



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ 2020-21**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Τίτλος εργασίας

**ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΤΗΝ ΕΠΟΧΗ ΤΩΝ ΚΟΡΩΝΟΪΩΝ**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΕΪΤΟΠΟΥΛΟΥ

Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΑΜ: mery 20029

Επιβλέπουσα: Δρ. ΞΥΔΕΑ-ΚΙΚΕΜΕΝΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ, Μάρτιος 2022



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

SCHOOL OF PUBLIC HEALTH

DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH POLICIES

TITLE OF POSTGRADUATE PROGRAM (MSc/MBA) IN
PROFESSIONAL AND ENVIRONMENTAL HEALTH 2020-21

Diploma Thesis

**Title: SAMPLE MANAGEMENT IN THE
BIOPATHOLOGICAL LABORATORY DURING THE
CORONAVIRUS PANDEMICS**

CHRISTINA SEITOPOULOU

Doctor Biopathologist

Registration Number: mepy20029

Supervisor: Dr. ANASTASIA XYDEA-KIKEMENI

Athens, March 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ 2020-21

Τίτλος εργασίας

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΗΝ
ΕΠΟΧΗ ΤΩΝ ΚΟΡΩΝΟΪΩΝ

Η μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

Α/α	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	Ξυδέα-Κικεμένη Αναστασία	Αναπλ. Καθηγήτρια	
2	Βατόπουλος Αλκιβιάδης	Καθηγητής	
3	Πατσουλά Ελένη	Αναπλ. Καθηγήτρια	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η Χριστίνα Σεϊτοπούλου του Κωνσταντίνου, με αριθμό μητρώου mery20029 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΕΙΑ, του Τμήματος ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, της Σχολής ΔΗΜΟΣΙΑΣ ΥΓΕΙΑΣ του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

**Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.*

Ο/Η Δηλών/ούσα

*** Χριστίνα Σεϊτοπούλου/ Ιατρός Βιοπαθολόγος
(Υπογραφή)**



Ψηφιακή Υπογραφή Επιβλέποντα..... (Υπογραφή)

*** Εάν κάποιος επιθυμεί απαγόρευση πρόσβασης στην εργασία για χρονικό διάστημα 6-12 μηνών (embargo), θα πρέπει να υπογράψει ψηφιακά ο/η επιβλέπων/ουσα καθηγητής/τρια, για να γνωστοποιεί ότι είναι ενημερωμένος/η και συναινεί. Οι λόγοι χρονικού αποκλεισμού πρόσβασης περιγράφονται αναλυτικά στις πολιτικές του Ι.Α. (σελ. 6):**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω δημόσια την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Δρ. Ξυδέα-Κικεμένη Αναστασία για την άψογη συνεργασία μας στην συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω δημόσια τη Δρ. Μουρτζίκου Αντωνία, Bio MSc, ClinBio MSc, MPH, MHSM, PhD, EurSpLM, συνεργάτιδα μου στο τμήμα Μοριακού Ελέγχου SARS COV-2, στο Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας Πειραιά «Άγιος Παντελεήμων» για την πολύτιμη βοήθειά της στην συγγραφή της διπλωματικής μου, καθώς και για την άψογη συνεργασία μας στο εν λόγω ιδιαίτερα δύσκολο τμήμα μοριακού ελέγχου, εν καιρώ πανδημίας.

ΑΦΙΕΡΩΣΗ

Η εργασία μου αφιερώνεται με καμάρι στην οικογένειά μου, στον σύζυγό μου, Χαραλάμπους Νικόλαο, στους γονείς μας, Χαραλάμπους Δημήτριο και Βασιλική, και στα παιδιά μου, τον 9χρονο Δημήτριο, που είναι στο φάσμα του αυτισμού και στον 4χρονο Βασίλειο, που παρακολουθούσε όλα τα διαδικτυακά μαθήματα ήσυχα και υπομονετικά.

Αφιερωμένο σε όλες τις οικογένειες παιδιών που βρίσκονται στο φάσμα του αυτισμού, να στείλω το μήνυμα ότι τίποτα δεν είναι ανέφικτο, τα παιδιά μας οι πρώτοι διδάξαντες και ότι η γνώση, η υπομονή και η επιμονή σε αυτό που αγαπάς πάντα καταλήγουν στο σωστό και επιθυμητό αποτέλεσμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι κορωνοϊοί ή κορωνοϊοί (CoVs) είναι μια οικογένεια ιών που προσβάλλουν ανθρώπους και ζώα με τον SARS-CoV-2 να είναι ένας νέος τύπος ιού. Θεωρούνται παγκοσμίως από τις σημαντικότερες αιτίες ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, γαστροεντερίτιδες, ηπατίτιδες και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Η βιοασφάλεια είναι η εφαρμογή προφυλάξεων ασφαλείας που μειώνουν τον κίνδυνο έκθεσης των εργαζόμενων του εργαστηρίου σε δυνητικά μολυσματικά μικρόβια και περιορίζουν τη μόλυνση του εργασιακού περιβάλλοντος και τελικά της κοινότητας.

Σκοπός: Η εργασία εστιάζει στη βιβλιογραφική ανασκόπηση από δημοσιεύσεις και διεθνείς οργανισμούς και φορείς (όπως WHO, ECDC, CDC) των υπαρχουσών γνώσεων και τον περαιτέρω εμπλουτισμό των δεδομένων στο πλαίσιο της πανδημίας σχετικά με τη διαχείριση της ομάδας των κορωνοϊών στα Βιοπαθολογικά Εργαστήρια.

Υλικό & Μεθοδολογία: Το υλικό της εργασίας προέκυψε από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση πηγών (άρθρων και review) του pubmed, του scopus, του google scholar, αλλά και από πλατφόρμες/ιστοσελίδες μεγάλων οργανισμών ΠΟΥ, CDC, ECDC, που αφορούν τους κορωνοϊούς, τις επιδημίες που προκάλεσαν, την πρόσφατη πανδημία COVID-19, και θέματα βιοασφάλειας που αφορούν τόσο σε διαχείριση δειγμάτων σε κλινικά εργαστήρια, όσο και στη διασφάλιση υγείας εργαζομένων, γενικού πληθυσμού και περιβάλλοντος. Η αναζήτηση έγινε από το Δεκέμβριο 2019 έως και το Σεπτέμβριο του 2021, επιλέχθηκαν 112 άρθρα καθώς και οι κατευθυντήριες οδηγίες του WHO, CDC, ECDC. Η αξιολόγηση των μελετών έγινε σύμφωνα με την πληρότητα των δεδομένων τους, και την αποδοχή των διεθνών οδηγιών.

Αποτελέσματα: Τα πρωτόκολλα της Βιοασφάλειας στις εργαστηριακές δομές και οι αυστηροί κανόνες που τα διέπουν έχουν άκρως επιτακτικό και χρήσιμο χαρακτήρα για την απρόσκοπτη εφαρμογή τους με σκοπό την διαχείριση όλων των μικροβιακών παραγόντων των δειγμάτων ,τύπων Βιοασφάλειας (I-IV), με κύριο μέλημα τον περιορισμό των επικίνδυνων και μολυσματικών για την δημόσια υγεία αερολυμάτων. Η διασφάλιση των παραπάνω, απορρέει από την ύπαρξη πρωτοκόλλου Βιοασφάλειας στις δομές υγείας , η οποία έχει τόσο προληπτικό ,όσο και περιοριστικό χαρακτήρα ,στην έκθεση όλων των εμπλεκόμενων σε μικροβιακούς παράγοντες (GMO's) στον εργαστηριακό τομέα.

Η έννοια της Βιοασφάλειας στον τομέα της υγείας μπορεί να υλοποιηθεί μέσω επιμορφωτικών σεμιναρίων, ημερίδων, συνεδρίων ,και αποσκοπεί τόσο για την προστασία των εργαζομένων-επαγγελματιών υγείας σε ατομικό, συλλογικό επίπεδο, όσο και για την προστασία του ίδιου του περιβάλλοντος.

Συμπεράσματα: Με το βλέμμα στην προστιθέμενη αξία και το όφελος της μελέτης, η εργασία επικεντρώθηκε στις επιδημίες MERS, SARS, COVID-19 και στη διαχείριση των δειγμάτων ασθενών από τα κλινικά Βιοπαθολογικά εργαστήρια, με έμφαση στη διασφάλιση της υγείας του ανθρώπινου δυναμικού που εργάζεται σε αυτά, την ελαχιστοποίηση των παραγόντων κινδύνου και διασποράς στην κοινότητα, αλλά και με το βλέμμα στραμμένο προς την προστασία του περιβάλλοντος από μη ηθελημένα απελευθέρωση βιολογικού παράγοντα.

Ο εμπλουτισμός των ήδη υπάρχουσών γνώσεων με νέες, η περαιτέρω κατανόηση του προβλήματος με απώτερο σκοπό την προάσπιση της ανθρώπινης ύπαρξης, και της δημόσιας υγείας, και η σύνοψη των ανωτέρω, θεωρούμε ότι αποτελεί το όφελος της προσπάθειας μας.

Λέξεις-Κλειδιά: Ανθρώπινοι κορωναϊοί, νόσος COVID-19, ιοί SARS-CoV-2, MERS, SARS, βιοασφάλεια, ΠΟΥ, ΚΕΕΛΠΝΟ, CDC, ECDC, Επιτροπή Νοσοκομειακών Λοιμώξεων (ΕΝΛ)

ABSTRACT

Introduction: Coronaviruses consist a large family of viruses that affect humans and animals. SARS-CoV-2 is a new species of coronaviruses. Coronaviruses cause viral infections of respiratory tract, gastroenteritis, hepatitis, and infections of the central nervous system. Biosafety is the implementation of safety precautions that minimize the exposure of the laboratory staff to contagious microbes and reduce pollution of the work environment and ultimately the community.

Material and Methods: The data of the present thesis is collected after the review search in scientific libraries such as pubmed, scopus, google scholar, as well as in the sites/platforms of WHO, CDC, ECDC, looking for related information about coronaviruses, epidemics and pandemics that they caused, the newborn outbreak of COVID-19, and issues of Biosafety that involve sample management and handling at the clinical laboratories, ensuring lab personnel, environment and public health in general. The research lasted from December 2019 up to September 2021. 138 articles are included along with the international guidelines of WHO, CDC, ECDC. The evaluation of the studies was made according to the completeness of their data and the acceptance of the international directives.

Results: The main principles of Biosafety at microbiology labs apply to the management of biological samples of unknown origin, as potentially infectious, even risk group 1 microbes, in a way that avoids the formation of aerosols. For this purpose the existence of a Biosafety Council in the field of health is needed, with the duty of studying, and recording technologies and restriction practices for prevention of any harm to the laboratory personnel caused by GMO's. Moreover, the Biosafety Council has the duty to inform and educate health professionals via workshops, seminars, round tables in congresses, etc, in order their own safety be achieved, and the protection of the environment additionally.

Conclusions: The study is focused on MERS, SARS, COVID-19 pandemics and on the handling of biological samples at microbiology laboratories, ensuring the health of laboratory personnel, by minimizing the risk factors and their spread to the community, but also looking at the environmental protection from an unwanted spread of these factors.

Thus, the gain of our effort was the enrichment of already existing knowledge and the further understanding of the problem, which are all aimed at preserving individual and public health.

Key words: human coronaviruses, COVID-19 disease, viruses SARS-CoV-2, MERS, SARS, biosafety, World Health Organization (WHO), CDC, ECDC

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Κατάταξη των ανθρώπινων κορωνοϊών με την ονομασία τους, την χρονολογία εμφάνισης τους, το φυσικό και τον ενδιάμεσο υποδόχο τους, καθώς και την ένταση των αναπνευστικών συμπτωμάτων που προκαλούν στον ξενιστή. Πηγή: Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης, 11 Φεβρουαρίου 2020..... 14
- Πίνακας 2.** Συγκεντρωτική παράθεση διενεργούμενων βιοχημικών εξετάσεων που αφορούν τον ορμονικό έλεγχο.....33
- Πίνακας 3.** Παράθεση Ιών, Βακτηρίων, Παρασίτων που ανιχνεύονται με PCR.....36

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1.** Περιγραφή των μηχανισμών μέσω των οποίων ο SARS-CoV-2 εισέρχεται στα κύτταρα. Πηγή: Jeffrey K Aronson. Coronaviruses-a general introduction. The Centre for Evidence-Based Medicine.2020. <https://www.cebm.net>.....21
- Σχήμα 2.** Η προοδευτική αύξηση των κλώνων του γονιδιώματος των ιών υπό διερεύνηση με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Πηγή: Andy Vierstraete, 1999. sliedeployer.gr.....37
- Σχήμα 3.** Παραστατική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. (www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html).....38
- Σχήμα 4.** Σχηματική παράθεση τα διαφόρων βημάτων της PCR. (www.pcr.html).....38

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** Είδη κορωνοϊών και ξενιστές τους. Πηγή: Viruses 2020, <https://doi.org/10.3390/v12020244>..... 12
- Εικόνα 2.** Ταξινόμηση των κορωνοϊών. Πηγή: “Taxonomy”. talk.ictvoline.org..... 13
- Εικόνα 3.** Η καταγωγή των ανθρώπινων κορωνοϊών με τους αναμενόμενους παρεμβαλλόμενους φορείς. Πηγή: Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. «Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes». Trends in Microbiology. 2017; doi:10.1016/j.tim.2016.09.001..... 15
- Εικόνα 4.** Το χρονοδιάγραμμα των πέντε πανδημιών από το 1918 και των ιών που κυκλοφόρησαν μετέπειτα. Πηγή: Emerging Infectious Diseases 2006, 12(1):15-22.....17
- Εικόνα 5.** Τα είδη κορωνοϊών που προκαλούν οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις στον άνθρωπο και οι αντίστοιχες χρονολογικά πανδημίες που προκάλεσαν. Πηγή: Journal of Virology 2012; 86(7):3995-4008..18
- Εικόνα 6.** Απεικόνιση του κορωνοϊού SARS-CoV-2 και Δομή του γονιδιώματος του. Πηγή: Respir Res 2020, 21:318του 2012 στην Μέση Ανατολή.....21
- Εικόνα 7.** Προσδιορισμός ειδικής φαρμακευτικής αγωγής όσον αφορά την καταπολέμηση της νόσου COVID-19. Πηγή: Rabaan A.A, Al-Ahmed S.H, Sah R. et al.(2020) <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00384>.....23

Εικόνα 8. Μηχανισμός διασποράς, και αρχικής ύπαρξης του ιού SARS-CoV-2 και της επακόλουθης νόσου Covid-19. Πηγή: Zhang R, Li Y, Zhang AL, Wang Y, and Molina MJ, 2020: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009637117>.....23

Εικόνα 9. Τα συμπτώματα της COVID-19 που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2. Πηγή: Mikael Häggström. Symptoms of coronavirus disease 2019. www.who.int . (time line 26/03/21)24

Εικόνα 10. Προσβολή ανθρώπινων οργάνων την περίοδο της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2. Πηγή: Lebeau G, Vagner D, et al. Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. <https://doi.org/10.3390/ijms21165932>.....25

Εικόνα 11. Τα στάδια της εργαστηριακής ανάλυσης και η εφαρμογή προφυλάξεων ασφαλείας σε κάθε ένα από αυτά. Πηγή: ΚΕΕΛΠΝΟ. Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας. Βιοασφάλεια. Τριφυνοπούλου Κ. 22-11-2013.....41

Εικόνα 12. Ταξινόμηση κατά WHO των μικροοργανισμών σε ομάδες κινδύνου. Πηγή: WHO....42

Εικόνα 13. Πρότυπο συστήματος διαχείρισης βιολογικού κινδύνου. Πηγή: International Biosafety and Biosecurity Laboratory Standard Development Initiative. www.biorisk.eu.....45

Εικόνα 14. Διαχείριση βιολογικού κινδύνου. Πηγή: Official Journal of the European Communities. Directive 2000[54]EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of the 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.....47

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΑΦΙΕΡΩΣΗ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	6
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή</u>	10
1.1 Σκοπός.....	10
1.2 Υλικό και Μεθοδολογία	11
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Περί κορωνοϊών</u>	12
2.1 Κορωνοϊοί	12
2.2 Επιδημίες οφειλόμενες στην οικογένεια των Κορωνοϊών.....	17
2.2.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των SARS-CoV.....	19
2.3 Ο SARS-CoV-2.....	20
2.3.1 Κλινικά χαρακτηριστικά και Πρόληψη της νόσου SARS-CoV.....	24
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Βιοπαθολογικό εργαστήριο</u>	26
3.1. Δομή του Βιοπαθολογικού Εργαστηρίου	26
3.1.1 Μικροβιολογικό Τμήμα	27
3.1.2 Αιματολογικό Τμήμα	32
3.1.3 Βιοχημικό- Ορμονολογικό Τμήμα.....	32
3.1.4 Ανοσολογικό Τμήμα	34
3.1.5 Τμήμα Ανοσολογίας Λοιμώξεων-Ορολογικό	35
3.1.6 Τμήμα Μοριακής Βιολογίας	36
3.1.6.1 Μοριακός έλεγχος (PCR)	36
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Βιολογικός παράγοντας στο Εργαστήριο</u>	41
4.1 Βασικές αρχές Βιοασφάλειας	41
4.2 Κανόνες λειτουργίας Εργαστηρίου	45
4.2.1 Χαρακτηριστικά θαλάμων βιολογικής ασφάλειας	45
4.2.1.1 Θάλαμος βιοασφάλειας τάξης Ι (BSC Ι)	45

4.2.1.2	Θάλαμος βιοασφάλειας τάξης II (BSC I)	46
4.2.1.3	Θάλαμος βιοασφάλειας τάξης III (BSC III)	46
4.2.1.4	Θάλαμος βιοασφάλειας IV (BSL-4)	46
4.3	Χειρισμοί δειγμάτων κλινικής μικροβιολογίας	46
4.3.1	Τμήμα Κλινικής Μικροβιολογίας	46
4.3.1.1	Χειρισμοί δειγμάτων SARS-CoV-2	48
4.3.1.2	Διαχείριση κλινικών δειγμάτων αρρώστων με διφορούμενη ή σίγουρη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2	49
4.3.2	Συλλογή αναπνευστικών δειγμάτων	49
4.3.3	Συλλογή δειγμάτων από την ανώτερη αναπνευστική οδό	50
4.3.4	Συλλογή δειγμάτων από την κατώτερη αναπνευστική οδό	51
4.3.5	Συλλογή συστατικών αίματος	51
4.4	Εξετάσεις που εκτελούνται στο Βιοπαθολογικό εργαστήριο για τους κορωναϊούς	51
4.4.1	Μοριακές εξετάσεις κατά το CDC	52
4.4.2	Ορολογικές δοκιμές κατά το CDC	52
4.5	Προστασία εργαζομένων	58
4.5.1	Απολύμανση εργαστηριακών χώρων	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Επιδημιολογικές μελέτες στο Εργαστήριο την εποχή του SARS-CoV-2		62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Συζήτηση-Συμπεράσματα		65
6.1	Συμπτώματα-Διάγνωση του long covid ή post covid-19 συνδρόμου	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1.1. Σκοπός

Σκοπός της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η ενδεδειγμένη βιβλιογραφική ανασκόπηση των ήδη υπάρχουσών γνώσεων από διεθνείς οργανισμούς και φορείς (όπως WHO, ECDC, CDC) και ο περαιτέρω εμπλουτισμός των δεδομένων με νέα εμπειριστατωμένη γνώση σχετικά με τη διαχείριση της ομάδας των κορωνοϊών στα Βιοπαθολογικά Εργαστήρια με γνώμονα την προστασία της ανθρώπινης ζωής στο πλαίσιο της Δημόσιας Υγείας.

Στο πλαίσιο αυτό επιπλέον στόχος αποτέλεσε η συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση της θεματικής περί των κορωνοϊών και αναλυτικότερα αυτών των ειδών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και επίσης η περιγραφική παράθεση του παραγόμενου έργου, της λειτουργίας, του χειρισμού των δειγμάτων, της χωροταξικής και εργονομικής κατανομής των επιμέρους τμημάτων ενός Βιοπαθολογικού Εργαστηρίου και φυσικά η εφαρμογή των προβλεπόμενων μέτρων για τη διασφάλιση της προστασίας του προσωπικού, την προστασία της κοινότητας, και την προστασία του περιβάλλοντος από μη ηθελημένη απελευθέρωση βιολογικού παράγοντα.

Επιμέρους στόχοι της μελέτης απετέλεσαν η παράθεση νόμων, κανονισμών και κατευθυντηρίων οδηγιών σε παγκόσμιο και ελληνικό επίπεδο, αναφορικά με τη βιοασφάλεια, τα επίπεδα βιοασφάλειας, τις δράσεις της επιτροπής λοιμώξεων, όπως αυτά προκύπτουν από διεθνείς και ελληνικούς φορείς.

1.2. Υλικό & Μεθοδολογία

Το υλικό της εργασίας προέκυψε από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση πηγών, όπως δημοσιεύσεων, άρθρων και review του pubmed, του scopus, του google scholar, αλλά και από πλατφόρμες/ιστοσελίδες μεγάλων οργανισμών υγείας ΠΟΥ, CDC και ECDC.

Ερευνήθηκαν βάσεις δεδομένων στο MEDLINE, CENTRAL, EMBASE, Scopus και αναζητήθηκαν δημοσιεύσεις που αφορούσαν τους κορωναϊούς (γενικά), τις επιδημίες που προκάλεσαν, την πρόσφατη πανδημία εξαιτίας του SARS-και θέματα βιοασφάλειας που αφορούν τόσο σε διαχείριση δειγμάτων σε κλινικά εργαστήρια, όσο και σε διασφάλιση υγείας εργαζομένων, γενικού πληθυσμού και περιβάλλοντος.

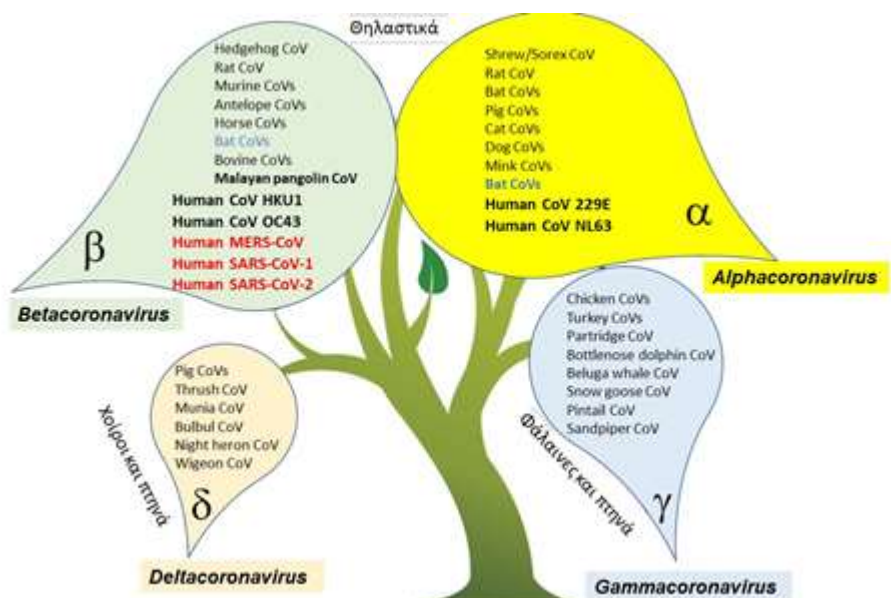
Η αναζήτηση έγινε από το Δεκέμβριο 2019 έως και το Σεπτέμβριο του 2021, με τα αρκτικόλεξα: coronaviruses, human, epidemic outbreaks, pandemics, SARS-CoV-2, MERS, SARS, RNA viruses, COVID-19, Virology, Epidemiology, coronavirus infections, Disease ecology, biosafety και στα ελληνικά: κορωναϊοί, επιδημίες, βιοασφάλεια, πανδημίες.

Από την αναζητηθείσα διεθνή βιβλιογραφία επιλέχτηκαν 112 άρθρα καθώς και οι κατευθυντήριες οδηγίες του WHO, CDC, ECDC. Η αξιολόγηση των μελετών έγινε σύμφωνα με την πληρότητα των δεδομένων τους, και την αποδοχή των διεθνών οδηγιών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Περί κορωνοϊών

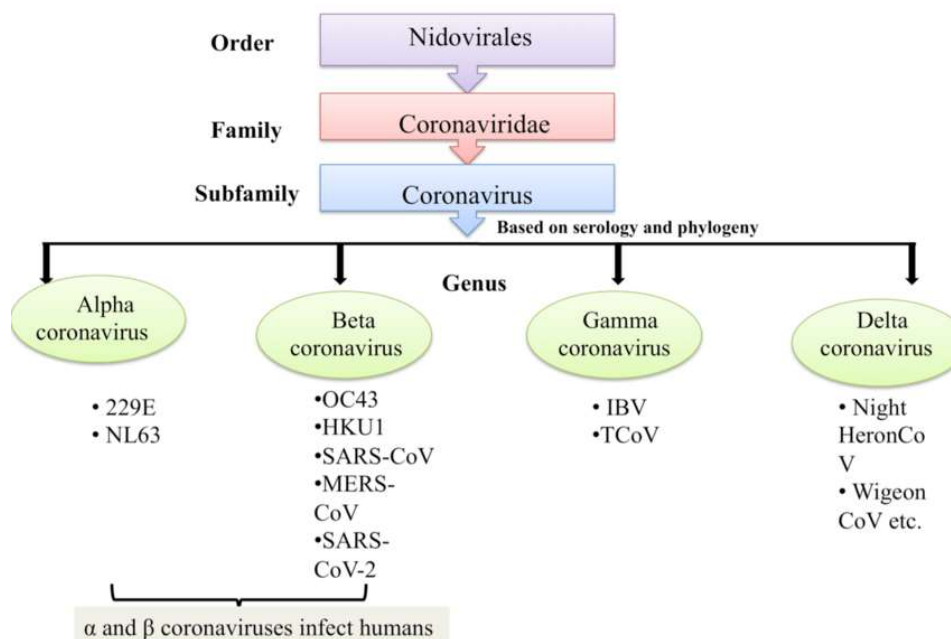
2.1. Κορωνοϊοί

"Κορωνοϊός", ιατρική ορολογία προερχόμενη αρχικά από την αρχαία ελληνική λέξη "κορώνη", η οποία σε δεύτερο βαθμό χρησιμοποιήθηκε από το λατινικό λεξιλόγιο ως "corona", που σημαίνει "στέμμα". Ιστορικά, το 1964 στο Λονδίνο οι επιστήμονες David Tyrrell και June Almeida στο εργαστήριο του νοσοκομείου Saint Thomas θεωρούνται ως οι πρώτοι ερευνητές και μελετητές των ανθρώπινων κορωνοϊών.^[1,2] Μάλιστα το 1968, έγινε η πρώτη αναφορά στους κορωνοϊούς στο περιοδικό Nature από μία ερευνητική ομάδα ιολόγων, η οποία απέδωσε τον ιατρικό όρο κορωνοϊός από την ιδιαίτερη μορφή τους. Επιστημονικά, το 1971 ο κορωνοϊός καταρτίστηκε ως διεθνής ιατρική ορολογία από μία ειδική επιτροπή η οποία είχε ως αρμοδιότητά της την ονοματοδοσία των εκάστοτε ιών, Εικόνα 1.^[3]



Εικόνα 1. Είδη κορωνοϊών και ξενιστές τους. Πηγή: *Viruses 2020*, <https://doi.org/10.3390/v12020244>.

Οι κορωνοϊοί ή κορωναιϊοί (CoVs) αποτελούν μια οικογένεια ιών που προσβάλλουν ανθρώπους και ζώα. [4-6] Αυτή η ομάδα των ιών μολύνει κατά κύριο λόγο πτηνά και θηλαστικά, διάφορα είδη σπονδυλωτών, και θεωρείται παγκοσμίως από τις κυριότερες αιτίες ιογενών λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού, γαστροεντερίτιδες, ηπατίτιδες και λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) σε πτηνά και θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Εικόνα 2).^[1, 7,8]



Εικόνα 2. Ταξινόμηση των κορωνοϊών. Πηγή: “Taxonomy”. talk. ictvonline.org

Το Ηνωμένο Βασίλειο και οι Ηνωμένες Πολιτείες τη δεκαετία του 1960, κατέχουν τα πρωτία της εύρεσης των ανθρώπινων κορωναιϊών, κάνοντας χρήση δύο ετερογενών μεθόδων.^[9] Τη δεκαετία του 1960, συγκεκριμένα το 1961, οι Tyrrell et al. περισυνέλεξαν έναν ιδιαίτερο ιό κρυολογήματος ονόματι B814.^[1,3,10,11] Μάλιστα επειδή ο ιός δεν μπορούσε να καλλιεργηθεί κάνοντας χρήση τις κλασικές μεθόδους για την εύρεση των αδενοϊών ρινοϊών, και των υπολοίπων ιών του κοινού κρυολογήματος, το 1965 οι Byrne και Tyrrell χρησιμοποίησαν όργανα ανθρώπινης εμβρυϊκής τραχείας, και κατόρθωσαν να καλλιεργήσουν το νέο ιό.^[12] Η καινοτόμος αυτή εργαστηριακή μέθοδος καλλιέργειας έχει την σφραγίδα του Bertil Hoorn.^[1] Ο απομονωμένος ιός όταν εμβολιάστηκε σε εθελοντική βάση στην ρινική κοιλότητα υγιών ανθρώπων προκάλεσε συμπτώματα κοινού κρυολογήματος και αδρανοποιήθηκε με τη χρήση αιθέρα, κάτι το οποίο απέδειξε ότι κατείχε φάκελο λιπιδίων.^[1,13] Το 1962, οι επιστήμονες, Procknow και Hamre κατάφεραν να αποσπασουν ένα καινούργιο στέλεχος του ιού από τους σπουδαστές της ιατρικής σχολής του Σικάγο ^[14], το οποίο ανεπτύχθη σε καλλιέργεια νεφρικού ιστού, αναφερόμενος ως 229E. Ο καινούργιος ιός προκάλεσε συμπτώματα κοινού κρυολογήματος στα άτομα που

εθελούσια δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην έρευνα, παρόμοια με αυτά του B814. Η ύπαρξη του αιθέρα για άλλη μία φορά έθεσε την παύση της δράσης του ιού. [14,15].

