging pathogens.

9. Βιβλιογραφία

- Afzal, A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res*, 26, 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002>
- Agarwal, A., & Steed, A. L. (2024). Advances in Understanding the Envelope Protein in Coronavirus Infection. *J Immunological. Sci*, 8, 1-7.
- Akhtarian, S., Miri, S., Doostmohammadi, A., Brar, S. K., & Rezai, P. (2021). Nanopore sensors for viral particle quantification: current progress and future prospects. *Bioengineered*, 12(2), 9189-9215. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1995991>
- Akkiz, H. (2022). The Biological Functions and Clinical Significance of SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Med (Lausanne)*, 9, 849217. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.849217>
- Al-Shanti, N., Saini, A., & Stewart, C. E. (2009). Two-Step versus One-Step RNA-to-CT 2-Step and One-Step RNA-to-CT 1-Step: validity, sensitivity, and efficiency. *J Biomol Tech*, 20(3), 172-179. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568456>
- Aleem, A., Ab, A. S., & Slenker, A. K. (2021). Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19).
- Amrane, S., Tissot-Dupont, H., Doudier, B., Eldin, C., Hocquart, M., Mailhe, M., Dudouet, P., Ormières, E., Ailhaud, L., & Parola, P. (2020). Rapid viral diagnosis and ambulatory management of suspected COVID-19 cases presenting at the infectious diseases referral hospital in Marseille, France,-January 31st to March 1st, 2020: A respiratory virus snapshot. *Travel medicine and infectious disease*, 36, 101632.
- Artika, I. M., Wiyatno, A., & Ma'roef, C. N. (2020). Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect Genet Evol*, 81, 104215. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104215>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5(2), 209-219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Baek, Y. H., Um, J., Antigua, K. J. C., Park, J.-H., Kim, Y., Oh, S., Kim, Y.-i., Choi, W.-S., Kim, S. G., & Jeong, J. H. (2020). Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 998-1007.
- Besser, John et al. (2017). Next-Generation Sequencing Technologies and their Application to the Study and Control of Bacterial Infections. 24(4).
- Bozidis, P., Petridi, E., & Gartzonika, K. (2023). An ARMS-multiplex PCR targeting SARS-CoV-2 Omicron sub-variants. *Pathogens*, 12(8), 1017. <https://doi.org/10.3390/pathogens12081017>

- Goswami, C., Sheldon, M., Bixby, C., Keddache, M., Bogdanowicz, A., Wang, Y., Schultz, J., McDevitt, J., LaPorta, J., & Kwon, E. (2022). Identification of SARS-CoV-2 variants using viral sequencing for the Centers for Disease Control and Prevention genomic surveillance program. *BMC infectious diseases*, 22(1), 404.
- Dong, T., Wang, M., Liu, J., Ma, P., Pang, S., Liu, W., & Liu, A. (2023). Diagnostics and analysis of SARS-CoV-2: current status, recent advances, challenges and perspectives. *Chemical Science*, 14(23), 6149-6206.
- Ilié, M., Benzaquen, J., Hofman, V., Long-Mira, E., Lassalle, S., Boutros, J., Bontoux, C., Lespinet-Fabre, V., Bordone, O., & Tanga, V. (2023). Accurate Detection of SARS-CoV-2 by Next-Generation Sequencing in Low Viral Load Specimens. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3478.
- Bentley, D. R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H. P., Smith, G. P., Milton, J., Brown, C. G., Hall, K. P., Evers, D. J., Barnes, C. L., & Bignell, H. R. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53-59.
- Boehm, E., Kronig, I., Neher, R. A., Eckerle, I., Vetter, P., & Kaiser, L. (2021). Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1109-1117.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res*, 186, 20-31. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007>
- Brierley, I. (1995). Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol*, 76 (Pt 8)(8), 1885-1892. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-1885>
- 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., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*, 38(7), 870-874. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
- Candido, K. L., Eich, C. R., de Farina, L. O., Kadowaki, M. K., da Conceicao Silva, J. L., Maller, A., & Simao, R. C. G. (2022). Spike protein of SARS-CoV-2 variants: a brief review and practical implications. *Braz J Microbiol*, 53(3), 1133-1157. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00743-z>
- Cao, Y., Wang, Y., Huang, D., & Tan, Y.-J. (2025). The Role of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein in Host Inflammation. *Viruses*, 17(8), 1046.
- Capobianchi, M. R., Rueca, M., Messina, F., Giombini, E., Carletti, F., Colavita, F., Castilletti, C., Lalle, E., Bordi, L., Vairo, F., Nicastri, E., Ippolito, G., Gruber, C. E. M., & Bartolini, B. (2020). Molecular characterization of SARS-CoV-2 from the first case of COVID-19 in Italy. *Clin Microbiol Infect*, 26(7), 954-956. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.025>
- Chiara, M., D'Erchia, A. M., Gissi, C., Manzari, C., Parisi, A., Resta, N., Zambelli, F., Picardi, E., Pavesi, G., & Horner, D. S. (2021). Next generation sequencing of SARS-CoV-2

- genomes: challenges, applications and opportunities. *Briefings in Bioinformatics*, 22(2), 616-630.
- Carter, L. J., Garner, L. V., Smoot, J. W., Li, Y., Zhou, Q., Saveson, C. J., *et al.* (2020). Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Central Science*, 6(5), 591–605. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00501>
- Cascella, M., Rajnik, M., Aleem, A., Dulebohn, S. C., & Di Napoli, R. (2024). Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19).
- Chan, J. F., Yip, C. C., To, K. K., Tang, T. H., Wong, S. C., Leung, K. H., Fung, A. Y., Ng, A. C., Zou, Z., Tsoi, H. W., Choi, G. K., Tam, A. R., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, O. T., & Yuen, K. Y. (2020). Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*, 58(5), 10.1128/jcm. 00310-00320. <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20>
- Charre C, Ginevra C, Sabatier M, Regue H, Destras G, Brun S, *et al.* Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evol* 6: veaa075. 2020.
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Dhar, M. S., Marwal, R., Vs, R., Ponnusamy, K., Jolly, B., Bhoyar, R. C., Sardana, V., Naushin, S., Rophina, M., & Mellan, T. A. (2021). Genomic characterization and epidemiology of an emerging SARS-CoV-2 variant in Delhi, India. *science*, 374(6570), 995-999.
- Grimaldi, A., Panariello, F., Annunziata, P., Giuliano, T., Daniele, M., Pierri, B., Colantuono, C., Salvi, M., Bouché, V., & Manfredi, A. (2022). Improved SARS-CoV-2 sequencing surveillance allows the identification of new variants and signatures in infected patients. *Genome Medicine*, 14(1), 90.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418-423.
- Chertow, D. S. (2018). Next-generation diagnostics with CRISPR. *science*, 360(6387), 381-382. <https://doi.org/10.1126/science.aat4982>
- Chiu, C. (2018). Cutting-Edge Infectious Disease Diagnostics with CRISPR. *Cell Host Microbe*, 23(6), 702-704. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.016>
- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem*, 66(4), 549-555. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029>

