



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ: ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Ανάπτυξη ανοσοενζυμικών διαγνωστικών μεθόδων έναντι αντιγόνων του ιού του SARS COV-2. Σύγκριση με μοριακές και αναλυτικές τεχνικές»

**Φοιτητής**

Γεώργιος Γκιούλης

A.M. 62117038

**Επιβλέποντες**

Δρ. Χρυσάνθη Βογιατζάκη, Δρ. Μαρία Τσουμάνη

Αθήνα 2022



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES**  
**DIVISION MEDICAL LABORATORIES**

**DISSERTATION**

«Development of immunoenzymatic diagnostic methods  
against SARS-CoV-2 virus antigens. Comparison with molecular  
and analytical techniques»

**STUDENT NAME**

Georgios Gkioulis

**SUPERVISORS**

Dr. Chrysanthi Vogiatzaki, Dr. Maria Tsoumani

Athens 2022



ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΒΟΓΙΑΤΖΑΚΗ	Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
ΜΑΡΙΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ	Ακαδημαϊκός υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΜΠΕΛΟΥΚΑΣ	Αναπληρωτής καθηγητής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

CHRYSANTHI VOGIATZAKI	Assistant Professor, Department of Biomedical Sciences, University of West Attica
MARIA TSOUMANI	Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences, University of West Attika
APOSTOLOS BELOUKAS	Associate Professor, Department of Biomedical Sciences, University of West Attica

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Γεώργιος Γκιούλης του Αλεξάνδρου με αριθμό μητρώου 62117038 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής 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».

Ο Δηλών





## *Ευχαριστίες*

*Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Βογιατζάκη για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την ακαδημαϊκή υπότροφο του τμήματος Βιοϊατρικών επιστημών κ. Δρ. Μαρία Τσουμάνη, για την καθοδήγηση και την βοήθεια που πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας.*

*Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη και την βοήθεια που μου έχουν προσφέρει σε κάθε μου προσπάθεια και τους αφιερώνω την πτυχιακή μου εργασία.*



## Περιεχόμενα

---

Συντομογραφίες.....	9
Περίληψη.....	11
Abstract.....	12
Εισαγωγή.....	13
1. Ανοσολογικές δοκιμασίες και φασματομετρία μάζας.....	18
1.1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	18
1.2. Ανοσοχρωματογραφία.....	26
1.2.1. Ορθότητα της ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση IgM και IgGαντισωμάτων.....	28
1.2.2. Ανοσοχρωματογραφία για την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgM και IgGαντισωμάτων για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε ένα rapid test.....	29
1.3. Ειδικές περιπτώσεις ψευδών αρνητικών IgM αποτελεσμάτων στην ELISA και στην ανοσοχρωματογραφία και τεχνικές για την αποφυγή τους.....	32
1.4. Ανοσοδοκιμασία Χημειοφωτάυγειας.....	35
1.5. Μέθοδος ανοσοφθορισμού για την διάγνωση του SARS-CoV-2.....	37
1.6. Ανάπτυξη ανοσολογικών δοκιμασιών για την ανίχνευση της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης N.....	38
1.7. Φασματομετρία μάζας.....	39
2. Μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2	

2.1 RT-qPCR.....	43
2.2.1. RT-qPCR για την διάγνωση του SARS-CoV-2.....	45
2.2. RT-LAMP.....	49
3. Σύγκριση μοριακών και ανοσολογικών δοκιμασιών.....	51
3.1. RT-qPCR και RT-LAMP.....	52
3.2. Ανοσολογικές δοκιμασίες: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	54
Συζήτηση.....	55
Βιβλιογραφία.....	61

## *Συντομογραφίες*

---

**RNA: Ribonucleic acid**

**SARS-CoV: Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus**

**MERS-CoV: Middle East Respiratory Syndrome- Coronavirus**

**SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus 2**

**COVID-19: Coronavirus Disease 2019**

**ACE2: Angiotensin-converting enzyme 2**

**RT-PCR: Reverse transcription PCR**

**RT-LAMP: Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification**

**ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay**

**LFA: Lateral Flow Assay**

**CLIA: Chemiluminescence immunoassay**

**rIFA: Recombinant immunofluorescence assay**

**Π.Ο.Υ.: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας**

**2019-nCoV: 2019-novel Coronavirus**

**NCP: Novel Coronavirus Pneumonia**

**Μ.Ε.Θ.: Μονάδα Εντατικής Θεραπείας**

**ARDS: Acute respiratory distress syndrome**

**RBD: receptor-binding domain**

**IgG: Immunoglobulin G**

**IgM: Immunoglobulin M**

**IgA: Immunoglobulin A**

**RF-IgM: Rheumatoid factor IgM**

**FDA: Food and Drug Administration**

**MOI: Multiplicity of infection**

**Ct: Cycle Threshold**

**OD: Optical density**

**DTT: Dithiothreitol**

**RLU: Relative light unit**

**cDNA: Complementary DNA**

**AU/mL: Astronomical Unit/mL**

**RNase P: Ribonuclease P**

**Cq: Quantification cycle**

**IU/mL: International Unit/mL**

**E.Coli: Escherichia Coli**

**ORF: Open reading frame**

**MS: Mass spectrometry**

**MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization**

**LC-MS: Liquid chromatography mass spectrometry**

**TMT: Tandem Mass Tag**

**NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide**

**LC-ESI-MS/MS: Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry**

**GMP: Guanosine monophosphate**

**PC: phosphatidylcholine**

**DG: diglycerides**

**CUBN: cubilin**

**C3: Complement 3**

## Περίληψη

---

OSARS-CoV-2 ανήκει στους κορωνοϊούς και αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου COVID-19. Έχει RNA ως γενετικό υλικό και περιβάλλεται από έλυτρο, ενώ η ακίδα του ιού έχει ως στόχο τους υποδοχείς του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2, κυρίως των κυψελιδικών επιθηλιακών κυττάρων. Η διάγνωση του SARS-CoV-2 είναι εξαιρετικά σημαντική τόσο για τη γρήγορη ιατρική περίθαλψη των ατόμων, όσο και για την επιδημιολογική αποτίμηση της νόσου COVID-19. Προς τούτο εφαρμόστηκαν μοριακές μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription PCR) και η χρήση ισοθερμικής ενίσχυσης με τη μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP). Ωστόσο οι μοριακές μέθοδοι απαιτούν ακριβό εξοπλισμό, ειδικευμένο προσωπικό, αντιδραστήρια, ενώ η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε πιστοποιημένα εργαστήρια και νοσοκομεία. Για αυτούς του λόγους οι ερευνητές ανέπτυξαν ανοσολογικές μεθόδους, όπως η ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), η Δοκιμασία Πλευρικής Ροής (Lateral Flow Assay) Ανοσοδοκιμασία Χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassay) και ανασυνδυασμένης κυτταρικής ανάλυσης έμμεσου ανοσοφθορισμού (Recombinant immunofluorescence assay). Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν σε μικρό χρονικό διάστημα να αναλύσουν χιλιάδες δείγματα ασθενών. Επιπρόσθετα η δοκιμασία Πλευρικής Ροής δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση του SARS-CoV-2 σε χώρους, εκτός των υγειονομικών μονάδων.

Οι ανοσολογικές μέθοδοι αν και εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, παρουσιάζουν και αρκετά μειονεκτήματα. Μερικά από αυτά είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα παθογόνα, η απουσία control στην μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας και οι αποκλίσεις της ανοσολογικής απόκρισης μεταξύ των ασθενών. Για την βέλτιστη απόδοση των μεθόδων, αυξημένη μέριμνα πρέπει να λάβει το προσωπικό κατά την μεταφορά και ανάλυση των δειγμάτων για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων. Ταυτόχρονα η ανάπτυξη νέων μεθόδων φασματομετρίας μάζας μπορεί να δώσουν την δυνατότητα για γρήγορη διάγνωση του ιού με υψηλή ευαισθησία και αποτελεσματικότητα. Συμπερασματικά οι μοριακοί μέθοδοι αποτελούν το gold standard, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας. Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι ιδανικές για το screening μεγάλου μέρους του πληθυσμού γρήγορα και αποτελεσματικά, έχουν χαμηλό κόστος και μικρές απαιτήσεις σε εξοπλισμό και προσωπικό και προτείνεται η συμπληρωματική διενέργειά τους, για την μείωση των ψευδώς αρνητικών ή θετικών αποτελεσμάτων.

## *Abstract*

---

SARS-CoV-2 belongs to the coronaviruses and is the causative agent of COVID-19. It has RNA as genetic material and is surrounded by an envelope, while the spike of the virus targets the angiotensin-converting enzyme 2 receptors, mainly the alveolar epithelial cells. The diagnosis of SARS-CoV-2 is extremely important both for the rapid medical treatment of individuals and for the epidemiological assessment of the pandemic. For this reason, molecular methods with high sensitivity and specificity were used, such as Reverse transcription PCR and Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. However, molecular methods require expensive equipment, specialized personnel, reagents, and the procedure can only be performed in certified laboratories and hospitals. For these reasons the researchers developed immunological methods, such as the Enzyme-linked immunosorbent assay, Lateral Flow Assay, Chemiluminescence immunoassay and Recombinant immunofluorescence assay. These methods can analyze in a short time thousands of patient samples. In addition, the Lateral Flow Assay does not require special equipment and can be used to diagnose SARS-CoV-2 in many areas outside of health facilities. Immune methods, although they show high sensitivity and specificity, also have several disadvantages. Some of these are cross-reactions with other pathogens, lack of control in the Lateral Flow Assay, and deviations in the immune response between patients. For optimal method performance, staff should be extra vigilant in transporting and analyzing samples to avoid produce false results. At the same time the development of new methods of mass spectrometry can enable the rapid diagnosis of the virus with high sensitivity and efficiency. In conclusion, molecular methods are the gold standard, due to their high sensitivity and specificity, while immunological methods are ideal for screening a large part of the population quickly and efficiently, have low cost and low equipment and personnel requirements and their complementary performance is recommended to reduce false negative or positive results.