Η μικροσκόπηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αποκάλυψε ότι οι ιοί έχουν τη μορφή, το σχήμα και τις ιδιαίτερες αιχμές που προσιδιάζει με ακίδα.[17] Αξίζει να αναφερθεί πως, τη δεκαετία του 1960 απομονώθηκαν οι πρώτοι ανθρώπινοι κορωνοϊοί από ρινικά επιχρίσματα παιδιού που παρουσίαζε τυπική συμπτωματολογία κοινού κρυολογήματος.[18]

Παράλληλα με την τελευταία ανακάλυψη του καινούργιου στελέχους του κορωνοϊού το 2019 το οποίο προκαλεί τη σοβαρή νόσο COVID-19, 7 κορωνοϊοί ως γνωστόν προσβάλλουν τον άνθρωπο και προκαλούν λοιμώξεις. Οι 4 ενδημικοί ανθρώπινοι κορωνοϊοί: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 και HCoV-HKU1 προκαλούν ήπιες λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού σε ενήλικα άτομα και παιδιά. Οι υπόλοιποι 3 κορωνοϊοί: SARS-CoV-1 (Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο), MERS-CoV (Μέσης Ανατολής Αναπνευστικό Σύνδρομο), και SARS-CoV-2 (Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο 2) είναι νεοαναδυόμενοι κορωνοϊοί που προκαλούν οξείες βαριές αναπνευστικές λοιμώξεις/πνευμονίες και οδηγούν έως και στο θάνατο, Πίνακας 1.[19-26]

Κατάταξη των ανθρώπινων κορωνοϊών

Strain	Discovery	Genera-Lineage	Cellular Receptor	Natural Host	Intermediate Host	Respiratory Symptom
HCoV-229E	1966	α	Aminopeptidase N (CD13)	Bats	Camelids	Mild
HCoV-OC43	1967	β-A	9-O-Acetylated sialic acid (SA)	Rodents	Cattle	Mild
SARS-CoV	2003	β-B	ACE2	Bats	Masked palm civets	Severe acute
HCoV-NL63	2004	α	ACE2	Bats	Unknown	Mild
HCoV-HKU1	2005	β-A	9-O-Acetylated sialic acid (SA)	Rodents	Unknown	Mild
MERS-CoV	2012	β-C	DPP4	Bats	Dromedary camels	Severe acute
SARS-CoV-2	2019	β-B	ACE2	Bats	Pangolin?	Severe acute

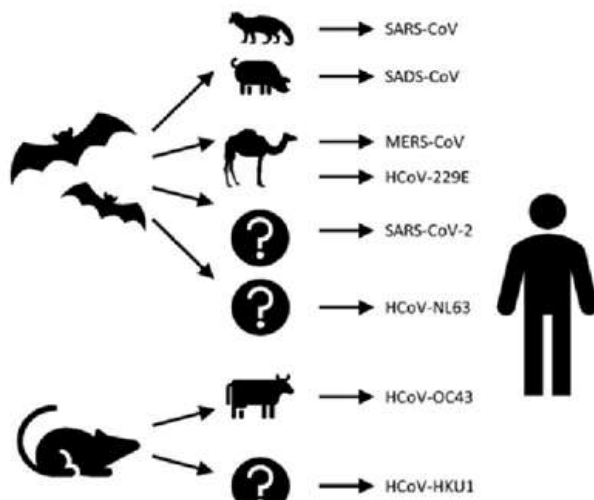
Πίνακας 1. Κατάταξη των ανθρώπινων κορωνοϊών με την ονομασία τους, την χρονολογία εμφάνισής τους, το φυσικό και τον ενδιάμεσο υποδόχο τους, καθώς και την ένταση των αναπνευστικών συμπτωμάτων που προκαλούν στον ξενιστή. Πηγή: Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης, 11 Φεβρουαρίου 2020.

Οι SARS-CoV, HCoV-NL63 και HCoV-HKU1 είχαν περιγραφεί το 2003, 2004 και 2005 αντίστοιχα. Παρά ταύτα, η ανακάλυψη τριών νέων κορωνοϊών δεν συνδέεται απαραίτητα με την αιφνίδια αύξηση αναδυόμενων λοιμώξεων από νέους κορωνοϊούς. Μόνο ο SARS-CoV έχει προσφάτως εισαχθεί στον ανθρώπινο πληθυσμό, ενώ οι άλλοι δύο υπήρχαν και προσέβαλαν τον άνθρωπο για μεγάλο χρονικό διάστημα.[24,27-29] Οι HCoV-HKU1 και HCoV-NL63 είναι αναπνευστικοί κορωνοϊοί, απαντώνται συνήθως το χειμώνα σε παγκόσμιο επίπεδο και επηρεάζουν το ανώτερο και κατώτερο

αναπνευστικό. Τα χαρακτηριστικά αυτά δεν διαφέρουν πολύ από τα συμπτώματα που περιγράφονται για τους ονομαζόμενους «παλιούς» ιούς HCoV-229E και HCoV-OC43.^[21,31-34]

Όλοι οι κορωνοϊοί θεωρούνται ότι προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο, ο οποίος θεωρητικά υπάρχει από το 8000 π.Χ. Υπάρχουν βέβαια και άλλες απόψεις, που υποστηρίζουν την ύπαρξή τους εδώ και 55 εκατομμύρια χρόνια ή περισσότερα, κάτι που συνηγορεί στην μακροπρόθεσμη παράλληλη εξέλιξη με διάφορα είδη πτηνών και νυχτερίδων, Εικόνα 3.^[35]

Οι α-κορωνοϊοί θεωρητικά εμφανίστηκαν το 2400 π.Χ., οι β-κορωνοϊοί το 3300 π.Χ., οι γ-κορωνοϊοί το 2800 π.Χ, ενώ οι δ-κορωνοϊοί το 3000 π.Χ. και αναφέρονται στα πτηνά και ειδικά στις νυχτερίδες^[36,37]. Οι νυχτερίδες λογίζονται ως φορείς των α και β ομάδων κορωνοϊών, ενώ τα πουλιά ως φορείς των γ και δ ομάδων κορωνοϊών, ως απόρροια της γενετικής τους ιδιότητας ως θερμόαιμα σπονδυλωτά.^[38] Η μεγάλη γκάμα ειδών πτηνών και νυχτερίδων ως φορείς προκάλεσε αφενός την εκτεταμένη ανάπτυξη, αφετέρου σε παγκόσμιο επίπεδο, τη διασπορά των κορωνοϊών.^[39]



Εικόνα 3. Η καταγωγή των ανθρώπινων κορωνοϊών με τους αναμενόμενους παρεμβαλλόμενους φορείς. Πηγή: Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. «Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes». Trends in Microbiology. 2017; doi:10.1016/j.tim.2016.09.001

Πολύς μεγάλος αριθμός ανθρώπινων κορωνοϊών προέρχεται από τις νυχτερίδες. Ειδικά ο κορωνοϊός NL63 έχει όμοια χαρακτηριστικά με έναν κορωνοϊό που ανήκει στην ομάδα της νυχτερίδας ονόματι ARCoV.2., ο οποίος χρονολογείται περίπου από το 1190 μ.Χ.-1449 μ.Χ. Ένας άλλος κορωνοϊός, ο 229 E, έχει όμοια χαρακτηριστικά με έναν κορωνοϊό που ανήκει στην ομάδα της νυχτερίδας ονόματι GhanaGrp1 Bt Cov, ο οποίος χρονολογείται περίπου από το 1686 μ.Χ.-1800 μ.Χ. Σε αντιπαράβολή, σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη των β-κορωνοϊών, ο κορωνοϊός των βοοειδών, πιστεύεται ότι κατάγεται από τα ποντίκια και σε καμία περίπτωση από τις νυχτερίδες.

Αναφορικά με τον κορωνοϊό των τρωκτικών, (ο αποκαλούμενος ιός της ηπατίτιδας των τρωκτικών) ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη μόλυνση του ΚΝΣ και του ήπατος των τρωκτικών, λέγεται ότι έχει σχέση τόσο με τον κορωνοϊό των βοοειδών όσο και με του ανθρώπου, τον λεγόμενο OC43. Όσον αφορά τον ανθρώπινο κορωνοϊό HKU1, παρομοίως με τον OC43, πιστεύεται ότι κατάγεται από τα ποντίκια.

Οι νυχτερίδες, τα μοναδικά ιπτάμενα θηλαστικά, είναι δυστυχώς φορείς ενός μεγάλου αριθμού ιών, οι οποίες υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να γίνουν ιδιαίτερα μολυσματικές. Αναφορικά οι ιοί είναι οι εξής: ο ιός Έμπολα, (μόλυνση σε νυχτερίδες, μετά στους γορίλες, χιμπατζήδες και από εκεί στους ανθρώπους), ο ιός Marburg (μόλυνση σε νυχτερίδες κατόπιν στους πιθήκους και μετά στον άνθρωπο), οι ιοί Hendra και Nipah (με ενδιάμεσους ξενιστές άλογα και χοίρους αντίστοιχα) και εν τέλει οι δύο προηγούμενοι κορωνοϊοί των επιδημιών της πρώτης εικοσαετίας του 21ου αιώνα, ο SARS και ο MERS. Το 2003, Ο SARS χρησιμοποίησε ως ενδιάμεσο ξενιστή τις νυχτερίδες μέσω της ασιατικής μοσχογαλής, ενώ το 2009 ο MERS, χρησιμοποίησε ως ενδιάμεσο ξενιστή τις καμήλες.

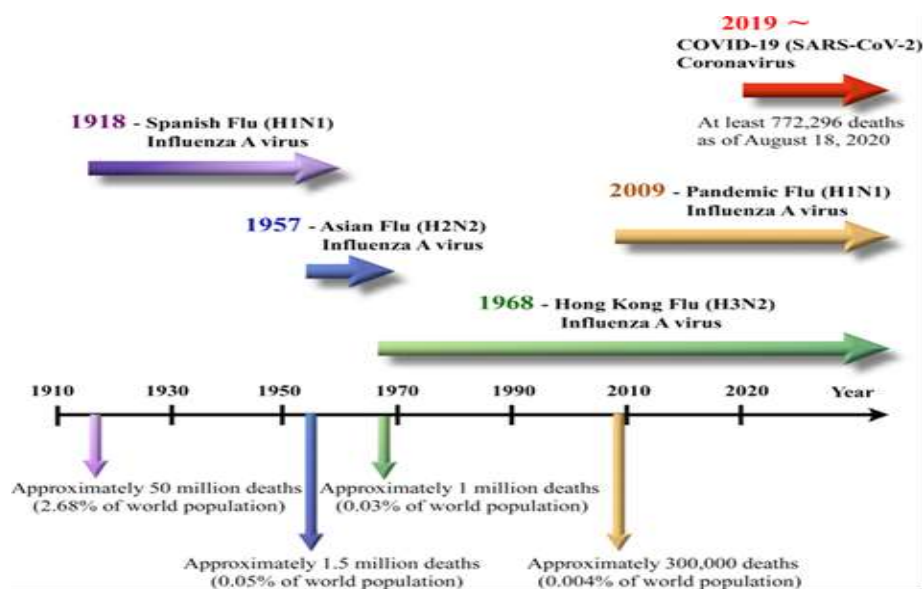
Το ερώτημα που τίθεται είναι το εξής: πως είναι δυνατόν οι ιοί που προέρχονται από τις νυχτερίδες να παραμένουν άκρως μολυσματικοί και επικίνδυνοι για τον άνθρωπο, παρόλο που εμπλέκεται στην διαδρομή τους ένας ξενιστής? Μία πρόσφατη μελέτη Αμερικανών ερευνητών του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας, η οποία δημοσιεύθηκε στην επιθεώρηση eLife, ανέφερε ότι οι νυχτερίδες με το πέρασμα των χρόνων κατάφεραν να αναπτύξουν ένα ιδιαίτερο, με ισχυρούς δεσμούς, ανοσοποιητικό σύστημα βασιζόμενο στην αστραπιαία ανταπόκρισή του στα εξωτερικά ερεθίσματα. Οι ιοί λοιπόν εάν θέλουν να επιβιώσουν και να πολλαπλασιαστούν στα κύτταρα του ξενιστή τους, θα πρέπει να τον ξεπεράσουν σε ταχύτητα πολλαπλασιασμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι ιοί να μην χάνουν αυτήν τους την ιδιότητα και να είναι ενεργοί στο 100% της δυναμικής τους, ακόμα και όταν αλλάζουν ξενιστή.^[40,42]

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι Αμερικανοί επιστήμονες παρατήρησαν ότι το ανοσοποιητικό σύστημα των νυχτερίδων όταν έρθει σε επαφή με τους ιούς, θέτει σε λειτουργία έναν κατακλυσμό ανοσολογικής υπεραντίδρασης, χωρίς όμως να θέτουν τον εαυτόν τους σε κίνδυνο. Σε αντίθεση με τους ανθρώπους, μία τέτοιου είδους αντίδραση, προκαλεί τα λεγόμενα αυτοάνοσα νοσήματα, ή και σε περιπτώσεις οξείας προσβολής μπορεί να επιφέρει πολυοργανική ανεπάρκεια, σηψαιμία ακόμα και θάνατο.

2.2.Επιδημίες-Πανδημίες οφειλόμενες στην οικογένεια των Κορωνοϊών

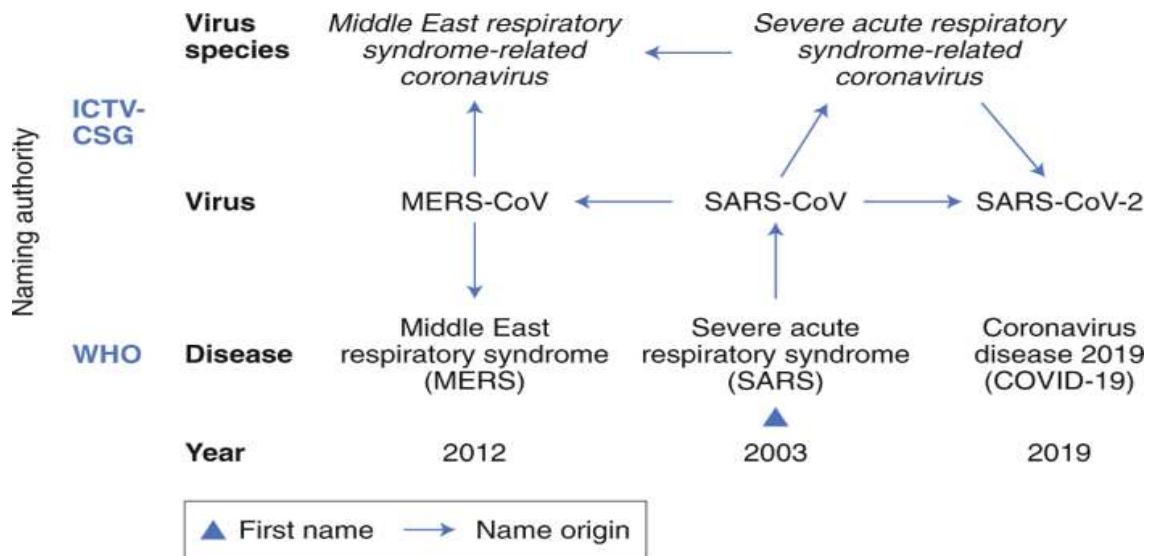
Πανδημία χαρακτηρίζεται μια επιδημία λοιμωδών ασθενειών που εξαπλώνεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς σε μια μεγάλη περιοχή και απειλεί το σύνολο του πληθυσμού. Η μετάβαση από μία επιδημία στην πανδημία γίνεται όταν αυξάνεται γεωμετρικά ο αριθμός των ανθρώπων που νοσούν. Όπως διευκρινίζεται από τον ΠΟΥ, μια ασθένεια δεν είναι πανδημία απλά επειδή εξαπλώνεται ή σκοτώνει πολλούς ανθρώπους, αλλά πρέπει επίσης να είναι και μολυσματική ή μεταδοτική.

Από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα, οι κορωνοϊοί έχουν προκαλέσει τρεις μεγάλης κλίμακας πανδημίες, αυτές του SARS, του MERS και πρόσφατα του COVID-19, Εικόνα 4. [43-49]



Εικόνα 4. Το χρονοδιάγραμμα των πέντε πανδημιών από το 1918 και των ιών που κυκλοφόρησαν μετέπειτα. Πηγή: *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12(1):15-22

Τρία είδη κορωνοϊών (από τα συνολικά επτά), δηλαδή οι κορωνοϊοί: SARS-CoV-1, MERS-CoV, και SARS-CoV-2 είναι κορωνοϊοί που προκαλούν σοβαρές έως και θανατηφόρες λοιμώξεις του αναπνευστικού και βαριές πνευμονίες. Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Τα είδη κορωνοϊών που προκαλούν οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις στον άνθρωπο και οι αντίστοιχες χρονολογικά πανδημίες που προκάλεσαν. Πηγή: *Journal of Virology* 2012; 86(7):3995-4008

1^η Πανδημία: Το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS) είναι μια ιογενής αναπνευστική ασθένεια που προκαλείται από τον κορωνοϊό που ονομάζεται SARS. Το SARS αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ασία το Φεβρουάριο του 2003. Η ασθένεια εξαπλώθηκε σε περισσότερες από δύο δωδεκάδες χώρες στη Βόρεια Αμερική, τη Νότια Αμερική, την Ευρώπη και την Ασία προτού περιοριστεί το παγκόσμιο ξέσπασμα του SARS του 2003.

Το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS) απέκτησε παγκόσμιο ενδιαφέρον τον Φεβρουάριο του 2003, όταν αξιωματούχοι στην Κίνα ενημέρωσαν τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) για 305 περιπτώσεις άτυπης πνευμονίας που είχαν συμβεί στην επαρχία Γκουανγκντόνγκ. Μέχρι τη στιγμή που η νέα μολυσματική ασθένεια δηλώθηκε ότι περιείχε τον Ιούλιο του 2003, είχαν αναφερθεί περισσότερες από 8.000 περιπτώσεις και 780 θάνατοι από 29 χώρες παγκοσμίως.

2^η Πανδημία: Το Αναπνευστικό Σύνδρομο της Μέσης Ανατολής (Middle East Respiratory Syndrome – MERS-CoV), γνωστή και ως “γρίπη των καμηλών”, γιατί ανιχνεύεται στις δρομάδες καμήλες αλλά αυτές εμφανίζουν αντισώματα. Εντοπίστηκε πρώτη φορά στους ανθρώπους το 2012 (ασθενής στην Σ. Αραβία) και προκάλεσε παγκόσμιο συναγερμό γιατί μόλις λίγα χρόνια νωρίτερα, το 2003, είχε εμφανιστεί ο SARS-CoV. Υπάρχει, επίσης, σε νυχτερίδες στην Μ. Ανατολή και στη Αφρική. Δεν είναι γνωστό πώς πέρασε από τις καμήλες στον άνθρωπο. Ο ιός αυτό προκαλεί διαφόρου βαθμού λοίμωξη του αναπνευστικού συστήματος, με συμπτώματα από ήπια μέχρι πολύ σοβαρά, πυρετό, βήχα, δύσπνοια. Ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα όταν νοσήσουν μπορεί να έχουν και μοιραία κατάληξη. Από τον 09/2012 έως και τον 12/2018, είχαν καταγραφεί 2266 περιπτώσεις μόλυνσης από τον MERS-CoV και 804 θάνατοι, σε 27 χώρες (θνησιμότητα 35,5%

των καταγεγραμμένων περιπτώσεων), με τις περισσότερες περιπτώσεις μόλυνσης και θανάτων στη Σαουδική Αραβία (1888 και 730 αντιστοίχως). Υγειονομικοί αξιωματούχοι ανέφεραν για πρώτη φορά τη νόσο στη Σαουδική Αραβία 09/2012.

Μέσω αναδρομικών ερευνών, αργότερα διαπίστωσαν ότι οι πρώτες περιπτώσεις MERS εμφανίστηκαν στην Ιορδανία τον 04/2012. Το εντονότερο και πιο γνωστό ξέσπασμα του MERS εκτός της Αραβικής Χερσονήσου αναφέρθηκε στη Δημοκρατία της Κορέας το 2015, το οποίο συνδέθηκε με την επιστροφή ενός ταξιδιώτη από την Αραβική Χερσόνησο.

3^η Πανδημία: Στην πόλη Wuhan- πρώτη σε πληθυσμό πόλη της επαρχίας Hubol στην Κίνα, τον 12ο μήνα του 2019 ξέσπασε επιδημία άτυπης πνευμονίας. Από τα πρώτα κιάλας 24ωρα, το επίσημο κινεζικό κράτος διαπίστωσε ότι τα αίτια της νέας επιδημίας καταλογίζονται σε έναν νέο κορωνοϊό, που προηγουμένως στο παρελθόν δεν είχε προσβάλει ξανά τον άνθρωπο.^[50-53]

Ο καινούργιος κορωνοϊός SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome –SARS-coronavirus- 2) που απομονώθηκε στις 11 Φεβρουαρίου 2020 προκαλεί τη νόσο COVID-19. Μέσω ταξιδιωτών, η νόσος COVID-19 μεταδόθηκε σε άλλες περιοχές της Κίνας, της Ασίας, της Ευρώπης, της Αμερικής και της Αυστραλίας. Έτσι ο ΠΟΥ (WHO) χαρακτήρισε το φαινόμενο ως Πανδημία. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εντός 30 ημερών μια τοπική επιδημία κατέστη πανδημία. Η θνητότητα από τη νόσο υπολογίστηκε αρχικώς στο 2,3% (2,9% στο Hubei, και 0,4% σε άλλες περιοχές της Κίνας). Όπως διαπιστώνεται, η θνητότητα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και το υποκείμενο νόσημα κυμαίνεται από <0,5 έως και >15%. Όπως ανακοινώθηκε από τον ΠΟΥ, ο κορωνοϊός έχει κρούσματα σε 114 χώρες παγκοσμίως, με πάνω από 118.000 μολύνσεις και έχει προκαλέσει τον θάνατο σε 4.291 ανθρώπους. Δυστυχώς η εξάπλωση είναι αστραπιαία αφού ο αριθμός των κρουσμάτων COVID-19, εκτός κινεζικού εδάφους, 13πλασιάστηκε και οι χώρες στις οποίες έχουν καταγραφεί κρούσματα τριπλασιάστηκαν. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ αναμένεται περαιτέρω κλιμάκωση της πανδημίας, με αύξηση τόσο του αριθμού των κρατών που αναφέρονται ότι επηρεάστηκαν από την πανδημία, όσο και των κρουσμάτων, των νοσηλειών και δυστυχώς των θανάτων.

2.2.1 Κλινικά χαρακτηριστικά των SARS-CoV

Τα πρώιμα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου SARS-CoV-2 μπορεί να είναι παρόμοια με άλλες ιογενείς ασθένειες και δεν είναι αρκετά διακριτά για να επιτρέψουν τη διάγνωση μόνο από σημεία και συμπτώματα. Οι κορωνοϊοί μπορούν να επιφέρουν εικόνα κοινού κρουολογήματος με σοβαρή συμπτωματολογία π.χ. πυρετό με ρίγος, αμυγδαλίτιδα, φαρυγγίτιδα, ωταλγία, κ.α.. Επίσης, η συμπτωματολογία κυμαίνεται από ήπια έως και σοβαρή όπως πνευμονία (είτε πρωτογενής ιογενής πνευμονία, είτε δευτερογενούς αιτιολογίας βακτηριακή πνευμονία) καθώς και βρογχίτιδα (είτε πρωτογενής ιογενής βρογχίτιδα, είτε δευτερογενούς αιτιολογίας βακτηριακή βρογχίτιδα). Το 2003, ο πρώτος κορωνοϊός που απομονώθηκε στον άνθρωπο ήταν στην επαρχία Hubol στην Κίνα

ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία του σοβαρού οξέως αναπνευστικού συνδρόμου (SARS). Ο ιός έχει την ιδιαιτερότητα να προκαλεί λοιμώξεις τόσο του ανώτερου όσο και του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Τα συμπτώματα από το αναπνευστικό αναπτύσσονται συχνά 2 έως 7 ημέρες μετά την έναρξη της ασθένειας και συνήθως περιλαμβάνουν μη παραγωγικό βήχα και δύσπνοια. Μπορεί να εμφανιστούν συμπτώματα ανώτερου αναπνευστικού όπως ρινόρροια και πονόλαιμος, αλλά είναι ασυνήθιστο.

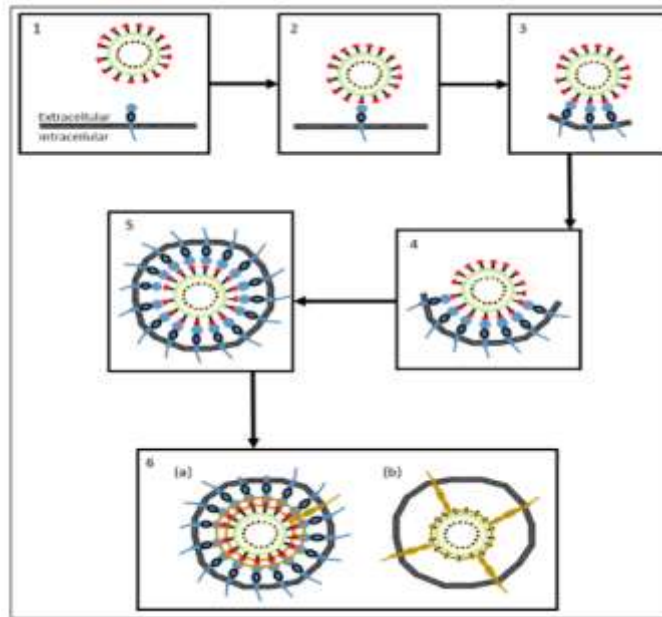
Η ασθένεια αρχίζει συνήθως με συστηματικά συμπτώματα όπως πυρετός, πονοκέφαλος και μυαλγίες. Οι άνδρες προσβάλλονται σε συχνότερη βάση από ότι οι γυναίκες, σε ποσοστό 51,4% : 48,6%.

Η ηλικία ≥ 60 ετών και τα υποκείμενα νοσήματα είναι προδιαθεσικοί παράγοντες (ΑΥ, ΣΔ Ι και ΙΙ, ΧΑΠ, καρκίνος, ΧΝΝ, κ.α.). Οι περισσότερες επιβεβαιωμένες περιπτώσεις ήταν ελαφρές (80,9%) και αφορούσαν άτομα ηλικίας 30-69 ετών. Σοβαρότερα νόσησε το 13,8% των ασθενών με: δύσπνοια, ταχύπνοια (≥ 30 αναπνοές/λεπτό), κορεσμός $O_2 \leq 93\%$, σχέση αρτηριακής μερικής πίεσης οξυγόνου προς κλάσμα εκπνεόμενου οξυγόνου $PaO_2/FiO_2 < 300$. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με εργαστηριακά στοιχεία για τη νόσο SARS-CoV-2 που έχουν αξιολογηθεί μέχρι σήμερα ανέπτυξαν ακτινογραφικά στοιχεία πνευμονίας την 7-10 ημέρα της ασθένειας και οι περισσότεροι (70% -90%) εμφάνισαν λεμφοπενία στην γενική εξέταση αίματος.