- Chung, H. Y., Jian, M. J., Chang, C. K., Lin, J. C., Yeh, K. M., Chen, C. W., Hsieh, S. S., Hung, K. S., Tang, S. H., Perng, C. L., Chang, F. Y., Wang, C. H., & Shang, H. S. (2022). Emergency SARS-CoV-2 Variants of Concern: Novel Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Rapid Detection and Surveillance. *Microbiol Spectr*, *10*(1), e0251321. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02513-21>
- Cleri, D. J., Ricketti, A. J., & Vernaleo, J. R. (2010). Severe acute respiratory syndrome (SARS). *Infect Dis Clin North Am*, *24*(1), 175-202. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.005>
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., 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. P., & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, *25*(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
- Cozzuto, L., Liu, H., Pryszcz, L. P., Pulido, T. H., Delgado-Tejedor, A., Ponomarenko, J., & Novoa, E. M. (2020). MasterOfPores: A Workflow for the Analysis of Oxford Nanopore Direct RNA Sequencing Datasets. *Front Genet*, *11*, 211. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00211>
- Dhama, K., Nainu, F., Frediansyah, A., Yatoo, M. I., Mohapatra, R. K., Chakraborty, S., Zhou, H., Islam, M. R., Mamada, S. S., Kusuma, H. I., Rabaan, A. A., Alhumaid, S., Mutair, A. A., Iqhrammullah, M., Al-Tawfiq, J. A., Mohaini, M. A., Alsalman, A. J., Tuli, H. S., Chakraborty, C., & Harapan, H. (2023). Global emerging Omicron variant of SARS-CoV-2: Impacts, challenges and strategies. *J Infect Public Health*, *16*(1), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2022.11.024>
- Dhamad, A. E., & Abdal Rhida, M. A. (2020). COVID-19: molecular and serological detection methods. *PeerJ*, *8*, e10180. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>
- Dolan, K. A., Dutta, M., Kern, D. M., Kotecha, A., Voth, G. A., & Brohawn, S. G. (2022). Structure of SARS-CoV-2 M protein in lipid nanodiscs. *Elife*, *11*, e81702.
- Dong, L., Zhou, J., Niu, C., Wang, Q., Pan, Y., Sheng, S., Wang, X., Zhang, Y., Yang, J., & Liu, M. (2021). Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta*, *224*, 121726.
- Drosten, C., Gottig, S., Schilling, S., Asper, M., Panning, M., Schmitz, H., & Gunther, S. (2002). Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, *40*(7), 2323-2330. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2323-2330.2002>
- Eaker, S., Johnson, M., Jenkins, J., Bauer, M., & Little, S. (2005). Detection of CFTR mutations using ARMS and low-density microarrays. *Biosens Bioelectron*, *21*(6), 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.10.033>
- Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., et al. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, *372*(6544), 815-821. <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>

- Farimani, A. B., Dibaeinia, P., & Aluru, N. R. (2017). DNA Origami–Graphene Hybrid Nanopore for DNA Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 92–100. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b11001>
- Feng, W., Newbigging, A. M., Le, C., Pang, B., Peng, H., Cao, Y., Wu, J., Abbas, G., Song, J., & Wang, D.-B. (2020). Molecular diagnosis of COVID-19: challenges and research needs. *Analytical chemistry*, 92(15), 10196-10209.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*, 34(3), e22-e22. <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>
- Foo, P. C., Chan, Y. Y., Mohamed, M., Wong, W. K., Nurul Najian, A. B., & Lim, B. H. (2017). Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. *Anal Chim Acta*, 966, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.019>
- Forster, P., Forster, L., Renfrew, C., & Forster, M. (2020). Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9241-9243.
- Gallas-Lindemann, C., Sureshkumar, P., Noack, M. J., & Sotiriadou, I. (2017). Loop-mediated isothermal amplification: an advanced method for the detection of *Giardia*. *Current Topics in Giardiasis. London, United Kingdom: IntechOpen*, 109-133.
- Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2021;70:95–99. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2>.
- Giri, B., Pandey, S., Shrestha, R., Pokharel, K., Ligler, F. S., & Neupane, B. B. (2021). Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. *Anal Bioanal Chem*, 413(1), 35-48. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02889-x>
- Gladkikh, A., Klyuchnikova, E., Pavlova, P., Sbarzaglia, V., Tsyganova, N., Popova, M., Arbuzova, T., Sharova, A., Ramsay, E., & Samoilov, A. (2023). Comparative analysis of library preparation approaches for SARS CoV 2 genome sequencing on the Illumina MiSeq platform. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2374. <https://doi.org/10.3390/ijms24032374>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews genetics*, 17(6), 333-351.
- Guler, G., Ozdemir, H., Omar, D., & Akdogan, G. (2021). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Biophysical and biochemical aspects of SARS-CoV-2 and general characteristics. *Prog Biophys Mol Biol*, 164, 3-18. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.05.007>
- Harper, H., Burridge, A., Winfield, M., Finn, A., Davidson, A., Matthews, D., Hutchings, S., Vipond, B., Jain, N., & Consortium, C.-G. U. (2021). Detecting SARS-CoV-2 variants with SNP genotyping. *PloS one*, 16(2), e0243185.