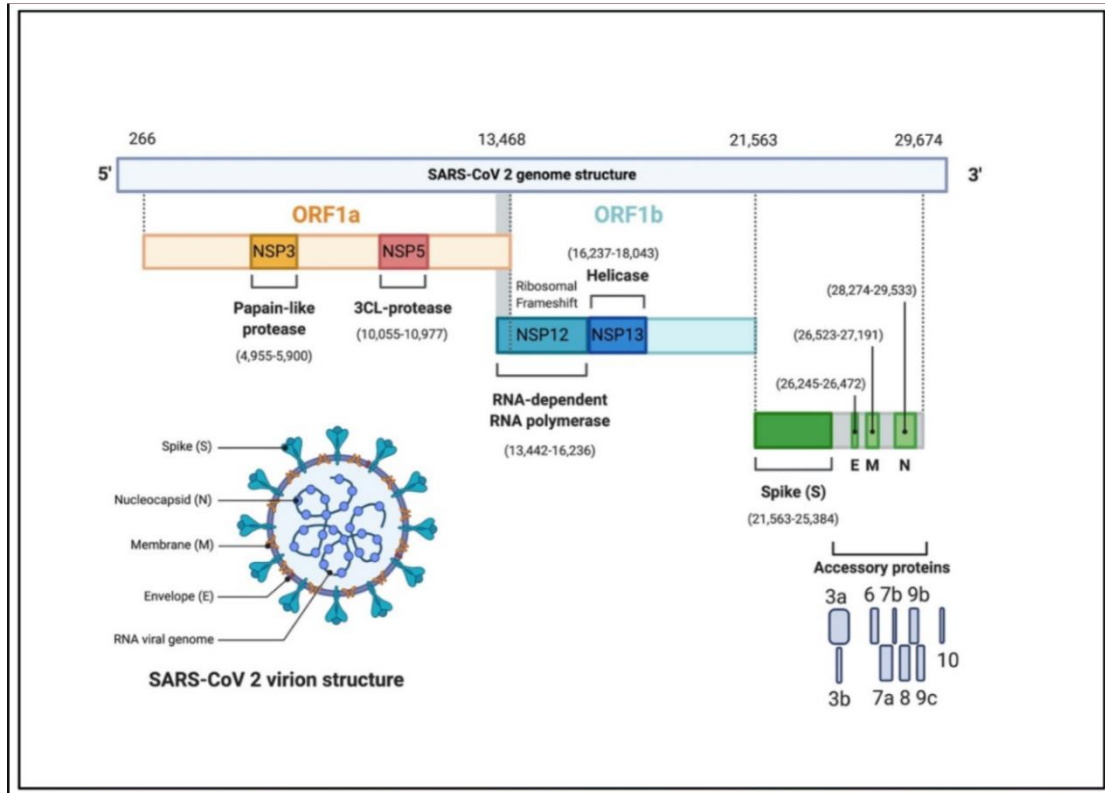
Τον Δεκέμβριο του 2019 ασθενείς με πνευμονία αγνώστου αιτιολογίας εισήχθησαν στα τοπικά νοσοκομεία της πόλης Γουχάν, πόλη και πρωτεύουσα της επαρχίας Χουμπέι, στην κεντρική Κίνα. Τους επόμενους μήνες οι Κινέζοι επιστήμονες θα ταυτοποιήσουν τον αιτιολογικό παράγοντα των πνευμονιών, ο οποίος είναι ένας νέος τύπος κορωνοϊού, ενώ το Υπουργείο Υγείας της Κίνας θα ενημερώσει τον Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) για περιστατικά πνευμονίας. Στον απόηχο των επιδημιολογικών εξελίξεων η Κίνα θα επιβάλλει αυστηρά περιοριστικά μέτρα στους πολίτες της επαρχίας Χουμπέι για να σταματήσει την διασπορά αφού πλέον έχει επιβεβαιωθεί η μετάδοση του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο. Ο νέος ιός θα λάβει την προσωρινή ονομασία 2019-nCoV (2019-novel Coronavirus), ονομασία η οποία άλλαξε σε NCP (Novel Coronavirus Pneumonia), μέχρι να λάβει την τελική του ονομασία από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών σε SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Την ίδια περίοδο ο Π.Ο.Υ. θα ονομάσει την νόσο, που προκαλείται από τον SARS-CoV-2, COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), ενώ θα ανακοινώσει ότι το ξέσπασμα αυτής της νόσου έχει πλέον χαρακτηριστικά πανδημίας[1].

Ο SARS-CoV-2 είναι ένας β-κορωνοϊός και ταξινομείται στην τάξη των *Nidovirales*, στην οικογένεια *Coronaviridae*, στην υποοικογένεια *Coronavirinae*, στο γένος *Betacoronavirus* στο υπογένος *Sarbecovirus*, στο είδος των κορωνοϊών που συσχετίζονται με το Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο (SARS)[1].

Τα βασικά μέρη του SARS-CoV-2, είναι το γενετικό του υλικό το οποίο είναι μία μονόκλωνη αλυσίδα mRNA και το καψίδιο που σχηματίζεται από την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη. Όπως όλοι οι κορωνοϊοί αποτελείται από μια μονόκλωνη αλυσίδα RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), κάτι που σημαίνει η μετάφραση των γονιδίων για την παραγωγή των πρωτεϊνών γίνεται κατευθείαν, ενώ η αλυσίδα του mRNA αποτελείται από περίπου 30kb. Το γενετικό υλικό του SARS-CoV-2 κωδικοποιεί 16 μη δομικές πρωτεΐνες, 4 δομικές και 6 βοηθητικές πρωτεΐνες. Οι 16 μη δομικές πρωτεΐνες βρίσκονται σε 2 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, το ORF1a και το ORF1b, τα οποία αναφέρονται μαζί ως ORF1ab, από τα οποία παράγονται 2 πολυπρωτεΐνες. Ο ρόλος των 16 μη δομικών πρωτεϊνών σχετίζεται με τη μεταγραφή και διπλασιασμό του RNA, καθώς και με τη διαφυγή του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Τα 2 πλαίσια ανάγνωσης, ORF1a και ORF1b αποτελούν το 70% του γονιδιώματος του ιού. Οι 4 δομικές πρωτεΐνες είναι οι: πρωτεΐνη S της ακίδας, η πρωτεΐνη N του νουκλεοκαψιδίου, η πρωτεΐνη της μεμβράνης (M) και η πρωτεΐνη (E) του ελύτρου. Ο ρόλος των βοηθητικών πρωτεϊνών δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα και συνεπώς είναι άγνωστος. Η 5',3' αμετάφραστες περιοχές φαίνεται να ελέγχουν την διαδικασία αντιγραφής του RNA, καθώς και την ιική μεταγραφή. Η



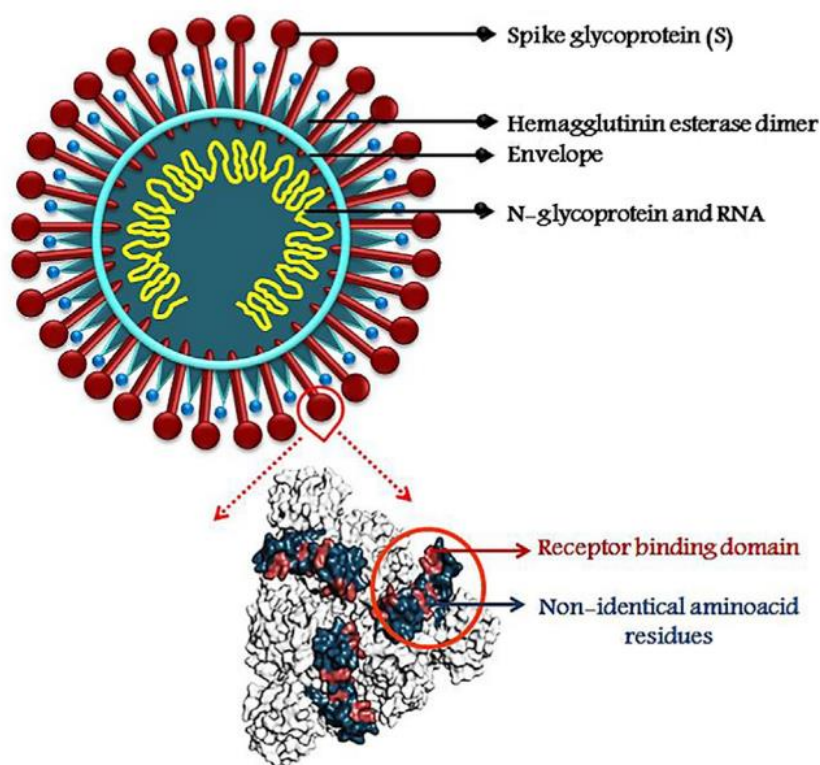
νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το 9 ORF και αποτελείται από 419 αμινοξέα. Πρωταρχικός σκοπός της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης είναι το "πακετάρισμα" του mRNA και την δημιουργία ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού σωματιδίου (RNP)[2].



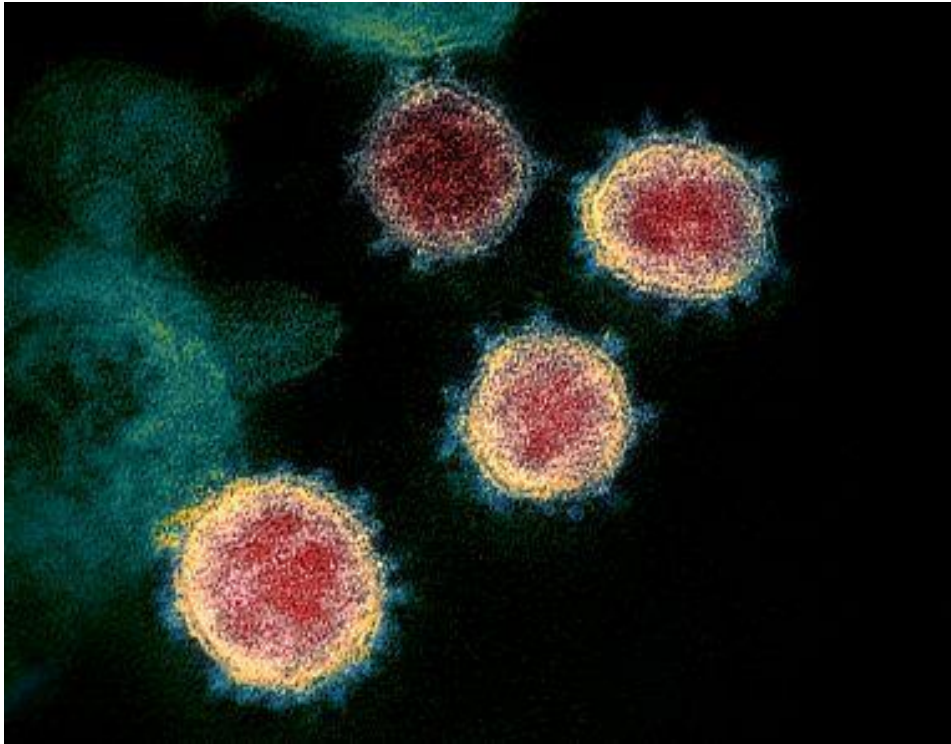
**Εικόνα 1:** Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 το οποίο αποτελείται από 2 κύρια πλαίσια ανάγνωσης ORF1a και ORF1b, ή όπως αναφέρονται μαζί και τα δύο πλαίσια ανάγνωσης ORF1ab από τα οποία κωδικοποιούνται 16 μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό και μεταγραφή του γενετικού υλικού του ιού. Επίσης τα δομικά γονίδια κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες ελύτρου E, νουκλεοκαψιδίου N, ακίδας S και μεμβράνης M[2].