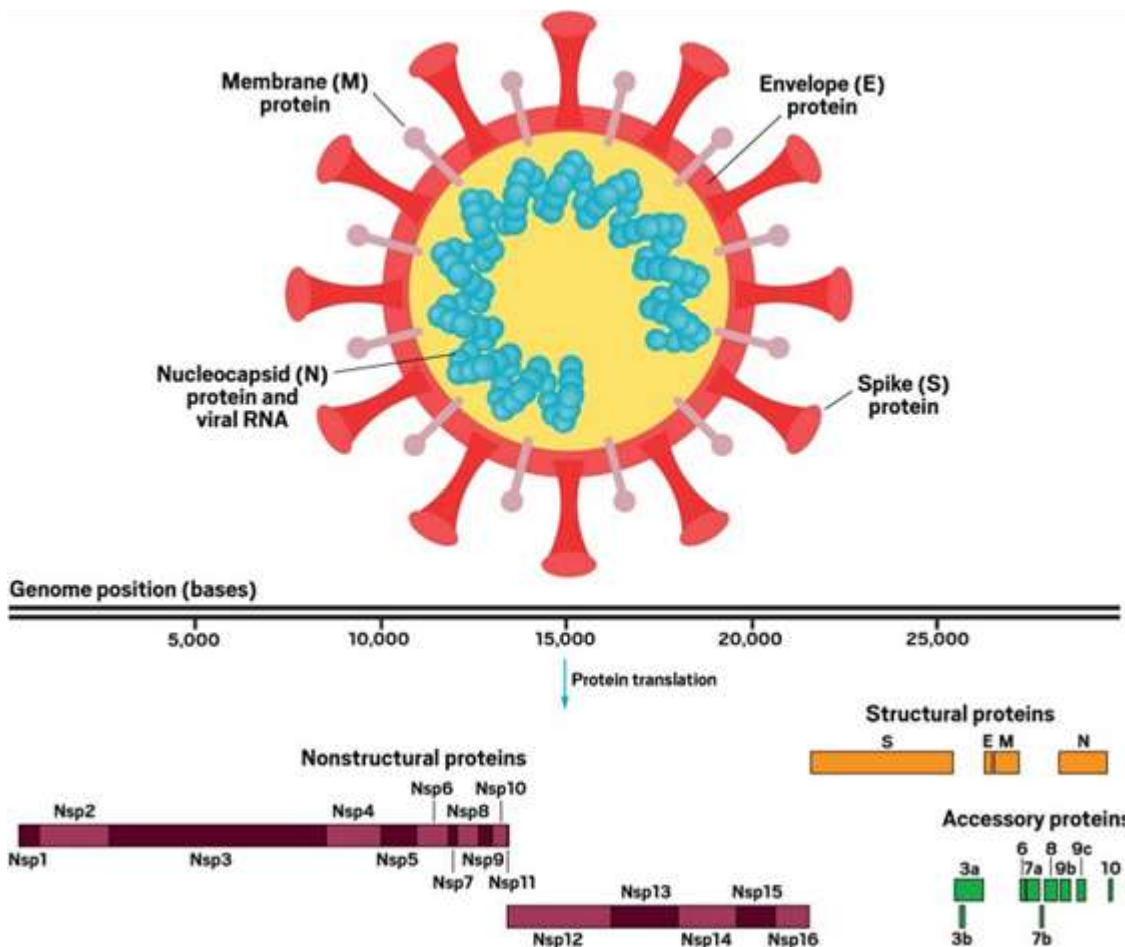
Οι κορωνοϊοί διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό στην επικινδυνότητα και στο προσδόκιμο επιβίωσης. Για παράδειγμα ο MERS-CoV, μπορεί να επιφέρει τον θάνατο σε περισσότερο από το 30% των ανθρώπων που έχει προσβάλλει, ενώ αντίθετα κάποιοι άλλοι είναι σχετικά ηπιότεροι με λιγότερες επιπλοκές και έχουν συμπτωματολογία όπως ένα κοινό κρυολόγημα, με καλύτερη σαφώς πρόγνωση.^[54]

2.3 Ο SARS-CoV-2

Γίνεται αναφορά για έναν καινούργιο τύπο ιού από την «ομάδα» των κορωνοϊών (Σχήμα 1), ο οποίος είναι ευρέως γνωστός εδώ και πολύ καιρό στον ιατρικό κόσμο από τις ακίδες γλυκοπρωτεΐνης που περιβάλλουν σαν κορώνα στην επιφάνεια του και χρησιμεύουν για την προσκόλλησή του στους ιστούς και την είσοδό του στα κύτταρα, Εικόνα 6.^[55-58]



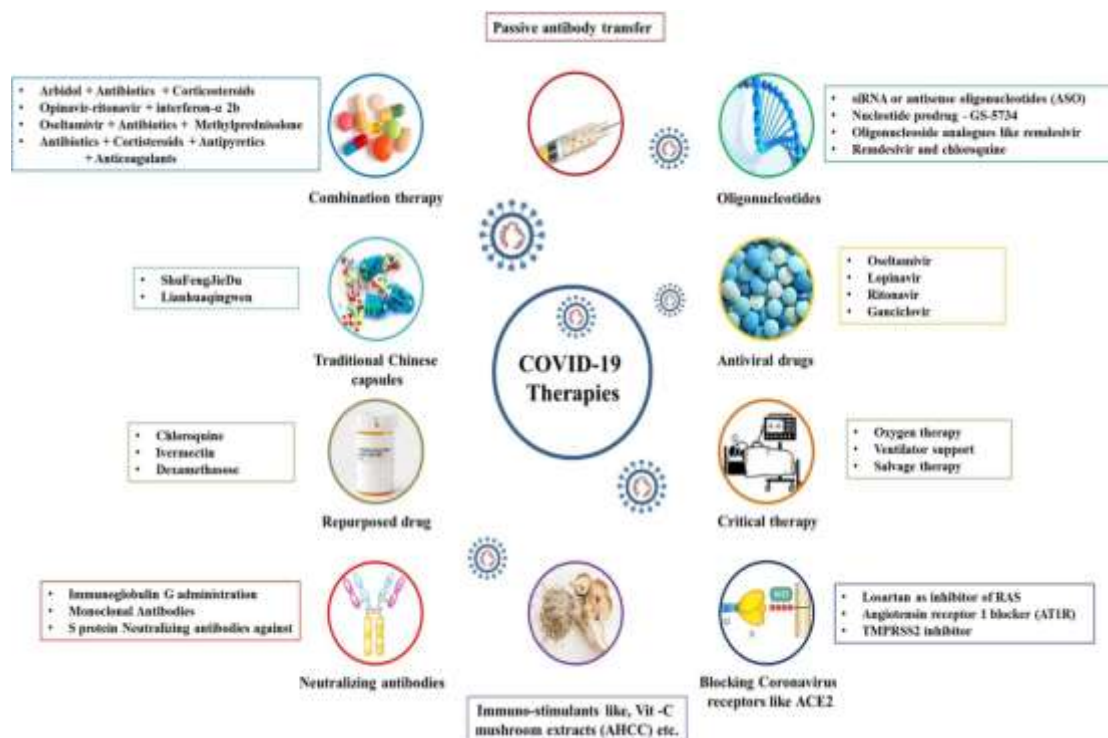
Σχήμα 1. Περιγραφή των μηχανισμών μέσω των οποίων ο SARS-CoV-2 εισέρχεται στα κύτταρα. Πηγή: Jeffrey K Aronson. Coronaviruses-a general introduction. The Centre for Evidence-Based Medicine.2020. <https://www.cebm.net>



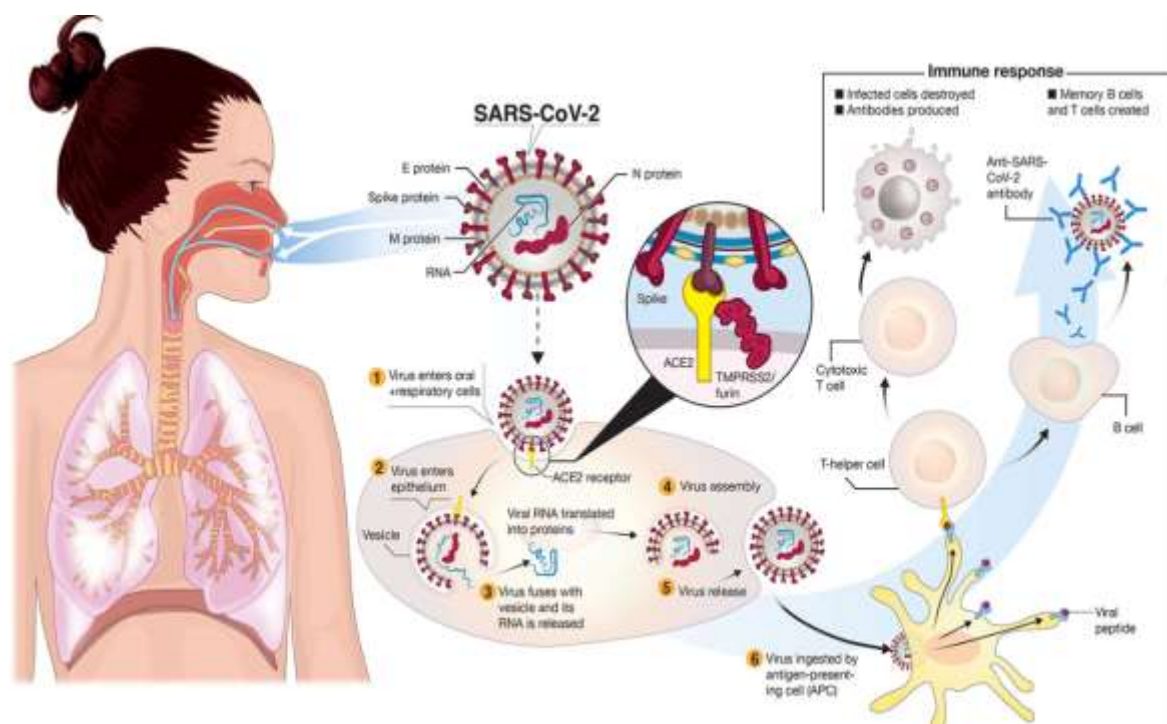
Εικόνα 6. Απεικόνιση του κορωναϊού SARS-CoV-2 και Δομή του γονιδιώματος του. Πηγή: Respir Res 2020, 21:318 του 2012 στην Μέση Ανατολή.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κατανόμασε τον νέο ιό «SARS-Cov-2» (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) και την ασθένεια που προκαλεί «COVID-19» (Corona Virus Disease-19).^[59] Δύο περίπου μήνες μετά τα πρώτα κρούσματα στην πόλη Wuhan της Κίνας, ο κορωνοϊός χαρακτηρίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σαν πανδημία.^[60] Μετά από 125.000 κρούσματα και πάνω από 4.600 θανάτους, ο ΠΟΥ δεν είχε άλλο περιθώριο αναμονής από το να χαρακτηρίσει τον κορωνοϊό SARS-CoV-2 ως πανδημία COVID-19, αφού ο ιός είχε πλέον εξαπλωθεί σε δεκάδες χώρες του κόσμου -ανάμεσά τους και την Ελλάδα- με δεκάδες χιλιάδες κρούσματα, νοσηλείες και αναπόφευκτα θανάτους.^[61-63] Πολλές χώρες έλαβαν πρωτοφανή μέτρα, με καραντίνα και εγκλεισμούς, το γνωστό lock-down, με άμεσο στόχο την ανάσχεση της εξάπλωσης της πανδημίας.^[64,65] Η επιβολή καραντίνας στα κράτη, επέφερε αναστολή λειτουργίας των ιδιωτικών επιχειρήσεων, των καταστημάτων, των σχολικών και πανεπιστημιακών δομών, την υπολειτουργία με προσωπικό ασφαλείας των δομών του δημοσίου τομέα, τον περιορισμό των ταξιδιωτικών προορισμών, τα παραπάνω ήταν κάποια από τα μέτρα που επιβλήθηκαν ^[26,40]. Βασική προϋπόθεση και ακρογωνιαίος λίθος ανάσχεσης της πανδημίας ήταν και παραμένει η σχολαστική τήρηση των βασικών κανόνων υγιεινής.^[66]

Ο ιός είναι πολύ ευκολομετάδοτος από άτομο σε άτομο και εξαπλώνεται αστραπιαία, προσβάλλοντας άτομα κάθε ηλικιακής ομάδας.^[67,68] Στις περισσότερες περιπτώσεις προκαλεί ήπια νόσο, όμως μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα επικίνδυνος, πιο σπάνια για τον παιδικό πληθυσμό και συχνότερα για τις ευπαθείς ομάδες. Δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τον ιό, γι' αυτό και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας διαθέτει λίγες πληροφορίες για την κατάστασή του. Η ανάλογη έρευνα διεξάγεται παράλληλα με την πανδημία, και έχει στόχο την ανάπτυξη προληπτικών, και θεραπευτικών μέσων ενάντια στον ιό, καθώς και τεχνικών εξουδετέρωσης αυτού. Μέχρι και σήμερα δεν υφίσταται ειδική θεραπεία για τη νόσο COVID-19. Οι θεραπείες που εφαρμόζονται είναι υποστηρικτικές και έχουν στόχο την αποτροπή σοβαρών επιπλοκών, Εικόνα 7.^[69,70]



Εικόνα 7. Προσδιορισμός ειδικής φαρμακευτικής αγωγής όσον αφορά την καταπολέμηση της νόσου COVID-19. Πηγή: Rabaan A.A, Al-Ahmed S.H, Sah R. et al. (2020). <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00384>

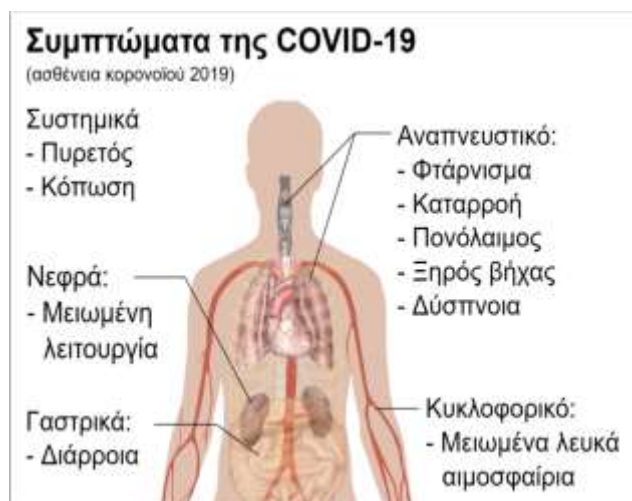


Εικόνα 8. Μηχανισμός διασποράς, και αρχικής ύπαρξης του ιού SARS-CoV-2 και της επακόλουθης νόσου Covid-19. Πηγή: Zhang R, Li Y, Zhang AL, Wang Y, and Molina MJ, 2020: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009637117>

Το καινούργιο στέλεχος του κορωνοϊού SARS-CoV-2, εξαπλώνεται από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω των σταγονιδίων από το βήχα ή το φτέρνισμα και τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως εντός 2-5 ημερών (μέγιστο χρονικό διάστημα 14 ημέρες) από τη μόλυνση. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το κάθε άτομο που νοσεί μολύνει 1,4 – 2,5 άλλα άτομα (συγκριτικά στην εποχική γρίπη κάθε ασθενής μολύνει κατά μέσο όρο 1,3 άλλα άτομα).

2.3.1.Κλινικά χαρακτηριστικά και Πρόληψη της νόσου SARS-CoV-2

Τα πιο συχνά συμπτώματα της λοίμωξης από τον COVID-19 είναι: Πυρετός (88%) • Ξηρός βήχας (68%) • Αναπνευστική δυσχέρεια (19%), Εικόνα 9.

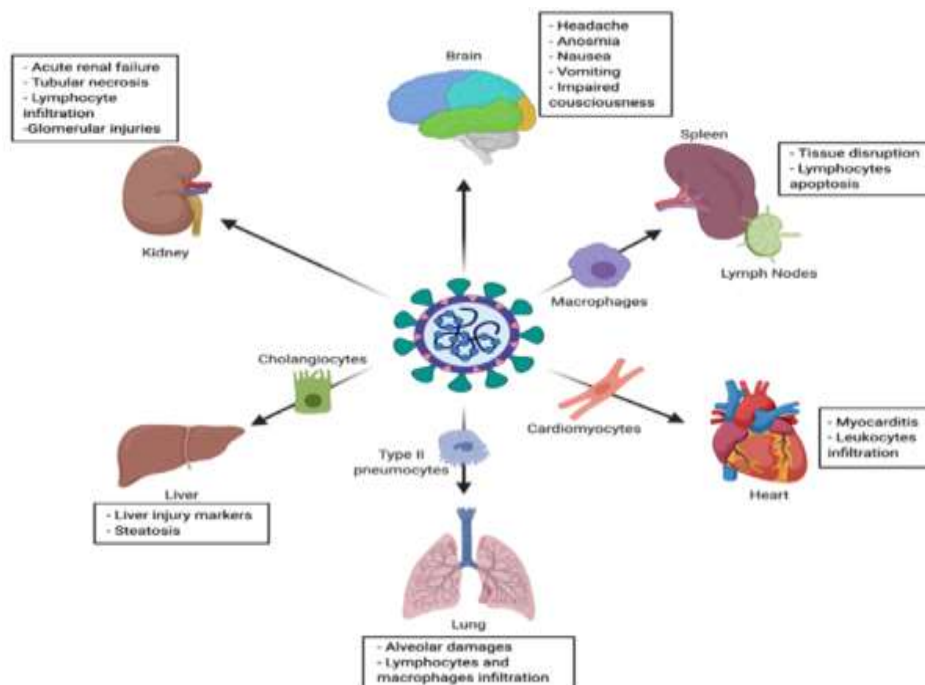


Εικόνα 9. Τα συμπτώματα της COVID-19 που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2. Πηγή: Mikael Häggström. Symptoms of coronavirus disease 2019. www.who.int . (time line 26/03/21)

Η δυσπεψία και η διάρροια είναι ασυνήθεις εκδηλώσεις, ωστόσο, παρατηρείται στο 50% περίπου των νοσηλευόμενων. Άλλα σημεία είναι η ανοσμία, που αποτελεί σημείο και άλλων ιώσεων του ανώτερου αναπνευστικού, οι μυαλγίες, η κεφαλαλγία και ο πονόλαιμος, Εικόνα 10. Ο χρόνος επώασης (ο χρόνος μεταξύ εγκατάστασης του ιού στον οργανισμό μας και της έναρξης των συμπτωμάτων της λοίμωξης) για τον COVID-19 υπολογίζεται στις 5-6 ημέρες. Ωστόσο, μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως και 14 ημέρες.

Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 2 έως 10 ημέρες. Τα πρώιμα συστηματικά συμπτώματα ακολουθούν στο διάστημα εντός 2 έως 7 ημερών και συνοδεύονται από ξηρό βήχα ή / και δύσπνοια, συχνά χωρίς συμπτώματα ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Υπάρχει μεγάλη

ανάπτυξη ακτινογραφικά επιβεβαιωμένης πνευμονίας την 7-10 ημέρα της ασθένειας, συνοδευόμενη από λεμφοπενία στις περισσότερες περιπτώσεις στην γενική εξέταση αίματος.



Εικόνα 10. Προσβολή ανθρώπινων οργάνων την περίοδο της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2.

Πηγή: Lebeau G, Vagner D, et al. Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. <https://doi.org/10.3390/ijms21165932>

Όσον αφορά την επιτήρηση της επιδημίας, και την έγκαιρη ανίχνευση πιθανών κρουσμάτων, λαμβάνονται υπόψιν συμπτώματα όπως: πυρετός, βήχας, δυσκολία στην αναπνοή, ενώ μερικοί άνθρωποι παρουσίασαν διάρροια και ναυτία / έμετο.

Από τον υπόλοιπο έλεγχο συστήνεται: ακτινογραφία θώρακος, παλμική οξυμετρία, πλήρης αιματολογικός έλεγχος (γενική αίματος, ΤΚΕ, CRP, βιοχημικός έλεγχος).

Από το μικροβιολογικό έλεγχο συστήνεται καλλιέργεια Sputum, Gram χρώση, έλεγχος για ιογενή αναπνευστικά παθογόνα (ιδίως γρίπη Α και Β και αναπνευστικό συγκυτικό ιό), δείγματα για το διαγνωστικό τεστ του αντιγόνου Legionella και πνευμονιοκόκκου στα ούρα.

Μετάδοση/ διασπορά

Ο SARS-CoV-2, όπως και άλλοι κορωναϊοί, εξαπλώνεται πιθανώς από αναπνευστικές εκκρίσεις ενός μολυσμένου ατόμου, π.χ. μέσω του βήχα.

Μέτρα ατομικής υγιεινής

Τα μέτρα ατομικής υγιεινής περιλαμβάνουν:

- Τακτική και σωστή υγιεινή των χεριών με υγρό σαπούνι και νερό, για τουλάχιστον 20 sec και προσεκτικό στέγνωμα αυτών με χάρτινες χειροπετσέτες μιας χρήσης και απόρριψη αυτών στους κάδους απορριμμάτων.
- Αντί του πλυσίματος χεριών, μπορεί να εφαρμοστεί καλό τρίψιμο των χεριών με αντισηπτικό αλκοολούχο διάλυμα.
- Αποφυγή επαφής χεριών με τη μύτη, στόμα, μάτια για τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης.
- Σε βήχα ή φτέρνισμα καλύπτεται η μύτη και το στόμα με το μανίκι στο ύψος του αγκώνα ή με χαρτομάντηλο, απορρίπτεται το ήδη χρησιμοποιημένο χαρτομάντηλο στους κάδους απορριμμάτων και γίνεται εκ νέου πλύσιμο των χεριών.
- Αποφυγή στενής επαφής, εφόσον αυτό είναι εφικτό, με οποιοδήποτε συμπτωματικό άτομο το οποίο έχει συμπτώματα από το αναπνευστικό π.χ. καταρροή, βήχα, φτέρνισμα κ.α.
- Παραμονή στο σπίτι και απουσία από τον εργασιακό χώρο οποιουδήποτε ατόμου εμφανίζει συμπτωματολογία λοίμωξης αναπνευστικού.

Κοινωνική απόσταση

Η κοινωνική απόσταση (social distancing) εφαρμόζεται τώρα στη χώρα μας ως κύριο μέτρο ανάσχεσης της πανδημίας και περιλαμβάνει αποφυγή συναθροίσεων και συγχρωτισμού, π.χ. δημόσιες υπηρεσίες, εκδηλώσεις, κ.α.. Σε προηγούμενες επιδημίες η έγκαιρη εφαρμογή του μέτρου αυτού έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική τόσο στην καθυστέρηση εμφάνισης νέων κρουσμάτων όσο και στην επίτευξη της διασποράς των κρουσμάτων σε δεύτερο χρόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Βιοπαθολογικό εργαστήριο

3.1 Δομή Βιοπαθολογικού Εργαστηρίου

Το Βιοπαθολογικό Εργαστήριο εντάσσεται στον εργαστηριακό τομέα και συμμετέχει καθοριστικά στην αποτελεσματική λειτουργία του Νοσοκομείου [71-82], δεδομένου ότι με την σωστή οργάνωση και λειτουργία του αποσκοπεί:

- Στην σωστή και έγκαιρη διάγνωση των προβλημάτων υγείας των ασθενών καθώς και στην αποτελεσματική αντιμετώπιση αυτών.
- Στην μείωση του χρόνου παραμονής του ασθενούς στο νοσοκομείο με σκοπό την ταχύτερη επάνοδό του στον εργασιακό χώρο.
- Στην ελαχιστοποίηση των δαπανών για νοσοκομειακή περίθαλψη, καθώς και των δαπανών της σχέσης κόστους νοσηλείας, θεραπείας, και αποθεραπείας του ασθενούς.

Η ευαισθησία και η αξιοπιστία των εργαστηριακών εξετάσεων διέπεται από τη χρήση σύγχρονων τεχνικών, εφαρμογών εξωτερικού και εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου αυτών, καθώς και από την υψηλή επιστημονική κατάρτιση του υγειονομικού προσωπικού.

Ανάλογα με το είδος των εξετάσεων, το Βιοπαθολογικό Εργαστήριο ταξινομείται στα επιμέρους τμήματά του που είναι: το Μικροβιολογικό, το Αιματολογικό, το Βιοχημικό- Ορμονολογικό, το Ανοσολογικό, το Τμήμα Ανοσολογίας Λοιμώξεων-Ορολογικό και το Τμήμα Μοριακής βιολογίας

3.1.1 Μικροβιολογικό Τμήμα

Το Μικροβιολογικό Τμήμα ασχολείται με τη μικροβιολογική διάγνωση. Σε αυτό λειτουργούν τα τμήματα της Γενικής Μικροβιολογίας, των Καλλιεργειών, καθώς και το τμήμα της Κλινικής Μικροβιολογίας με δραστηριότητες:

- Μικροσκοπική ανεύρεση παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρώση κατά Gram
- Καλλιέργειες για την ανεύρεση και απομόνωση παθογόνων αερόβιων και αναερόβιων βακτηριδίων και μυκήτων, από κλινικά δείγματα σε στερεά (π.χ. τριβλία) και υγρά θρεπτικά υλικά (π.χ. ζυμοί)
- Αιμοκαλλιέργειες για αναερόβια, αερόβια, μύκητες, βακτηρίδια
- Ταυτοποίηση με αυτόματο σύστημα ταυτοποίησης μικροβίων (π.χ. VITEK)
- Έλεγχος ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας των μικροβίων (MIC), έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και στα αντιμυκητησιακά.
- Μικροσκόπηση άμεσου παρασκευάσματος και καλλιέργειες βιολογικών υγρών (αρθρικό, ΕΝΥ, πλευριτικό, περικαρδιακό, περιτοναϊκό,) και υγρών περιτοναϊκών πλύσεων
- Οξεάντοχη χρώση Ziehl- Nielsen για τη μικροσκοπική ανεύρεση οξεάντοχων μικροβίων
- Ειδική χρώση Ziehl-Nielsen για την ανεύρεση νοκάρδιας και κρυπτοσποριδίου στα κόπρανα κ.α.
- Καλλιέργειες σε ειδικά θρεπτικά υλικά για την ανίχνευση μυκοβακτηριδίων
- Ανίχνευση Chlamydia trachomatis με τη τεχνική του ανοσοφθορισμού
- Ανίχνευση Ureaplasma Urealyticum και Mycoplasma hominis στο ουρογεννητικό σύστημα
- Ανίχνευση Pneumocysti carini με ανοσοφθορισμό
- Ανίχνευση του αντιγόνου του S.pneumoniae - πνευμονιοκόκκου σε δείγμα ούρων

- Ανίχνευση αντιγόνου της Legionella σε δείγμα ούρων
- Ανίχνευση Clostridium difficile σε δείγμα κοπράνων
- Ανίχνευση Leptospira σε δείγμα ούρων με ειδική χρώση
- Γενική και παρασιτολογική εξέταση κοπράνων
- Καλλιέργεια και γενική εξέταση ούρων
- Τεστ κυήσεως
- Mayer κοπράνων -ανίχνευση αιμοσφαιρίνης στα κόπρανα

Ειδικότερα, στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας, για την καλύτερη διερεύνηση των εκάστοτε λοιμώξεων εκτελείται μοριακός έλεγχος τόσο για τη διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων όσο και ιογενών.

Στα επιμέρους υποτομήματα του τομέα της Μοριακής Βιολογίας εκτελούνται οι παρακάτω διαγνωστικές εξετάσεις :

- Ορολογικές εξετάσεις ιογενών, βακτηριακών, παρασιτικών και μυκητιασικών λοιμώξεων
- Καλλιέργειες δειγμάτων βιολογικών παραγόντων
- Αντιβιογράμματα και έλεγχος μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά (MIC)
- Ανίχνευση παρασίτων λοιμωδών ασθενειών

Οι αρμοδιότητες του Εργαστηρίου Κλινικής Μικροβιολογίας είναι οι εξής :

- Ερευνητικό έργο
- Πρακτική και θεωρητική κατάρτιση εργαζομένων
- Διασφάλιση και τήρηση πρωτοκόλλων Βιοασφάλειας στους χώρους υγείας
- Επιδημιολογική επιτήρηση στις δομές υγείας
- Νοσοκομειακές λοιμώξεις-αντιμικροβιακή αγωγή
- Πρακτική άσκηση εργαζομένων
- Συνεργασία με άλλες δομές επιδημιολογικής και εργαστηριακής διάγνωσης, π.χ. ΕΣΔΥ,ΕΚΕΑ

Το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας ασχολείται με δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς και πρέπει να υπάρχει δυνατότητα απομόνωσης των παθογόνων αυτών μικροοργανισμών, χρησιμοποιώντας κατάλληλους χώρους, ειδικό υλικοτεχνικό εξοπλισμό, καθώς και εξειδικευμένο εξοπλισμό για την προστασία των εργαζομένων. Πρέπει να μειώνεται στο ελάχιστο η πιθανότητα επιμολύνσεων τόσο των κλινικών δειγμάτων όσο και των εργαστηριακών μεθόδων, ώστε να αποτραπεί η δημιουργία ψευδώς (-) ή ψευδώς (+) αποτελεσμάτων.

Το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας πρέπει να το σχεδιάζουν και το κατασκευάζουν Αρχιτέκτονες, Μηχανικοί και κατασκευαστές με γνώσεις νοσοκομειακών υποδομών. Κατά τον σχεδιασμό των νοσοκομειακών συγκροτημάτων, ακολουθείται η διαδικασία του στοιχειοθετημένου σχεδιασμού (Evidence-based Design ή EBD), που ανέπτυξε την έννοια του ο Ulrich το 1984, ενώ

η συμβολή των Ιατρών-Βιοπαθολόγων βοηθάει στη ορθή λήψη των αποφάσεων, τη μείωση του κινδύνου, τον εξορθολογισμό των οικονομικών απαιτήσεων και την αποτροπή κατασκευής λανθασμένων οικοδομοτεχνικών κατασκευών.

Το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας πρέπει να έχει ενιαίους χώρους και να βρίσκεται εντός του νοσοκομείου γιατί:

- Γίνεται γρήγορη και ορθή μεταφορά των κλινικών δειγμάτων στο εργαστήριο
- Διασφαλίζει την αποδοτικότερη εκπαίδευση, καλύτερη συνεργασία μεταξύ του προσωπικού
- Υπάρχει καλύτερη συνεργασία μεταξύ κλινικών και εργαστηριακών ειδικοτήτων
- Υπάρχει επαρκής εργαστηριακή ασφάλεια

Το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας πρέπει να είναι τόσο μεγάλο, όσο:

- Για κάθε υγειονομικό, πρέπει να υπάρχουν 6 m² χωρίς να προσμετρώνται τα ογκώδη εργαστηριακά μηχανήματα (οι τοίχοι, διάδρομοι, αποθήκες, ο εξοπλισμός γραφείου)
- Οι χώροι πρέπει να είναι μεγαλύτεροι αν θεωρείται ότι είναι για εργαστήριο που θα εξυπηρετεί κλινικούς και πανεπιστημιακούς σκοπούς, ή ταυτόχρονα για κλινικούς, πανεπιστημιακούς, και ερευνητικούς σκοπούς
- Να υπάρχει πρόβλεψη για περαιτέρω διάθεση χώρων για μελλοντική χρήση

Οι Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος του εργαστηρίου είναι:

- Θέσεις εργασίας νοσοκομείου
- Απαιτούμενος υλικοτεχνικός εξοπλισμός
- Ειδικές κτιριακές εγκαταστάσεις
- Η παραλαβή των κλινικών δειγμάτων , η γκάμα των εξετάσεων και ο αθροιστικός αριθμός τους
- Η διεύθυνση των δειγμάτων των ασθενών
- Οι χρώσεις (Gram, Giemsa, κλπ)
- Η μικροσκόπηση των δειγμάτων (κοινότυπο μικροσκόπιο, ηλεκτρονικό, ειδικό για ανοσοφθορισμό κ.ά.)
- Χώρος παρασκευής τριβλίων
- Τμήμα καθαρισμού, αποστείρωσης και φύλαξης πραγμάτων (πιπετών, νεφροειδών, και μηχανημάτων για πολλαπλές χρήσεις κλπ)
- Ειδικά απομονωμένα τμήματα για παράσιτα, οξεάντοχα μικρόβια, μύκητες
- Τμήμα μοριακού ελέγχου
- Ειδικά τμήματα για κοινότυπους ιούς, βακτήρια
- Εξοπλισμός γραφείου για το προσωπικό, αποθηκευτικοί χώροι, τμήμα συνεδριάσεων
- Δωμάτια ξεκούρασης για το προσωπικό καθώς και για τους εφημερεύοντες (εφημερείο)

Διάταξη των πάγκων στο Κλινικό Εργαστήριο:

- ✓ Η Διάταξη πρέπει να έχει το σχήμα Π για να αποφεύγεται ο συνωστισμός και να υπάρχει καλύτερη αξιοποίηση των χώρων
- ✓ Η Ευθεία διάταξη προτιμάται για Πανεπιστημιακά Εργαστήρια όπου κυκλοφορούν πολλοί εργαζόμενοι

- Για τον τεχνολογικό εξοπλισμό η σχέση κόστους-οφέλους πρέπει να διαδραματίζει βασικό ρόλο ώστε μηχανήματα εξελιγμένης τεχνολογίας να προτιμώνται, συγκριτικά με τα παλαιότερα. Παλαιότερης κοπής μηχανήματα, δοκιμασμένα στον χρόνο και στην εργασία, δεν θα πρέπει να απορρίπτονται ,πόσο μάλλον όταν έχουν μικρότερη οικονομική επιβάρυνση.
- Υλικοτεχνικός εξοπλισμός • Παροχή σταθερής τάσης ηλεκτρικό ρεύμα • Σταθεροποιητής τάσεως UPS (Uninterruptible Power Supply) για την απρόσκοπτη και αξιόπιστη λειτουργία των μηχανημάτων •Υπαρξη γεννήτριας σε περίπτωση διακοπής ρεύματος • Κατάλληλα σχεδιασμένο σύστημα κλιματισμού, θέρμανσης και αερισμού, air-condition • Ειδικότερα στην παροχή και διακίνηση φυσικού αερίου -gas- χρειάζεται μεγάλη προσοχή για την αποτροπή ατυχήματος λόγω διαρροής , ανάφλεξης και πυρκαγιάς.
- Ειδικός εξοπλισμός για ατυχή συμβάντα • Ειδικά φάρμακα για οξέα, αλκάλια και ραδιενεργά υλικά σε κουτί πρώτων βοηθειών • Σε περίπτωση μόλυνσης από μολυσματικά αντικείμενα, ή βιολογικούς παράγοντες απαιτείται η χωρίς καθυστέρηση επικοινωνία με την επιτροπή νοσοκομειακών λοιμώξεων και τον ειδικό λοιμωξιολόγο της υγειονομικής μονάδας
- Τηλεφωνικοί αριθμοί έκτακτης ανάγκης, σχέδιο εκκένωσης σε περίπτωση ατυχών συμβάντων • Για την άμεση διαχείριση τραυματισμών των υγειονομικών • Για την διαχείριση φυσικών καταστροφών (σεισμών, πυρκαγιών, πλημμυρών, κ.α.) • Εκπαίδευση και ασκήσεις ετοιμότητας (ασκήσεις ενδεχόμενης πυρκαγιάς ,σεισμού κ .α.)