- Hatch, A. C., Fisher, J. S., Tovar, A. R., Hsieh, A. T., Lin, R., Pentoney, S. L., Yang, D. L., & Lee, A. P. (2011). 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR. *Lab on a Chip*, 11(22), 3838-3845.
- Hazen, G. G. (1974). Proteinases: Method for Automatic Analysers. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 1000-1005). Elsevier.
- He, R., Leeson, A., Ballantine, M., Andonov, A., Baker, L., Dobie, F., Li, Y., Bastien, N., Feldmann, H., & Strocher, U. (2004). Characterization of protein–protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus. *Virus research*, 105(2), 121-125.
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *BioTechniques*, 56(2), 61–passim. <https://doi.org/10.2144/000114133>
- Hess, J. F., Kohl, T. A., Kotrova, M., Ronsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Bruggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S., & Paust, N. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnol Adv*, 41, 107537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16), 7276-7280. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol*, 19(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., Gao, H., Guo, L., Xie, J., Wang, G., Jiang, R., Gao, Z., Jin, Q., Wang, J., & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Islam, K. U., & Iqbal, J. (2020). An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 560616. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.560616>
- Islam, M. T., Alam, A. R. U., Sakib, N., Hasan, M. S., Chakrovarty, T., Tawyabur, M., Islam, O. K., Al-Emran, H. M., Jahid, M. I. K., & Anwar Hossain, M. (2021). A rapid and cost-effective multiplex ARMS-PCR method for the simultaneous genotyping of the circulating SARS-CoV-2 phylogenetic clades. *Journal of medical virology*, 93(5), 2962-2970.
- Ito, N., Mossel, E. C., Narayanan, K., Popov, V. L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C. J., & Makino, S. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *Journal of virology*, 79(5), 3182-3186.
- Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2021). SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with

- associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem*, 413(1), 49-71.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>
- Jiang, S., Hillyer, C., & Du, L. (2020). Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends in immunology*, 41(5), 355-359.
- John, G., Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Ananth, S., Williams, C., Chaubey, A., Rojiani, A. M., & Kolhe, R. (2021). Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A tool for SARS-CoV-2 diagnosis, monitoring new strains and phylodynamic modeling in molecular epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 845–867.
<https://doi.org/10.3390/cimb43020061>
- Kandeel, M., Mohamed, M. E. M., Abd El-Lateef, H. M., Venugopala, K. N., & El-Beltagi, H. S. (2022). Omicron variant genome evolution and phylogenetics. *J Med Virol*, 94(4), 1627-1632. <https://doi.org/10.1002/jmv.27515>
- Kashir, J., & Yaqinuddin, A. (2020). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical hypotheses*, 141, 109786.
- Khan, P., Aufdembrink, L. M. & Engelhart, A. E (2020). Isothermal SARS-CoV-2 Diagnostics: Tools for Enabling Distributed Pandemic Testing as a Means of Supporting Safe Reopenings. *ACS Synth. Biol.* 9, 2861–2880.
<https://dx.doi.org/10.1021/acssynbio.0c00359>
- Khater, F. J., & Moorman, J. P. (2003). Severe acute respiratory syndrome: an overview. *South Med J*, 96(9), 907-910; quiz 911. <https://doi.org/10.1097/01.SMJ.0000087846.37700.D3>
- Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921 e910.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>
- Kinloch, N. N., Ritchie, G., Brumme, C. J., Dong, W., Dong, W., Lawson, T., Jones, R. B., Montaner, J. S., Leung, V., & Romney, M. G. (2021). Corrigendum to: Suboptimal biological sampling as a probable cause of false-negative covid-19 diagnostic test results. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(1), 184-184.
- Kojabad, A. A., Farzanehpour, M., Galeh, H. E. G., Dorostkar, R., Jafarpour, A., Bolandian, M., & Nodooshan, M. M. (2021). Droplet digital PCR of viral DNA/RNA, current progress, challenges, and future perspectives. *J Med Virol*, 93(7), 4182-4197.
<https://doi.org/10.1002/jmv.26846>
- Kubina, R., & Dziedzic, A. (2020). Molecular and Serological Tests for COVID-19 a Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics. *Diagnostics (Basel)*, 10(6), 434. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060434>
- Lee, J. S., Goldstein, J. M., Moon, J. L., Herzegh, O., Bagarozzi, D. A., Jr., Oberste, M. S., Hughes, H., Bedi, K., Gerard, D., Cameron, B., Benton, C., Chida, A., Ahmad, A., Petway, D. J., Jr., Tang, X., Sulaiman, N., Teklu, D., Batra, D., Howard, D., Sheth, M., Kuhnert, W., Bialek, S. R., Hutson, C. L., Pohl, J., & Carroll, D. S. (2021). Analysis of the initial lot of the CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. *PloS one*, 16(12), e0260487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260487>

- Levy, S. E., & Myers, R. M. (2016). Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 17(1), 95-115. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>
- Li, J., Huang, D. Q., Zou, B., Yang, H., Hui, W. Z., Rui, F., Yee, N. T. S., Liu, C., Nerurkar, S. N., Kai, J. C. Y., Teng, M. L. P., Li, X., Zeng, H., Borghi, J. A., Henry, L., Cheung, R., & Nguyen, M. H. (2021). Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J Med Virol*, 93(3), 1449-1458. <https://doi.org/10.1002/jmv.26424>
- Li, Q., Nie, J., Wu, J., Zhang, L., Ding, R., Wang, H., Zhang, Y., Li, T., Liu, S., & Zhang, M. (2021). SARS-CoV-2 501Y. V2 variants lack higher infectivity but do have immune escape. *Cell*, 184(9), 2362-2371. e2369
- Li, Y., Li, S., Wang, J., & Liu, G. (2019). CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends Biotechnol*, 37(7), 730-743. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.005>
- Li, Y. D., Chi, W. Y., Su, J. H., Ferrall, L., Hung, C. F., & Wu, T. C. (2020). Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. *J Biomed Sci*, 27(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00695-2>
- Lian, J., Jin, X., Hao, S., Jia, H., Cai, H., Zhang, X., Hu, J., Zheng, L., Wang, X., Zhang, S., Ye, C., Jin, C., Yu, G., Gu, J., Lu, Y., Yu, X., Xiang, D., Li, L., Liang, T., Sheng, J., & Yang, Y. (2020). Epidemiological, clinical, and virological characteristics of 465 hospitalized cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from Zhejiang province in China. *Influenza Other Respir Viruses*, 14(5), 564-574. <https://doi.org/10.1111/irv.12758>
- Lieberman, J. A., Pepper, G., Naccache, S. N., Huang, M. L., Jerome, K. R., & Greninger, A. L. (2020). Comparison of Commercially Available and Laboratory-Developed Assays for In Vitro Detection of SARS-CoV-2 in Clinical Laboratories. *J Clin Microbiol*, 58(8), 10.1128/jcm.00821-00820. <https://doi.org/10.1128/JCM.00821-20>
- Lin, J., Su, G., Su, W., & Zhou, C. (2017). [Progress in digital PCR technology and application]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 33(2), 170-177. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.160269>
- Little, S. (1995). Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Current protocols in human genetics*, 7(1), 9.8. 1-9.8. 12.
- Liu, C., Shi, Q., Peng, M., Lu, R., Li, H., Cai, Y., Chen, J., Xu, J., & Shen, B. (2020). Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 Virus in discharged COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*, 12(21), 20997-21003. <https://doi.org/10.18632/aging.104020>
- Liu, R., Han, H., Liu, F., Lv, Z., Wu, K., Liu, Y., Feng, Y., & Zhu, C. (2020). Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta*, 505, 172-175. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.03.009>