OSARS-CoV-2, όπως και όλοι οι ανθρωπίνους κορωνοϊοί (229E, NL63, OC43, HK41), περιβάλλεται από μια διπλή λιπιδική μεμβράνη που ονομάζεται έλυτρο. Το έλυτρο προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi του κυττάρου του ξενιστή, καθώς και από ιικές πρωτεΐνες. Ειδικότερα η πρωτεΐνη E θεωρείται το κύριο συστατικό του ελύτρου και είναι υψηλά υδρόφοβη. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με έρευνες, ο ρόλος της πρωτεΐνης E δεν περιορίζεται μόνο στη δημιουργία του ελύτρου, αλλά και στη δημιουργία μεμβρανωδών κύστεων, ικών σωματιδίων (VLPs-viral-like particles), την επαγωγή της απόπτωσης και σύνθεσης της ιντερφερόνης α, ενώ έχει παρατηρηθεί και η συμμετοχή της στην αντιγραφή του ιικού RNA. Η πρωτεΐνη M, γνωστή και ως E1 μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, έχει θεωρηθεί ότι σχετίζεται με την ιική μολυσματικότητα του ιού, μέσω της σύνδεσης

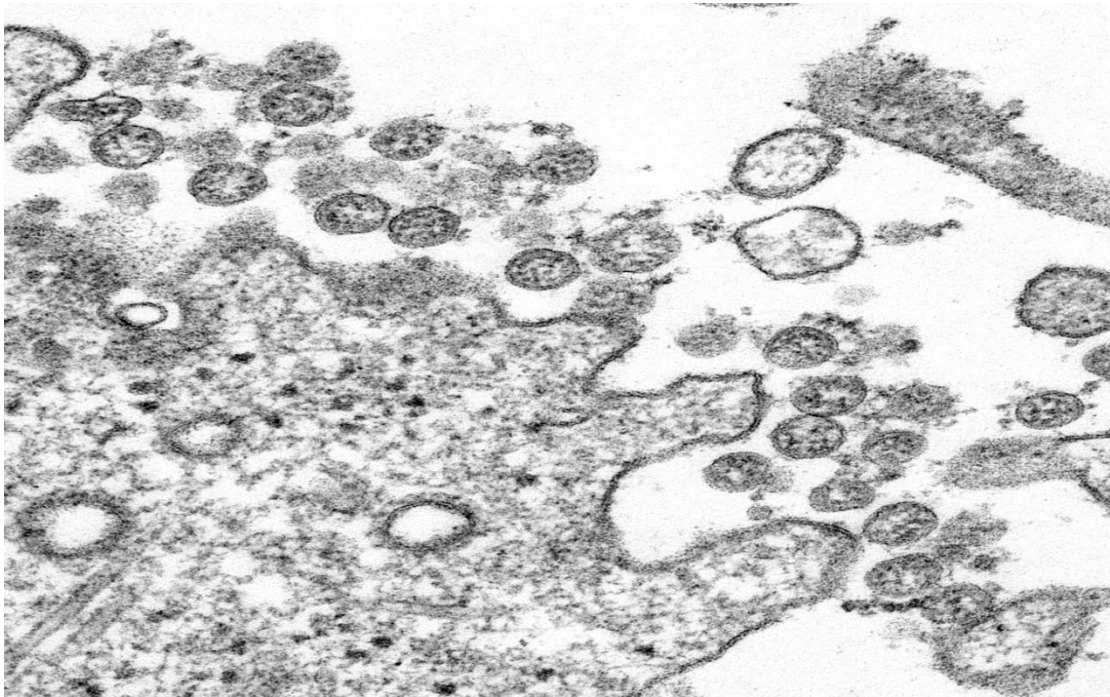
με την πρωτεΐνη S και τους υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή. Επίσης έχει παρατηρηθεί, ότι εμπλέκεται και στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, λόγω της υψηλής αντιγονικότητάς της. Παράλληλα φέρεται να έχει ρόλο στη συγκρότηση και μορφολογία των ιικών σωματιδίων, καθώς και στον πολλαπλασιασμό και πακετάρισμα του ιικού RNA. Τέλος η πρωτεΐνη ακίδα S μοριακού βάρους 600 kDa είναι μια τριμερής πρωτεΐνη, η οποία είναι εξαιρετικά γλυκοζυλιωμένη, κάτι που την βοηθά να ξεφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, αλλά και να διατηρεί την ακεραιότητά της. Έχει δύο υπομονάδες την S1 και S2. Η υπομονάδα S1 περιέχει την επικράτεια σύνδεσης με τον υποδοχέα (receptor binding domain, RBD) που είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό και σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς του ξενιστή. Η S2 υπομονάδα περιέχει να απαραίτητα στοιχεία για την μεμβρανική σύντηξη. Η S πρωτεΐνη συνδέεται με τους κυτταρικούς υποδοχείς ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), οι οποίοι βρίσκονται στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, ένα σημαντικό βήμα για την μεμβρανική σύντηξη. Επιπρόσθετα η πρωτεΐνη ακίδα είναι ο βασικός στόχος των εξουδετερωτικών αντισωμάτων και εμβολίων[2].



**Εικόνα 2.** Δομή του SARS-CoV-2[3].

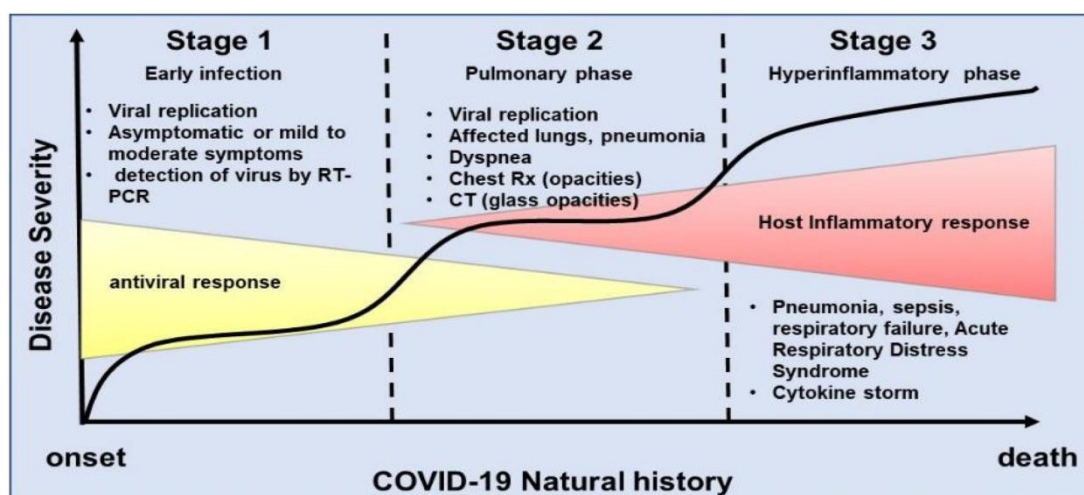


**Εικόνα 3:** Ο ιός SARS-CoV-2 στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης[4].



**Εικόνα 4.** Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διεύλεσης, όπου γίνονται ορατά εξωκυτταρικά σφαιρικά ιικά σωματίδια του SARS-CoV-2[5].

Η λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 χωρίζεται σε 3 στάδια. Το αρχικό στάδιο έχει διάρκεια 1<sup>η</sup> έως την 7<sup>η</sup> ημέρα από την αρχή των συμπτωμάτων, το ενδιάμεσο στάδιο έχει διάρκεια από την 8<sup>η</sup>-14<sup>η</sup> ημέρα και το τελικό στάδιο αποτελείται από την 15<sup>η</sup> ημέρα[6].



Εικόνα 5: Τα στάδια της λοίμωξης της COVID-19[6].

Τα διαγνωστικά εργαλεία της επιστημονικής κοινότητας είναι η μοριακή μέθοδος PCR (Polymerase Chain Reaction) ή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και η ταχεία ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία ανίχνευσης αντιγόνου του ιού ή rapidτεστ. Η διάγνωση του ιού με τις δοκιμασίες αυτές έχουν εξαιρετική σημασία για την έκβαση της πανδημίας. Στους περισσότερους ανθρώπους και ειδικά σε άτομα νεαρής ηλικίας, εμφανίζεται μια ασυμπτωματική κλινική εικόνα, κάτι το οποίο είναι επικίνδυνο αφού ο ξενιστής μπορεί να μεταδώσει τον ιό στο κοινωνικό του περιβάλλον εν αγνοία του. Με τη διάγνωση του ιού υπάρχει η δυνατότητα να διακοπεί εγκαίρως η αλυσίδα μολύνσεων με αποτέλεσμα τον περιορισμό της διασποράς και τον αυτοπεριορισμό του ατόμου στην οικία του. Επίσης η διενέργεια διαγνωστικών τεστ στις ευπαθείς ομάδες οδηγεί σε έγκαιρη διάγνωση, άμεση επιτήρηση και ιατροφαρμακευτική περίθαλψη του ασθενούς.



### Molecular tests

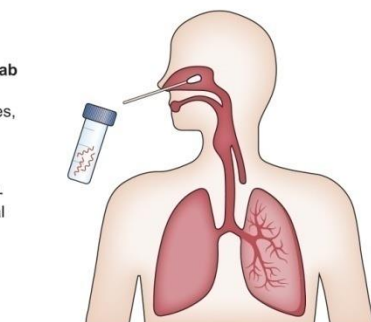
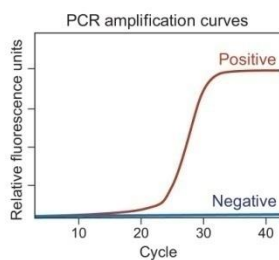
**Samples: respiratory tract:**

• **Nasopharyngeal specimen using swab**

- Oropharyngeal and anterior nares specimen, sputum, endotracheal aspirates, bronchoalveolar lavage.