Το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας πρέπει να τηρεί τα πρωτόκολλα ασφαλείας για το προσωπικό, παρέχοντας τα κατάλληλα μέτρα Βιοασφάλειας, σε ένα σωστά διαμορφωμένο χώρο εργασίας ο οποίος θα πρέπει να:

-Τονώνει την διάθεση και τις ελπίδες των εργαζομένων

- Καλυτερεύει τις εργασιακές συνθήκες

- Μειώνει τα πιθανά λάθη

-Διατηρεί ακέραιο το προσωπικό χωρίς μετακινήσεις και αποσπάσεις

-Μειώνει το χρόνο διενέργειας των εργαστηριακών εξετάσεων χωρίς όμως να κάμπτεται η ποιότητα και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων

Χωροταξικά και για θέματα Ασφάλειας ο τομέας Κλινικής Μικροβιολογίας απαιτείται να διαθέτει δύο εισόδους, διάδρομο ανάμεσά τους και από τις δύο πλευρές ξεχωριστά (Διάδρομοι πλάτους 2,5 m) και να υπάρχει πρόβλεψη για ασφαλή μετακίνηση του προσωπικού, δυνατότητα μεταφοράς οργάνων-μηχανημάτων μεγάλου όγκου, καθώς και σχέδιο έκτακτων περιπτώσεων για ασφαλή εκκένωση.

Κατόπιν της εισόδου πρέπει να υπάρχει ο εξοπλισμός γραφείου, η αίθουσα συνεδριάσεων , οι χώροι ξεκούρασης του προσωπικού, οι χώροι φύλαξης βιβλίων, ώστε οι επισκέπτες του εργαστηρίου να μην εισέρχονται στο κυρίως εργαστήριο και να δημιουργείται όχληση. Έτσι με αυτόν τον τρόπο αποτρέπονται ατυχή συμβάντα, μολύνσεις και η χωρίς νόημα απασχόληση του προσωπικού.

Δίπλα στην είσοδο του τομέα, , στο κυρίως τμήμα του εργαστηρίου, είναι ο ειδικός χώρος υποδοχής των δειγμάτων των ασθενών. Πρέπει να επικρατεί ηρεμία και τάξη ώστε να αποφευχθούν τυχόν ατυχήματα.. Η υποδοχή δειγμάτων πρέπει να γίνεται μέσω σωληνωτού ταχυδρομείου, σε κατάλληλο πάγκο υποδοχής, με εξοπλισμό ελέγχου καταλληλότητας του δείγματος σε ειδικές οβίδες. Πρέπει να υπάρχει το λεγόμενο Fume Hood , το οποίο αποσκοπεί στην ασφάλεια του προσωπικού και την απαγωγή τυχόν κακοσμίας από τα δείγματα, επωαστικό κλίβανο και ψυγείο ή ψυγεία-καταψύκτες συγκεντρωμένα σε ένα χώρο για θέμα καθαρά πρακτικότητας.

Στο κυρίως εργαστήριο η διάταξη έχει ως εξής:

- Η μία άκρη θα πλαισιωθεί από όλα τα μεγάλα όργανα και μηχανήματα (επωαστικοί κλίβανοι, ΘΒΑ, ψυγεία ,φυγόκεντροι, κ.α.)
- Η άλλη άκρη θα μπορεί να υποστηρίξει υποτμήματα πολλών μεθόδων και εξετάσεων (τμήμα χρώσεων κ.α.)
- Άλλα υποτμήματα είναι τα εξής :
 - Τμήμα ιολογικού ελέγχου
 - Τμήμα βακτηριολογικού ελέγχου
 - Τμήμα παρασίτων
 - Τμήμα ελέγχου μυκήτων
 - Ορολογικό (άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός)
 - Τμήμα μοριακού ελέγχου
 - Τμήμα αναεροβίων , αεροβίων καλλιέργειών κ.ά.
 - Χώροι αποθήκευσης
 - Χώρος παρασκευής ειδικών τριβλίων (αιματούχο άγαρ, σοκολατούχο, κ.α.)

Στην άκρη του εργαστηρίου εδρεύουν τα τμήματα που διαχειρίζονται υλικά, δοκιμασίες και κλινικά δείγματα υψηλού κινδύνου, όπως πχ. καλλιέργειες για μυκοβακτηρίδια, μηνιγγιτιδόκοκκο, πνευμονιόκοκκο κ.α.

Είναι απαραίτητη η ύπαρξη και η λειτουργία:

- Εσώκλειστου δωματίου με διπλά ανοιγόμενη πόρτα εισόδου, δίχως μετατόπιση αέριας μάζας (Βιοασφάλεια τύπου III)
- Ειδικά διαμορφωμένο σύστημα αερισμού, το οποίο δεν θα επικοινωνεί με το υπόλοιπο εργαστήριο
- Διαδικασία απολύμανσης της αέριας μάζας που εξέρχεται μέσω φίλτρων
- Ύπαρξη απολυμαντικών , αποστειρωτικών σκευασμάτων
- Ύπαρξη ντουζιέρας και αποδυτηρίων δίπλα στον κυρίως χώρο εργασίας.

Στο κεντρικό εργαστήριο και ειδικότερα στην άκρη του εργαστηρίου (για να απάνονται οι κακοσμίες) τοποθετείται:

- το αυτόκαυστο

- οι νιπτήρες, που πρέπει να τοποθετούνται σε όλους τους χώρους δίπλα στην έξοδο και να ενεργοποιούνται με ειδικό κουμπί- αισθητήρα ή με το κάτω άκρο
- νιπτήρας και ντουζιέρα τα οποία θα μπορεί να προσεγγίσει ο οποιοσδήποτε τραυματιστεί σε 10 δευτερόλεπτα το αργότερο
- νιπτήρας και ντουζιέρα κρύου νερού, με τεχνική εκτόξευσης διάρκειας ενός τετάρτου της ώρας.

Το μικροβιολογικό εργαστήριο είναι υποχρεωμένο βάσει πρωτοκόλλου να διαθέτει «Σχέδιο εκκένωσης του Τμήματος», με τις αντίστοιχες σημάνσεις σε τοίχους και πόρτες σε εμφανές τοποθετημένο σημείο. Σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης οι εργαζόμενοι δεν πρέπει να κατευθύνονται όλοι προς την ίδια κατεύθυνση, εκτός εάν δεν υπάρχει άλλη επιλογή .

Όλη η οικοδομοτεχνική υποστήριξη των εργαστηρίων πρέπει να είναι ομαλής και λείας επιφάνειας, χωρίς γωνίες και προεξοχές, αδιάβροχη, να καθαρίζεται χωρίς δυσκολία, να είναι ανθεκτική στα απολυμαντικά και στα χημικά διαβρωτικά σκευάσματα.

Οι πόρτες πρέπει να παρέχουν οπτική επαφή με τον εξωτερικό χώρο και να κλείνουν αυτοματοποιημένα, να ανοίγουν από μέσα προς τα έξω για την γρήγορη εκκένωση σε περίπτωση ανάγκης, ενώ όλοι οι εργαστηριακοί χώροι θα πρέπει να είναι προσβάσιμοι για τον κατάλληλο, ενδεδειγμένο καθαρισμό.

3.1.2 Αιματολογικό Τμήμα

Το Αιματολογικό διαρθρώνεται σε επιμέρους τμήματα, στο καθένα από τα οποία διενεργούνται διαφορετικές εξετάσεις. Η διάρθρωση έχει ως εξής:

1. Τμήμα Γενικού Ελέγχου που πραγματοποιεί Γενική Εξέταση Αίματος σε αιματολογικό αναλυτή, ΤΚΕ, Μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος (πλακάκι) μετά από χρώση May-Grünwald-Giemsa, μέτρηση Δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ)

2. Τμήμα Αιμόστασης και Θρομβοφιλίας που πραγματοποιεί Έλεγχο Αιμόστασης: ΡΤ, ΑΡΤΤ, Ινωδογόνο, D-dimers, Λειτουργικό έλεγχο αιμοπεταλίων (PFA-100), Έλεγχο Θρομβοφιλίας: ΑΤΙΙΙ, ProtC, ProtS, APC-R, αντιπηκτικό λύκου, ομοκυστεΐνη ορού και Μοριακό Έλεγχο Θρομβοφιλίας: ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων που κωδικοποιούν FV Leiden, FII 20210A, MTHFR677T, MTHFR1298C

3. Τμήμα Αιμολυτικού Ελέγχου και μέτρησης επιπέδων ΕΡΟ που πραγματοποιεί Μυελογράμματα και κυτταροχημικές χρώσεις μυελού των οστών, Μοριακή Κυτταρογενετική (FISH), Αιματινικούς δείκτες Φερριτίνης, Β12, Φυλλικού οξέος και Αιμολυτικά τεστ.

3.1.3 Βιοχημικό- Ορμονολογικό Τμήμα

Στο Βιοχημικό τμήμα πραγματοποιείται ο παρακάτω έλεγχος:

- ❖ Τυπικός βιοχημικός έλεγχος σε καθημερινή βάση σε κλινικά δείγματα (ούρα, αίμα) για τον έλεγχο της καρδιάς, των νεφρών, του παγκρέατος, του ήπατος και των χοληφόρων.
- ❖ Μέτρηση λιπιδίων (LDL, HDL, VLDL, λιποπρωτεΐνες κ.α.)
- ❖ Μέτρηση βιολογικών υγρών (ΕΝΥ, πλευριτικό, περιτοναϊκό, αρθρικό, ασκτικό, περικαρδιακό κ.α.)
- ❖ Ειδικός ορμονολογικός έλεγχος (υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες, θυρεοειδής αδένας, παραθυρεοειδείς αδένες, επινεφρίδια ,πάγκρεας) Πίνακας 2.
- ❖ Ειδική μέτρηση καρκινικών δεικτών (CEA, 19-9 κ.α.)
- ❖ Ποσοτική μέτρηση δεικτών καρδιολογικής αιτιολογίας (τροπονίνη κ.α.)
- ❖ Ποσοτική μέτρηση επιπέδου φαρμακευτικών ουσιών (βαρβιτουρικών, ναρκωτικών ουσιών, αντιμικροβιακών παραγόντων, αντιεπιληπτικών, ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων ασθενών υπό μεταμόσχευση κ.α.)

ΠΑΘΗΣΕΙΣ	ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ
Έλεγχος θυρεοειδικής λειτουργίας	T3 T4 TSH FT4 FT3 Anti-TPO Anti-TG TSH-ReAB HTg CT Καλσιτονίνη
Έλεγχος Αναπαραγωγικού Συστήματος	FSH LH Prl E2 Prg SHBG
Έλεγχος Συνδρόμου Cushing	Cortisol ACTH
Υπερτρίχωση-Έλεγχος Υπερανδρογοναιμίας	Testo Free Testo 17OHPg Δ4 DHEA-s

Έλεγχος μεγαλακρίας	GH IGF-1
Έλεγχος σακχαρώδη διαβήτη	HBA1C Ινσουλίνη C-πεπτιδίο Αλβουμίνη ούρων 24h Anti-GAD
Έλεγχος για ενδοκρινική Υπέρταση-Επινεφριδιακή	Αλδοστερόνη Ρενίνη (ενεργή)
Διαταραχές ωσμωτικότητας	Ωσμωτική πίεση ορού Ωσμωτική πίεση ούρων
Έλεγχος Παραθυρεοειδούς-Οστεοπόρωσης	Οστεοκαλσίνη PTH

Πίνακας 2. Συγκεντρωτική παράθεση διενεργούμενων βιοχημικών εξετάσεων που αφορούν τον ορμονικό έλεγχο.

3.1.4 Ανοσολογικό Τμήμα

Στο ανοσολογικό τμήμα, μέσα από την συνεχή εξέλιξη και την ανακάλυψη νέων ανοσοβιολογικών δεικτών, πραγματοποιούνται εξετάσεις που οδηγούν στον προσδιορισμό των παθολογικών μηχανισμών και λειτουργιών των νοσημάτων του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι κυριότερες εξετάσεις που διεξάγονται στο Ανοσολογικό τμήμα είναι:

- HLA τυποποίηση
- Έλεγχος Πατρότητας (Προσδιορισμός HLA, A, B, C, αντιγόνων στο παιδί, τη μητέρα και τον «πιθανό» πατέρα)
- Προ-μεταμοσχευτικός έλεγχος λήπτη συμπαγών οργάνων (HLA φαινότυπου και αντι-HLA αντισώματα [κυτταροτοξικά αντισώματα])
- HLA φαινότυπος του λήπτη, των γονέων και των πιθανών δοτών - αδέρφια κ.α.
- HLA τυποποίηση των τάξης II αντιγόνων (HLA-DR)
- Διασταύρωση ιστοσυμβατότητας (cross-match) του λήπτη με το δότη για μεταμόσχευση νεφρού
- μέθοδος Elisa και στο μικροσκόπιο με ανοσοφθορισμό για έλεγχο των αυτοαντισωμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται τα:
 - ✓ αντιπυρηνικά αντισώματα- ANA
 - ✓ αντι-DNA
 - ✓ αντιμιτοχονδριακά αντισώματα – AMA και LKM
 - ✓ αντισώματα έναντι των λείων μυϊκών ινών- SMA
 - ✓ αντιθυρεοειδικά αντισώματα: έναντι θυρεοσφαιρίνης και μικροσωμιακά, αλλά και με μέθοδο Elisa TPO και TG
 - ✓ αντισώματα έναντι των ουδετεροφίλων: ANCA-P και ANCA-C
 - ✓ ENA αντισώματα / SSA/SSB-Ro/LA Sm/RNp Jo-1 σκληρόδερμα-70
 - ✓ αντιτοιχωματικά στομάχου (APCA)
 - ✓ αντισώματα έναντι τριών τύπων αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων (ACA) : IgG, IgM IgA

Ειδικότερα, για τον έλεγχο αυτοάνοσων νοσημάτων ελέγχεται η παρουσία ή μη με ανοσοφθορισμό των: Αντιπυρηνικά/ ANA, Anti-ENA, -DNA, Anti SS-A (Ro), SS-B (La), Anti-Sm, Anti-CCP (CyclicCitruinatedPeptideAntibody), ASMA, Ανοσοσφαιρίνες A, G, M, D, E, Anti-RNP, APCA, c-ANCA, p-ANCA, Anti-SMA, hs-CRP, RA-test, β2-Μικροσφαιρίνη, Συμπλήρωμα C3, C4, C ολικό, Anti-dsDNA, Anti-ssDNA, Anti-μιτοχονδριακά (AMA), Anti-ωοθηκικά.

- Μέτρηση ανοσοσφαιρινών (IgG, IgM, IgA υποτάξεις ανοσοσφαιρινών και β2 μικροσφαιρίνη)
- Μέτρηση συμπληρώματος (C3, C4, CH50)

- Λιπιδαιμικός έλεγχος [μέτρηση APO, A, B, E και Lp (a)]
- Προσδιορισμός ANΤΙΓΟΝΩΝ ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΟΣ της συζύγου και του συζύγου
- αντι-HLA αντισώματα της συζύγου
- Διασταύρωση ιστοσυμβατότητας ορού της συζύγου με λεμφοκύτταρα του συζύγου
- Παρασκευή και χορήγηση εμβολίου (λεμφοκύτταρα του συζύγου στην σύζυγο)
- Έλεγχος αλλεργίας (προσδιορισμό της ολικής IgE, καθώς και ένας μεγάλος αριθμός ειδικών IgE (Greek panel II (36 αλλεργιογόνα), Greek panel V (16 αλλεργιογόνα), Greek panel VI (16 αλλεργιογόνα))
- Κυτταρομετρία ροής (ανοσοφαινότυπος AIDS και αιματολογικών περιστατικών).

3.1.5 Τμήμα Ανοσολογίας Λοιμώξεων-Ορολογικό

Ασχολείται με την ανίχνευση και ταυτοποίηση λοιμωδών νοσημάτων, όπως:

- ❖ Λοιμώδη νοσήματα: Ηπατίτιδες, Ερυθρά (Rubella) HIV I, II, Τοξόπλασμα, Κυτταρομεγαλοϊό (CMV), Έρπης (HSV), Ελικοβακτηρίδιο, Χλαμύδια, Ανεμευλογιά (VZV), Λιστέρια, Μυκόπλασμα, ASTO, EBV, Αντισώματα ιλαράς, Borrelia, Brucella, Παρωτίτιδα, Αντιεχινokokκικά Ab.

Στο Εργαστήριο πραγματοποιείται ο έλεγχος αντισωμάτων (IgG, IgM) και αντιγόνων με τις ακόλουθες εξετάσεις:

- αντισώματα έναντι της ηπατίτιδας B
- αντισώματα έναντι της ηπατίτιδας C
- αντισώματα έναντι της ηπατίτιδας A
- αντισώματα έναντι της ηπατίτιδας D (υφίσταται επιδημιολογικά με την ηπατίτιδα B)
- αντισώματα έναντι της ηπατίτιδας E
- αντισώματα έναντι του ιού της ανθρώπινης ανοσοεπάρκειας- HIV
- αντισώματα έναντι του κυταρομεγαλοϊού
- αντισώματα έναντι του ιού Epstein-Barr
- αντισώματα έναντι των ερπητοϊών I και II
- αντισώματα έναντι της ιλαράς
- αντισώματα έναντι της τοξοπλάσμωσης
- CRP C- αντιδρώσα πρωτεΐνη
- RF –ρευματοειδής παράγοντας
- ASTO -αντιστρεπτολυσίνη
- WIDAL – διάγνωση τυφοειδούς πυρετού
- WRIGHT- διάγνωση βρουκέλλωσης
- RPR για έλεγχο σύφιλης

3.1.6 Τμήμα Μοριακής Βιολογίας

Στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας πραγματοποιείται η Μοριακή Ανίχνευση Ιών, Βακτηρίων, Παρασίτων, Πίνακας 3. Ειδικότερα για τον HPV πραγματοποιείται Ανίχνευση και τυποποίηση 41 στελεχών του ιού και Aptima HPV mRNA test.

Ιοί	Βακτήρια	Παράσιτα
HBV	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
HCV	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Acanthamoeba</i>
HDV	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Fungi / Μύκητες
HHV (1-8)	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Aspergillus spp.</i>
CMV (HHV 5)	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Pneumocystis carinii jiroveci</i>
HPV	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Leishmania species</i>
HIV 1/2	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Leptospira genus</i>
Parvo B-19	Gram +/- βακτήρια	
Ιοί αναπνευστικού	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Ιοί Μηνιγγίτιδας	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

Πίνακας 3. Παράθεση Ιών, Βακτηρίων, Παρασίτων που ανιχνεύονται με PCR.

3.1.6.1 Μοριακός έλεγχος –PCR- αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

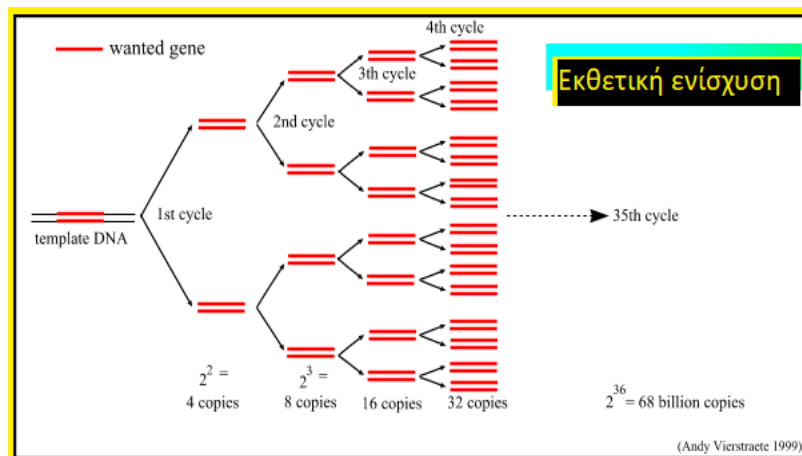
PCR- (Polymerase Chain Reaction) ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μία εξειδικευμένη μέθοδος της μοριακής βιολογίας, κατά την οποία πραγματώνεται, με τη βοήθεια ενζύμων, απομόνωση και πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction) είναι μία εμφατική τεχνική για την ταχεία ανάλυση συγκεκριμένων υπό διερεύνηση τμημάτων DNA. Εφαρμόζεται τόσο στην έρευνα -in vitro-, όσο και στην διαδικασία της διάγνωσης πιθανών μικροβιακών παραγόντων στο Βιοπαθολογικό εργαστήριο -in vivo-. Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την μέθοδο είναι τα εξής :

- 4 δεοξυριβονουκλεοτίδια –dNTPs
- 2 συνθετικοί νουκλεοτιδικοί εκκινητές –primers-(περίπου 20 νουκλεοτίδια έκαστος), συμπληρωματικοί περιοχών σε αντικρουόμενες πλευρές των δύο αλυσίδων, έτσι ώστε να περιέχεται μεταξύ τους η DNA ακολουθία. Οι εκκινητές αυτοί μετά τον υβριδισμό με το DNA-στόχο έχουν τα 3'-OH άκρα αντικρουστά μεταξύ τους.
- Μία ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες DNA πολυμεράση που μέσω αυτής οι εκκινητές προσεγγίζουν τις συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA.

- Μία αλληλουχία στόχος, δείγματος DNA, που βρίσκεται μεταξύ του ζευγαριού των εκκινητών και μπορεί να εκτείνεται περίπου στα 100-3500 bp.

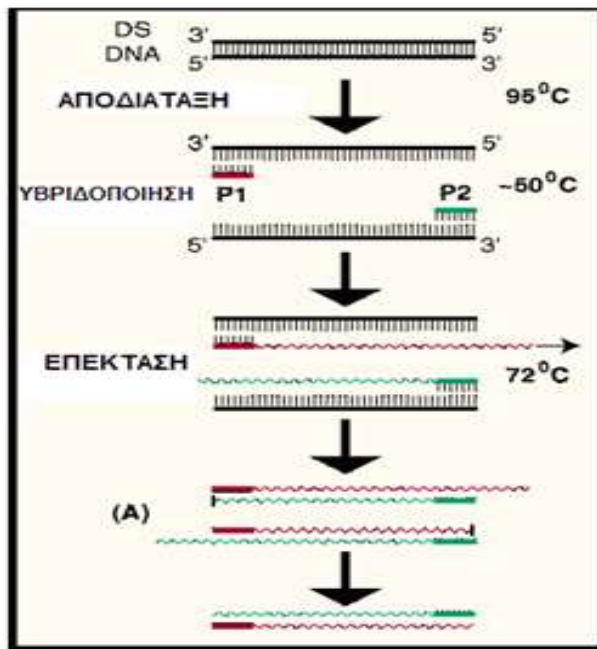
Η τεχνική της PCR χρησιμοποιεί μονόκλωνο μόριο DNA ως βάση για τη δημιουργία ενός νέου συμπληρωματικού κλώνου. Τα μονόκλιωνα μόρια παράγονται απλοϊκά από δίκλιωνα μόρια DNA, εφόσον θερμανθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να αποχωριστούν. Η DNA πολυμεράση μαζί με ένα ελάχιστο κομμάτι δίκλωνου DNA ξεκινά την διαδικασία της σύνθεσης. Άρα, η στιγμή της έναρξης της σύνθεσης του DNA μπορεί να ορισθεί με την ύπαρξη ενός ολιγονουκλεοτιδίου -εκκινητή- (primer), που αλληλοσυνδέεται με το αρχικό μόριο, ώστε σε δεύτερη φάση, με τους κατάλληλους εκκινητές να υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης από την DNA πολυμεράση σαφούς περιοχής του DNA.

Η τυποποιημένη τεχνική της PCR εμπεριέχει έναν συγκεκριμένο αριθμό κυκλικών διαδικασιών για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου, Σχήμα 2.

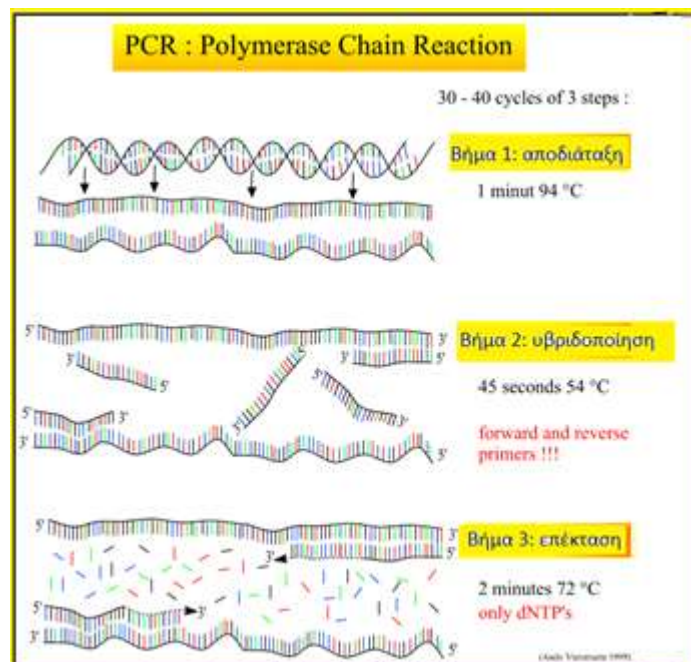


Σχήμα 2. Η προοδευτική αύξηση των κλώνων του γονιδιώματος των ιών υπό διερεύνηση με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Πηγή: Andy Vierstraete, 1999. sliedepayer.gr

Κάθε κύκλος περιέχει τρία βήματα, Σχήματα 3 και 4:



Σχήμα 3. Παραστατική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html).



Σχήμα 4. Σχηματική παράθεση τα διαφόρων βημάτων της PCR. (www.pcr.html).

1^ο βήμα: Μετουσίωση –DENATURATION-. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η θερμική μετουσίωση της δίκλωνης αλυσίδας του DNA στόχου, μέσω της αύξησης της θερμοκρασίας στην δεξαμενή αντίδρασης στους 95 °C. Στο στάδιο αυτό στην δεξαμενή αντίδρασης υπάρχουν: η θερμοανθεκτική πολυμεράση, τα dNTPs, και το ζευγάρι των εκκινητών-primers. Η διαδικασία διαρκεί 1 λεπτό περίπου.

2^ο βήμα: Υβριδοποίηση –ANNEALING-. Στο δεύτερο στάδιο, της υβριδοποίησης, η θερμοκρασία του μίγματος μειώνεται αργά και σταθερά περίπου στους 55°C. Η θερμοκρασία αυτή διαφέρει σύμφωνα με τις διεργασίες. Σε όλη τη διάρκεια αυτού του σταδίου οι εκκινητές σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τις συμπληρωματικές περιοχές του DNA στόχου.

3^ο βήμα: Επιμήκυνση –EXTENSION-. Στο τρίτο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται περίπου στους 72 °C, όπου είναι και η καλύτερη θερμοκρασία για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης. Ο επωαστικός χρόνος διαφέρει σύμφωνα με το μήκος του τμήματος στόχου. Η σύνθεση του DNA αρχίζει στο 3' -OH άκρο κάθε εκκινητή.

Μοριακός έλεγχος (PCR)

Για την ανίχνευση του νέου κορωνοϊού SARS CoV-2 χρησιμοποιείται η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) και αυτή τη στιγμή αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον έλεγχο ενεργού λοίμωξης από τον ιό SARS CoV-2. Λαμβάνεται ρινοφαρυγγικό δείγμα και μπορούμε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα μέσα σε λίγες ώρες. Παρόλα αυτά, η μοριακή εξέταση, όπως και κάθε εξέταση, έχει και αδυναμίες. Έτσι, η μοριακή μέθοδος μπορεί να είναι αρνητική σε πολύ αρχικά στάδια της νόσου, καθώς και σε κάποιους ασθενείς, στους οποίους ο ιός μπορεί να εξαφανιστεί από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα μετά την έβδομη μέρα, αλλά να συνεχίσει να υπάρχει στους πνεύμονες. Επιπλέον, οι μοριακές εξετάσεις μας δείχνουν αν κάποιος έχει τον ιό τώρα, αλλά δεν μπορούν να μας δείξουν αν κάποιος νόσησε στο παρελθόν. Αν δηλαδή κάποιος είχε συμπτώματα, όπως βήχα και πυρετό, πριν ένα μήνα και είχε προσβληθεί από κορωνοϊό, μπορεί η μοριακή εξέταση του να είναι αρνητική.