- Loeffelholz, M. J., Alland, D., Butler-Wu, S. M., Pandey, U., Perno, C. F., Nava, A., Carroll, K. C., Mostafa, H., Davies, E., McEwan, A., Rakeman, J. L., Fowler, R. C., Pawlotsky, J. M., Fourati, S., Banik, S., Banada, P. P., Swaminathan, S., Chakravorty, S., Kwiatkowski, R. W., Chu, V. C., Kop, J., Gaur, R., Sin, M. L. Y., Nguyen, D., Singh, S., Zhang, N., & Persing, D. H. (2020). Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 Test. *J Clin Microbiol*, *58*(8), 10.1128/jcm.00926-00920. <https://doi.org/10.1128/JCM.00926-20>
- Lopez Bernal, J., Andrews, N., Gower, C., Gallagher, E., Simmons, R., Thelwall, S., Stowe, J., Tessier, E., Groves, N., & Dabrera, G. (2021). Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant. *New England Journal of Medicine*, *385*(7), 585-594.
- Ludwig, S., & Zarbock, A. (2020). Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg*, *131*(1), 93-96. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004845>
- Mahony, J., Chong, S., Bulir, D., Ruyter, A., Mwawasi, K., & Waltho, D. (2013). Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *Journal of clinical virology*, *58*(1), 127-131.
- Malik, Y. S., Verma, A. K., Kumar, N., Touil, N., Karthik, K., Tiwari, R., Bora, D. P., Dhama, K., Ghosh, S., Hemida, M. G., Abdel-Moneim, A. S., Banyai, K., Vlasova, A. N., Kobayashi, N., & Singh, R. K. (2019). Advances in Diagnostic Approaches for Viral Etiologies of Diarrhea: From the Lab to the Field. *Front Microbiol*, *10*, 1957. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01957>
- Meredith, L. W., Hamilton, W. L., Warne, B., Houldcroft, C. J., Hosmillo, M., Jahun, A. S., ... Goodfellow, I. (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), 1263–1272. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30562-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30562-4)
- Mlcochova, P., Kemp, S. A., Dhar, M. S., Papa, G., Meng, B., Ferreira, I. A., Datir, R., Collier, D. A., Albecka, A., & Singh, S. (2021). SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*, *599*(7883), 114-119.
- Minigulov, N., Boranbayev, K., Bekbossynova, A., Gadilgerayeva, B., & Filchakova, O. (2024). Structural proteins of human coronaviruses: what makes them different? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *14*, 1458383.
- Mohd, H. A., Al-Tawfiq, J. A., & Memish, Z. A. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology*, *13*, 87. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>
- Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H., & Notomi, T. (2012). Novel Molecular Diagnostic Platform for Tropical Infectious Diseases. *Current Topics in Tropical Medicine*, 445.
- Moore, S. C., Penrice-Randal, R., Alruwaili, M., Dong, X., Pullan, S. T., Carter, D. P., ... Hiscox, J. A. (2020). Amplicon-based detection and sequencing of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19 and identification of deletions in the

- viral genome that encode proteins involved in interferon antagonism. *Viruses*, 12(10), 1164. <https://doi.org/10.3390/v12101164>
- Morley, A. A. (2014). Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*, 1(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.06.001>
- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*, 16(3), 223-229. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Nao, N., Shirato, K., Katano, H., Matsuyama, S., & Takeda, M. (2020). Detection of second case of 2019-nCoV infection in Japan. *Problem Set 2*, 23, 1-9.
- Natarajan, A., Shetty, A., Delanerolle, G., Zeng, Y., Zhang, Y., Raymont, V., Rathod, S., Halabi, S., Elliot, K., & Shi, J. Q. (2023). A systematic review and meta-analysis of long COVID symptoms. *Systematic reviews*, 12(1), 88.
- Natoli, M., Kundrod, K., Chang, M., Smith, C., Paul, S., Eldin, K., Patel, K., Baker, E., Schmeler, K., & Richards-Kortum, R. (2021). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for point-of-care detection of SARS-CoV-2: A clinical study to evaluate agreement with RT-qPCR. *The Lancet Global Health*, 9, S3.
- Newton, C. R., Heptinstall, L. E., Summers, C., Super, M., Schwarz, M., Anwar, R., Graham, A., Smith, J. C., & Markham, A. F. (1989). Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet*, 2(8678-8679), 1481-1483. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92931-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92931-0)
- Nicola, M., Alsafi, Z., Sohrabi, C., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., Agha, M., & Agha, R. (2020). *The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review*. **International Journal of Surgery**, 78, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2020.04.018>
- Niu, P., Lu, R., Zhao, L., Wang, H., Huang, B., Ye, F., Wang, W., & Tan, W. (2020). Three Novel Real-Time RT-PCR Assays for Detection of COVID-19 Virus. *China CDC Wkly*, 2(25), 453-457. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.116>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- O'Connell, M. R. (2019). Molecular Mechanisms of RNA Targeting by Cas13-containing Type VI CRISPR-Cas Systems. *J Mol Biol*, 431(1), 66-87. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.029>
- Ortiz-Prado, E., Simbana-Rivera, K., Gomez-Barreno, L., Rubio-Neira, M., Guaman, L. P., Kyriakidis, N. C., Muslin, C., Jaramillo, A. M. G., Barba-Ostria, C., Cevallos-Robalino, D., Sanches-SanMiguel, H., Unigarro, L., Zalakeviciute, R., Gadian, N., & Lopez-Cortes, A. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 98(1), 115094. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094>