**Detection of viral genome by real time RT-PCR-based assays** with PCR primer-probe sets for regions of genes of the viral nucleocapsid, RNA pol, or envelope.

**RT-PCR(+)** from the first few days after symptom onset and prolonged up to 35 days (15 days on average)

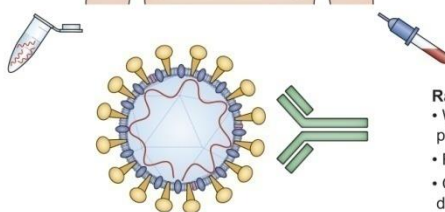


### Serological tests:

**Immunoassays:** Detection/quantification of seroconversion: Patient IgM and IgG specific to SARS-CoV-2 spike or nucleocapsid proteins.

**Main types of immunoassays:**

- Neutralisation assay: Quantitative information on antibodies able to inhibit virus growth *ex vivo*
- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantification of antibodies specific to the virus
- Immunochromatography assay: qualitative lateral flow assay (rapid diagnostic test): detection of antibodies specific to the virus



**Rapid diagnostic tests (RDT):**

- Works with venous whole blood, serum, or plasma
- Rapid test (15 min) - No instrument required
- Only qualitative (aid screening and diagnosis in combination with RT-PCR)
- Aid in risk stratification and cohort study

**Εικόνα 6:** Μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την διάγνωση της COVID-19[7].

Βασικός στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η διενέργεια βιβλιογραφικής ανασκόπησης, η οποία εστιάζει στην ανάλυση των εργαστηριακών διαγνωστικών μεθόδων που έχουν εφαρμοστεί για τη διάγνωση της νόσου COVID-19.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΑΙ

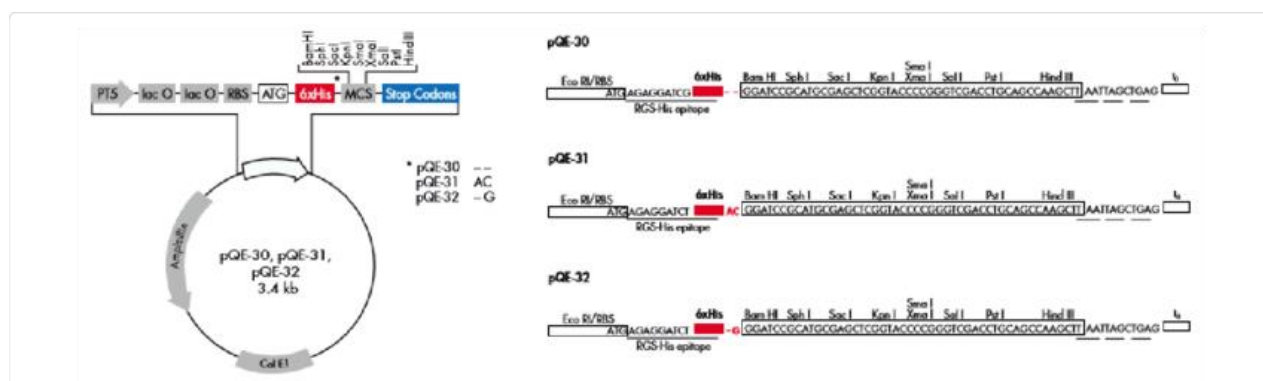
### ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

#### 1.1. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) είναι μια αναλυτική μέθοδος ανοσοχημικού προσδιορισμού, όπου με την προσθήκη συγκεκριμένου υποστρώματος προκύπτει έγχρωμο διαλυτό προϊόν, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι ή με φασματοφωτόμετρο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντισωμάτων σε δείγματα πλάσματος ή ορού. Ωστόσο έχουν δημιουργηθεί και μέθοδοι ELISA, που ανιχνεύουν αντιγόνα του ιού, σε ρινοφαρυγγικά δείγματα, πτύελα και βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (Εικόνα 11). Στη μέθοδο της κλασικής έμμεσης ELISA το αντιγόνο του ιού, το οποίο είναι επιστρωμένο στις πλάκες μικροτιτλοδότησης συνδέεται με ειδικά αντισώματα έναντι του ιού. Στη συνέχεια αντι-ισοτυπικό αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο συνδέεται με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος για την ανίχνευση του [12].

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται είναι ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ακίδα του ιού ή νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη του. Για την δημιουργία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 14 έως 667 της ακίδας του ιού, με την χρήση της RT-PCR. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε αυτό το τμήμα της πρωτεΐνης ακίδας, είναι διότι δεν μπορούσε να εκφραστεί ολόκληρη η πρωτεΐνη ακίδα από το βακτήριο *Escherichiacoli*. Στη συνέχεια το προϊόν της RT-PCR κλωνοποιήθηκε στις θέσεις *Bam*Hi και *Kpn*I στον φορέα pQE-31[13].

Το κλωνοποιημένο προϊόν υποβλήθηκε σε πέψη με την χρήση της ενδονουκλεάσης *Pst*I και το θραύσμα το οποίο περιείχε το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τα υπολείμματα αμινοξέων 250-667 της πρωτεΐνης ακίδας κοινοποιήθηκε στο πλασμίδιο-φορέα pQE-30[13].



**Εικόνα 7:** Τα πλασμίδια φορείς pQE-30 και pQE-31[14].

Τέλος πραγματοποιείται οκαθαρισμός της πρωτεΐνης ακίδας με την προσθήκη και χρήση 6 διαδοχικών καταλοίπων αμινοξέων ιστιδίνης στο κλωνοποιημένο προϊόν, που ονομάζεται 6\*His-Tag. Τα υπολείμματα ιστιδίνης συντονίζονται εύκολα με ιόντα μετάλλων μετάπτωσης  $Ni^{2+}$  ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια ή σε ρητίνη για καθαρισμό. Περίπου 3 mg πρωτεΐνης λαμβάνονται από 1L *Escherichiacoli* που περιέχουν τα πλασμίδια-φορείς[13].

Άλλη μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται είναι ηELISA στερεής φάσης για την ανίχνευση συγκεκριμένων αντισωμάτων, όπως τα αντισώματα IgM, IgG ή IgA στον ορό δείγματος. Τα φρεάτια (wells) μικροτιτλοδότησης πολυστυρένιου είναι προεπικαλυμμένα με αντισώματα, τα οποία συνδέονται και ανιχνεύουν τα αντισώματα-στόχους (IgM, IgGκαι IgA). Μετά την πρώτη επώαση μετά την προσθήκη του δείγματος, ειδικά αντισώματα δεσμεύονται στα well. Στο τέλος γίνεται έκπλυση των wells με αποτέλεσμα να μείνουν μόνο τα ειδικά αντισώματα και γίνεται προσθήκη αντιγόνων του SARS-CoV-2 συζευγμένων με ένζυμα ή άλλους ιχνηθέτες[12].

Τέλος έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι ELISAόπως η ELISA με βάση τον φθορισμό, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι περισσότερων του ενός αντιγόνων στο ίδιο δείγμα, καθώς και δυνατότητα ποσοτικοποίησης του αποτελέσματος σε μικρό χρονικό διάστημα. Αυτή η ανοσολογική μέθοδος λειτουργεί με την σύζευξη αντιγόνων του SARS-CoV-2σεμικροσωματίδιαπολυστερινίου, τα οποία συνδέονται με τα πιθανά αντισώματα του SARS-CoV-2 στον ορό του δείγματος. Τα υπόλοιπα απομακρύνονται μέσω των εκπλύσεων. Παράλληλα τα συνδεδεμένα αντισώματα συνδέονται με ανθρώπινα αντι-ισοτυπικά αντισώματα έναντιIgM, IgGκαι IgA. Τέλος τα μικροσωματίδια ενώνονται με φυκοερυθρίνη και τα συνδεδεμένα αντισώματα μετρώνται σε κυτταρόμετρο LumineX. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης των αντισωμάτων στον ορό[12].

Η ELISA χημειοφωταύγειας είναι μια καινούργια μέθοδος που προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και αυτοματισμό και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντισωμάτων IgM και IgG. Επίσης έχει αναπτυχθεί μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας που προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία και μικρότερο χρόνο παράδοσης αποτελέσματος[12].

HELISA διπλών αντιγόνων είναι τρίτης γενιάς μέθοδος και προσφέρει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται προσθήκη ορού ή πλάσματος από δείγμα ασθενή, στις πλάκες μικροτιτλοδότησης, η οποίες είναι επικαλυμμένες με ανασυνδυασμένα αντιγόνα του SARS-CoV-2. Κατά την πρώτη επώαση, τα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά έναντι των αντιγόνων του SARS-CoV-2, δεσμεύονται από τα αντιγόνα της πλάκας μέσα στους πυθμένες και με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα σύμπλοκο αντιγόνου αντισώματος. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται εκπλύσεις, ώστε να απομακρυνθούν οι αδέσμευτες πρωτεΐνες του ορού, καθώς και τα μη ειδικά αντισώματα. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η προσθήκη ενός δεύτερου ανασυνδυασμένου αντιγόνου SARS-CoV-2, το οποίο είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο. Κατά την δεύτερη επώαση το συζευγμένο αντιγόνο συνδέεται με το δεσμευμένο αντίσωμα, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός συμπλόκου, αντιγόνου-αντισώματος-αντιγόνου-ενζύμου. Τέλος πραγματοποιείται έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν να αδέσμευτα συζευγμένα αντιγόνα και γίνεται προσθήκη υποστρώματος για την παραγωγή χρώματος.[12].

Το γενετικό υλικό του SARS-CoV-2 κωδικοποιεί περίπου 20 πρωτεΐνες, 16 μη δομικές και 4 δομικές πρωτεΐνες. Το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου δυνητικά θα παράγει αντισώματα εναντίων αυτών των πρωτεϊνών. Αυτό σημαίνει ότι ο ορός του δείγματος θα περιέχει τα αντισώματα εναντίων αυτών των πρωτεϊνών. Ωστόσο, τα αντισώματα αυτά διαφέρουν ως προς την πληθώρα και την καταλληλότητα τους, αναφορικά με τη διαφοροποίηση τουSARS-CoV-2 από τους υπόλοιπους κορωνοϊούς που μολύνουν τον άνθρωπο. Οι περισσότερες μέθοδοι

ELISA χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη ακίδα ή την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη ως αντιγόνα. Το αντιγόνο το οποίο έχει επιλεγεί για την μέθοδο θα πρέπει να είναι ικανό να ανιχνεύεται και να διαφοροποιείται από συγγενικούς ιούς, στην περίπτωση του SARS-CoV-2, από τους κοινούς κορωνοϊούς (229E, NL63, OC43), καθώς και από τον SARS-CoV. Οι ELISA που χρησιμοποιούν την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη ως αντιγόνο έχουν μικρότερη ειδικότητα σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν την πρωτεΐνη ακίδα ως αντιγόνο, στο να διαχωρίζουν μια μόλυνση από τον SARS-CoV-2 από έναν άλλο ανθρώπινο κορωνοϊό. Ωστόσο εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία, διότι η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ποσότητα[12].