Εφαρμογή της RT-PCR μεθόδου

Η εκθετική ενίσχυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής παρέχει μια πολύ ευαίσθητη τεχνική στην οποία μπορεί να ανιχνευθεί πολύ χαμηλός αριθμός αντιγράφων μορίων RNA. Το RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση γενετικών ασθενειών και ημιποσοτικά στον προσδιορισμό της αφθονίας συγκεκριμένων διαφορετικών μορίων RNA εντός ενός κυττάρου ή ιστού ως μέτρο έκφρασης γονιδίου.

Αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στη διάγνωση γενετικών ασθενειών. Η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση γενετικών ασθενειών όπως το σύνδρομο Lesch-Nyhan, αλλά και στην ανίχνευση καρκίνου:

Η RT-PCR χρησιμοποιείται συνήθως για τη μελέτη των γονιδιωμάτων των ιών των οποίων τα γονιδιώματα αποτελούνται από RNA, όπως το Influenzavirus A, ρετροϊούς όπως ο HIV και ο SARS-CoV-2 που προκαλεί την πανδημική νόσο COVID-19.

Το “gold standard” της διάγνωσης των περισσότερων παθήσεων αφορά την εργαστηριακή τεκμηρίωση με αξιόπιστες και επικυρωμένες τεχνικές ανάλυσης. Όμως ειδικά σε περιπτώσεις μίας ανερχόμενης μεταδοτικής νόσου (συγκεκριμένα της COVID-19), μπορεί να μην διατίθενται τεχνικές τόσο ειδικές και ευαίσθητες ώστε να είναι ικανές επακριβώς να τεκμηριώνουν την θετικότητα ή μη των εκάστως κλινικών δειγμάτων. Εδώ τίθεται ένα σοβαρό ζήτημα για το πόσο η κλινική αξιολόγηση της συμπτωματολογίας μέσα σε άσηπτες συνθήκες, με κίνδυνο της μόλυνσης του υγειονομικού προσωπικού, μπορεί να θέσει την διάγνωση. Είναι σημαντικό λοιπόν για την διάγνωση μιας νόσου όπως της COVID-19, η λήψη επιδημιολογικού ιστορικού.

Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι αναλύσεων για μολυσματικές νόσους – εκείνοι που ανιχνεύουν τον ίδιο το μολυσματικό παράγοντα (π.χ. τεχνικές PCR για ιικό mRNA) κι εκείνοι που ανιχνεύουν την αντίδραση του ξενιστή (του ατόμου) στο μολυσματικό παράγοντα (π.χ. ορολογικές τεχνικές ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων). Σήμερα προσφέρονται και οι δύο τύποι αναλύσεων για τη νόσο COVID-19. Για την ανίχνευση του ιικού mRNA τα πλέον κλινικά επικυρωμένα και δοκιμασμένα τεστ (CE-IVD) για τη νόσο COVID-19 σήμερα είναι εκείνα που ανιχνεύουν άμεσα και ποσοτικοποιούν το ιικό φορτίο mRNA. Η ανίχνευση ιικού RNA αποτελεί ένδειξη για τρέχουσα λοίμωξη και υποδηλώνει μολυσματικότητα και κίνδυνο μετάδοσης σε άλλους.

Εντούτοις, η παρουσία ιικού RNA σε ένα άτομο, ιδιαίτερα σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, μπορεί να αντιπροσωπεύει υπολείμματα ιικού mRNA σε ένα άτομο και όχι βιώσιμα ιικά σωματίδια, ικανά να μεταδώσουν τη νόσο.

Χρειάζονται μελέτες παρακολούθησης της δυναμικής του ιικού mRNA σε ήδη μολυσμένα άτομα, σε διάφορα σωματικά βιολογικά υγρά και ανατομικές περιοχές και σύγκριση αυτών με τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου προκειμένου να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Η μέθοδος ανίχνευσης του ιικού mRNA βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (rRT-PCR) συγκεκριμένων γονιδιακών στόχων του ιού (τουλάχιστον δύο) κι εφαρμόζεται σε δείγματα του κατώτερου ή ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.

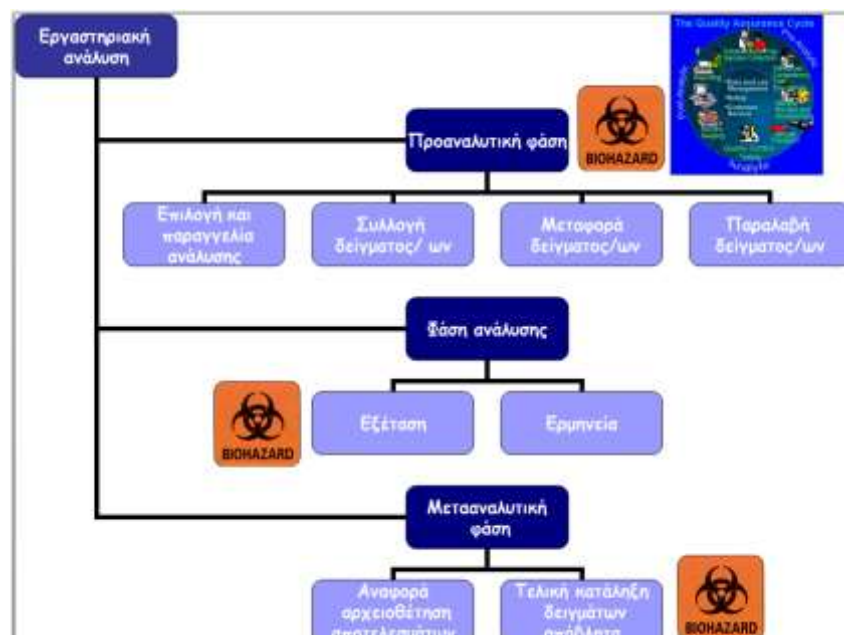
Τα αποτελέσματα των αναδρομικών μελετών έως τώρα έχουν δείξει, πως στα πρώτα στάδια της νόσου, η αξονική τομογραφία του πνεύμονα, και άλλες εργαστηριακές εξετάσεις μπορούν να θέσουν την διάγνωση. Η μειωμένη ευαισθησία του μοριακού ελέγχου έγκειται στο γεγονός, ότι στα πρώτα, δίχως συμπτωματολογία, στάδια της νόσου το ιικό φορτίο διαφέρει ανάλογα με την ανατομική περιοχή που είναι δυνατόν να συλληχθεί, χωρίς πάντα αυτό να είναι εφικτό και

εφαρμόσιμο. Τελευταία γίνεται χρήση και κάποιων ανοσοδιαγνωστικών τεστ για την ανίχνευση των αντισωμάτων του ασθενούς απέναντι στην νόσο COVID-19, όμως σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να αντικαταστήσει την μοριακή μέθοδο ανίχνευσης του ιικού mRNA του SARS-CoV-2. Το mRNA του ιού SARS-CoV-2 ανιχνεύεται γενικότερα στην οξεία περίοδο της μόλυνσης σε δείγματα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος(ρινοφαρυγγικό επίχρισμα, ρινικές, στοματικές πλύσεις κ.α.) Όμως το επιδημιολογικό, και ατομικό ιστορικό του αρρώστου, η κλινική συμπτωματολογία και ο υπόλοιπος εργαστηριακός έλεγχος θα καθορίσουν την πορεία της λοίμωξης του αρρώστου. Τα θετικά αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του mRNA του ιού SARS-CoV-2. Τα θετικά αποτελέσματα δεν μπορούν όμως να αποκλείσουν τη συλλοίμωξη από άλλους ιούς, ή μία άλλη βακτηριακή λοίμωξη. Από την άλλη τα αρνητικά αποτελέσματα δεν είναι σε θέση να αποκλείσουν τη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2, γιατί και θα πρέπει να συνυπολογίζονται προσεκτικά όλα τα προαναφερθέντα προς όφελος του αρρώστου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Βιολογικός παράγοντας στο Εργαστήριο

4.1 Βασικές αρχές Βιοασφάλειας

Η βιοασφάλεια είναι η εφαρμογή προφυλάξεων ασφαλείας που μειώνουν τον κίνδυνο έκθεσης του εργαστηρίου σε δυνητικά μολυσματικό μικρόβιο και περιορίζουν τη μόλυνση του εργασιακού περιβάλλοντος και τελικά της κοινότητας, Εικόνα 11.



Εικόνα 11. Τα στάδια της εργαστηριακής ανάλυσης και η εφαρμογή προφυλάξεων ασφαλείας σε κάθε ένα από αυτά. Πηγή:ΚΕΕΛΠΝΟ. Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας. Βιοασφάλεια. Τριφυνοπούλου Κ. 22-11-2013

Γιατί πρέπει να υπάρχει Βιοασφάλεια στα Εργαστήρια:

Η έννοια της βιοασφάλειας στον εργαστηριακό τομέα , είναι ο ακρογωνιαίος λίθος για την προάσπιση της δημόσιας υγείας, αποσκοπώντας στην παρακώλυση ή στον περιορισμό στο ελάχιστο της απελευθέρωσης και διασποράς μολυσματικών παραγόντων. Η εναρμόνιση της λειτουργίας του εργαστηρίου στην εθνική και διεθνή ισχύουσα νομοθεσία είναι επιβεβλημένη για την εύρυθμη λειτουργία του, και θέτει τις σωστές βάσεις τόσο για την προστασία κλινικών δειγμάτων και “προϊόντων”, όσο και την προστασία του περιβάλλοντος.

Υπάρχουν τέσσερα επίπεδα Βιοασφάλειας. Κάθε επίπεδο βιοασφάλειας έχει συγκεκριμένους ελέγχους για τον περιορισμό των βιολογικών παραγόντων. Επίσης έχει τα δικά του ειδικά στοιχεία ελέγχου περιορισμού που απαιτούνται για τις εργαστηριακές πρακτικές, τον εξοπλισμό ασφαλείας και την κατασκευή εγκαταστάσεων.

Οι πρωταρχικοί κίνδυνοι που καθορίζουν τα επίπεδα περιορισμού είναι η μολυσματικότητα, η σοβαρότητα της νόσου, η μεταδοτικότητα και η φύση της εργασίας που διεξάγεται, Εικόνα 12.

Η προέλευση του μικροβίου ή του εν λόγω παράγοντα και η οδός έκθεσης είναι επίσης σημαντικές. Σε ευρεία χρήση από πολλούς οργανισμούς με στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της επάρκειας εφαρμόζονται τα: ISO 9000 (Ποιότητα), ISO 14001 (Περιβάλλον), OHSAS 18001 (Υγιεινή και Ασφάλεια Εργασίας).



Εικόνα 12. Ταξινόμηση κατά WHO των μικροοργανισμών σε ομάδες κινδύνου. Πηγή:WHO

Η ταξινόμηση των βιολογικών παραγόντων είναι η ακόλουθη:

Ομάδα κινδύνου 1: Αναφέρεται σε βιολογικούς παράγοντες που δεν προκαλούν νόσο στον άνθρωπο ή σε ζώο και δεν παρουσιάζουν κανέναν ή ελάχιστο κίνδυνο για το άτομο και την

κοινότητα. Ενδεικτικά ισχύουν κυρίως για εργαστηριακές δομές που χειρίζονται μικροοργανισμούς που δεν προκαλούν λοιμώξεις (*Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*) για οποίες είναι υπεραρκετή η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας όπως προσδιορίζονται από τα ειδικά πρωτόκολλα. Εφαρμόζονται σε εργαστήρια στα οποία ο ειδικός εξοπλισμός δεν κρίνεται απαραίτητος, καθώς οι πάσης φύσεως πράξεις πραγματοποιούνται σε πάγκο δίχως laminar flow hood με ασφαλείς εργαστηριακές μεθόδους. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα εργαστήρια για διδακτικούς σκοπούς.

Ομάδα κινδύνου 2: Αναφέρεται σε βιολογικούς παράγοντες φαινομενικά παθογόνους για τον άνθρωπο ή τα ζώα με περιορισμένο κίνδυνο για το άτομο, μικρό για την κοινότητα όπου δουλεύονται δείγματα με *Hepatitis A*, *Streptococcus sp.* *Salmonellae*

Τα κλινικά δείγματα των βιολογικών αυτών παραγόντων διαχειρίζονται στα βιοπαθολογικά εργαστήρια των τριτοβάθμιων νοσοκομείων και ειδικότερα οι διάφορες μορφές αυτών όπως διάφοροι ιστοί, ΕΝΥ, πλευριτικό υγρό, το αίμα και τα παράγωγα αυτού, κ.τ.λ. Είναι σημαντικό να επισημανθεί πως σε κάθε είδους εργασίες οι οποίες πραγματοποιούνται σε αυτό το στάδιο ενδείκνυνται να γίνεται χρήση των ειδικών θαλάμων ασφαλείας για την αποφυγή δημιουργίας αερολυμάτων. Οι βιολογικοί παράγοντες που επεξεργάζονται σε αυτό το στάδιο ανήκουν στην ομάδα κινδύνου 2. Σε ανάλογη περίπτωση, βιολογικών παραγόντων ομάδας κινδύνου 3, όπου η μετάδοση αυτών δεν είναι αερογενής (*HBV*, *HCV*, *HIV-AIDS* κ.τ.λ.), ακολουθείται το πρωτόκολλο βιοασφάλειας τύπου 2.

Όσον αφορά τους ειδικούς χειρισμούς, προς αποφυγή δημιουργίας αερολυμάτων είναι απαραίτητος ο Θάλαμος Βιολογικής Ασφάλειας (ΘΒΑ), όπου διατίθεται κατάλληλο σύστημα αερισμού για το άνοιγμα- κλείσιμο των σκευών και σωληναρίων, των σταθερών, στεγανοποιημένων συσκευών ομογενοποίησης βιολογικών δειγμάτων, και των ειδικών αεροστεγών φυγοκέντρων με ατομικά αποσπώμενα καλύμματα στους υποδοχείς αυτών.

Ομάδα κινδύνου 3: Αναφέρεται σε βιολογικούς παράγοντες όπου υπάρχει μεγάλης κλίμακας κίνδυνος για τον άνθρωπο ως μονάδα, μέτριας για την κοινότητα, με μικροοργανισμούς που αν και τις περισσότερες φορές δεν υφίσταται μετάδοση από άτομο σε άτομο, εντούτοις επιφέρουν βαριά νόσο. Τέτοια παραδείγματα βιολογικών παραγόντων που η μετάδοση είναι κυρίως αερογενής, είναι οι *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetti*, *SARS-CoV*, *M.Tuberculosis*, *B. anthracis*, όπου η σοβαρή νόσηση είναι η επικρατέστερη περίπτωση και σε αρκετές περιπτώσεις έχει θανατηφόρο κατάληξη. Αξίζει να σημειωθεί, ότι όταν διαχειρίζονται μεγάλη ποσότητα βιολογικών παραγόντων βιοασφάλειας σταδίου 2, ακολουθείται η διαδικασία και το πρωτόκολλο βιοασφάλειας σταδίου 3, όπου υπό κανονική ποσότητα θα προβλεπόταν πρωτόκολλο βιοασφάλειας σταδίου 2.

Ο αναγκαίος ειδικός εξοπλισμός αποτελείται από :

✓ Ενδεής ΘΒΑ

- ✓ Ξεχωριστός προθάλαμος προετοιμασίας για το προσωπικό πριν την είσοδο στον χώρο εργασίας
- ✓ Ειδική εμφανώς τοποθετημένη σήμανση εισόδου
- ✓ ΜΑΠ: Μέσα Ατομικής Προστασίας στο υγειονομικό προσωπικό, σε πληθώρα και είδος
- ✓ Ο χρειώδης εργαστηριακός εξοπλισμός (ψυγεία, φυγόκεντροι, κλίβανοι) είναι κομμάτι του ειδικού χώρου σταδίου βιοασφάλειας 3 και βρίσκονται στον ίδιο χώρο
- ✓ Ύπαρξη συσκευής αυτοκαύστου με ξεχωριστή είσοδο επιβλαβών πραγμάτων μέσα στον θάλαμο εργασίας και απομάκρυνση αυτών κατόπιν αποστείρωσης έξω από τον θάλαμο εργασίας (αναγκαίες 2 θύρες)
- ✓ Ελεγχόμενη πρόσβαση από προσωπικό εντός και εκτός εργαστηρίου
- ✓ Ειδικά φίλτρα για τον εξερχόμενο αέρα
- ✓ Ύπαρξη ειδικού καταιωνιστήρα στην έξοδο

Ομάδα κινδύνου 4: Αναφέρεται σε βιολογικούς παράγοντες όπου υπάρχει πολύ σοβαρής κλίμακας κίνδυνος για τον άνθρωπο ως μονάδα όπως και για την κοινότητα γενικότερα, με βιολογικούς παράγοντες που είναι υπεύθυνοι πρόκλησης βαριάς νόσου. Τέτοια παραδείγματα βιολογικών παραγόντων όπου η μετάδοση είναι αερογενής, είναι ο ιός Ebola, ο ιός Lassa, ιός Marburg, ιοί άκρως επικίνδυνοι για την δημόσια υγεία, υπεύθυνοι για σοβαρότατη νόσηση και υψηλό αριθμό θανάτων. Η κρισιμότητα της κατάστασης, απαιτεί ξεχωριστό κτίριο, ή τελείως απομονωμένο εργαστηριακό τομέα με 2 εισόδους, άριστα και επαρκώς εκπαιδευμένο προσωπικό, με απόλυτο έλεγχο των εμπλεκόμενων καθώς και των βιολογικών υλικών προς εξέταση, από και προς αυτόν. Όσον αφορά το σύστημα αερισμού, πρέπει να διαθέτει διπλά τοποθετημένα φίλτρα στην έξοδο του αέρα . Οι εργαστηριακές δομές επιπέδου βιοασφάλειας 4, αφορούν και τα ερευνητικά κρατικά εργαστήρια βιολογικού πολέμου.

Ως βασικές αρχές βιοασφάλειας πάντως ισχύουν:

- η διαχείριση όλων των κλινικών δειγμάτων αγνώστου πηγής και στοιχείων να γίνεται ως μολυσματικών
- ακόμη και βιολογικών παραγόντων ομάδας βιοασφάλειας επιπέδου 1 να γίνεται με κατάλληλες εργαστηριακές πρακτικές
- σκοπός της διαχείρισης είναι η αποτροπή δημιουργίας αερολυμάτων κατά την εργασία
- Για τη διασφάλιση όλων των παραπάνω κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη και λειτουργία της επιτροπής Βιοασφάλειας στις δομές υγείας αντικείμενο της οποίας είναι η μελέτη και η καταγραφή των τεχνολογιών και των πρακτικών περιορισμού για την πρόληψη τυχαίας ή ακούσιας έκθεσης των εργαζομένων στα κλινικά ή ερευνητικά εργαστήρια σε παθογόνους παράγοντες: Βιολογικά υλικά, Τοξίνες Μικροοργανισμούς, και Γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς (GMO's), Εικόνα 13.

- Η επιτροπή Βιοασφάλειας έχει ως βασική αρμοδιότητα την ενημέρωση και εκπαίδευση των Εργαστηριακών Επιστημόνων-Βιοπαθολόγων, Τεχνολόγων Ιατρικών Εργαστηρίων μέσω σεμιναρίων, συνεδρίων, εκπαιδευτικών ημερίδων, εργαστηριακών φροντιστηρίων σε συνέδρια κ.λ.π, με στόχο την προστασία τόσο των ιδίων όσο και του περιβάλλοντος.



Εικόνα 13. Πρότυπο συστήματος διαχείρισης βιολογικού κινδύνου. Πηγή: International Biosafety and Biosecurity Laboratory Standard Development Initiative. www.biorisk.eu

Ένα ιδιαίτερο αντικείμενο είναι η ενημέρωση για την εργαστηριακή ασφάλεια από σκόπιμη έκθεση (Laboratory Biosecurity), με σκοπό την αποτροπή μη εξουσιοδοτημένης πρόσβασης, απώλειας, κλοπής, κατάχρησης ή σκόπιμης απελευθέρωσης βιολογικών παραγόντων από τα εργαστήρια.

Ο τελικός στόχος είναι, σε συνεργασία με την Ελληνική Εταιρία Βιοασφάλειας, την Ευρωπαϊκή (EBSA - European Biosafety Association) αλλά και την Διεθνή (IFBA - International Federation of Biosafety Associations) να δημιουργηθεί Κουλτούρα και Γνώση για τη Βιοασφάλεια και πιο συγκεκριμένα η ευαισθητοποίηση των εργαζομένων για τους κινδύνους, η σημασία της Βιοασφάλειας για την προστασία από τους κινδύνους και οι τρόποι αντιμετώπισης των κινδύνων μέσω των κανόνων και των διαδικασιών της Βιοασφάλειας.^[83]

4.2.Κανόνες λειτουργίας Εργαστηρίου

4.2.1Χαρακτηριστικά θαλάμων βιολογικής ασφάλειας

4.2.1.1 Θάλαμος βιοασφάλειας τάξης I (BSC I)

Στόχος είναι η προστασία του χειριστή μέσω μιας εισερχόμενης νηματικής ροής αέρα αλλά όχι του βιολογικού υλικού, αφού ο εισερχόμενος αέρας δεν φιλτράρεται. Αναγκαία θεωρείται η παρουσία φίλτρων HEPA στον αεραγωγό του εξερχόμενου αέρα. Ο χειρισμός βιολογικών παραγόντων θεωρείται χαμηλής επικινδυνότητας (κατηγορίες 1 και 2), άρα οι πρακτικές δεν καθιστούν αναγκαίο την διασφάλιση του δείγματος βιολογικού παράγοντα.^[105]

4.2.1.2 Θάλαμος βιοασφάλειας τάξης II (BSC II)

Στα περισσότερα βιοπαθολογικά εργαστήρια ο θάλαμος αποσκοπεί στην α) προστασία του χειριστή β) προστασία του βιολογικού υλικού γ) προστασία του περιβάλλοντος χώρου. Υπάρχει απορρόφηση εισερχόμενης νηματοειδούς ροής του αέρα κάτωθεν του εργασιακού πάγκου στον θάλαμο, επιτυγχάνεται επαναφορά και φιλτράρισμα στην κυκλοφορία με κατεύθυνση από πάνω προς τα κάτω. Επιπλέον η κάθετη νηματοειδής ροή αποστειρωμένου αέρα δημιουργεί ένα «τείχος προστασίας» μεταξύ του εσωτερικού της καμπίνας και του χειριστή. Ο εισερχόμενος αέρας περνά προληπτικά μέσω φίλτρου HEPA, ενώ ένα 2ο φίλτρο HEPA χρησιμοποιείται για τον εξερχόμενο αέρα.^[106]

4.2.1.3 Θάλαμος βιοασφαλείας τάξης III (BSC III)

Ο ασκούμενος την εργασία φορά αρχικά τα ειδικά πλαστικά γάντια τα οποία είναι τμήμα του θαλάμου «glove box»-ερμητικά κλειστοί, πριν ξεκινήσει την επεξεργασία του βιολογικού υλικού. Η παροχή αέρα μέσω του θαλάμου διαμέσου ενός φίλτρου HEPA, εξέρχεται μέσω διπλού φίλτρου HEPA αποσκοπώντας στην δημιουργία αρνητικής πίεσης στο εσωτερικό του θαλάμου. Αυτή η πρακτική συναινεί στην απόλυτη διαφύλαξη από μεριάς του εμπλεκόμενου, καθώς οι βιολογικοί παράγοντες είναι πολύ υψηλής επικινδυνότητας, κατηγορίας 4.^[106]

4.2.1.4 Θάλαμος βιοασφάλειας IV (BSL-4)

Εφαρμόζονται όταν χρησιμοποιούνται βιολογικοί παράγοντες όπως οι ιοί, Ebola, Lassa, Marburg, με αερογενή μετάδοση, υπεύθυνοι για πρόκληση σοβαρότατων παθήσεων, στεγάζονται σε ερευνητικά κέντρα βιολογικού πολέμου. Σκοπός η παροχή υπέρτατης ασφάλειας, παράλληλα μπορεί να υπάρξει περίπτωση χειρισμού βιολογικών παραγόντων σε θάλαμο ασφαλείας επιπέδου 3 ή 4, εάν και εφόσον ο ασκούμενος την εργασία διαθέτει την ειδική ενδυμασία, με χαρακτηριστικό την θετική πίεση στο εσωτερικό της.^[106]

4.3 Χειρισμοί δειγμάτων κλινικής μικροβιολογίας

4.3.1 Τμήμα Κλινικής Μικροβιολογίας

Τα κλινικοδιαγνωστικά Βιοπαθολογικά εργαστήρια των νοσοκομείων που εκτελούν τις συνήθεις αιματολογικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές εξετάσεις σε δείγματα ορού, αίματος, ούρων και άλλων κλινικών δειγμάτων πρέπει να ακολουθούν τις συνήθεις ασφαλείς εργαστηριακές τεχνικές, συμπεριλαμβανομένων των βασικών κανόνων προφύλαξης (Standard Precautions) για τον ασφαλή χειρισμό δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων όταν χειρίζονται δείγματα ασθενών με πιθανή ή σίγουρη λοίμωξη COVID-19, Εικόνα 13.^[107,84]



Εικόνα 14. Διαχείριση βιολογικού κινδύνου. Πηγή: Official Journal of the European Communities. Directive 2000[54]EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of the 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

Δεδομένου ότι η παροχή γρήγορων αποτελεσμάτων έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη φροντίδα των ασθενών, πρέπει να υπάρχουν αποτελεσματικά και έγκαιρα μέσα για τη δημιουργία και στη συνέχεια την αναφορά των αποτελεσμάτων των κλινικών μικροβιολογικών αναλύσεων. Επιπλέον, σήμερα, διαπιστώνεται ότι αυξανόμενος αριθμός ασθενών έχουν λοίμωξη που προκαλείται από παθογόνους παράγοντες που είτε ήταν πολύ ασυνήθιστοι στο παρελθόν είτε ακόμη και τελείως μη αναγνωρισμένοι. Ως αποτέλεσμα, οι ειδικοί μολυσματικών ασθενειών, ειδικότερα, εξαρτώνται περισσότερο από ποτέ από την πρόσβαση σε διαγνωστικές πληροφορίες υψηλής ποιότητας από εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας.

Η κλινική μικροβιολογία είναι ένας συγκεκριμένος συνδυασμός γνώσης, στάσης και πρακτικής που στοχεύει στην άμεση κλινική εμπλοκή στη διαχείριση μολυσματικών ασθενειών χρησιμοποιώντας τις βασικές αρχές της ιατρικής μικροβιολογίας και της κλινικής ιατρικής. Οι τομείς περιλαμβάνουν τη διαχείριση θετικών αιμοκαλλιιεργειών, τη διαχείριση ασθενών σε μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), τον έλεγχο των νοσοκομειακών λοιμώξεων και τη μικροβιολογία της δημόσιας υγείας, την ανάπτυξη νοσοκομειακής και κοινοτικής αντιμολυσματικής πολιτικής, οργάνωση κλινικών-μικροβιολογικών συναντήσεων και παροχή έκτακτης υπηρεσίας

εκτός ωραρίου. Η εφαρμογή αυτής της κλινικής προσέγγισης και η αυξημένη δέσμευση με την άμεση φροντίδα των ασθενών θα απαιτούσε αλλαγές στην υπάρχουσα δομή εκπαίδευσης και τα πρότυπα εργασίας του ιατρικού και τεχνικού προσωπικού στη μικροβιολογία.^[108]

4.3.1.1 Χειρισμοί δειγμάτων SARS-CoV-2

Οδηγίες βιοασφάλειας για διαγνωστικά εργαστήρια που χειρίζονται δείγματα από άτομα με ύποπτη, πιθανή ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη COVID-19 ^[109]

Οι συγκεκριμένες οδηγίες παρέχονται προκειμένου να βοηθήσουν κυρίως τα κλινικά διαγνωστικά εργαστήρια στην εφαρμογή των κατάλληλων μέτρων Βιοασφάλειας για τον ασφαλή χειρισμό δειγμάτων από ύποπτα ή επιβεβαιωμένα κρούσματα COVID-19, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι για το προσωπικό των εργαστηρίων.

Η ορθή εργαστηριακή πρακτική, ακολουθώντας τις βασικές αρχές που διέπουν τις καλές μικροβιολογικές πρακτικές (Good Microbiological Practices, GMPs), η πιστή εφαρμογή των τυποποιημένων διαδικασιών μέσα στο εργαστήριο (Standard Operating Procedures, SOPs) και η τήρηση των βασικών μέτρων βιολογικής ασφάλειας από το προσωπικό του εργαστηρίου θα συμβάλει στην ελαχιστοποίηση των δυνητικών κινδύνων από μολυσματικά υλικά.

Σημεία-κλειδιά για την Βιοασφάλεια εργαστηρίου σχετικά με τον SARS-CoV-2

Όλες οι διαδικασίες πρέπει να εκτελούνται με βάση την εκτίμηση του βιολογικού κινδύνου στο συγκεκριμένο εργαστήριο και μόνο από προσωπικό με αποδεδειγμένη ικανότητα, τηρώντας αυστηρά τα σχετικά πρωτόκολλα. Η αρχική επεξεργασία (πριν από την απενεργοποίηση) όλων των δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σε πιστοποιημένο Θάλαμο βιολογικής ασφάλειας (Biosafety Cabinet, BSC) ή άλλη συσκευή πρωτογενούς περιορισμού (primary containment device). Οι εργαστηριακές δοκιμασίες/ εργασίες που δεν περιλαμβάνουν πολλαπλασιασμό του ιού και άρα υψηλή συγκέντρωση του παθογόνου μπορούν να διενεργούνται σε εγκαταστάσεις και με διαδικασίες που αντιστοιχούν σε επίπεδο Βιοασφάλειας 2 (BSL-2). Κατάλληλα απολυμαντικά, με αποδεδειγμένη δραστηριότητα έναντι ιών με περίβλημα πρέπει να χρησιμοποιούνται (π.χ. υποχλωριώδες (οικιακή χλωρίνη), αλκοόλ, υπεροξειδίο του υδρογόνου, ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου και φαινολικές ενώσεις). Τα δείγματα ασθενών από ύποπτα ή επιβεβαιωμένα κρούσματα πρέπει να μεταφέρονται ως "Biological Substance, Category B" με σήμανση UN3373". Μόνο καλλιέργειες του ιού ή στελέχη πρέπει να μεταφέρονται ως "Infectious substance, affecting humans, Category A" κατά UN2814.