- Paden, C. R., Tao, Y., Queen, K., Zhang, J., Li, Y., Uehara, A., & Tong, S. (2020). Rapid, sensitive, full-genome sequencing of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*, 26(10), 2401.
- Pal, M., Kerorsa, G. B., & Kandi, V. (2020). A knowledge update on SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 and its global public health implications. *American Journal of Clinical Medicine Research*, 8(1), 23-27.
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F., & Morita, K. (2004). Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*, 42(1), 257-263. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.257-263.2004>
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*, 18(6), 407-421. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>
- Poljak, M., Korva, M., Knap Gasper, N., Fujs Komlos, K., Sagadin, M., Ursic, T., Avsic Zupanc, T., & Petrovec, M. (2020). Clinical Evaluation of the cobas SARS-CoV-2 Test and a Diagnostic Platform Switch during 48 Hours in the Midst of the COVID-19 Pandemic. *J Clin Microbiol*, 58(6), 10.1128/jcm.00599-00520. <https://doi.org/10.1128/JCM.00599-20>
- Pomari, E., Piubelli, C., Perandin, F., & Bisoffi, Z. (2019). Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Infect*, 25(12), 1510-1516. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.009>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*, 16(1), 4-10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Rahmani, S., & Rezaei, N. (2022). Omicron (B.1.1.529) variant: Development, dissemination, and dominance. *J Med Virol*, 94(5), 1787-1788. <https://doi.org/10.1002/jmv.27563>
- Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., Du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature microbiology*, 5(11), 1403-1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Ramdas, K., Darzi, A., & Jain, S. (2020). 'Test, re-test, re-test': using inaccurate tests to greatly increase the accuracy of COVID-19 testing. *Nat Med*, 26(6), 810-811. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0891-7>
- Ren, S. Y., Wang, W. B., Gao, R. D., & Zhou, A. M. (2022). Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. *World J Clin Cases*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v10.i1.1>
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D.,

- Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., & Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *science*, 300(5624), 1394-1399. <https://doi.org/10.1126/science.1085952>
- Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*, 109, 102433. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>
- Roy, S., Coldren, C., Karunamurthy, A., Kip, N. S., Klee, E. W., Lincoln, S. E., Leon, A., Pullambhatla, M., Temple-Smolkin, R. L., Voelkerding, K. V., Wang, C., & Carter, A. B. (2018). Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn*, 20(1), 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>
- Sahebnasagh, A., Avan, R., Saghafi, F., Mojtahedzadeh, M., Sadremomtaz, A., Arasteh, O., Tanzifi, A., Faramarzi, F., Negarandeh, R., Safdari, M., Khataminia, M., Rezai Ghaleho, H., Habtemariam, S., & Khoshi, A. (2020). Pharmacological treatments of COVID-19. *Pharmacol Rep*, 72(6), 1446-1478. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00152-9>
- Sahoo, P. R., Sethy, K., Mohapatra, S., & Panda, D. (2016). Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*, 9(5), 465-469. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>
- Sakaloglou, P., Bozidis, P., Kourou, K., Kostoulas, C., Gouni, A., Tsaousi, E., Koumpouli, D., Argyropoulou, S., Oikonomidis, P., Peponi, H., Sarantaenas, I., Christaki, E., Georgiou, I., & Gartzonika, K. (2024). Genomic and epidemiological surveillance of SARS-CoV-2 epidemic in northwestern Greece. *Acta Microbiologica Hellenica*, 69(4), 285–294. <https://doi.org/10.3390/amh6904002>
- Salajegheh Tazerji, S., Magalhaes Duarte, P., Rahimi, P., Shahabinejad, F., Dhakal, S., Singh Malik, Y., Shehata, A. A., Lama, J., Klein, J., Safdar, M., Rahman, M. T., Filipiak, K. J., Rodriguez-Morales, A. J., Sobur, M. A., Kabir, F., Vazir, B., Mboera, L., Caporale, M., Islam, M. S., Amuasi, J. H., Gharieb, R., Roncada, P., Musaad, S., Tilocca, B., Koohi, M. K., Taghipour, A., Sait, A., Subbaram, K., Jahandideh, A., Mortazavi, P., Abedini, M. A., Hokey, D. A., Hogan, U., Shaheen, M. N. F., Elaswad, A., Elhaig, M. M., & Fawzy, M. (2020). Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) to animals: an updated review. *J Transl Med*, 18(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02534-2>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology (Basel)*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Sethuraman, N., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *Jama*, 323(22), 2249-2251. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
- Shehata, M. M., Gomaa, M. R., Ali, M. A., & Kayali, G. (2016). Middle East respiratory syndrome coronavirus: a comprehensive review. *Frontiers of medicine*, 10, 120-136.