Η *in-Cell* ELISA είναι μια ποσοτική μέθοδος και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και μέτρηση πρόσφατων ενδοκυτταρικών συντιθέμενων πρωτεϊνών S. Η επιλογή της πρωτεΐνης S βασίζεται στο γεγονός ότι μπορεί να διαγνώσει την παρουσία του SARS-CoV-2 και με άλλες ανοσολογικές μεθόδους όπως η western-blot και ο ανοσοφθορισμός[15].

Για την ανάπτυξη της *in-cell* ELISA, χρησιμοποιήθηκε το αντιγόνο 1A9, το οποίο είναι ειδικό έναντι της S2 υπομονάδας της πρωτεΐνης ακίδας του ιού. Στη συνέχεια 2 κυτταρικές σειρές, VeroE6 (επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πιθήκου) και Caco-2 (ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου), τοποθετήθηκαν σε 96 πηγαδάκια στην πλάκα μικροτιτλοδότησης και στη συνέχεια μολύνθηκαν, με υψηλό πολλαπλασιασμό μόλυνσης, με στελέχη του SARS-CoV-2 που απομονώθηκαν στην Γαλλία. Μετά από 2,24,48 ή 72 ώρες τα κύτταρα σταθεροποιούνται. Πραγματοποιείται τοποθέτηση του αντισώματος 1A9 για 1 ώρα και στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση. Μετά την πλύση τοποθετείται ένα δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με την υπεροξειδάση του χρένου HRP (Horseradish Peroxidase), τα κύτταρα επώάζονται για 1 ώρα και πραγματοποιείται ξανά πλύση πριν την προσθήκη από του υποστρώματος υπεροξειδική τετρα-μεθυλβενζιδίνη (3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB). Μετά από 5 λεπτά, η αντίδραση σταματάει με την χρήση H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και καταγράφεται η οπτική πυκνότητα (OD) στα 450 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρο ανάγνωσης μικροπλακών[15]. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέσω ενός ανάλογου δευτερεύοντος αντισώματος το οποίο είναι σημασμένο με την HRP. Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει την ανίχνευση, με μεγαλύτερη ευαισθησία, την παρουσία διαφοροποιήσεων στον ιικό πολλαπλασιασμό, ενώ είναι μια πιο γρήγορη διαδικασία από την μέθοδο υπολογισμού της συγκέντρωσης των νεοσυντιθέμενων ιών. Μια άλλη εφαρμογή της *In-Cell* ELISA είναι ο προσδιορισμός της ιικής συγκέντρωσης στα ιικά αποθέματα, στις κυτταρικές καλλιέργειες ή σε δείγματα από τους στυλεούς των ασθενών. Επιπρόσθετα η *In-Cell* ELISA έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τα μολυσμένα από τα μη μολυσμένα well, ακόμα και σε αυτά που παρουσιάζουν χαμηλό πολλαπλασιασμό μόλυνσης (MOI-Multiplicity of infection), 4



μέρες μετά την μόλυνση, με αποτέλεσμα να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ανάλυση της μέσης μολυσματικής δόσης ιστοκαλλιέργειας (TCID<sub>50</sub>- Median Tissue Infectious Dose)[15].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η In-Cell ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ποσοτικοποίηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Οροί ασθενών οι οποίοι είχαν ελεγχθεί και είχαν δώσει αρνητικά ή θετικά αποτελέσματα για αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2, τιτλοδοτήθηκαν και επωάστηκαν με SARS-CoV-2 για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν τον εμβολιασμό με Caco-2 κύτταρα. 2 ημέρες μετά, έγινε χρήση της in-cell ELISA. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες 2 οροί ασθενών που είχαν ληφθεί πριν την αρχή της πανδημίας [15].

Σύμφωνα με έρευνα από τους ερευνητές Jääskeläinen et.al, το 2020,πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση μεθόδων ELISA, οι οποίες ανιχνεύουν IgGκαι IgA αντισώματα στον ορό ασθενών. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στην ανασυνδυασμένη δομική πρωτεΐνη ακίδα (S1) του SARS-CoV-2 και ελέγχθηκαν για διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους ανθρώπινους κορωνοϊούς. Για την εκτίμηση της ειδικότητας, πραγματοποιήθηκε κατά τα έτη 2019 και το 2020 συλλογή 37 ορών ασθενών, από 15 άνδρες και 22 γυναίκες, τους οποίους οι ερευνητές θεωρούσαν αρνητικούς στον SARS-CoV-2. Από τους 37 ορούς, οι 11 έχουν προέλθει από ασθενείς, οι οποίοι είχαν διαγνωστεί, με την χρήση μοριακών μεθόδων, θετικοί στους εποχικούς ανθρώπινους κορωνοϊούς (OC43, NL63, 229E) ή άλλους ιούς του αναπνευστικού συστήματος. Από αυτούς τους 11 ορούς οι 4 συλλέχτηκαν το 2019 και οι υπόλοιποι το 2020. Οι 4 οροί θεωρήθηκαν αρνητικοί για τον SARS-CoV-2, ενώ οι υπόλοιποι 11 ελέγχθηκαν με μοριακές μεθόδους και βρέθηκαν αρνητικοί για τον SARS-CoV-2.Τέλος οι υπόλοιποι 26 οροί προέρχονται από ανθρώπους που βρέθηκαν θετικοί σε αδενοϊούς, εντεροϊούς, ιό της γρίπης Α, ιός της γρίπης Β, ιοί της παραγρίπης, στον αναπνευστικό συγκυτιακό ιό, μέσω ανίχνευσης IgΜαντισωμάτων κατά το έτος το 2019. Τα δείγματα αυτά θεωρήθηκαν αρνητικά για τον ιό SARS-CoV-2 [16].

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τους 37 ορούς που θεωρούνταν αρνητικοί, η ELISAέδωσε αρνητικά αποτελέσματα για IgΓαντισώματα σε 34 ασθενείς, ενώ αρνητικά για IgΑαντισώματα σε 24 ασθενείς. Η ειδικότητα του τεστ συνεπώς για τα IgGκαι τα IgΑείναι 91,9% και 73.0% αντίστοιχα. Οροί δείγματος από ασθενή με μόλυνση από τον ανθρώπινο κορωνοϊό OC43, έδειξαν διασταυρούμενη αντίδραση, ωστόσο διασταυρούμενη αντίδραση δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς που είχαν μολυνθεί με τους ανθρώπινους κορωνοϊούς229Eή NL631 [16].

**Πίνακας 1:** Ειδικότητα ELISAγια την ανίχνευση των IgΑαντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2[16].

Οροί ασθενών	IgG (-)	Ειδικότητα (IgG)
37	34	91,9%
	IgA (-)	Ειδικότητα (IgA)
	24%	73.0%

Για την έρευνα της απόδοσης της ELISAσε δείγματα από άτομα τα οποία είχαν μολυνθεί από τον SARS-CoV-2, πραγματοποιήθηκε συλλογή ορών από ασθενείς, οι οποίοι είχαν διαγνωστεί με COVID-19 με την χρήση RT-PCR σε ρινοφαρυγγικό δείγμα. Συνολικά πραγματοποιήθηκε συλλογή 47 ορών από 40 άτομα (23 άνδρες και 17 γυναίκες). Τέλος έγινε χρήση της ELISAγια τον έλεγχο 13 ορών από άτομα τα οποία πιθανών να έχουν COVID-19[16].

**Πίνακας 2:** Αριθμός ορών ασθενών, όπου ανιχνεύτηκαν IgA ή IgGή και τα δύο είδη αντισωμάτων[16].

Οροί ασθενών (Θετικοί στον SARS-CoV-2)	ΑνίχνευσημόνοIgG με την μέθοδο ELISA	Ανίχνευση μόνο IgA με την μέθοδο ELISA	Ανίχνευση IgAκαι IgG με την μέθοδο ELISA
39	15	11	14

Από τους 40 ασθενείς με επιβεβαιωμένηCOVID-19, ένας ασθενής, από τον οποίο είχε ληφθεί ένα δείγμα ορού πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, δεν ελέγχθηκε περαιτέρω και συνεπώς ο έλεγχος για IgAκαι IgG αντισώματα προχώρησε στους υπόλοιπους 39 ασθενείς. Για 14 ασθενείς, οι οροί τους έτυχε να συλλεχθούν την ίδια μέρα με το ρινοφαρυγγικό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην RT-PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένας από τους 14 ορούς δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα για IgG αντισώματα, ενώ μόνο 6 έδωσαν θετικό IgAαποτέλεσμα. Επειδή σε αυτούς ασθενείς η συλλογή των ορών έγινε την ίδια μέρα με την συλλογή των ρινοφαρυγγικών δειγμάτων, προκύπτει το συμπέρασμα ότι τα IgAαντισώματα εμφανίζονται πιο νωρίς από τα IgGκαι δείγματα τα οποία ελέγχονται για τα IgAαντισώματα, δίνουν πιο συχνά θετικό αποτέλεσμα, σε σχέση με αυτά που ελέγχονται για τα IgG αντισώματα [17].

Συνολικά από τους 39 ασθενείς με COVID-19, οι 13 ασθενείς ήταν θετικοί και στα IgGκαι στα IgAαντισώματα, 15 στα IgG αντισώματα, ενώ 11 ασθενείς βρέθηκαν μόνο σταIgAαντισώματα, με αποτέλεσμα οι θετικοί ασθενείς στα IgA αντισώματα να

ανέρχονται στους 24. Η μέση διάρκεια από την εμφάνιση των συμπτωμάτων για την ανίχνευση των IgGαντισωμάτων ήταν 12 ημέρες, ενώ για την ανίχνευση των IgAαντισωμάτων 11 ημέρες [17].