Η διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις διαδικασίες του εργαστηρίου όπως και για άλλα αναπνευστικά παθογόνα. Οι ακόλουθες δραστηριότητες μπορούν να εκτελούνται σε εγκαταστάσεις επιπέδου βιοασφάλειας 2 (BSL-2), χρησιμοποιώντας τις συνήθεις πρακτικές εργασίας BSL-2. Τα δείγματα πρέπει να βρίσκονται ήδη σε σφραγισμένο, απολυμασμένο εξωτερικά πρωτογενή περιέκτη.

Τα δείγματα ασθενών από ύποπτα ή επιβεβαιωμένα κρούσματα πρέπει να μεταφέρονται ως "Biological Substance, Category B" με σήμανση UN3373, τριπλή συσκευασία για τη μεταφορά μολυσματικής ουσίας κατηγορίας B.

4.3.1.2 Διαχείριση κλινικών δειγμάτων αρρώστων με διαφορούμενη ή σίγουρη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2

1) Τα κλινικά διαγνωστικά εργαστήρια των νοσοκομείων που εκτελούν τις συνήθεις αιματολογικές, βιοχημικές και μικροβιολογικές εξετάσεις σε δείγματα ορού, αίματος, ούρων και άλλων κλινικών δειγμάτων πρέπει να ακολουθούν τις συνήθεις ασφαλείς εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένων των βασικών προφυλάξεων (Standard Precautions) για τον ασφαλή χειρισμό δυνητικά μολυσματικών δειγμάτων όταν χειρίζονται δείγματα ασθενών με ύποπτη ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη COVID-19.

2) Επομένως, κατά την αποστολή των κλινικών δειγμάτων των ασθενών (αίμα, ούρα, πτύελα, κόπρανα κλπ), πρέπει να τηρούνται οι συνήθεις διαδικασίες ασφαλείας:

A) Όλα τα δείγματα πρέπει να τοποθετούνται σε ειδικό σακουλάκι και να συνοδεύονται από το αντίστοιχο παραπτεμπτικό.

B) Τα φιαλίδια να είναι καλά κλεισμένα και να μην έχουν λερωθεί εξωτερικά με το βιολογικό δείγμα.

3) Τα δείγματα από ασθενείς με πιθανή ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη από Covid-19 πρέπει να φέρουν επισήμανση ότι προέρχονται από ύποπτο ή επιβεβαιωμένο κρούσμα Covid-19, επειδή σε ορισμένες φάσεις επεξεργασίας των δειγμάτων μπορεί να δημιουργηθεί αερόλυμα.

4) Τα δείγματα από ασθενείς με πιθανή ή επιβεβαιωμένη λοίμωξη από Covid-19 **ΑΠΑΓΟΡΕΥΕΤΑΙ** να διακινούνται με το σωληνωτό ταχυδρομείο.

4.3.2 Συλλογή αναπνευστικών δειγμάτων

Μπορούν να συλλεχθούν οκτώ τύποι αναπνευστικών δειγμάτων για ιογενείς ή / και βακτηριακές διαγνωστικές:

- 1) ρινοφαρυγγική πλύση / αναρρόφησης
- 2) ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα,
- 3) στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα,
- 4) βρογχοκυψελιδική πλύση,
- 5) τραχειακή αναρρόφηση,
- 6) πλευρική βρύση υγρού,
- 7) πτύελα και

8) μετά το θάνατο, ιστό. Το ρινοφαρυγγικό πλύσιμο / αναρροφήματα είναι το δείγμα επιλογής για την ανίχνευση των περισσότερων αναπνευστικών ιών και είναι ο προτιμώμενος τύπος δείγματος για παιδιά κάτω των 2 ετών.

Σε αντίθεση με τα περισσότερα αναπνευστικά παθογόνα για τα οποία τα αναπνευστικά δείγματα συλλέγονται βέλτιστα εντός 72 ωρών μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, τα επίπεδα του SARS-CoV μπορεί να είναι υψηλότερα αργότερα κατά τη διάρκεια της νόσου.

4.3.3 Συλλογή δειγμάτων από την ανώτερη αναπνευστική οδό

1. Ρινοφαρυγγική πλύση/ αναρρόφηση

Αφήνουμε τον ασθενή να καθίσει με το κεφάλι να έχει κλίση ελαφρώς προς τα πίσω. Ενσταλάζουμε 1 ml-1,5 ml μη βακτηριοστατικού φυσιολογικού ορού (pH 7,0) σε ένα ρουθόφι. Ξεπλένουμε έναν πλαστικό καθετήρα ή σωλήνα με 2 ml-3 ml αλατούχου διαλύματος. Εισάγουμε την σωλήνωση στο ρουθόφι παράλληλα με τον ουρανίσκο. Αναρρόφηση ρινοφαρυγγικών εκκρίσεων. Επαναλαμβάνουμε αυτήν τη διαδικασία για το άλλο ρουθόφι. Συλλέγουμε τα δείγματα σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Επισημαίνουμε κάθε δοχείο δείγματος με τον αριθμό ταυτότητας του ασθενούς και την ημερομηνία συλλογής. Εάν αποστέλλουμε εντός του νοσοκομείου, χρησιμοποιούμε ψυχρές συσκευασίες για να διατηρηθεί το δείγμα στους 4° C. Εάν μεταφέρεται εκτός του νοσοκομείου, συσκευάζουμε σε ξηρό πάγο.

2. Ρινοφαρυγγικά ή στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα

Χρησιμοποιούμε μόνο αποστειρωμένα επιχρίσματα ρακόν ή ραγιόν με πλαστικούς άξονες. Να μην χρησιμοποιούνται μάκτρα αλγινικού ασβεστίου ή τολύπια με ξύλινα ραβδιά, καθώς μπορεί να περιέχουν ουσίες που αδρανοποιούν ορισμένους ιούς και αναστέλλουν την PCR δοκιμασία.

Αναλυτικά:

•Ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα

Εισάγουμε έναν στυλεό στο ρουθόφι παράλληλα με τον ουρανίσκο. Αφήνουμε τον στυλεό στη θέση του για λίγα δευτερόλεπτα για να απορροφήσουμε εκκρίσεις. Σκουπίζουμε και τα δύο ρουθόφια.

•Οροφαρυγγικά επιχρίσματα

Περνάμε τις οπίσθιες περιοχές του φάρυγγα και της αμυγδαλής, αποφεύγοντας τη γλώσσα. Τοποθετούμε τα επιχρίσματα αμέσως σε αποστειρωμένα φιαλίδια που περιέχουν 2 mL μέσων μεταφοράς ιού. Σπάμε το μοχλό εφαρμογής κοντά στο άκρο για να επιτρέψουμε το σφίξιμο του καλύμματος. Επισημαίνουμε κάθε δοχείο δείγματος με τον αριθμό ταυτότητας του ασθενούς και την ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Εάν το δείγμα αποστέλλεται εντός του νοσοκομείου,

χρησιμοποιούμε ψυχρές συσκευασίες για να διατηρήσουμε το δείγμα στους 4° C. Εάν το δείγμα αποστέλλεται εκτός του νοσοκομείου, συσκευάζουμε σε ξηρό πάγο.

4.3.4 Συλλογή δειγμάτων από την κατώτερη αναπνευστική οδό

1. Βρογχοκυψελιδική πλύση, αναρρόφηση τραχείας, παρακέντηση υπεζωκοτικού

Υγρού

Φυγοκεντρούμε τη μισή ποσότητα του δείγματος και στερεώνουμε το κυτταρικό σφαιρίδιο σε φορμαλίνη. Τοποθετούμε το υπόλοιπο μη αποσυμπιεζόμενο υγρό σε αποστειρωμένα φιαλίδια με εξωτερικά πώματα και εσωτερικά στεγανοποιητικά δακτυλίου O. Εάν δεν υπάρχει εσωτερική στεγανοποίηση δακτυλίου O, σφραγίζουμε καλά με το διαθέσιμο καπάκι και ασφαλίζουμε με το Parafilm®. Επισημαίνουμε κάθε δοχείο δείγματος με τον αριθμό ταυτότητας του ασθενούς και την ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Εάν το δείγμα αποστέλλεται εντός του νοσοκομείου, χρησιμοποιούμε ψυχρές συσκευασίες για να διατηρηθεί το δείγμα στους 4°C. Εάν το δείγμα αποστέλλεται εκτός του νοσοκομείου, αποστέλλουμε σταθερά κελιά σε θερμοκρασία δωματίου και μη σταθεροποιημένα κελιά κατεψυγμένα.

2. Πτύελα

Εκπαιδεύουμε τον ασθενή σχετικά με τη διαφορά μεταξύ των πτυέλων και των εκκρίσεων από το στόμα. Ζητάμε από τον ασθενή να ξεπλύνει το στόμα με νερό και στη συνέχεια να αποβάλει βαθιά πτύελα βήχα απευθείας σε ένα αποστειρωμένο βιδωτό κυπελλάκι με καπάκι συλλογής πτυέλων ή αποστειρωμένο ξηρό δοχείο.

4.3.5 Συλλογή συστατικών αίματος

Ορός και αίμα (πλάσμα) πρέπει να συλλέγονται στην έξαρση της νόσου για δοκιμή RT-PCR. Η αξιοπιστία των δοκιμών RT-PCR που πραγματοποιούνται σε δείγματα αίματος μειώνεται καθώς η ασθένεια εξελίσσεται. Τόσο σε οξεία, όσο και σε ανάρρωση δείγματα ορού θα πρέπει να συλλέγονται για έλεγχο αντισωμάτων. Για να επιβεβαιώσουμε ή να αποκλείσουμε τη μόλυνση από SARS-CoV, είναι σημαντικό να συλλέξουμε δείγματα ορού > 28 ημέρες μετά την έναρξη της ασθένειας.

4.4. Εξετάσεις που εκτελούνται στο Βιοπαθολογικό εργαστήριο για τους κορωνοϊούς

Γενικά, οι εργαστηριακές εξετάσεις εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες:

- Μοριακές εξετάσεις , οι οποίες αναζητούν ενδείξεις ενεργού λοίμωξης και
- Ορολογικές εξετάσεις , οι οποίες ανιχνεύοντας αντισώματα στο SARS-CoV-2 αναζητούν προηγούμενη λοίμωξη. Οι ορολογικές εξετάσεις είναι για σκοπούς παρακολούθησης ή διερεύνησης και όχι για διαγνωστικούς σκοπούς.

4.4.1 Μοριακές εξετάσεις κατά το CDC

Οι μοριακές εξετάσεις χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της ενεργού λοίμωξης (παρουσία CoV) σε άτομα που πιστεύεται ότι έχουν μολυνθεί με corona -virus με βάση τα κλινικά συμπτώματά τους και έχουν συνδέσεις με μέρη όπου έχει corona -virus

- ❖ Οι δοκιμασίες PCR ,αντίστροφης μεταγραφής σε απτό χρόνο (rRT-PCR) είναι μοριακές δοκιμές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ιικού RNA σε κλινικά δείγματα. Ο τρέχων ορισμός περίπτωσης του CDC για εργαστηριακή επιβεβαίωση της μόλυνσης sars-CoV-2, απαιτεί είτε ένα θετικό αποτέλεσμα rRT-PCR για τουλάχιστον δύο συγκεκριμένους γονιδιωματικούς στόχους, είτε ένα μόνο θετικό στόχο με αλληλουχία ενός δεύτερου στόχου.
- ❖ Τα περισσότερα κρατικά εργαστήρια στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν εγκριθεί για δοκιμή για SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας μια δοκιμασία rRT-PCR που αναπτύχθηκε από το CDC.
- ❖ Η επιτυχία των δοκιμών rRT-PCR εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η εμπειρία και η εμπειρία του εργαστηρίου, το εργαστηριακό περιβάλλον (π.χ. αποφυγή μόλυνσης) και ο τύπος και η κατάσταση των δειγμάτων που δοκιμάζονται. Για αυτόν τον προσδιορισμό rRT-PCR, το CDC συνιστά τη συλλογή πολλαπλών δειγμάτων, όπως κατώτερη (βρογχική κυψελιδική πλύση, πτύελα και τραχεία αναρροφήματα) και άνω (π.χ. ρινοφαρυγγικά και στοματοφαρυγγικά επιχρίσματα) αναπνευστικά δείγματα, δείγματα ορού και κοπράνων.
 - ❖ Το CDC θεωρεί ότι ένα άτομο που βρίσκεται υπό έρευνα είναι αρνητικό για ενεργή μόλυνση SARS-CoV-2 μετά από ένα αρνητικό τεστ rRT-PCR στα συνιστώμενα δείγματα. Δεδομένου ότι ένα μόνο αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει πλήρως τη μόλυνση MERS-CoV, σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να δοκιμαστούν επιπλέον δείγματα.
- ❖ Το CDC θεωρεί ότι ένας γνωστός ασθενής covid-19, είναι αρνητικός για ενεργή μόλυνση SARS-CoV-2 μετά από δύο διαδοχικές αρνητικές δοκιμές rRT-PCR σε όλα τα δείγματα.

4.4.2 Ορολογικές δοκιμές κατά το CDC

Ορολογικός έλεγχος χρησιμοποιείται για την ανίχνευση προηγούμενης λοίμωξης (αντισώματα κατά του SARS-CoV-2) σε άτομα που ενδέχεται να έχουν εκτεθεί στον ιό. Τα αντισώματα είναι πρωτεΐνες που παράγονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος για να επιτεθούν και να σκοτώσουν ιούς, βακτήρια και άλλα μικρόβια κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Η παρουσία

αντισωμάτων στο SARS-CoV-2 δείχνει ότι ένα άτομο είχε προηγουμένως μολυνθεί με τον ιό και είχε αναπτύξει ανοσοαπόκριση.

- ❖ Η ELISA, ή ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία. Αποτελεί μια δοκιμασία διαλογής που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας και της συγκέντρωσης συγκεκριμένων αντισωμάτων που συνδέονται με μια ιική πρωτεΐνη. Συνιστάται από το CDC και στοχεύει την πρωτεΐνη S (spike protein) και την πρωτεΐνη N του νουκλεοκαψιδίου (Nucleocapsid) του κορωνοϊού SARS-CoV-2.
- ❖ Εάν ένα κλινικό δείγμα προσδιοριστεί ότι είναι θετικό σε αντίσωμα από οποιαδήποτε ELISA, τότε το CDC χρησιμοποιεί τη δοκιμή μικροεξουδετέρωσης για να επιβεβαιώσει το θετικό αποτέλεσμα.
- ❖ Η δοκιμασία μικρο-εξουδετέρωσης είναι μια εξαιρετικά ειδική επιβεβαιωτική δοκιμή που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση εξουδετερωτικών αντισωμάτων ή αντισωμάτων που μπορούν να εξουδετερώσουν τον ιό. Αυτή η μέθοδος θεωρείται πρότυπο χρυσού για την ανίχνευση συγκεκριμένων αντισωμάτων σε δείγματα ορού. Ωστόσο, σε σύγκριση με το ELISA, ο προσδιορισμός μικροεξουδετέρωσης είναι εντατικός και χρονοβόρος, απαιτώντας τουλάχιστον 5 ημέρες πριν από τα αποτελέσματα.
- ❖ Εάν ένα κλινικό δείγμα είναι θετικό είτε με ELISA, και θετικό με μικροεξουδετέρωση, το δείγμα προσδιορίζεται ότι επιβεβαιώνεται θετικό.
- ❖ Εάν ένα κλινικό δείγμα είναι θετικό και από τις δύο ELISA και αρνητικό από την εξουδετέρωση μικροαντιστοπισμού, το δείγμα προσδιορίζεται ότι είναι απροσδιόριστο.
- ❖ Εάν ένα κλινικό δείγμα είναι θετικό μόνο με μία ELISA και αρνητικό με μικροαποουρεοποίηση, το δείγμα προσδιορίζεται ως αρνητικό.
- ❖ Εάν ένα κλινικό δείγμα είναι αρνητικό και από τις δύο ELISA, το δείγμα προσδιορίζεται αρνητικό.

Στο τέλος, ο τελικός προσδιορισμός ενός επιβεβαιωμένου θετικού ορολογικού αποτελέσματος απαιτεί θετικό τεστ ELISA και επιβεβαίωση με ανάλυση μικροεξουδετέρωσης.

A. Συλλογή ορού για έλεγχο αντισωμάτων ή RT-PCR

Συλλέγουμε 5-10 ml πλήρους αίματος σε έναν σωλήνα διαχωρισμού ορού. Αφήνουμε το αίμα να πήξει, φυγοκεντρούμε για λίγο και συλλέγουμε όλους τους προκύπτοντες ορούς σε φιαλίδια με εξωτερικά καπάκια και εσωτερικά στεγανοποιητικά με δακτυλίους O. Εάν δεν υπάρχει εσωτερικό στεγανοποιητικό δακτύλιο O, σφραγίζουμε καλά με το διαθέσιμο καπάκι και ασφαλίζουμε με το Parafilm®. Η ελάχιστη ποσότητα ορού που προτιμάται για κάθε δοκιμή είναι 200 μl η οποία μπορεί εύκολα να ληφθεί από 5 mL πλήρους αίματος.

Απαιτείται τουλάχιστον 1 mL πλήρους αίματος για τον έλεγχο παιδιατρικών ασθενών. Εάν είναι δυνατόν, συλλέγουμε 1 mL σε σωληνάριο με EDTA και σε σωληνάριο πήξης. Εάν μπορεί να ληφθεί μόνο 1 mL, χρησιμοποιούμε ένα σωληνάριο πήξης.

Επισημαίνουμε κάθε δοχείο δείγματος με τον αριθμό ταυτότητας του ασθενούς και την ημερομηνία συλλογής του δείγματος. Εάν το δείγμα καταψυχθεί και μεταφερθεί στο εργαστήριο εντός του νοσοκομείου, αποστέλλεται με ψυχρές συσκευασίες για να διατηρηθεί το δείγμα στους 4° C. Εάν τα δείγματα καταψυχθούν ή μεταφερθούν εκτός, μεταφέρονται σε ξηρό πάγο.

B. Συλλογή αίματος EDTA (πλάσμα) για RT-PCR

Συλλέγουμε 5 -10 mL αίματος σε ένα σωληνάριο με EDTA (μωβ). Επισημαίνουμε κάθε δοχείο δείγματος με τον αριθμό ταυτότητας του ασθενούς και την ημερομηνία συλλογής. Αποθηκεύουμε και στέλνουμε τα δείγματα αίματος με ψυχρές συσκευασίες για να διατηρηθούν τα δείγματα στους 4° C.

III. Συλλογή δειγμάτων κοπράνων για PCR

Συλλέγουμε δείγματα κοπράνων το συντομότερο δυνατό κατά τη διάρκεια της ασθένειας. Αν και η συλλογή παλαιότερων δειγμάτων είναι ιδανική, ο ιός SARS-CoV-2 έχει εντοπιστεί στα κόπρανα μόλις ένα μήνα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων.

Τοποθετούμε κάθε δείγμα κοπράνων - όσο μεγαλύτερη ποσότητα μπορεί να ληφθεί (τουλάχιστον 10 mL) - σε στεγανό, πλαστικό δοχείο μίας χρήσης και ψύχουμε στους 4° C.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ!!!! Ψύχουμε ή καταψύχουμε τα σωληνάκια αφού τοποθετηθούν δείγματα σε αυτά. Εάν τα δείγματα θα εξεταστούν εντός 48 ωρών μετά την συλλογή, μπορούν να ψυχθούν. Εάν τα δείγματα πρέπει να διατηρηθούν περισσότερο από 48 ώρες, τα καταψύχουμε το συντομότερο δυνατό μετά την συλλογή. Παρόλο που προτιμάται η αποθήκευση σε καταψύκτη εξαιρετικά χαμηλής θερμοκρασίας (-70° C βαθειά κατάψυξη), η αποθήκευση σε καταψύκτη οικιακού τύπου (εάν έχει ρυθμιστεί σωστά στους -20° C) είναι αποδεκτή για μικρά χρονικά διαστήματα.

❖ Απαραίτητες προφυλάξεις κατά τον χειρισμό των δειγμάτων.

Όλες οι διαδικασίες της τεχνικής του μοριακού ελέγχου δεν τροποποιούνται, αναφορικά με την λειτουργία του μηχανήματος, τα ειδικά αντιδραστήρια, το ειδικό πρωτόκολλο μεθόδου. Ειδικότερα:

- Κάθε κιτ αντιδραστηρίων έχει συγκεκριμένη ημερομηνία λήξης
- Τα απόβλητα της διαδικασίας απορρίπτονται βάσει πρωτοκόλλων όσον αφορά την ειδική νομοθεσία κάθε κράτους .^[85]

- Δεν γίνεται χρήση υλικού στο μηχάνημα της RT PCR, που μπορεί να περιέχει θειοκυανική γουανιδίνη ή άλλου υλικού που να περιέχει γουανιδίνη γιατί μπορεί να δημιουργηθούν επικίνδυνες ή τοξικές ενώσεις σε περίπτωση μείγματος με χλωρίνη.

Τα θετικά αποτελέσματα είναι τυπικά της ύπαρξης RNA του ιού SARS-CoV-2.

❖ Αποτελέσματα και ερμηνεία για κλινικά δείγματα της PCR

1.Στόχος ανθρώπινου γονιδίου RNase P (RP)

Τα δείγματα των ασθενών πρέπει να εμφανίζουν καμπύλες ανάπτυξης φθορισμού για τον στόχο RP που τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (C_q 45,00), κάτι που θέτει την επιβεβαίωση της ύπαρξης ανθρώπινου γονιδίου RNase P.

Στην περίπτωση μη ανίχνευσης του στόχου RP σε ένα από τα δείγματα που εξετάζονται μπορεί να οφείλεται σε :

- Μη κατάλληλη εκτέλεση και οργάνωση της προσδιοριστικής ανάλυσης
- Μη κατάλληλη εκχύλιση νουκλεϊκού οξέος από κλινικά δείγματα με συνέπεια την έλλειψη δείγματος RNA ή/και την διάσπαση του RNA ή τη μεταφορά ουσιών ανασταλτικότητας
- Έλλειψη επαρκούς ποσότητας ανθρώπινου κυτταρικού υλικού λόγω κακής συλλογής ή απώλειας της πληρότητας του δείγματος.
- Ακατάλληλο αντιδραστήριο ή εμπλοκή στην λειτουργία του εξοπλισμού. Αν η ανάλυση RP δεν προσδιορίζει θετικά αποτελέσματα για τα κλινικά δείγματα, εμφανίζονται τα παρακάτω αποτελέσματα :

- Αν οι στόχοι N1 και N2 είναι θετικοί (C_q 45,00) ακόμη και στην περίπτωση απουσίας RP, η έκβαση του αποτελέσματος είναι έγκυρη. Ίσως κάποια δείγματα να μην εμφανίζουν καμπύλες ανάπτυξης RNase P λόγω μικρού αριθμού κυττάρων αρχικά στο κλινικό δείγμα ή λόγω ιικών στόχων που ελαττώνουν την καταβολή της ενίσχυσης RP, ειδικότερα σε δείγματα με μεγάλο ιικό φορτίο. Η ένδειξη αρνητικού σήματος RP δεν εμποδίζει μονίμως την ύπαρξη RNA του ιού SARS-CoV-2 στο εξεταζόμενο δείγμα ασθενούς.
- Αν ο στόχος RP είναι αρνητικός (μη ανίχνευση C_q ή C_q >45,00) και 1 ή και οι 2 στόχοι (N1 ,N2) είναι αρνητικοί (μη ανίχνευση C_q ή C_q >45,00), τότε ακυρώνεται το αποτέλεσμα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Σε περίπτωση αναπαραγωγής του αποτελέσματος, δηλαδή όταν και οι 2 στόχοι παραμένουν εξίσου αρνητικοί, τότε ενημερώνονται οι κλινικοί ιατροί ότι το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο και ζητείται νέο δείγμα εάν είναι εφικτό.

2.Στόχοι γονιδίων N1 και N2 του SARS-COV-2

• Ένα κλινικό δείγμα θεωρείται αρνητικό για τον ιό SARS-CoV-2 , όταν όλοι οι μάρτυρες πληρούν και τις 2 βασικές προϋποθέσεις:

-Οι καμπύλες ανάπτυξης για τους στόχους N1 και N2 ΔΕΝ τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (μη ανίχνευση Cq ή Cq >45,00).

-Η καμπύλη ανάπτυξης για τον στόχο RP ΔΕΝ τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (Cq 45,00).

• Ένα δείγμα θεωρείται θετικό για τον ιό SARS-CoV-2 όταν όλοι οι μάρτυρες πληρούν την εξής βασική προϋπόθεση :

- οι καμπύλες ανάπτυξης και για τους δύο στόχους N1 και N2 τέμνουν τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (Cq 45,00). Ο στόχος RP μπορεί να είναι ή να μην είναι θετικός αλλά το αποτέλεσμα SARS-CoV-2 παραμένει έγκυρο.

• Ένα κλινικό δείγμα θεωρείται ασαφές για τον ιό SARS-CoV-2 όταν όλοι οι μάρτυρες πληρούν ΜΙΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΔΥΟ βασικές προϋποθέσεις:

-Η καμπύλη ανάπτυξης για έναν από τους στόχους 2019-nCoV τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (Cq 45,00), ενώ η καμπύλη ανάπτυξης για τον άλλο στόχο 2019-nCoV δεν τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (μη ανίχνευση Cq ή Cq >45,00).

-Η καμπύλη ανάπτυξης για τον στόχο RP τέμνει τη γραμμή ουδού εντός 45,00 κύκλων (Cq 45,00). Σε περιπτώσεις ασαφούς αποτελέσματος, το εκχυλισμένο RNA από το δείγμα πρέπει να επαναπροσδιοριστεί.. Αν δεν υπάρχει υπόλοιπο RNA, πρέπει να εκχυλιστεί ξανά το RNA από το υπόλοιπο δείγμα και να επανεξεταστεί το δείγμα. Εάν γίνει επαλήθευση της μέτρησης , τότε αναφέρεται το αποτέλεσμα ως ασαφές.

• Στην περίπτωση που το δείγμα του μάρτυρα είναι θετικό για τα γονίδια-στόχους N1 ή N2 (Cq 45,00), τότε πιθανά να έχει δημιουργηθεί επιμόλυνση του δείγματος κατά την διαδικασία. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την ακύρωση όλων των αποτελεσμάτων των υπολοίπων δειγμάτων, που εξετάζονταν με τον εν λόγω μάρτυρα και η διαδικασία επαναλαμβάνεται εκ νέου.

Ποιοτικός έλεγχος για την PCR

• Ο ποιοτικός έλεγχος πρέπει να εκτελείται σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα, και τις απαιτούμενες διεργασίες διαπίστευσης και ποιοτικού ελέγχου του εργαστηριακού τομέα.

• Οι διεργασίες ποιοτικού ελέγχου στοχεύουν στο κατά βήμα έλεγχο των αντιδραστηρίων και της προσδιοριστικής ανάλυσης

- Σύμφωνα με το πρωτόκολλο σωστής εργαστηριακής πρακτικής (cGLP) συνιστάται πάντοτε η χρήση θετικού μάρτυρα εκχύλισης σε κάθε παρτίδα απομόνωσης νουκλεϊκού οξέος.
- Πρέπει να ελέγχονται πάντα ένας αρνητικός μάρτυρας (NTC) και ένας θετικός μάρτυρας συνθετικού RNA του ιού SARS-CoV-2 σε κάθε διεργασία ενίσχυσης και ανίχνευσης του ιού.
- Πραγματοποιείται εξέταση όλων των θετικών μαρτύρων πριν από τον έλεγχο των διαγνωστικών δειγμάτων, κάθε φορά με καινούργιο κιτ, ώστε να διασφαλιστεί η σωστή λειτουργία των συστατικών και αντιδραστηρίων του κιτ.
- Είναι απαραίτητη η παρουσία του μάρτυρα στην διαδικασία της εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος στα προς διερεύνηση δείγματα των ασθενών.

Περιορισμοί

1. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την κατάλληλη συλλογή, μεταφορά, αποθήκευση και επεξεργασία των κλινικών δειγμάτων.
2. Η τεχνική προσδιορισμού του ιού πρέπει να εκτελείται μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Η παρωχημένη γνώση ή και η έλλειψή της μπορεί να επιφέρει λανθασμένα αποτελέσματα
3. Ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος από τον εν λόγω ιό. Το νουκλεϊκό οξύ μπορεί να παραμείνει ακόμη και 3 μήνες μετά, όταν ο ιός δεν θα υπάρχει πλέον πια στον οργανισμό του πρώην ασθενούς.
4. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν θα πρέπει να λαμβάνονται ως το μοναδικό εργαλείο αποκλεισμού της λοίμωξης από τον ιό SARS-CoV-2. Συνιστάται περαιτέρω κλινικοεργαστηριακός και επιδημιολογικός έλεγχος.
5. Συνιστάται η αποφυγή της επιμόλυνσης των κλινικών δειγμάτων, και των μηχανημάτων, ακολουθώντας συγκεκριμένα πρωτόκολλα εργασίας.

Προφυλάξεις ασφαλείας

Οι εργασίες θα πρέπει να εκτελούνται μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό ώστε να αποτραπούν τυχόν λάθη.

Η εξέταση αφορά μόνο την ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος του ιού SARS-CoV-2, αποκλείοντας άλλους ιούς, και γενικότερα άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Η προετοιμασία τόσο των κλινικών δειγμάτων των ασθενών όσο και των μαρτύρων πρέπει να διενεργείται σε ξεχωριστά δωμάτια για την αποφυγή πιθανώς ψευδών θετικών αποτελεσμάτων.