- Shembekar, N., Chaipan, C., Utharala, R., & Merten, C. A. (2016). Droplet-based microfluidics in drug discovery, transcriptomics and high-throughput molecular genetics. *Lab Chip*, 16(8), 1314-1331. <https://doi.org/10.1039/c6lc00249h>
- Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Abdullah Al-Maskri, A. A., Kang, Y., Zeng, S., & Cai, S. (2020). Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J Pharm Anal*, 10(2), 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
- Sheridan, C. (2020). Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol*, 38(5), 515-518. <https://doi.org/10.1038/d41587-020-00010-2>
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J., & Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol*, 331(5), 991-1004. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00865-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00865-9)
- Song, J., El-Tholoth, M., Li, Y., Graham-Wooten, J., Liang, Y., Li, J., Li, W., Weiss, S. R., Collman, R. G., & Bau, H. H. (2021). Single- and Two-Stage, Closed-Tube, Point-of-Care, Molecular Detection of SARS-CoV-2. *Anal Chem*, 93(38), 13063-13071. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03016>
- Song, J., Liu, C., Mauk, M. G., Rankin, S. C., Lok, J. B., Greenberg, R. M., & Bau, H. H. (2017). Two-Stage Isothermal Enzymatic Amplification for Concurrent Multiplex Molecular Detection. *Clin Chem*, 63(3), 714-722. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.263665>
- Suo, T., Liu, X., Feng, J., Guo, M., Hu, W., Guo, D., Ullah, H., Yang, Y., Zhang, Q., & Wang, X. (2020). ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1259-1268.
- Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X., Duan, Y., Zhang, H., Wang, Y., Qian, Z., Cui, J., & Lu, J. (2020). On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *Natl Sci Rev*, 7(6), 1012-1023. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa036>
- Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., & Ziebuhr, J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, 84(Pt 9), 2305-2315. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19424-0>
- Thye, A. Y., Law, J. W., Pusparajah, P., Letchumanan, V., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2021). Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern (VOCs): An Impending Global Crisis. *Biomedicines*, 9(10), 1303. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101303>
- Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y. C., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. C. W. (2020). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS nano*, 14(4), 3822-3835. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
- van Kasteren, P. B., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., de Jonge, J., van den Brandt, A., Molenkamp, R., Reusken, C., & Meijer, A. (2020). Comparison of seven

- commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*, 128, 104412. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104412>
- Velavan, T. P., & Meyer, C. G. (2020). The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Health*, 25(3), 278-280. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
- Verma, R., Saha, S., Kumar, S., Mani, S., Maiti, T. K., & Surjit, M. (2021). RNA-Protein Interaction Analysis of SARS-CoV-2 5' and 3' Untranslated Regions Reveals a Role of Lysosome-Associated Membrane Protein-2a during Viral Infection. *Msystems*, 6(4), e0064321. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00643-21>
- Villas-Boas, L. S., Paula, A. V., Silva, A. R. D., Jr., Paiao, H. G. O., Tozetto-Mendoza, T. R., Manuli, E. R., Leal, F. E., Ferraz, A. B. C., Sabino, E. C., Bierrenbach, A. L., Witkin, S. S., & Mendes-Correa, M. C. (2022). Absence of neutralizing antibodies against the Omicron SARS-CoV-2 variant in convalescent sera from individuals infected with the ancestral SARS-CoV-2 virus or its Gamma variant. *Clinics (Sao Paulo)*, 77, 100068. <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2022.100068>
- Velu, P., Cong, L., Rand, S., Qiu, Y., Zhang, Z., Zhang, J., Guo, J., Ruggiero, P., Sukhu, A., & Fautleroy, K. (2022). Rapid detection of SARS-CoV-2 variants of concern by single nucleotide polymorphism genotyping using TaqMan assays. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 104(4), 115789.
- Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W. R., Laydon, D. J., Dabrera, G., & O'Toole, Á. (2021). Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B. 1.1. 7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data. *MedRxiv*, 2020.2012. 2030.20249034.
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292. e286.
- Wang, M., Fu, A., Hu, B., Tong, Y., Liu, R., Liu, Z., ... Zhang, Y. (2020). Nanopore target sequencing for accurate and comprehensive detection of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Small*, 16(32), e2002169. <https://doi.org/10.1002/smll.202002169>
- Wang, X., Yao, H., Xu, X., Zhang, P., Zhang, M., Shao, J., Xiao, Y., & Wang, H. (2020). Limits of Detection of 6 Approved RT-PCR Kits for the Novel SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Clin Chem*, 66(7), 977-979. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa099>
- Warsi, I., Khurshid, Z., Shazam, H., Umer, M. F., Imran, E., Khan, M. O., Slowey, P. D., & Goodson, J. M. (2021). Saliva Exhibits High Sensitivity and Specificity for the Detection of SARS-COV-2. *Diseases*, 9(2), 38. <https://doi.org/10.3390/diseases9020038>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, 27(3), 325-328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>

- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., & Pei, Y.-Y. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265-269.
- Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., Li, N., Guo, Y., Li, X., Shen, X., Zhang, Z., Shu, F., Huang, W., Li, Y., Zhang, Z., Chen, R. A., Wu, Y. J., Peng, S. M., Huang, M., Xie, W. J., Cai, Q. H., Hou, F. H., Chen, W., Xiao, L., & Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, *583*(7815), 286-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>
- Yan, C., Cui, J., Huang, L., Du, B., Chen, L., Xue, G., Li, S., Zhang, W., Zhao, L., Sun, Y., Yao, H., Li, N., Zhao, H., Feng, Y., Liu, S., Zhang, Q., Liu, D., & Yuan, J. (2020). Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*, *26*(6), 773-779. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.001>
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, *29*(17), E88-88. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.e88>
- Yu, L., Wu, S., Hao, X., Dong, X., Mao, L., Pelechano, V., Chen, W. H., & Yin, X. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin Chem*, *66*(7), 975-977. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D., & Fouchier, R. A. (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, *367*(19), 1814-1820. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- 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., & Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, *527*(3), 618-623. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.136>
- Zhang, F., Abudayyeh, O. O., & Gootenberg, J. S. (2020). A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics*, *8*.
- Zhang, J., Cai, Y., Lavine, C. L., Peng, H., Zhu, H., Anand, K., Tong, P., Gautam, A., Mayer, M. L., & Rits-Volloch, S. (2022). Structural and functional impact by SARS-CoV-2 Omicron spike mutations. *Cell reports*, *39*(4).
- Zhang, L., Parvin, R., Fan, Q., & Ye, F. (2022). Emerging digital PCR technology in precision medicine. *Biosens Bioelectron*, *211*, 114344. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114344>.
- Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2020). A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell*, *181*(2), 223-227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>