Τέλος εξετάστηκαν και 13 ασθενείς οι οποίοι πιθανώς να είχαν COVID-19. Από αυτούς, ένας ασθενής βρέθηκε θετικός και στα IgAκαι στα IgG αντισώματα, ένας ασθενής βρέθηκε θετικός μόνο στα IgGαντισώματα και ένας ασθενής βρέθηκε θετικός μόνο στα IgAαντισώματα [1].

**Πίνακας 3:** Αριθμός ατόμων που πιθανός να είχαν COVID-19 και εξετάστηκαν με την μέθοδο ELISAγια την ανίχνευση IgAκαι IgMαντισωμάτων[17].

Οροί ασθενών που πιθανώς έχουν COVID-19	Ανίχνευση μόνο IgA	Ανίχνευση μόνο IgM	Ανίχνευση και IgAκαι IgM
13	1	1	1

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους ερευνητές Roy et.al 2020 έγινε χρήση ELISA με πλάκα μικροτιτλοδότησης, επιστρωμένη με το αντιγόνο RBD της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2. Για την επιβεβαίωση ότι η μέθοδος που βασίζεται στο RBD μπορεί να διαχωρίζει άτομα τα οποία είχαν εκτεθεί στον SARS-CoV-2, από αυτά τα οποία δεν είχαν εκτεθεί, IgM, IgGκαι IgA αντισώματα ειδικά για το RBDτης πρωτεΐνης ακίδας, εξετάστηκαν σε μια ομάδα ατόμων, οι οποίοι είχαν διαγνωστεί με COVID-19και στη συνέχεια αναρρώσαν με διενέργεια δύο διαδοχικών αρνητικών μοριακών τεστ. Άτομα τα οποία ήταν αρνητικά και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες[17].

Η περιοχή RBD της πρωτεΐνης ακίδας μπορεί και διαχωρίζει ένα αντιγόνο του SARS-CoV-2, από ένα αντιγόνο του SARS-CoV. Συνεπώς οι μέθοδοι ELISA που χρησιμοποιούν την περιοχή RBD ως αντιγόνο, εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα.

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν την ανίχνευση συντριπτικά υψηλότερου επιπέδου αντι-RBD ειδικά IgG αντισώματα στα άτομα τα οποία είχαν αναρρώσει, σε σχέση με τους μάρτυρες. Επίσης παρατηρήθηκε, ότι τα επίπεδα των αντισωμάτων των ατόμων που είχαν αναρρώσει από τον SARS-CoV-2, εμφάνιζαν διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, μεταξύ των ασθενών[17].

Επιπρόσθετα για να εξακριβωθεί, εάν ειδικά IgM, IgG και IgA αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2 μπορούν να ανιχνευτούν σε άτομα με διαφορετικά επίπεδα ανοσίας, πραγματοποιήθηκε ανάλυση στα αρχικά στάδια της λοίμωξης. Εξετάστηκε το προφίλ της ανοσίας έναντιRBD της πρωτεΐνης ακίδας σε μια ομάδα μολυσμένων και μη μολυσμένων ατόμων. Εξετάστηκαν συνολικά 118 άτομα, σε διαφορετικές ημέρες από την αρχή των συμπτωμάτων. Διαπιστώθηκε ένα μεγάλο εύρος απόκρισης των

επιπέδων IgG, IgA και IgM αντι-RBD αντισωμάτων, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, με υψηλά επίπεδα IgG και IgA σε θετικούς ασθενείς σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες[17].

Επίσης διαπιστώθηκε ότι όταν τα άτομα εμφάνιζαν υψηλά επίπεδα IgG, είχαν χαμηλά IgM και διάφορα επίπεδα IgA. Αντίθετα άτομα τα οποία είχαν υψηλά IgM, είχαν μέτρια επίπεδα IgG και IgA[17].

Τα αποτελέσματα για την ειδική RBD-ELISA, έδειξαν ότι τα αντισώματα IgM είναι τα πρώτα αντισώματα τα οποία παράγονται. Ο συνδυασμός των IgG και IgA αντισωμάτων είναι ο καλύτερος διαγνωστικός δείκτης. Ωστόσο στα αρχικά στάδια της νόσου ο πιο έγκυρος διαγνωστικός δείκτης είναι ο συνδυασμός των IgM και IgA. Ειδικότερα η ευαισθησία της RBD-ELISA για την ανίχνευση των IgM είναι συνολικά 77,94%, για τα αντισώματα IgA είναι 94,12% και για τα IgG 82,35%. Τέλος μετά το πέρας 15-21 ημερών από την έναρξη των συμπτωμάτων, ο καλύτερος διαγνωστικός δείκτης είναι τα IgA αντισώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η υψηλότερη ειδικότητα για την ανίχνευση των IgM αντισωμάτων εντοπίζεται 21 ημέρες πριν την έναρξη των συμπτωμάτων. Υψηλή ειδικότητα για τα IgM αντισώματα εμφανίζεται σε όλη τη διάρκεια της λοίμωξης[17].

**Πίνακας 4:** Ευαισθησία της ELISA-RBD για την ανίχνευση των IgM, IgG και IgA αντισωμάτων, τα οποία είναι ειδικά για την περιοχή RBD της πρωτεΐνης ακίδας του ιού[17].

ELISA-RBD	Ευαισθησία για IgM	Ευαισθησία για IgG	Ευαισθησία για IgA
	77,94%	82,35%	94,12%

Οι ερευνητές Rikhtegaran et.al, συνέλεξαν 100 δείγματα πλάσματος από ασθενείς με COVID-19, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε μοριακό έλεγχο PCR και είχαν θετικό αποτέλεσμα. Τα δείγματα προήλθαν από ασθενείς που νοσηλεύονταν στο Πανεπιστημιακό Κλινικό Κέντρο του Maryland, που διαγνώστηκαν με COVID-19, τον Απρίλιο-Μάιο του 2020. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν 300 προ-επιδημικά δείγματα ορού/πλάσματος ως αρνητικοί μάρτυρες[18].

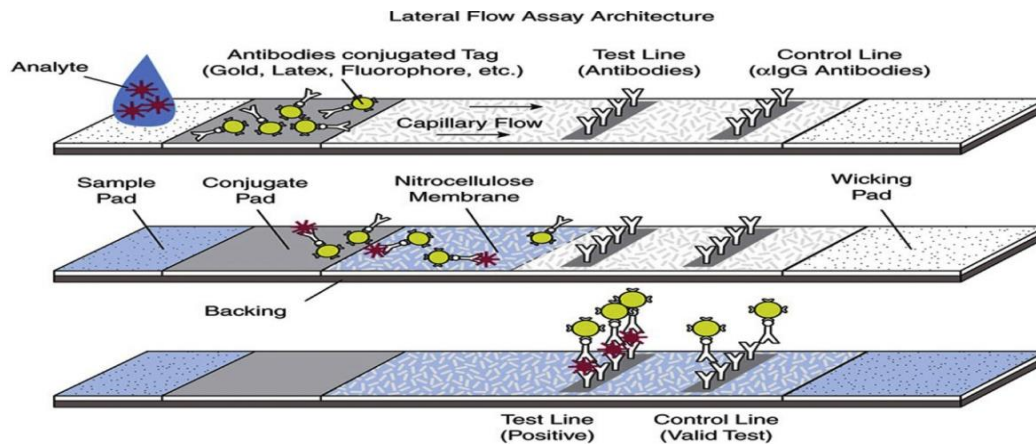
Στη συνέχεια αναπτύχθηκαν τρεις διαφορετικές ELISA για την ποιοτική αξιολόγηση του ανθρώπινου ορού ή πλάσματος, για την ανίχνευση IgG ή IgA αντισωμάτων (IgG και IgA ELISA), ειδικά για το τριμερές της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2, και της ανίχνευσης των IgG αντισωμάτων ειδικών έναντι της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης (IgG ELISA). Για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση των μεθόδων, χρησιμοποιήθηκαν 8 θετικά και 8 αρνητικά δείγματα. Τα αντι-νουκλεοκαψιδικά αντισώματα εμφανίζονται νωρίτερα σε σχέση με τα αντισώματα έναντι της

πρωτεΐνης ακίδας του ιού. Συνεπώς, η ανίχνευση των αντι-νουκλεοκαψιδικών αντισωμάτων μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία της μεθόδου, όταν η ανίχνευση πραγματοποιεί στα αρχικά στάδια της μόλυνσης από το ιό. Η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου έχει μικρό μέγεθος και μπορεί να εύκολα να παραχθεί και να καθαρισθεί σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς ξενιστές σε μεγάλες ποσότητες[18].

Ανάλυση της ομολογίας των πρωτεϊνών της ακίδας και του νουκλεοκαψιδίου του SARS-CoV-2, έδειξε ότι το 90% των αμινοξέων του νουκλεοκαψιδίου εμφανίζει ομοιότητες με αυτό του MERS-CoV και 28%-29% ομοιότητα με αυτό των άλφα και βήτα κορωνοϊών. Το ίδιο ποσοστό ομοιότητας, με τους άλλους κορωνοϊούς εμφανίζεται και στην πρωτεΐνη ακίδα και ιδιαίτερα στην περιοχή S2 της ακίδας. Συνεπώς προτείνεται να χρησιμοποιηθεί ως στόχος η περιοχή S1 της ακίδας, ώστε να αυξηθεί η ειδικότητα της δοκιμασίας. Η ειδικότητα των μεθόδων ELISA που χρησιμοποίησαν ως αντιγόνο την πρωτεΐνη S της ακίδας του ιού, κυμαίνεται από 100%-93,7%. Παράλληλα η ειδικότητα των μεθόδων ELISA που χρησιμοποίησαν ως στόχο την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη, η ειδικότητα κυμαίνεται από 100%-98,3% [18].