Οι εξεταζόμενοι μάρτυρες και τα κλινικά δείγματα θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά μολυσματικά ή υλικά με επικίνδυνους μολυσματικούς παράγοντες σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της εργαστηριακής Βιοασφάλειας.^[86,87]

4.5 Προστασία εργαζομένων

Σύμφωνα με τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες των πρωτοκόλλων Βιοασφάλειας στον εργαστηριακό χώρο, οι υγειονομικοί υπάλληλοι κάνουν χρήση των μέσων ατομικής προστασίας, (ΜΑΠ), τα οποία περιλαμβάνουν την ιατρική ποδιά-εργαστηριακή μπλούζα, γυαλιά προστασίας, γάντια νιτριλίου χωρίς πούδρα κ.α. Οι κανόνες των πρωτοκόλλων Βιοασφάλειας στον εργαστηριακό χώρο, ορίζουν αλλαγή των εξεταστικών γαντιών μετά από κάθε επαφή με δυνητικά μολυσμένες επιφάνειες και αντικείμενα.^[88-90] Σε περίπτωση διάχυσης μολυσματικού υγρού, αμέσως γίνεται απολύμανση με ειδικά απολυμαντικά.^[84,91]

Τα δείγματα πρέπει πάντα να αντιμετωπίζονται ως μολυσματικά και να ακολουθούνται οι σωστές πρακτικές Βιοασφάλειας στον εργαστηριακό τομέα. Ο υπεύθυνος του εργαστηρίου θα πρέπει να ελέγχει την τήρηση των πρωτοκόλλων και να κάνει τυχόν επισημάνσεις και διορθώσεις, με στόχο την ασφάλεια τόσο των εργαζομένων, και του εργασιακού χώρου, όσο και του ευρύτερου περιβάλλοντος. Η ρήση, «Μόνο επαρκώς εκπαιδευμένο προσωπικό στον χειρισμό μολυσματικών υλικών» περικλείει όλη την έννοια της Βιοασφάλειας και της προστασίας των εργαζομένων στα εργαστήρια.

Σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των αρχών δημόσιας υγείας κάθε κράτους, σε πιθανή μόλυνση από τον ιό SARS-COV-2, τα εν λόγω κλινικά δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται με τις απαραίτητες προφυλάξεις, με τον ειδικό εξοπλισμό.^[92,93]

Στην διαχείριση των κλινικών δειγμάτων γίνεται χρήση ειδικού εργαστηριακού εξοπλισμού, όπως στείρα ρύγχη πιπέτας χωρίς DNάση και RNάση, με πώμα που να αποτρέπει την δημιουργία αερολύματος.

Κατά τη διάρκεια όλης της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης- PCR- πρέπει να ακολουθούνται συγκεκριμένοι κανονισμοί που να αποσκοπούν στην πρόληψη μόλυνσης, σε όλα τα στάδια, από τα δομικά στοιχεία της εν λόγω αντίδρασης :

- Οι διαδικασίες του μοριακού ελέγχου προϋποθέτουν ξεχωριστά δωμάτια εργασίας στα οποία υπάρχουν συγκεκριμένα αντιδραστήρια και αναλώσιμα για το κάθε στάδιο.
- Όλες οι επιφάνειες, στις οποίες γίνονται εργασίες του μοριακού ελέγχου, θα πρέπει να απολυμαίνονται τακτικά με ειδικά καθαριστικά σε καθημερινή βάση όπως διάλυμα χλωρίνης 10%, ή με προϊόντα όπως για παράδειγμα το RNase AWAY και το DNAZap, κ.α.

- Τα ρύγχη των πιπετών είναι μίας χρήσης και απορρίπτονται στον ειδικό κάδο με τη σήμανση για τα μολυσματικά.
- Τα αντιδραστήρια και τα σωληνάρια στα οποία γίνεται η εξέταση της PCR θα πρέπει να διατηρούνται καθαρά, μακριά από επιμολύνσεις, ερμητικά κλειστά μετά από κάθε είδους εργασία.

Απαγορεύεται ρητά η κατανάλωση φαγητού και ποτού, το κάπνισμα, το άτμισμα, στους χώρους εργασίας.

4.5.1 Απολύμανση εργαστηριακών χώρων

Η απολύμανση των εργαστηριακών δομών προϋποθέτει τη χρήση 0.1% υποχλωριώδους νατρίου (αραίωση 1:50 αν γίνεται χρήση της οικιακής χλωρίνης με αρχική συγκέντρωση 5%) κατόπιν καθαρισμού με ουδέτερης βάσης απορρυπαντικό. Αναφορικά για τις επιφάνειες που ενδέχεται να υποστούν φθορές από τη χρήση υποχλωριώδους νατρίου, κρίνεται σκόπιμο η χρήση αιθανόλης με συγκέντρωση 70% αφού πρωτίστως καθαριστεί με ουδέτερης βάσης απορρυπαντικό.^[94] Ο καθαρισμός πραγματοποιείται με τον ειδικό προστατευτικό ατομικό εξοπλισμό, σύμφωνα με το πρωτόκολλο σωστής χρήσης και απόρριψης αυτού.^[94-96]

Ο εξοπλισμός που απορρίπτεται πρέπει να θεωρείται ως ύποπτο μολυσματικό υλικό και να ακολουθούνται όλα τα προβλεπόμενα πρωτόκολλα βάσει νόμου. Στην περίπτωση που γίνεται χρήση εξοπλισμού προστασίας πολλαπλών χρήσεων, είναι επιβεβλημένο η απολύμανσή του με τα ειδικά απολυμαντικά, π.χ. 70% αιθανόλη ή 0.1% υποχλωριώδες νάτριο , μετά από κάθε χρήση. Εάν γίνει χρήση άλλων απολυμαντικών, ακολουθούνται πιστά κατά γράμμα οι οδηγίες του φυλλαδίου του σκευάσματος της κατασκευαστικής εταιρίας. Σε όλη την διάρκεια καθαρισμού και απολύμανσης του εργαστηριακού χώρου πρέπει ο αερισμός να είναι σε μέγιστη ισχύ.

Ο προστατευτικός ατομικός εξοπλισμός περιέχει:

- Ειδικά ατομικά προστατευτικά γυαλιά
- Ατομικές, μίας χρήσης, μάσκες υψηλής αναπνευστικής προστασίας τύπου FFP2 , FFP3
- Ειδική ατομική, μίας χρήσης, προστατευτική αδιάβροχη ενδυμασία , με μακριά μανίκια
- Προστατευτικά γάντια μίας χρήσης

Οι πιθανώς μολυσματικές επιφάνειες, όπως παράθυρα, τοίχοι, πλακάκια και είδη υγιεινής στο μπάνιο, πρέπει να υπόκεινται σε ιδιαίτερο καθαρισμό. Τα υφάσματα , καλύμματα, κουρτίνες, κλπ, πρέπει να πλένονται με απορρυπαντικό στους 90°C. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν λόγω της

ιδιαιτερότητας των υφασμάτων, θα πρέπει να γίνεται χρήση κατάλληλων απορρυπαντικών που να περιέχουν υποχλωριώδες νάτριο ή ειδικό απορρυπαντικό για τα συγκεκριμένα υφάσματα.

Τα πρωτόκολλα απολύμανσης σχετικά με την περίπτωση επαφής με ύποπτο ή επιβεβαιωμένο κρούσμα λοίμωξης COVID-19, το οποίο έχει παρευρεθεί για κάποιο χρονικό διάστημα στους χώρους εργασίας, εκπαίδευσης και υγείας, όπως για παράδειγμα εργασιακοί χώροι, πανεπιστήμια, φοιτητικές εστίες, σχολεία, μαθητικές εστίες, εργαστήρια, οικοτροφεία, ιδρύματα, ξενοδοχεία, δομές υγείας, εφαρμόζονται κατά γράμμα βάσει νομοθεσίας. Τώρα, εάν το άτομο με συμπτωματολογία (ήπια, μέτρια, βαριά) είναι περαστικό και δεν μένει για εύλογο χρονικό διάστημα στους συγκεκριμένους χώρους, συστήνεται η απολύμανση των τοίχων, των διαδρόμων. Οι χώροι από όπου έχει απλώς περάσει το συμπτωματικό άτομο, όπως οι διάδρομοι, συστήνεται η απολύμανση με τις συνηθισμένες πρακτικές της δομής, βασιζόμενη στο φύλλο οδηγιών του κάθε απολυμαντικού, απορρυπαντικού προϊόντος ακολουθώντας πιστά την ισχύουσα νομοθεσία.

Ο καθαρισμός των επιφανειών με τις οποίες το άτομο με συμπτωματολογία έχει έρθει σε επαφή θα πρέπει να καθαρίζονται και να απολυμαίνονται βάσει συγκεκριμένων πρωτοκόλλων.

Αναφορικά οι επιφάνειες είναι :

- πράγματα που φαίνεται να έχουν λερωθεί ή μολυνθεί μετά από επαφή με βιολογικά σωματικά υγρά του ατόμου με συμπτωματολογία
- οι υπόλοιπες επιφάνειες που ενδεχομένως να έχουν λερωθεί, πόμολα πόρτας, τηλέφωνα, χειριστήρια και οι ίδιες οι οικιακές συσκευές, τουαλέτες, μπάνια, έπιπλα, φωτιστικά, ηλεκτρονικοί υπολογιστές, κ.α.

Όσον αφορά τον καθαρισμό και την απολύμανση των, σκληρής σύστασης, επιφανειών όπως πόμολα, έπιπλα, πατώματα κ.α., πρέπει να χρησιμοποιούνται υφάσματα ή πανάκια μίας χρήσης, απορροφητικό καθαριστικό χαρτί καθώς και σφουγγαρίστρες οι οποίες θα έχουν την δυνατότητα απόσπασης κεφαλής αυτών. Μετά το πέρας της απολύμανσης των χώρων από τους οποίους υπάρχει αναφορά εμφάνισης επιβεβαιωμένου κρούσματος, τα υφάσματα, τα πανάκια και οι σφουγγαρίστρες θα πρέπει απομακρύνονται σε ειδικούς σάκους για επικίνδυνα μολυσματικά απόβλητα. Εάν για παράδειγμα τα έπιπλα που διαθέτουν ταπετσαρία δεν μπορούν να πλυθούν και να απολυμανθούν, μπορεί να γίνει χρήση του ατμού ως μέσου καθαρισμού.^[95] Αξίζει να σημειωθεί, ότι θα πρέπει σε όλα τα στάδια καθαρισμού και απολύμανσης, να εκμηδενίζεται ο ψεκασμός καθώς και το πιτσίλισμα, προς αποφυγή περαιτέρω διασποράς και προστασίας των εμπλεκόμενων.

Η λοίμωξη με τους ιούς SARS-CoV και MERS-CoV, σύμφωνα με τα δεδομένα τελευταίων μελετών, καταδεικνύουν ότι η επίδραση του ιού μειώνεται πάρα πολύ μετά τις 72 ώρες. Έχει λοιπόν ύψιστη σημασία ο καθαρισμός και η απολύμανση του χώρου, στον οποίο βρέθηκε ένα συμπτωματικό άτομο, να πραγματοποιηθεί σε αυτό το διάστημα διότι με την παρέλευση αυτού του διαστήματος το ιικό φορτίο θα αρχίσει να μειώνεται σταδιακά.^{94,97}

Για την καλύτερη οριοθέτηση και εξάλειψη της πανδημίας, υπάρχει σύσταση για καταγραφή των προσωπικών στοιχείων του προσωπικού καθαριότητας, σε περίπτωση πιθανού ή επιβεβαιωμένου κρούσματος, ώστε να υπάρξει ιχνηλάτηση και επίβλεψη των επαφών αυτών 2 εβδομάδες μετά τον καθαρισμό.

Οι νομοθετικές διατάξεις των Π.Δ. 186/95, Π.Δ. 174/97 και Π.Δ. 15/99, καθορίζουν τις ιδιότητες του εκάστου επιπέδου βιοασφάλειας (κατάλληλος εργαστηριακός εξοπλισμός, σχεδιασμός εργασιακών χώρων, εργασιακές μέθοδοι, απολύμανση χώρων) με τις οποίες κάθε εργαστηριακός τομέας πρέπει να εναρμονίζεται και να ακολουθεί πιστά.

Οι αναφερόμενες κατευθυντήριες οδηγίες εργασιακών συνθηκών (guidelines) επικυρωμένες από διεθνείς οργανισμούς αποσκοπούν σε μία ενιαία συγκεκριμένη χρήση πρωτοκόλλων και τεχνικών.. Η χρήση αυτών των πρωτοκόλλων και τεχνικών αποτρέπουν τον εμπλουτισμό προσωπικών τεχνικών και πρωτοκόλλων από τους ίδιους τους εργαζόμενους, μειώνοντας στο ελάχιστο την διασπορά των βιολογικών παραγόντων προάγοντας την προστασία της υγείας όλων. Αναπόφευκτα, η τήρηση των guidelines, μειώνει τα διαδικαστικά λάθη, φέρνοντας το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα στις πιο ασφαλείς συνθήκες. Το ISO 9000, ένα ευρέως γνωστό σύστημα ποιότητας, αντικατοπτρίζει την έννοια της σχέσης ποιότητας προϊόντος και ασφάλειας εργασίας. Μάλιστα τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση ενστερνισμού ενός συστήματος ποιότητας όλο και περισσότερων δομών/εργαστηρίων/χώρων εργασίας, το οποίο θα είναι ικανό να εκτελείται σε όλα, ανεξαιρέτως, τα στάδια της διαδικασίας παραγωγής.

Στην Ελλάδα από τον Μάρτιο του 2006 υφίσταται ειδικό πρότυπο σύστημα (ΕΛΟΤ EN ISO 15189) για την έγκριση διαπιστευτηρίων των κλινικών εργαστηρίων το οποίο ορίζει τα επίπεδα βιοασφάλειας στον εργαστηριακό τομέα (διαχείριση αποβλήτων ,μέτρα προστασίας όλων των εργαζομένων από τους μολυσματικούς βιολογικούς παράγοντες, κτιριακές υποδομές ,ειδικός εξοπλισμός, κ.τ.λ.) καθώς και επιλεκτικά θέματα οργάνωσης όπως η εκπαίδευση και η έγκυρη ενημέρωση του προσωπικού, η τήρηση χαρτοφυλακίου του ιατρικού ιστορικού των εργαζομένων, ειδικού χαρτοφυλακίου για τα χαρακτηριστικά και την ποιότητα προϊόντων, (προαναλυτικές, αναλυτικές, μετααναλυτικές διαδικασίες μηχανημάτων, αξιοπιστία, ευαισθησία και επαναληψιμότητα εργαστηριακών εξετάσεων κ.τ.λ.)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Επιδημιολογικές μελέτες στο Εργαστήριο την εποχή του SARS-CoV-2

Η βιοασφάλεια ήταν πάντα μια σημαντική πτυχή της καθημερινής εργασίας σε οποιοδήποτε ερευνητικό ίδρυμα, ιδιαίτερα για τα εργαστήρια κυτταρομετρίας Shared Resources Laboratories (SRL). Τα SRL είναι χώροι κοινής χρήσης που διευκολύνουν την ανταλλαγή γνώσεων, τεχνογνωσίας και ιδεών. Αυτή η κοινή χρήση περιλαμβάνει αναπόφευκτα την επαφή και την αλληλεπίδραση όλων εκείνων που βρίσκονται σε αυτό το εργασιακό περιβάλλον σε καθημερινή βάση. Η τρέχουσα πανδημία που προκαλείται από τον SARS-CoV-2 έχει προκαλέσει την επαναξιολόγηση πολλών πολιτικών που διέπουν τις λειτουργίες των SRL. Χιλιάδες εργαζόμενοι στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης (HCWs) έχουν μολυνθεί από τον νέο κορωνοϊό (COVID-19) κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19. Το εργαστηριακό προσωπικό στα τμήματα μετάγγισης αίματος διατρέχει μεγάλη πιθανότητα να μολυνθεί από τον ιό SARS-CoV-2, εάν η εργαστηριακή προστασία βιοασφάλειας είναι ανεπαρκής.^[98]

Όσον αφορά τις πρακτικές προστασίας της εργαστηριακής βιοασφάλειας, οι κύριες προκλήσεις ήταν οι μη βέλτιστες πρακτικές εργαστηριακής ασφάλειας και οι ανεπαρκείς εργαστηριακές συνθήκες. Οι κύριες ελλείψεις ήταν η ανεπαρκής εκπαίδευση σε θέματα ασφάλειας και ασφάλειας, καθώς και η έλλειψη ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού, φυγοκεντρικών αυτόματης αφαίρεσης καπακιού και ντουλαπιών βιοασφάλειας. Κατά συνέπεια, θα πρέπει να ενισχυθεί η εκπαίδευση του προσωπικού του εργαστηρίου σε θέματα ασφάλειας για να βελτιώσουμε τις πρακτικές προστασίας της εργαστηριακής βιοασφάλειας και να διασφαλιστεί ότι οι εργαστηριακές συνθήκες είναι επαρκείς για τη βελτίωση της ασφάλειας των εργαστηριακών διαδικασιών. Η Task Force της Διεθνούς Ομοσπονδίας Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (IFCC) για τον COVID-19 διεξήγαγε μια παγκόσμια έρευνα για να κατανοήσει πώς τα εργαστήρια βιοχημείας διαχειρίζονται τις λειτουργικές προκλήσεις κατά τη διάρκεια της πανδημίας της νόσου του κοροναϊού 2019 (COVID-19). Μια ηλεκτρονική έρευνα διανεμήθηκε παγκοσμίως για την καταγραφή των επιχειρησιακών εκτιμήσεων για τον μετριασμό των κινδύνων βιοασφάλειας στο εργαστήριο. Επιπλέον, ζητήθηκε από τα εργαστήρια να υποδείξουν τις λειτουργικές προκλήσεις που αντιμετώπισαν.^[99]

Συνολικά 1.210 έγκυρες υποβολές συμπεριλήφθηκαν σε αυτήν την ανάλυση. Οι περισσότεροι από τους συμμετέχοντες στην έρευνα εργάζονταν σε νοσοκομειακά εργαστήρια. Περίπου το 15% των εργαστηρίων περιόρισε ορισμένες δοκιμές σε ασθενείς με κλινικά ύποπτο ή επιβεβαιωμένο COVID-19 λόγω ανησυχιών για τη βιοασφάλεια. Λίγο πάνω από το 10% των εργαστηρίων χρειάστηκε να περιορίσουν το μενού δοκιμών ή τις υπηρεσίες τους λόγω περιορισμένων πόρων.

Περίπου το ένα τρίτο των εργαστηρίων πραγματοποίησαν παρακολούθηση θερμοκρασίας, ενώ τα δύο τρίτα των εργαστηρίων αύξησαν την συχνότητα απολύμανσης. Μόλις λιγότερο από το 50% των εργαστηρίων χώρισαν τις ομάδες τους.^[100]

Η μεγαλύτερη αναφερόμενη πρόκληση που αντιμετωπίζουν τα εργαστήρια κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, είναι η εξασφάλιση επαρκών προμηθειών ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού (ΜΑΠ), αναλυτικού εξοπλισμού, συμπεριλαμβανομένων αυτών που χρησιμοποιούνται στο σημείο περίθαλψης, καθώς και αντιδραστηρίων, αναλώσιμα και άλλα εργαστηριακά υλικά. Σημαντικό ρόλο έπαιξε και το εργασιακό stress όσο και οι τρόποι διαχείρισης του, όσο και το burn-out των υγειονομικών υπαλλήλων.^[101]

Ο περιορισμός των εξετάσεων και των υπηρεσιών μπορεί να έχει ανεπιθύμητες συνέπειες καθώς οι κλινικοί ιατροί στερούνται σημαντικές πληροφορίες για την παροχή της κατάλληλης φροντίδας στους ασθενείς τους. Ο κατάλογος του προσωπικού και οι ανησυχίες για τη βιοασφάλεια απαιτούν μακροπρόθεσμες λύσεις, καθώς είναι ζωτικής σημασίας για τη συνεχή λειτουργία του εργαστηρίου κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης πανδημίας.^[99]

Μελέτη που διεξήχθη στη Νιγηρία, διανεμήθηκε ερωτηματολόγιο μέσω του διαδικτύου και αναλύθηκε με τη χρήση στατιστικού πακέτου SPSS.25, έδειξε ότι η πλειονότητα των ερωτηθέντων είχε υψηλή επίγνωση των εργαστηριακών μέτρων ασφαλείας (60,3%) και επέδειξαν καλές προσωπικές προσπάθειες για τη δημιουργία ενός ασφαλούς περιβάλλοντος εργαστηριακών δοκιμών (63%). Το επίπεδο ευαισθητοποίησης των εργαστηριακών μέτρων ασφαλείας συσχετίστηκε σημαντικά με το επίπεδο εκπαίδευσης των ερωτηθέντων ($\chi^2=6.143$; $p=0,046$) και επηρεάζει τις προσπάθειες των ερωτηθέντων να δημιουργήσουν ένα ασφαλές περιβάλλον εργαστηριακών δοκιμών ($p=0,007$). Ωστόσο, μόνο λίγοι ερωτηθέντες θα μπορούσαν να επιβεβαιώσουν πειστικά τη διαθεσιμότητα επαρκών και κατάλληλων ΜΑΠ με κατάλληλη εκπαίδευση χρήσης (45,1%), επαρκή ανάπαυση και άλλα πακέτα πρόνοιας (45,8%) καθώς και πρόσβαση σε κατάλληλα ντουλάπια βιολογικής ασφαλείας (BSC) και άλλα βασικό εξοπλισμό στα εργαστήριά τους (48,8%). Επιπλέον, υπήρξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της διαθεσιμότητας των παραγόντων που βοηθούν την ασφάλεια του εργαστηρίου και των προσπαθειών των ερωτηθέντων να δημιουργήσουν ένα ασφαλές περιβάλλον για δοκιμές με την τιμή p να κυμαίνεται μεταξύ $< 0,0001$ και $0,003$. Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη αποκάλυψε ότι παρά την υψηλή επίγνωση των μέτρων ασφαλείας και τις καλές προσωπικές προσπάθειες των συμμετεχόντων στη μελέτη για τη δημιουργία ενός ασφαλούς περιβάλλοντος εργαστηριακών δοκιμών, υπήρχε ανεπαρκής διαθεσιμότητα εγκαταστάσεων ασφαλείας, εξοπλισμού, υποστήριξης και πακέτων πρόνοιας που απαιτούνται για την ενίσχυση της ασφαλείας τους. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να παρέχουμε τον απαραίτητο εργαστηριακό εξοπλισμό βιοασφάλειας και ΜΑΠ προκειμένου να μην τίθεται σε κίνδυνο η ασφάλεια των επιστημόνων της ιατρικής καθώς εκτελούν τα καθήκοντά τους στην αντιμετώπιση της πανδημίας COVID-19.^[101]

Σε μελέτη, η οποία διερευνούσε την συμμόρφωση του τεχνικού προσωπικού ιατρικών εργαστηρίων (MLT) στις πρακτικές ελέγχου των λοιμώξεων κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19, ανέδειξε ότι η συμμόρφωση των τεχνικών ιατρικών εργαστηρίων στις οδηγίες ελέγχου λοιμώξεων είναι απαραίτητη για τη μείωση του κινδύνου έκθεσης σε μολυσματικούς παράγοντες. Ο πληθυσμός της

μελέτης αποτελούνταν από 444 MLT που εργάζονταν σε ιδιωτικούς και κρατικούς τομείς υγείας στην Ιορδανία. Περισσότερο από το 87% των συμμετεχόντων ανέφερε συμμόρφωση με τις οδηγίες για την υγιεινή των χεριών και τη χρήση ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού (ΜΑΠ) κατά την αλληλεπίδραση με ασθενείς (74,5%) και το χειρισμό κλινικών δειγμάτων (70,0%). Επιπλέον, το 88,1%, το 48,2% και το 7,7% ανέφεραν ότι φορούσαν ποδιά εργαστηρίου, μάσκες προσώπου και γυαλιά, ανά πάσα στιγμή, αντίστοιχα. Η πλειοψηφία ανέφερε αυξημένη τήρηση των πρακτικών ελέγχου των λοιμώξεων κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19. Αυτό περιλαμβάνει αυξημένη χρήση ΜΑΠ στο χώρο εργασίας (94,2%), αυξημένη συχνότητα απολύμανσης εργαστηριακών επιφανειών (92,4%) και εργαστηριακού εξοπλισμού (86,7%) και αυξημένη συχνότητα πλυσίματος χεριών/χρήσης αντισηπτικών (94,6%). Η κατοχή πτυχίου συνδέθηκε σημαντικά με την αυξημένη συμμόρφωση των συμμετεχόντων στην καθημερινή χρήση γυαλιών/προστασίας ματιών ($p=0,002$), και τη χρήση ΜΑΠ κατά το χειρισμό κλινικών δειγμάτων ($p=0,011$). Η ύπαρξη εργασιακής εμπειρίας >10 ετών συσχετίστηκε με αυξημένη τήρηση της χρήσης ΜΑΠ κατά το χειρισμό κλινικών δειγμάτων ($p=0,001$).

Συμπερασματικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι οι τεχνικοί ιατρικών εργαστηρίων ανέφεραν πολύ καλή συμμόρφωση με τις περισσότερες αξιολογημένες πρακτικές ελέγχου λοιμώξεων. Επιπλέον, ανέφεραν αυξημένη συμμόρφωση με τις κατευθυντήριες γραμμές ελέγχου των λοιμώξεων κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID-19. ^[102]

Με την απουσία ειδικής και τεκμηριωμένης έως τώρα θεραπείας και μόνο με τα διαθέσιμα εμβόλια για τον κορωνοϊό, η καταλληλότερη προσέγγιση για τον έλεγχο της COVID-19 λοίμωξης είναι να τεθούν σε καραντίνα άτομα και να απομονωθούν συμπτωματικά άτομα και ύποπτα ή μολυσμένα κρούσματα. Αν και η ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής-πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) θεωρείται το πρότυπο εργαλείο (gold standard) για την οριστική διάγνωση της νόσου COVID-19, το υψηλό ψευδώς αρνητικό ποσοστό, η χαμηλή ευαισθησία, οι περιορισμένες προμήθειες και οι αυστηρές απαιτήσεις για εργαστηριακές ρυθμίσεις ενδέχεται να καθυστερήσει την ακριβή διάγνωση. Η αξονική τομογραφία (CT) έχει αναφερθεί ως σημαντικό εργαλείο για τον εντοπισμό και τη διερεύνηση ύποπτων ασθενών με νόσο COVID-19 σε πρώιμο στάδιο. ^[102]

Άλλη μελέτη, ^[103] έθεσε ως στόχο την εξέταση των θετικών επιδράσεων του κατάλληλου ατομικού προστατευτικού εξοπλισμού για επαγγελματίες υγείας πρώτης γραμμής που παρείχαν φροντίδα σε ασθενείς με νόσο Covid-19, σε τέσσερα νοσοκομεία στη Wuhan, Κίνα. Συμμετείχαν 420 επαγγελματίες υγείας (116 γιατροί και 304 νοσηλευτές) που εργάζονταν στη Γουχάν σε δύο συνδεδεμένα νοσοκομεία του Πανεπιστημίου Sun Yat-sen και του Νοσοκομείου Nanfang του Southern Medical University για 6-8 εβδομάδες, από τις 24 Ιανουαρίου έως τις 7 Απριλίου 2020. Στους συμμετέχοντες στη μελέτη παρασχέθηκε κατάλληλος ατομικός προστατευτικός εξοπλισμός για την παροχή υγειονομικής περίθαλψης σε ασθενείς που εισήχθησαν στο νοσοκομείο με Covid-19 και συμμετείχαν σε διαδικασίες παραγωγής αεροζόλ. Επιλέχθηκαν 77 επαγγελματίες υγείας

χωρίς ιστορικό έκθεσης στην Covid-19 και 80 ασθενείς που είχαν αναρρώσει από την Covid-19 για να επαληθευτεί η ακρίβεια της εξέτασης αντισωμάτων. Ως συμπτωματολογία θεωρήθηκαν πυρετός, βήχας και δύσπνοια, καθώς και ενδείξεις σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου λοίμωξης από κοροναϊό 2 (SARS-CoV-2), που ορίζεται ως θετικό τεστ για νουκλεϊκά οξέα ειδικά για τον ιό σε ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα ή ένα θετικό τεστ για αντισώματα IgM ή IgG στα δείγματα ορού. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η μέση ηλικία των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν 35,8 έτη, ενώ το 68,1% (286/420) ήταν γυναίκες. Οι συμμετέχοντες στη μελέτη, εργάζονταν 4-6 ώρες βάρδιες, κατά μέσο όρο 5,4 ημέρες την εβδομάδα, και κατά μέσο όρο 16,2 ώρες κάθε εβδομάδα σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Και οι 420 συμμετέχοντες στη μελέτη είχαν άμεση επαφή με ασθενείς με Covid-19 και πραγματοποίησαν τουλάχιστον μία διαδικασία παραγωγής αεροζόλ. Κατά τη διάρκεια της περιόδου ανάπτυξης στη Γουχάν, κανένας από τους συμμετέχοντες στη μελέτη δεν ανέφερε συμπτώματα που σχετίζονται με τον Covid-19. Όταν οι συμμετέχοντες επέστρεψαν στο σπίτι, όλοι βρέθηκαν αρνητικοί για ειδικά νουκλεϊκά οξέα SARS-CoV-2 και αντισώματα IgM ή IgG (95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,0 έως 0,7%).^[103]

Συμπερασματικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι προτού διατεθεί ένα ασφαλές και αποτελεσματικό εμβόλιο, οι επαγγελματίες υγείας παραμένουν ευάλωτοι στην Covid-19. Παρά το γεγονός ότι διατρέχουν υψηλό κίνδυνο έκθεσης, οι συμμετέχοντες στη μελέτη προστατεύτηκαν κατάλληλα και δεν προσβλήθηκαν από λοίμωξη, ούτε ανέπτυξαν προστατευτική ανοσία έναντι του SARS-CoV-2. Τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης πρέπει να δίνουν προτεραιότητα στην προμήθεια και διανομή εξοπλισμού ατομικής προστασίας και να παρέχουν επαρκή εκπαίδευση στους επαγγελματίες υγείας στη χρήση του %).^[103,104]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η κατάσταση στην οποία βρίσκεται η παγκόσμια κοινότητα την τελευταία διετία, έθεσε σε μεγάλο συναγερμό τόσο την ιατρική κοινότητα, όσο και τις πολιτικές ηγεσίες των χωρών, που κλήθηκαν να διαχειριστούν μία πανδημία, μετά ουσιαστικά από έναν αιώνα, από την πανδημία της ισπανικής γρίπης. Το ξέσπασμα στην πόλη Wuhan της Κίνας το Δεκέμβριο του 2019, και η ραγδαία εξάπλωσή του εντός και εκτός των ορίων της Κίνας, σε όλο τον κόσμο, έφερε τρομερές αλλαγές σε όλους τους τομείς (πολιτικό, οικονομικό, κοινωνικό, εργασιακό, ιατρικό, θρησκευτικό τομέα).^[43-45]

Η σύγχυση που επικράτησε στις αρχές της πανδημίας, τόσο για την προέλευση του ιού, την λοιμογόνο δράση του, τη διασπορά και μεταδοτικότητα του, σε συνδυασμό με την ανέτοιμη κατάσταση των συστημάτων υγείας των εκάστοτε χωρών, κατέστησαν την πανδημία του SARS-

CoV-2, εξαιρετικά δύσκολη στη διαχείρισή της. Οι αντικρουόμενες απόψεις περί χρήσης της μάσκας, σε υγιείς και νοσούντες, είδους μάσκας, απλής χειρουργικής, FFP2, FFP3, με βαλβίδα, υφασμάτινης, ο τρόπος μετάδοσης και μολυσματικότητας, η επιβίωση του ιού, ο χρόνος και ο μηχανισμός της λοιμογόνου δράσης του, η ασυμπτωματική φορεία και οι τρόποι ελέγχου και αντιμετώπισης, η έννοια της καραντίνας και του εγκλεισμού, η περιορισμένη χρήση των μοριακών μεθόδων PCR λόγω κόστους σε παγκόσμια κλίμακα, η έλλειψη γνώσεων για το συγκεκριμένο στέλεχος, έφερε προ τετελεσμένων την παγκόσμια κοινότητα με αποτέλεσμα τον τραγικό απολογισμό εκατομμυρίων νεκρών και πρώην νοσούσαντων με post – Covid syndrome, οι οποίοι χρήζουν μακροχρόνιας ιδιαίτερης και πολυδάπανης παρακολούθησης και αντιμετώπισης. [47-49]

Το σύνδρομο long covid ή post covid-19 είναι ένας ιατρικός όρος που αναφέρεται στις συνέπειες κατόπιν νοσήσεως από κορωνοϊό στην υγεία του πρώην ασθενή από COVID-19, εβδομάδες ή και μήνες μετά από τη νόσηση. Ειδικότερα, ο κορωνοϊός SARS-CoV-2 προκαλεί οξεία αναπνευστική νόσο, τα συμπτώματα της οποίας εμφανίζουν οι ασθενείς ακόμη και μετά την παρέλευση τριών μηνών από την έναρξη της οξείας φάσης της λοίμωξης. Μάλιστα σύμφωνα με τις πηγές του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), ένας ορισμένος αριθμός ασθενών, μετά την νοσηλεία τους παρουσιάζουν συμπτώματα όπως εύκολη κόπωση, συμπτώματα καρδιαγγειακής, αναπνευστικής και νευρολογικής φύσης, τα οποία έχουν σαν χαρακτηριστικό την εμφάνισή τους μετά την παρέλευση του διμήνου από την οξεία φάση της νόσου, χωρίς να μπορεί να δοθεί άλλη αιτιολογική εξήγηση για την εμφάνισή τους.