- Zhang, R., Li, Y., Zhang, A. L., Wang, Y., & Molina, M. J. (2020). Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(26), 14857-14863.
- Zhen, W., Smith, E., Manji, R., Schron, D., & Berry, G. J. (2020). Clinical Evaluation of Three Sample-to-Answer Platforms for Detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*, 58(8), 10.1128/jcm.00783-00720. <https://doi.org/10.1128/JCM.00783-20>
- Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J., & Li, M. M. (2021). Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med*, 41(1), 25-43. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>
- Zhu, P., & Wang, L. (2017). Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(1), 34-75.
- Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins. *Bioinformatics and biology insights*, 15, 11779322211025876.
- Yang, H., & Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 685-700.
- Bohn, M. K., Lippi, G., Horvath, A. R., Erasmus, R., Grimmmler, M., Gramegna, M., Mancini, N., Mueller, R., Rawlinson, W. D., & Menezes, M. E. (2021). IFCC interim guidelines on rapid point-of-care antigen testing for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic and symptomatic individuals. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 59(9), 1507-1515.
- Vandenberg, O., Martiny, D., Rochas, O., van Belkum, A., & Kozlakidis, Z. (2021). Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 171-183.
- Mirabile, A., Sangiorgio, G., Bonacci, P. G., Bivona, D., Nicitra, E., Bonomo, C., Bongiorno, D., Stefani, S., & Musso, N. (2024). Advancing pathogen identification: the role of digital PCR in enhancing diagnostic power in different settings. *Diagnostics*, 14(15), 1598.
- Xia, J., Tong, J., Liu, M., Shen, Y., & Guo, D. (2020). Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *Journal of medical virology*, 92(6), 589-594.

10. Ιστότοποι

- [https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019-ncov#:~:text=Coronaviruses%20\(CoV\)%20are.%2D19%20virus%E2%80%9D;https://en.wikipedia.org/wiki/COVID-19_pandemic](https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019-ncov#:~:text=Coronaviruses%20(CoV)%20are.%2D19%20virus%E2%80%9D;https://en.wikipedia.org/wiki/COVID-19_pandemic)

- <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>
- <https://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi>
- <https://www.cdc.gov/covid/hcp/clinical-care/clinical-specimen-guidelines.html>

11. Κατάλογος Πινάκων / Εικόνων

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Νοσηλεία 41 ατόμων σε θάλαμο με αρν. Πίεση και απλό (Huang et al., 2020)

Πίνακας 2. Βιοχημικές και ειδικές εξετάσεις νοσηλευόμενων με Covid-19 (Lian et al., 2020)

Πίνακας 3. Εκκινήτες και ιχνηθέτες που προτάθηκαν προς χρήση από το κέντρο ελέγχου και πρόληψης ασθενειών της Αμερικής (Dhamad & Abdal Rhida, 2020)

Πίνακας 4. Χαρακτηρισμός του αποτελέσματος ως αρνητικό ή θετικό (Dhamad & Abdal Rhida, 2020)

Πίνακας 5. Διαθέσιμα εμπορικά κιτ

Πίνακας 6. Απόδοση τελικού αποτελέσματος μέθοδο DETECTR

Πίνακας 7. Παρακολούθηση μεταβολής του χρώματος σε χρωματομετρική μέθοδο αναλόγως με το στάδιο της αντίδρασης. Χρήση Leucocrystal Violet (LCV) (Song et al., 2021)

Πίνακας 8. Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο Penn-RAMP για την ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 (Kashir & Yaqinuddin, 2020)

Πίνακας 9. Παρουσίαση των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων πλατφορμών εμπορικών εταιριών, καθώς και αναφορά της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται. Παρουσιάζεται επίσης και το φάσμα αναγνώσματος, όπως και ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η κάθε εκτέλεση (Zhong et al., 2021).

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1 . Μηχανισμοί και ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την έκφραση του γονιδιώματος του κορωνοϊού SARS (Snijder et al., 2003)
- Εικόνα 2. Μετάδοση του SARS-CoV-2 (Zhang et al., 2020)
- Εικόνα 3 *Σχηματική περιγραφή της Ακίδας (S) και του ιού SARS-CoV2* Güler, G., et al. (2021).
- Εικόνα 4. Σχηματική απόδοση της δομής του γονιδιώματος και των κωδικοποιημένων πρωτεϊνών για την εκδοχή pp1ab και pp1a του IVDC-HB-01/2019 (HB01). Το μεγαλύτερο γονίδιο που ονομάζεται orf1ab κωδικοποιεί την πρωτεΐνη pp1ab, η οποία περιλαμβάνει 15 nsps πρωτεΐνες (nsp1-nsp10 and nsp12-nsp16). Η pp1a κωδικοποιείται επίσης από το γονίδιο orf1a και περιλαμβάνει 10 nsps (nsp1-nsp10). Οι δομικές πρωτεΐνες, κωδικοποιούνται από τα 4 δομικά γονίδια, τα οποία συμπεριλαμβάνουν την ακίδα (S), φάκελος (E), μεμβράνης (M) και νουκλεοκαψιδίου (N) γονίδια. Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του γονιδιώματος του 2019-nCoV βρέθηκαν μέσα από τις διαθέσιμες βιβλιοθήκες GeneMarkS <http://exon.gatech.edu/GeneMark/genemarks.cgi> και ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). (A. Wu et al., 2020)
- Εικόνα 5. Γονιδιώματα και δομές των ιών SARS-CoV και MERS-CoV (Sahebnasagh et al., 2020)
- Εικόνα 6. Ο κύκλος της ζωής των εξαιρετικά παθογόνων κορωνοϊών που επηρεάζουν τον άνθρωπο (CoVs) και συγκεκριμένα εξουδετερωτικά αντισώματα (nAbs) κατά των ιών αυτών (Jiang et al., 2020)
- Εικόνα 7. Δομή πρωτεΐνης Spike (Walls et al., 2020)
- Εικόνα 8. Απεικόνιση των παραλλαγών ενδιαφέροντος (VOCs): B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.617/B.1.617.2 (Delta) και P.1 (Gamma) και οι μεταλλάξεις κλειδιά που τις χαρακτηρίζουν (Thye et al., 2021)
- Εικόνα 9. Απεικόνιση της παραλλαγής Omicron (B.1.1.529) (Dhama et al., 2023)
- Εικόνα 10. Απεικόνιση της αρχής της μοριακής μεθόδου rt RT-PCR (Afzal, 2020)
- Εικόνα 11. Οι βασικές αρχές του ψηφιακού PCR (Lin et al., 2017). Το δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα διαμοιράζεται σε σταγονίδια ή κελιά, με τέτοιο τρόπο ώστε σε κάθε κελί να περιέχεται κατά προτίμηση 1 αντίγραφο DNA. Ο φθορισμός που παράγεται μετριέται ανά σταγόνα ή κελί και αντιπροσωπεύει τον απόλυτο αριθμό αντιγράφων DNA στο δείγμα που εξετάζεται. (Lin et al., 2017)
- Εικόνα 12. Στην μέθοδο SHERLOCK με την RPA μετατρέπεται το ιικό RNA σε dsDNA και στη συνέχεια με τη βοήθεια της πολυμεράσης T7 δημιουργείται μια συμπληρωματική αλυσίδα RNA από DNA εκμαγείο. Έπειτα το σύμπλοκο Cas13–tracrRNA προσδένεται στον στόχο και απελευθερώνεται η φθορίζουσα