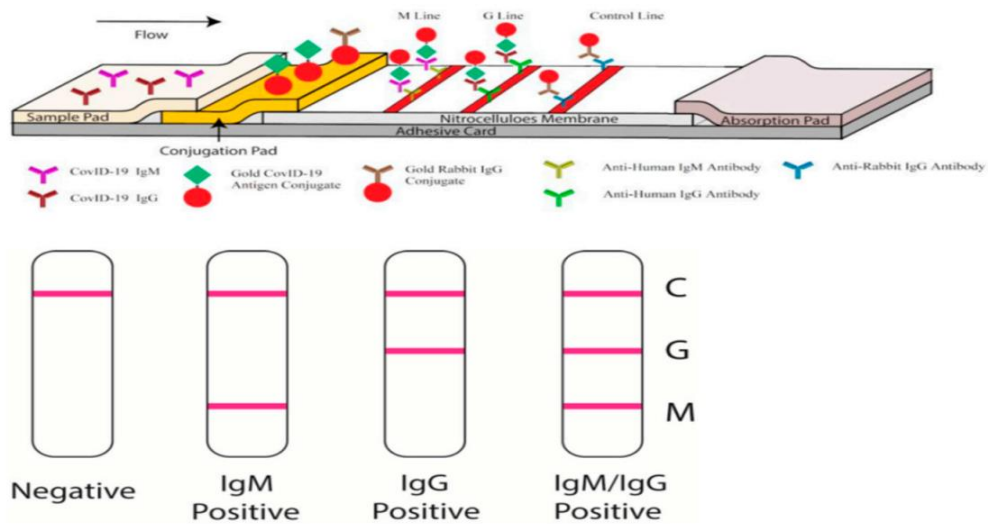
## **1.2. Ανοσοχρωματογραφία**

Στα ανοσοχρωματογραφικά τεστ (μέθοδος πλευρικής ροής) εντοπισμού αντιγόνου, η λωρίδα νιτροκυτταρίνης φέρει ακινητοποιημένο έναν ιχνηθέτη (κολλοειδής χρυσός, φθορίζοντα νανοσωματίδια ή μαγνητικά σωματίδια), συζευγμένο με αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) έναντι του εξεταζόμενου αντιγόνου. Στα αντιγονικά τεστ για τη διάγνωση της COVID-19, anti-SARS-CoV-2 αντισώματα ειδικά έναντι της πρωτεΐνης ακίδας του ιού ή της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης είναι ακινητοποιημένα στη λωρίδα της νιτροκυτταρίνης. Όταν πραγματοποιείται η προσθήκη του κλινικού δείγματος αναμειγμένο με λυτικό ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο αδρανοποιεί τα ιικά σωματίδια και βοηθά στην απελευθέρωση των αντιγόνων του ιού, παρατηρείται πλευρική ροή του δείγματος λόγω του τριχοειδούς φαινομένου μέσω της μεμβράνης. Εάν στο κλινικό δείγμα υπάρχει αντιγόνο SARS-CoV-2, αυτό συνδέεται με ακινητοποιημένα anti-SARS-CoV-2 αντισώματα, συζευγμένα με ιχνηθέτη, και δημιουργείται ένα σύμπλοκο αντισώματος-ιχνηθέτη-αντιγόνου[12].



**Εικόνα 8:** Αρχή μεθόδου ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση αντιγόνου SARS-CoV-2 [12].

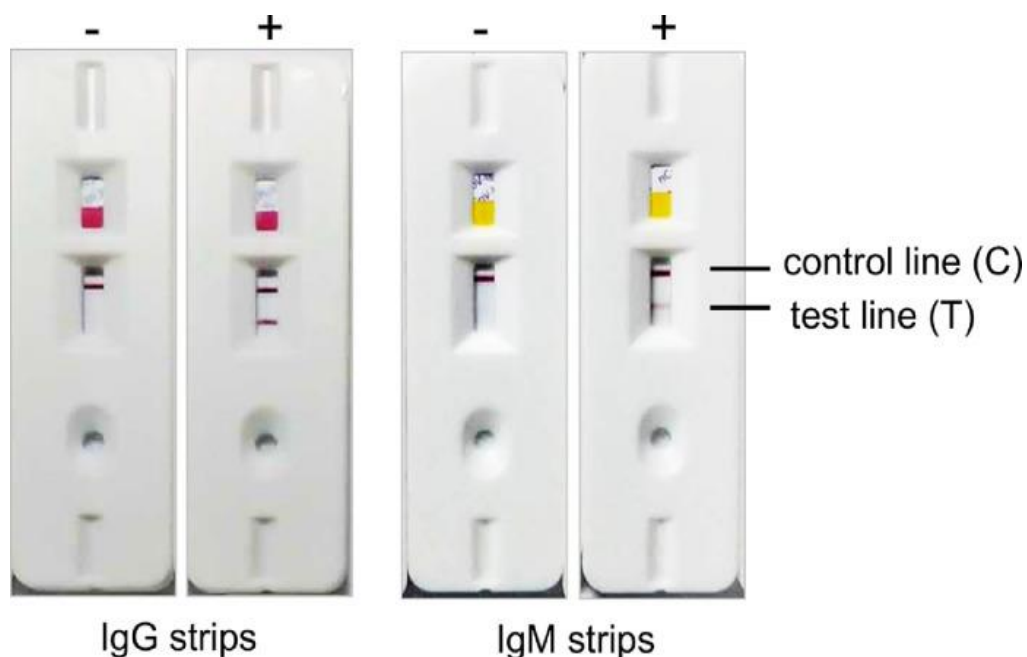
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχουν αναπτυχθεί rapid τεστ τα οποία μπορούν να ανιχνεύουν IgG και IgM αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2, σε δείγματα αίματος, ορού ή πλάσματος. Κατά τον έλεγχο, πραγματοποιείται προσθήκη 10 με 15  $\mu$ l δείγματος, ενώ στη συνέχεια γίνεται προσθήκη και λυτικού διαλύματος. Καθώς το δείγμα ρέει κατά μήκος της λωρίδας νιτροκυτταρίνης, τα anti-SARS-CoV-2 IgG και IgM αντισώματα, αν είναι παρόντα στο δείγμα, συνδέονται με τα SARS-CoV-2 αντιγόνα τα οποία είναι συζευγμένα με χρωματομετρικό χρυσό. Όπως το συζευγμένο δείγμα συνεχίζει να ρέει πάνω στη λωρίδα, τα anti-CoV-2 IgM αντισώματα συνδέονται πάνω στην γραμμή M (IgM) και τα anti-SARS-CoV-2 IgG αντισώματα συνδέονται στη γραμμή G (IgG). Τα εναπομείναντα συζευγμένα IgG αντισώματα ρέουν προς την γραμμή του control, όπου συνδέονται με anti-IgG αντισώματα. Στο συγκεκριμένο rapid τεστ, η λωρίδα εμφανίζει τρεις μωβ/κόκκινες έγχρωμες ζώνες, ανάλογα με το αποτέλεσμα. Η μια λωρίδα είναι αυτή του control (C), πρέπει πάντα κατά την διενέργεια του τεστ να είναι έγχρωμη και δηλώνει την εγκυρότητα του rapid τεστ. Παράλληλα οι άλλες 2 λωρίδες είναι υπεύθυνες για την παρουσία των IgM και IgG αντισωμάτων αντίστοιχα. Σε περίπτωση που μόνο η γραμμή του control είναι ορατή, τότε το δείγμα είναι αρνητικό. Σε αντίθετη περίπτωση αν εκτός από την γραμμή του control και η γραμμή του IgM ή του IgG και των δύο είναι ορατές το δείγμα είναι θετικό. Τέλος αν η γραμμή του control δεν είναι ορατή κατά την διενέργεια του τεστ, το αποτέλεσμα δεν είναι έγκυρο και η εξέταση θα πρέπει να επαναληφθεί [18].



**Εικόνα 9:** Ανοσοχρωματογραφία για την ανίχνευση αντισωμάτων IgM ή/και IgG με τη χρήση δείγματος ολικού αίματος, ορού ή πλάσματος [18].

### 1.2.1. Ορθότητα της ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων.

Για τον έλεγχο της ορθότητας της διαγνωστικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε από τους Yunbao et.al, το 2020, μελέτη κατά την οποία συλλέχθηκαν 86 δείγματα αίματος, ορών ή πλάσματος, από 67 θετικούς, για τον SARS-CoV-2, ασθενείς. Η μόλυνση από τον SARS-CoV-2 είχε επιβεβαιωθεί με τη διενέργεια real-time RT-PCR. Τα δείγματα εξετάστηκαν με δύο rapid τεστ, ένα rapid τεστ που ανιχνεύει IgM αντισώματα και ένα που ανιχνεύει IgG αντισώματα. Τα rapid τεστ έχουν ως ιχνηθέτη τον κολλοειδή χρυσό [19].



**Εικόνα 10:** Λωρίδες rapid τεστ, οι οποίες ανιχνεύουν IgG ή IgM αντισώματα, έναντι του SARS-CoV-2 [19].

Ο έλεγχος COVID-19 εξετάσθηκε και για τα τρία στάδια της νόσου, το πρώιμο στάδιο, το ενδιάμεσο στάδιο και το τελικό στάδιο. 27 από τα 86 δείγματα εξετάστηκαν κατά το πρώιμο στάδιο και έδωσαν 3 θετικά IgM rapid τεστ και 1 θετικό τεστ για τα IgG. Κατά το ενδιάμεσο στάδιο εξετάστηκαν 28 δείγματα, τα οποία έδωσαν 22 θετικά IgM τεστ και 16 θετικά IgG τεστ. Τέλος 31 δείγματα εξετάστηκαν κατά το τελικό στάδιο και έδωσαν 23 θετικά IgM τεστ και 30 θετικά IgG τεστ [19].

**Πίνακας 5:** Ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε κάθε στάδιο της λοίμωξης, με την μέθοδο την ανοσοχρωματογραφίας, για την ανίχνευση IgM ή IgG αντισωμάτων. Επίσης ο δείκτης θετικότητας για IgM και IgG αντισώματα σε κάθε στάδιο της λοίμωξης από SARS-CoV-2 [19].

Στάδιο λοίμωξης	Αριθμός δειγμάτων	IgM θετικά	IgG θετικά	Δείκτης Θετικότητας IgM	Θετικότητας IgG
Πρώιμο Στάδιο	27	3	1	11,1 %	3,6%
Ενδιάμεσο Στάδιο	28	22	16	78,6%	57,1%
Τελικό Στάδιο	31	23	30	74,2%	96,8%
Σύνολο	86	48	47	-	-

Για το rapid τεστ που ανιχνεύει το αντίσωμα IgM, ο δείκτης θετικότητας ήταν 11,1 % στο αρχικό στάδιο, 78,6% στο ενδιάμεσο στάδιο και 74,2% στο τελικό στάδιο της λοίμωξης. Παράλληλα για το rapid τεστ που ανιχνεύει το αντίσωμα IgG, ο δείκτης θετικότητας ήταν 3,6% στο αρχικό στάδιο, 57,1% στο ενδιάμεσο στάδιο και 96,8% στο τελικό στάδιο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα rapid τεστ δεν έχουν υψηλή ευαισθησία κατά το αρχικό στάδιο της λοίμωξης, αυτό που ανιχνεύει IgM εμφανίζει καλύτερη ευαισθησία κατά το ενδιάμεσο στάδιο της λοίμωξης, ενώ το rapid τεστ που ανιχνεύει το αντίσωμα IgG εμφανίζει καλύτερη ευαισθησία κατά το τελικό στάδιο της λοίμωξης. Για την βέλτιστη ευαισθησία, προτείνεται από τους ερευνητές, συνδυασμός των δύο rapid τεστ, μέθοδος η οποία θα αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία, ιδιαίτερα στο ενδιάμεσο στάδιο. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι τα αντισώματα IgM και IgG μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας από την 4<sup>η</sup> ημέρα, από την αρχή των συμπτωμάτων. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι στη μέθοδο αυτή δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί η ειδικότητα, ενώ η ένταση του χρώματος των ζωνών δεν



αποδεικνύει την ποσότητα των αντισωμάτων, γεγονός που της προσδίδει σοβαρό μειονέκτημα[19].