Οι πρώην ασθενείς της νόσου COVID-19 που επέζησαν, εκδηλώνουν σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 30% έως 80%, τουλάχιστον ένα από τα προαναφερθέντα συμπτώματα, διάρκειας αρκετών μηνών κατόπιν υποχωρήσεως της οξείας φάσης της νόσου. [110,111] Το ευτυχές είναι ότι οι περισσότεροι ασθενείς δεν χρήζουν νοσηλείας.

Τον Ιούνιο του 2021 το Imperial College του Λονδίνου δημοσίευσε μία έρευνα που αφορούσε 1/2 εκατομμύριο άτομα, τα οποία νόσησαν στην Αγγλία. Τα αποτελέσματα της έρευνας ήταν θεαματικά, η μεγαλύτερη ομάδα ασθενών εμφάνισε γενικά συμπτώματα, όπως αδυναμία, κακουχία, κεφαλαλγία, εύκολη κόπωση, σε αντίθεση με τη μικρότερη ομάδα ασθενών που εμφάνισε συμπτώματα του αναπνευστικού όπως δύσπνοια, βήχας. [112]

6.1 Συμπτώματα-Διάγνωση του long covid ή post covid-19 συνδρόμου

Η κλινική συμπτωματολογία του συνδρόμου long covid-19 είναι η εξής:

- γενική μη εστιασμένη συμπτωματολογία, όπως εύκολη κόπωση, αδυναμία, ζάλη
- συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα (βήχας, δύσπνοια κ.α.)

- συμπτώματα από το ανοσολογικό σύστημα (αλλαγή στην εικόνα των ήδη υπαρχουσών αυτοάνοσων νοσημάτων με υφέσεις και εξάρσεις)
- συμπτώματα από το καρδιαγγειακό σύστημα (πόνος στο στήθος, ταχυκαρδία, αρρυθμίες, περιπτώσεις μυοκαρδίτιδας, περικαρδίτιδας)
- συμπτώματα από το μυοσκελετικό σύστημα (μυαλγίες, αρθραλγίες)
- συμπτώματα από το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα (διαταραχές ύπνου, διαταραχές συγκέντρωσης και μνήμης με ενδεχόμενη ακόμη και απώλεια αυτών, αλλαγή ή απώλεια γεύσης και όσφρησης, κ.α.)
- συμπτώματα από το αιματολογικό σύστημα (λευκοπενία, λεμφοπενία, διαταραχές πήξης και αιμόστασης, θρομβώσεις, κ.α.)
- συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα (γαστρεντερικές διαταραχές, διαρροϊκό σύνδρομο, κ.α.)
- συμπτώματα από το νεφρικό / ουροποιητικό σύστημα (ηλεκτρολυτικές διαταραχές, επιδείνωση παθήσεων, όπως χρόνια νεφρική νόσος, κ.α.)
- συμπτώματα από το ενδοκρινικό σύστημα (διαταραχές εμμήνου ρύσεως, κ.α.)

Το σύνδρομο του long covid-19 έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- η διάγνωσή του γίνεται μετά την παρέλευση 3 μηνών από τα πρώτα συμπτώματα της νόσου Covid-19
- τα συμπτώματα ενδέχεται να μην έχουν υποχωρήσει 3 μήνες από την αρχική φάση της νόσου και να επιμένουν
- το σύνδρομο long covid έχει μια αρχή, όμως πιθανώς να μην έχει ένα σαφές τέλος

Τα στοιχεία πρόσφατων μελετών κατέδειξαν ότι μόλις το 22,9% των ασθενών, μετά από 1 χρόνο, απαλλάχθηκαν από την συμπτωματολογία, μάλιστα αναφέρουν ότι κάποια συμπτώματα υποχωρούν πιο γρήγορα, άλλα αργότερα με υφέσεις και εξάρσεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα, τα συμπτώματα της COVID-19 από το νευρολογικό σύστημα τα οποία επιμένουν και μετά από ένα χρόνο από την έναρξη της νόσου.

Η long COVID, από τα επίσημα στοιχεία προσβάλλει περισσότερο τις γυναίκες παρά τους άνδρες, όμως οι άνδρες προσβάλλονται πιο βαριά, με υψηλότερους δείκτες, αυτών της νοσηλείας, διασωλήνωσης και θνητότητας.

Ηλικιακά, προσβάλλει περίπου το 10% των ατόμων ηλικίας 18-49 ετών και 22% των ατόμων άνω των 70 χρόνων. Ασθενείς με υποκείμενο νόσημα όπως το αλλεργικό άσθμα είναι πιθανότερο να

εκδηλώσουν long Covid, παράλληλα 10 στα 100 παιδιά που ασθένησαν από Covid-19, εκδηλώνουν συμπτωματολογία συνδρόμου long Covid.

Οι 2 βασικές ομάδες ασθενών που θα εκδηλώσουν συμπτωματολογία συνδρόμου long Covid, είναι οι εξής:

1. πρώην ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα όπως αναπνευστικά (ΧΑΠ, άσθμα, πνευμονική υπέρταση, κ.λ.π.), καρδιολογικά (ΑΥ,αρρυθμίες, κ.λ.π.), γαστρεντερικά (έλκος, κολίτιδα, κ.λ.π.), νευρολογικά (νόσος Πάρκινσον, άνοια κ.λ.π.), νεφρολογικά (ΧΝΝ, σπειραματονεφρίτιδα,κ.λ.π.) νοσήματα ενδοκρινών αδένων (ύπερ ή υποθυρεοειδισμός, κ.λ.π.)

2. πρώην ασθενείς δίχως γνωστά υποκείμενα νοσήματα πριν την λοίμωξη από τον COVID-19.

Σε όλες τις περιπτώσεις, το χρονικό διάστημα της ανάρρωσης από τη λοίμωξη, δεν επηρεάζεται από το χρονικό διάστημα της οξείας φάσης της νόσου, τη μετέπειτα νοσηλεία, τη διασωλήνωση την μεταφορά στη ΜΕΘ.

Σε μία πρόσφατη δημοσίευση μελέτης του Γραφείου Εθνικής Στατιστικής του Ηνωμένου Βασιλείου διεξήχθη πληθυσμιακή έρευνα σε 2.326 μαθητές που νόσησαν από COVID-19, σύμφωνα με την οποία το 13 % των παιδιών ηλικίας 2 έως 11 ετών και το 14,5 % των παιδιών ηλικίας 12 έως 16 ετών εμφάνισαν κάποια συμπτώματα όπως βήχας, εύκολη κόπωση, μυοσκελετικούς πόνους, κεφαλαλγία. Η πληθυσμιακή αυτή ομάδα εμφάνισε το σύνδρομο long Covid, όπου αποκτήθηκαν πολύτιμα στοιχεία και εμπειρία, που μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για ιδιότυπες περιπτώσεις. Η μελέτη αυτή ανέδειξε μία πρωτόγνωρη κατάσταση, την επιμονή και παραμονή συμπτωμάτων (εύκολη κόπωση και αδυναμία) σε έναν στους δέκα μαθητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης για περισσότερο από έναν μήνα μετά την αρχική διάγνωση της νόσου COVID-19. Συμπληρωματικά, στην μελέτη αυτή, ένας στους έξι από τους δέκα μαθητές περιόρισε τις καθημερινές δραστηριότητές του, λόγω ανικανότητας εκτέλεσης.

Αναφορικά με το θεραπευτικό κομμάτι, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα σκευάσματα, όπως για παράδειγμα η κολχικίνη, σε ειδικές κατηγορίες ασθενών, λόγω υψηλής τοξικότητας και παρενεργειών. Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί και για τα εμβόλια για τα οποία οι αρχικές εκτιμήσεις ανέφεραν περισσότερη και μεγαλύτερη προστασία σε ισχύ και χρόνο, ενώ στην πορεία οι αρχικές προσδοκίες διαψεύσθηκαν με ακόλουθο νέο σχεδιασμό κινήσεων για την αντιμετώπιση της πανδημίας.^[68,69]

Τα μέτρα προστασίας και οριοθέτησης της πανδημίας στον εργασιακό χώρο και ειδικά στο Εργαστήριο, υπέστησαν και αυτά αλλαγές, και αυτό γιατί αρχικά δεν υπήρχε μια ολοκληρωμένη σφαιρική εικόνα για το γονιδίωμα του ιού και τον τρόπο δράσης του. Στην αρχή υπήρχε πολύς σχολαστικός καθαρισμός των επιφανειών με ειδικά απολυμαντικά, που στην συνέχεια αναθεωρήθηκε διότι οι έρευνες έδειξαν ότι ο ιός δεν επιβιώνει για χρονικό διάστημα πέραν των 72 ωρών σε επιφάνειες.^[83,86, 87]

Όσον αφορά τη χρήση των ΜΑΠ, έχει πλέον καταστεί σαφές η χρησιμότητα και η αναγκαιότητα των Μέσων Ατομικής Προστασίας (ΜΑΠ) σε όλους τους χώρους υγειονομικού ενδιαφέροντος και μάλιστα η επικαιροποίηση των πρωτοκόλλων δείχνει μία πιο αυστηρή αντιμετώπιση λόγω και των πρόσφατων μεταλλάξεων, όπως η δέλτα μετάλλαξη που έχει κυριεύσει στον ελλαδικό χώρο, με την όμικρον να ακολουθεί, τα δεδομένα της οποίας ακόμα διερευνώνται.^[89- 91]

Τέλος, αναδύονται πολλά και εύλογα ερωτήματα ως προς τη διαχείριση της πανδημίας σε πολιτικό, οικονομικό, επιστημονικό, κοινωνικό επίπεδο, με τις ανάλογες αστοχίες ή αντίθετα ευστοχίες της εν λόγω διαχείρισης. Όπως:

1. Είναι σε θέση ισχύος η επιστημονική κοινότητα σε σχέση με τους CORONAVIRUSES και ειδικά με τον SARS-Cov- 2;
2. Η ενασχόληση των επαγγελματιών υγείας με την πανδημία έχει φέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα, την οριοθέτησή της και εν τέλει την εξουδετέρωση του ιού, και αν όχι,
3. Ποιοι είναι εκείνοι οι παράγοντες που θα την καθορίσουν;

Τα ερωτήματα πολλά. Με απώτερο στόχο την επιστροφή στην κανονικότητα με διαφορετικούς βέβαια όρους καλείται η επιστημονική κοινότητα, για άλλη μία φορά στην ανθρώπινη ιστορία, να βρει και να δώσει τις κατάλληλες απαντήσεις, να ανασυγκροτηθεί και να συνταχθεί ενιαία και προγραμματισμένα, ώστε στο μέλλον να είναι κατάλληλα προετοιμασμένη για παρόμοιες καταστάσεις, με γνώμονα την εμπειριστατωμένη γνώση και πολύτιμη εμπειρία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tyrrell DA, Fielder M, (2002); Cold Wars: The Fight Against the Common Cold. Oxford University Press p. 96. ISBN 978-0-19-263285-2
2. Ellis H, (2003); Cold Wars: The Fight against the Common Cold. BMJ, 326(7379):57. PMC1124964
3. Lalchandama K, (2020); The chronicles of coronaviruses: the bronchitis, the hepatitis and the common cold. Science Vision, 20 (1):43–53. doi:10.33493/scivis.20.01.04
4. Almeida JD, Berry DM, Cunningham CH, Hamre D, Hofstad MS, Mallucci L, McIntosh K, Tyrrell DAJ, (1968); Virology: Coronaviruses, Nature 220(5168): 650. Available from: <https://doi.org/10.1038/220650b0>
5. Murray PR, Pfaller MA, Rosenthal KS, (2012); Ιατρική Μικροβιολογία. Εκδόσεις Παρισιάνου; σελ.597–600. ISBN 978-960-394-903-9
6. Definition of CORONAVIRUS. Available from: www.merriam-webster.com. Retrieved 7-2-2021
7. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY, (2010); Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. Viruses, 2(8):1804–1820, doi:10.3390/v2081803
8. Gu J, Han B, Wang J, (2020); COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal–Oral Transmission, Gastroenterology, 158(6):1518–1519. doi:10.1053/j.gastro.2020.02.054
9. Shors T, (2021); Coronavirus. Access Science, doi:<https://doi.org/10.1036/1097-8542.163220>
10. Sturman LS, Holmes KV, (1983); The Molecular Biology of Coronaviruses. Advances in Virus Research, 28: 35–112. doi:10.1016/S0065-3527(08)60721-6
11. Estola T, (1970); Coronaviruses, a New Group of Animal RNA Viruses. Avian Diseases, 14 (2): 330–336. doi:10.2307/1588476
12. Tyrrell DA, Bynoe ML, (1965); Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. British Medical Journal, 1(5448):1467–70. doi:10.1136/bmj.1.5448.1467
13. Kendall EJ, Bynoe ML, Tyrrell DA, (1962); Virus isolations from common colds occurring in a residential school. British Medical Journal, 2 (5297):82–6. doi:10.1136/bmj.2.5297.82
14. Hamre D, Procknow JJ, (1966); A new virus isolated from the human respiratory tract. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 121 (1): 190–3. doi:10.3181/00379727-121-30734
15. Almeida JD, Tyrrell DA, (1967); The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture». The Journal of General Virology, 1 (2): 175–8. doi:10.1099/0022-1317-1-2-175
16. Almeida J, (2008); June Almeida (née Hart). BMJ, 336(7659):1511. doi: 10.1136/bmj.a434
17. Almeida JD, Tyrrell DA, (1967); The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. J Gen Virol, 1(2):175-8. doi: 10.1099/0022-1317-1-2-175
18. Shors T, (2020); Department of Biology and Microbiology, University of Wisconsin, Oshkosh, Wisconsin. Last reviewed: January 2021. Available from: doi:<https://doi.org/10.1036/1097-8542.163220>
19. King A, (2020); An uncommon cold. New Scientist, 246(3280):32-35, doi:10.1016/S0262-4079(20)30862-9

20. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C, (2018); Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res*, 100:163-188. doi: 10.1016/bs.aivir.2018.01.001
21. Lau SK, Woo PC, Yip CC, Tse H, Tsoi HW, Cheng VC, Lee P, (2006); Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol*, 44(6):2063-71. doi: 10.1128/JCM.02614-05
22. Zhang J, Markotter W, Kuzmin IV, Holmes EC, Tong S, (2017); Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History. *J Virol*, 91(5):e01953-16. doi: 10.1128/JVI.01953-16
23. Corman VM, Lienau J, Witzentrath M, (2019); Coronaviruses as the cause of respiratory infections. *Internist*, 60(11):1136-1145. doi: 10.1007/s00108-019-00671-5
24. van der Hoek L, (2007); Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther*, 12(4 Pt B):651-8. PMID:17944272
25. Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, Carlson-Stevermer J, (2021); Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell*, 184(1):106-119. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.004
26. Al-Eitan LN, Tarkhan AH, Alghamdi MA, Marston DA, Wu G, McElhinney LM, Brown IH, Fooks AR, (2020); Bat-Borne Coronaviruses in Jordan and Saudi Arabia: A Threat to Public Health? *Viruses*, 12(12):1413. doi: 10.3390/v12121413
27. Lostroh P, (2019); *Molecular and Cellular Biology of Viruses*, CRC Press Inc. ISBN-10: 0815345232
28. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, Shum MHH, Jiang JF, Zhu HC, Tong YG, (2020); Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583:282–285. doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>
29. Paules CI, Marston HD, Fauci AS, (2020); Coronavirus infections—More than just the common cold. *JAMA*, 323(8):707–708. doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.0757>
30. Perlman S, (2020); Another decade, another coronavirus. *N. Engl. J. Med*, 382:760–762. doi: <https://doi.org/10.1056/nejme2001126>
31. Kahn JS, (2006); The widening scope of coronaviruses. *Curr Opin Pediatr*, 18(1):42-7. doi: 10.1097/01.mop.0000192520.48411.fa.
32. Kristoffersen AW, Nordbø SA, Rognlien AG, Christensen A, Døllner H, (2011); Coronavirus causes lower respiratory tract infections less frequently than RSV in hospitalized Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J*, 30(4):279-83. doi:10.1097/INF.0b013e3181fcb159
33. Pyrc K, Berkhout B, van der Hoek L, (2007); Identification of new human coronaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5(2):245-53. doi: 10.1586/14787210.5.2.245
34. Kuypers J, Martin ET, Heugel J, Wright N, Morrow R, Englund JA, (2007); Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics*, 119(1):e70-6. doi: 10.1542/peds.2006-1406
35. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF, (2020); The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*, 26(4):450-452. doi:10.1038/s41591-020-0820-9
36. Drexler JF, Corman VM, Drosten C, (2014); Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res*, 101:45-56. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.10.013
37. Luk HKH, Li X, Fung J, Lau SKP, Woo PCY, (2019); Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol*, 71:21-30. doi: 10.1016/j.meegid.2019.03.001
38. Tao Y, Shi M, Chommanard C, Queen K, Zhang J, Markotter W, (2017); Surveillance of Bat Coronaviruses in Kenya Identifies Relatives of Human Coronaviruses NL63 and 229E and Their Recombination History. *J Virol*, 91(5):e01953-16. doi: 10.1128/JVI.01953-16

39. Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, (2015); Evidence for an Ancestral Association of Human Coronavirus 229E with Bats. *J Virol*, 89(23):11858-70. doi: 10.1128/JVI.01755-15
40. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, (2012); Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86 (7): 3995–4008. doi:10.1128/JVI.06540-11
41. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M, (2017); Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*, 25 (1): 35–48. doi:10.1016/j.tim.2016.09.001
42. Wertheim JO, Chu DKW, Peiris JSM, Pond SLK, Poon LLM, (2013); A case for the ancient origin of coronaviruses. *Journal of Virology*, 87 (12): 7039–45. doi:10.1128/JVI.03273-12
43. Coronavirus disease (COVID-19). Available from: www.who.int. Retrieved 26-3-2021
44. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *σελ.* 11–12. Retrieved 5-3-2020
45. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, (2020); Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395 (10223):497–506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
46. Outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): increased transmission beyond China – fourth update. ECDC, 20-2-2020
47. Heymann DL, Shindo N, (2020); COVID-19: what is next for public health?. *Lancet*, 395(10224):542–545. doi:10.1016/s0140-6736(20)30374-3
48. Nikolettseas MM, (2020); Covid-19 Loci of Infection: transport pathways and mechanisms. ISBN 978-1087885742
49. Coronavirus Disease 2019, (COVID-19). Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved 2-3-2020
50. CDC. COVID-19 and Your Health. Retrieved 16-2-2021
51. Organization, World Health. Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report 12, 2020
52. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019. Retrieved 9-4- 2021
53. CDC. Cases, Data, and Surveillance. Retrieved 27-2-2021
54. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, (2020); Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809): 465–469. doi:10.1038/s41586-020-2196-x
55. Sunil T, (2020); The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. *Pathogens and Immunity*, 5 (1): 342–363. doi:10.20411/pai.v5i1.377
56. Letko M, Marzi A, Munster V, (2020); Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*, 5(4):562-569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y
57. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS, (2020); Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*, 46(4):586-590. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9
58. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q, (2020); High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*, 12(1):8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x

59. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q, (2020); Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55 (6): 105948. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105948
60. Cucinotta D, Vanelli M, (2020); WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*, 91(1): 157-160. doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397
61. <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/greece/>
62. ECDC. Outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): increased transmission beyond China – fourth update» (PDF). Retrieved 20-2-2020
63. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, Melidou A, Neher RA, (2020); Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020». *Euro Surveill*, 25(32):2001410. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410
64. Coronavirus (COVID-19): What is social distancing? Public health matters. Government of the United Kingdom. Retrieved 9-3-2020
65. Pueyo T, (2020); Coronavirus: Why You Must Act Now. <https://medium.com/@tomaspueyo/coronavirus-act-today-or-people-will-die-f4d3d9cd99ca>
66. CDC. Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Patients with Confirmed Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) or Persons Under Investigation for COVID-19 in Healthcare Settings. Retrieved 29-3-2021
67. Parry J, (2020); China coronavirus: cases surge as official admits human to human transmission. *BMJ*, 368:m236. doi: 10.1136/bmj.m236
68. Chen J, (2020); Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes and Infection*, 22(2): 69-71. doi.org/10.1016/j.micinf.2020.01.004
69. Quirch M, Lee J, Rehman S, (2020); Hazards of the Cytokine Storm and Cytokine-Targeted Therapy in Patients With COVID-19: Review. *Journal of Medical Internet Research*, 22(8):e20193. doi:10.2196/20193
70. Bhaskar S, Sinha A, Banach M, Mittoo S, Weissert R, Kass JS, Rajagopal S, Pai AR, (2020); Cytokine Storm in COVID-19—Immunopathological Mechanisms, Clinical Considerations, and Therapeutic Approaches: The REPROGRAM Consortium Position Paper. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.01648
71. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson Jr RB, (2013); A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)(a). *Clin Infect Dis*, 57(4):e22-e121. DOI: 10.1093/cid/cit278
72. Brooks K, (2012); Ready Reference to microbes, 3rd ed., Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc., Washington, DC
73. Brown M, (2014); Microbiology basics. In: *APIC Text of Infection Control and Epidemiology*, 4th Edition, Clinical Editor Grota P. Washington, DC, Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc., Chapter 24.
74. Chosewood LC, Wilson DE, (2009). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (5th ed.). <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf>
75. Damani N, (2012); *Manual of infection prevention and control*, 3rd Ed., Oxford University Press, Oxford, UK. ISBN 978-0-19-969835-6.
76. Diekema DJ, Pfaller MA, (2015); Prevention of health care-associated infections. In *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Ed., Jorgensen JH and Pfaller MA, Editors in Chief, ASM Press, Washington, DC, <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch8>

77. Diekema DJ, Saubolle MA, (2011); Clinical microbiology and infection prevention. *J Clin Microbiol*, 49(9):S57-S60. doi: 10.1128/JCM.00690-11
78. Gastmeier P, Schwab F, Baerwolff S, Rueden H, Grundmann H, (2006); Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care units. *J Hosp Infect*, 62(2):181-186. Doi:10.1016/j.jhin.2005.08.010
79. Gerner-Schmidt P, Hyytia-Trees E, Rota PA, (2011); Molecular Epidemiology. In *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Ed., ASM Press, Washington, DC. DOI:<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0004-2018>
80. Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) 2012 CRE Toolkit, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cretoolkit/>
81. Iram S, Zeenat A, Yusuf NW, Aslam M, (2015); Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay– Report from a developing country. *Pak J Med Sci*, 31(1):105-110. doi: 10.12669/pjms.311.6970
82. Kalenic S, Budimir A, (2009); The role of microbiology laboratory in healthcare-associated infection prevention. *Int J Infect Control*, 5(2) DOI: 10.3396/ijic.V5i2.014.09
83. Biorisk management Laboratory biosecurity guidance (WHO) 2006
84. CDC-Biosafety in the Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 6th Edition, Revised June 2020
85. World Health Organization. Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus. Geneva: WHO. Retrieved 11 May 2020
86. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/-biosafety-guidelines.html>
87. Laboratory biosafety manual, Third edition (WHO) 2004
88. CDC Guidelines: «Improve the Fit and Filtration», «Maximizing Fit for Cloth and Medical Procedure Masks to Improve Performance and Reduce SARS-CoV-2 Transmission and Exposure 2021», «Improve How Your Mask Protects You», «Your Guide to Masks»
89. Centers for Disease Control and Prevention. Using Personal Protective Equipment (PPE). Atlanta: CDC. Retrieved 11 May 2020 from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/using-ppe.html>
90. CEN WORKSHOP AGREEMENT Community face coverings - Guide to minimum requirements, methods of testing and use. CWA 17553. June 2020
91. World Health Organization- Laboratory biosafety manual-3rd edition-Geneva 2004
92. WHO Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020
93. WHO Laboratory testing for 2019- nCoV in suspected human cases, January 2020
94. Behzadinasab S, Chin A, Hosseini M, Poon L, Ducker WA, (2020); A surface coating that rapidly inactivates SARS-CoV-2. *ACS Appl Mater Interfaces*, 12(31):34723-34727. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c11425>
95. Buonanno M, Welch D, Shuryak I, Brenner DJ, (2020); Far-UVC light (222 nm) efficiently and safely inactivates airborne human coronaviruses. *Sci Rep*, 10:10285. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67211-2>
96. Donskey CJ, (2019); Decontamination devices in health care facilities: Practical issues and emerging applications. *Am J Infect Control*, 47:23-28. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.03.005>
97. Hora PI, Pati SG, McNamara PJ, Arnold WA, (2020); Increased use of quaternary ammonium compounds during the SARS-CoV-2 pandemic and beyond: consideration of environmental implications. *Environ Sci Technol Lett*, 7(9):622-631. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00437>

98. Warmbrod KL, Cole J, Sharkey CM, Sengupta A, Connell N, Casagrande R, Delarosa P, (2021); Biosafety Professionals: A Role in the Pandemic Response Team. *Health Security*, 19(4): 454-458. <https://doi.org/10.1089/HS.2021.0015>
99. Loh TP, Horvath AR, Wang C-B, Koch D, Adeli K, Mancini N, Ferrari M, (2020); Operational considerations and challenges of biochemistry laboratories during the COVID-19 outbreak: an IFCC global survey. *Clin Chem Lab Med*, 58(9):1441-1449. doi: 10.1515/cclm-2020-0710.
100. Misra V, Agrawal R, Kumar H, Kar A, Kini U, Poojary A, Chakrabarti I, (2020); Guidelines for various laboratory sections in view of COVID-19: Recommendations from the Indian Association of Pathologists and Microbiologists, 63(3):350-357. PMID: 32769321
101. Lekan-Agunbiade TT, Agunbiade OI, (2021); Laboratory diagnosis and management of COVID-19 cases: creating a safe testing environment. *BMC Infect Dis*, 21(1):1114. DOI: 10.1186/s12879-021-06806-0
102. Nimer R, Swedan S, Kofahi H, Khabour O, (2021); Increased Adherence to Infection Control Practices Among Medical Laboratory Technicians During the COVID-19 Pandemic: A Self-Reported Survey Study. *Ann Glob Health*, 87(1):56. DOI: 10.5334/aogh.3378
103. Liu M, Cheng S-Z, Xu K-W, Yang Y, Zhu Q-T, Zhang H, (2020); Use of personal protective equipment against coronavirus disease 2019 by healthcare professionals in Wuhan, China: cross sectional study. *BMJ*, 369: m2195. DOI: 10.1136/bmj.m2195
104. Martinelli L, Kopilaš V, Vidmar M, Heavin C, Machado H, Todorović Z, (2021); Face Masks During the COVID-19 Pandemic: A Simple Protection Tool With Many Meanings. *Front Public Health*, 13(8):606635. DOI: 10.3389/fpubh.2020.606635
105. Interim laboratory Biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), CDC, February 16, 2020
106. Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV), WHO, Interim Guidance, 12 February 2020
107. Sautter RL, Thomson RJ, (2015); Consolidated clinical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, 53(5):1467-72. DOI: 10.1128/JCM.02569-14
108. Bhattacharya S, (2010); Clinical microbiology: Should microbiology be a clinical or a laboratory speciality? *Indian J Pathol Microbiol*, 53(2):217-21. DOI: 10.4103/0377-4929.64323
109. Filkins LM, Bryson AL, Miller SA, Mitchell SL. (2020); Navigating Clinical Utilization of Direct-from-Specimen Metagenomic Pathogen Detection: Clinical Applications, Limitations, and Testing Recommendations. *Clin Chem*, 66(11):1381-1395. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa183
110. Di Toro A, Bozzani A, Tavazzi G, Urtis M, Giuliani L, Pizzoccheri R, (2021); Long COVID: long-term effects? *Eur Heart J Suppl*, 23(Suppl E):E1-E5. doi: 10.1093/eurheartj/suab080
111. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, Villapol S. (2021); More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 11, Article number: 16144 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95565-8>
112. Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, (2021); Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine*, 38:101019. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101019