ουσία. Στη μέθοδο DETECTR με την RPA μετατρέπεται το ιικό RNA σε dsDNA και στη συνέχεια με τη βοήθεια του συμπλόκου Cas12a–tracrRNA ενεργοποιείται το ένζυμο και απελευθερώνεται το μόριο με τη φθορίζον ουσία (Carter et al., 2020). Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μέθοδο LAMP. Τα βέλη μας υποδείχνουν την σειρά των βημάτων με την οποία πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA. Η αλληλουχία στόχος είναι σημαδεμένη με το κόκκινο χρώμα. Στην αρχή βλέπουμε τα αρχικά βήματα για την δημιουργία των δομών βρόχων και στην συνέχεια την συνεχόμενη κυκλική ενίσχυση που πραγματοποιείται.

Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μέθοδο LAMP. Τα βέλη μας υποδείχνουν την σειρά των βημάτων με την οποία πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA. Η αλληλουχία στόχος είναι σημαδεμένη με το κόκκινο χρώμα. Στην αρχή βλέπουμε τα αρχικά βήματα για την δημιουργία των δομών βρόχων και στην συνέχεια την συνεχόμενη κυκλική ενίσχυση που πραγματοποιείται (Notomi et al., 2000).

Εικόνα 14. Σχηματική περιγραφή των εκκινητών που χρησιμοποιούμε στη μέθοδο ARMS.

Ένα ζεύγος εσωτερικών ειδικών εκκινητών και ένα ζεύγος κοινών εκκινητών χρησιμοποιούνται για κάθε αντίδραση. Αναφέρεται επίσης και μια μη αναγνώριση για να αυξηθεί η ειδικότητα. Οι δυο κοινοί εκκινητές σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε τα προϊόντα τους να ξεχωρίζουν ως προς το μέγεθος τους κατά την απεικόνιση της γέλης ηλεκτροφόρησης (Ye et al., 2001)

Εικόνα 15. Εξέλιξη των τεχνολογιών αλληλούχισης κατά τις τέσσερις τελευταίες δεκαετίες και κατηγοριοποίηση σε 3 γενεές. Η πρώτη γενιά αλληλούχιση με τη μέθοδο κατά Sanger έβαλε τα θεμέλια για την ανάπτυξη της αλληλούχισης. Η μαζική παράλληλη αλληλούχιση έκανε την εμφάνιση της με τις πλατφόρμες της Illumina και Ion Torrent. Η Τρίτη γενιά περιλαμβάνει τις πλατφόρμες PacBio και Nanopore, παρέχοντας μας την τεχνολογία των βραχέων και μακρών αναγνωσμάτων. (Satam et al., 2023)

Εικόνα 16. Παρουσιάζεται μια γενική ροή εργασιών για το NGS. Αρχικά, το δείγμα νουκλεϊκού οξέος πρέπει να εξαχθεί από το δείγμα. Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης παράγει έναν πληθυσμό θραυσμάτων DNA καθορισμένων μηκών με καθορισμένες αλληλουχίες ολιγομερών και στα δύο άκρα ώστε να είναι συμβατές με την εφαρμοσμένη τεχνική NGS (Hess et al., 2020)

Εικόνα 17. Απεικόνιση του ρευστού θαλάμου (flow cell) της Illumina https://support-docs.illumina.com/IN/NextSeq_550-500/Content/IN/NextSeq/FlowCell_Overview_fNS.htm

Εικόνα 18. Σχηματική περιγραφή του ιοντικού ρεύματος και θεωρητικός υπολογισμός του ιοντικού ρεύματος κατά τη διάρκεια μετατόπισης των διαφορετικών βάσεων (Farimani et al., 2017).

12.Χρήσιμες Συντομογραφίες

Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	Π.Ο.Υ. / WHO
European Centre for Disease Control and Prevention	ECDC
Coronavirus Disease 2019	COVID-19
Variants of concern	VOC
Point of Care	POC
Middle East Respiratory Syndrome	MERS
Severe Acute Respiratory Syndrome	SARS
Alphacoronavirus	αCoV
Betacoronavirus	βCoV
Gammacoronavirus	γCoV
Deltacoronavirus	δCoV
Angiotensin - converting enzyme 2	ACE2
Open Reading Frame	ORF
Untranslated Regions	UTRs
non-structural proteins	nsp
RNA-Dependent RNA Polymerase	RdRp
complementary DNA	cDNA
Receptor-Binding Domain	RBD
REAL-TIME PCR	RT-PCR
Digital PCR	dPCR
droplet digital PCR	ddPCR
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	CRISPR
Specific High Sensitivity Enzyme Reporter Unlocking	SHERLOCK
Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter	DETECTR
Loop mediated isothermal amplification	LAMP
Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification	RT-LAMP
Forward Inner Primer / Backward Inner Primer	FIP / BIP
Forward Loop Primer / Backward Loop Primer	LF / LB
deoxyribonucleoside triphosphate	dNTP

hydroxynepthol blue	HNB
Primers with Enhanced Nucleotide Nucleobases for Rapid Amplification of Minimal Pathogens	Penn-RAMP
Amplification Refractory Mutation System	ARMS
Next Generation Sequencing	NGS
Quality Control	QC
Single Nucleotide Variant	SNV