Ωστόσο υπάρχει μια ειδική κατηγορία ασθενών για μελέτη. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν ασθενείς που έχουν δώσει αρνητικό αποτέλεσμα στην real-time RT-PCR, ωστόσο εμφανίζουν συμπτώματα COVID-19 και έχει επιβεβαιωθεί η ιική πνευμονία τους με την μέθοδο της ραδιογραφίας. Η περίπτωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων οφείλεται σε κάποιους περιορισμούς της μοριακής τεχνικής. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος 39 δειγμάτων, από 37 ασθενείς, με τη μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας, για την ανίχνευση IgM και IgG αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: 9 δείγματα (23,1%) ήταν θετικά στα IgM αντισώματα και 15 δείγματα (38,5%) ήταν θετικά στα IgG αντισώματα. Στο σύνολο των δειγμάτων, 17 δείγματα (43,6%) ήταν θετικά σε κάποια ή/και στις δύο τάξεις ανοσοσφαιρινών, τα οποία ήταν αρνητικά στην real-time RT-PCR[19].

**Πίνακας 6 :** Αριθμός ατόμων με συμπτώματα COVID-19, τα οποία είχαν αρνητικό μοριακό αποτέλεσμα. Συνολικά το 43,6% ήταν θετικό σε κάποια ή/και στις δύο τάξεις ανοσοσφαιρινών έναντι του SARS-CoV-2[19].

Αριθμός δειγμάτων ατόμων με αρνητικό PCR και συμπτώματα ιικής πνευμονίας.	Θετικοί με IgM ανοσοσφαιρίνες	Θετικοί με IgG ανοσοσφαιρίνες	Σύνολο δειγμάτων που ήταν θετικό σε IgM ή/και IgM ανοσοσφαιρίνες	Βιβλιογραφική αναφορά
39	9 (23,1%)	15(38,5%)	17(43,6%)	[13]

Παράλληλα 22 δείγματα από αυτήν την ομάδα, ελέγχθηκαν για το εντοπισμό αντισωμάτων, σε διάφορα στάδια της λοίμωξης. Τα αποτελέσματα έδειξαν τα εξής: 9 δείγματα από ασθενείς που βρίσκονται στο αρχικό στάδιο, εμφάνισαν με το rapid test που ανιχνεύει το αντίσωμα IgM, δείκτη θετικότητας 22,2%. Επιπρόσθετα 6 δείγματα από ασθενείς που βρίσκονται στο ενδιάμεσο στάδιο και 7 δείγματα από ασθενείς που βρίσκονται στο τελικό στάδιο εμφάνισαν δείκτη θετικότητας 33,3% και 57,1% αντίστοιχα. Τέλος για τα ίδια δείγματα, το rapid test που εντοπίζει το αντίσωμα IgG, εμφάνισε δείκτη θετικότητας 44,4%, 66,7% και 71,4% αντίστοιχα. Και σε αυτήν την περίπτωση συστήνεται ο συνδυασμός των 2 rapid test για την βέλτιστη δυνατή ευαισθησία, η οποία φέρεται να ανέρχεται στο 83,3% για τα άτομα που βρίσκονται στο ενδιάμεσο στάδιο[19].

**Πίνακας 7:** Ευαισθησία μεθόδου ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση αντιγόνων IgM ή IgG [19].

Αριθμός δειγμάτων με συμπτώματα πνευμονίας και αρνητική PCR.	22
Θετικά δείγματα από ασθενείς στο αρχικό στάδιο	9
Θετικά δείγματα από ασθενείς στο ενδιάμεσο στάδιο	6
Θετικά δείγματα από ασθενείς στο τελικό στάδιο	7
Ευαισθησία μεθόδου με τον συνδυασμό και των 2 rapidτεστ	83,3%

Και στις 2 περιπτώσεις ασθενών η συγκεκριμένη ανοσολογική διαδικασία εμφανίζεται επαρκής για να λειτουργήσει ως συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδος με την RT-PCR[19].

### **1.2.2.Ανοσοχρωματογραφία για την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgMκαι IgΓαντισωμάτων για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε ένα τεστ ταχείας ανίχνευσης.**

Για την ταχύτερη διάγνωση του SARS-CoV-2, οι ερευνητές Zhengtuetal.,,,,,,, το 2020, ανέπτυξαν rapidτεστ, σύμφωνα με το οποίο μία λωρίδα, θα μπορεί να ανιχνεύει ταυτόχρονα anti-SARS-CoV-2 αντισώματα IgMκαι IgG[18].

Για να διαπιστωθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα του τεστ έγινε λήψη φλεβικού αίματος από 525 ασθενείς. Από αυτούς του ασθενείς, οι 397 ήταν κλινικά και εργαστηριακά θετικά επιβεβαιωμένοι με τη μέθοδοPCR, ενώ 128 ασθενείς είχαν αρνητικό αποτέλεσμα με την διαδικασία της PCR. Το φλεβικό αίμα των ασθενών τέθηκε για έλεγχο αντισωμάτων IgMκαι IgG, με τη χρήση του rapid τεστ και τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: από τους 397 θετικούς ασθενείς, ανιχνεύτηκαν από το rapid τεστ οι 352, από τους οποίους οι256 είχαν και IgMκαι IgΓαντισώματα, οι 24 είχαν μόνο IgGκαι οι 72 είχαν μόνο IgM, αποτέλεσμα που υποδηλώνει 88,66% ευαισθησία. Παράλληλα από τους 128 ασθενείς που ήταν αρνητικοί, μόνο οι 12 βγήκαν ψευδώς θετικοί, κάτι που υποδηλώνει 90,63% ειδικότητα. Λόγω της φύσης και λειτουργικότητας των συγκεκριμένων αντισωμάτων μπορεί να καταλήξουμε σε συμπέρασμα για το στάδιο της λοίμωξης που βρίσκεται ο ασθενής, αφού τα IgΜαντισώματα εμφανίζονται στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, σε αντίθεση με τα IgΓαντισώματα που εμφανίζονται σε τελικά στάδια της λοίμωξης[18].

**Πίνακας 8 :** Η ευαισθησία και η ειδικότητα του rapid τεστ για την ταυτόχρονη ανίχνευση των IgM και IgG αντισωμάτων[18].

	<b>Θετικά δείγματα</b>	<b>Αρνητικά δείγματα</b>
<b>Αριθμός δειγμάτων</b>	397	128
<b>IgG και IgM θετικά</b>	256	1
<b>IgG θετικά</b>	24	1
<b>IgM θετικά</b>	72	10
<b>Ευαισθησία</b>	88,66%	-
<b>Ειδικότητα</b>	-	90,63%

Επίσης πραγματοποιήθηκε έρευνα και σε 58 ασθενείς που είχαν διαγνωστεί με COVID-19. Το 94,83% είχε και IgM και IgG αντισώματα, το 1,72% είχε μόνο IgM, ενώ μόνο το 3,45% είχε IgG αντισώματα. Η διενέργεια των τεστ πραγματοποιήθηκε από την 8<sup>η</sup> μέχρι την 33<sup>η</sup> ημέρα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων[22].

**Πίνακας 9:** Ποσοστό θετικότητας IgM και IgG, σε δείγματα από 58 ασθενείς[18].

<b>Τάξη ανοσοσφαιρινών</b>	<b>Αριθμός θετικών δειγμάτων</b>	<b>Ποσοστό θετικότητας</b>
<b>IgM</b>	1	1,72
<b>IgG</b>	2	3,45
<b>IgM &amp; IgG</b>	55	94,83

Τέλος η χρήση τριχοειδικού αίματος για την διάγνωση του SARS-CoV-2, κάνει ευκολότερη την διενέργεια του τεστ, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάγνωση εκτός νοσοκομειακών μονάδων αλλά και για οικιακή χρήση. Παράλληλα είναι γνωστό ότι οι περισσότεροι φορείς του ιού είναι ασυμπτωματικοί ή έχουν ήπια συμπτώματα, οπότε είναι δύσκολος ο έλεγχος του πληθυσμού. Με την χρήση του διαγνωστικού τεστ μπορεί να εύκολα να επιβεβαιωθεί αν κάποιος είναι μολυσμένος, αφού σε σχεδόν όλες τις περιπτώσεις ο SARS-CoV-2, προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων. Ωστόσο η διαγνωστική μέθοδος εμφανίζει και σοβαρά μειονεκτήματα. Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση των IgM αντισωμάτων μειώνεται και εξαφανίζεται με την πάροδο δύο εβδομάδων. Παράλληλα η συγκέντρωση των IgM και IgG αντισωμάτων μπορεί να βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε κάποιους ασθενείς. Όλοι αυτοί οι λόγοι μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τέλος δεν έχουν γίνει επαρκείς έρευνες για να διαπιστωθεί αν υπάρχει διασταυρούμενη αντίδραση από άλλους ιούς, όπως τους ιούς της γρίπης ή άλλους κορωνοϊούς, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια καλή συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδο, όπου μαζί με την RT-PCR μπορούν να δώσουν τα βέλτιστα αποτελέσματα[18].

### **1.3. Ειδικές περιπτώσεις ψευδών αρνητικών IgMαποτελεσμάτων στην ELISAκαι στην ανοσοχρωματογραφία και τεχνικές για την αποφυγή τους.**

Η ανάλυση δειγμάτων ορού για την ανίχνευση IgMκαι IgGαντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2, πραγματοποιείται συχνά στα κλινικά εργαστήρια για τη διάγνωση της COVID-19. Οι κύριοι μέθοδοι για την ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων είναι η ανοσοχρωματογραφία και η ELISA. Με την χρήση των δύο αυτών μεθόδων για την ανίχνευση των IgM, είναι δυνατή η ανίχνευση ύποπτων κρουσμάτων νωρίτερα, με μεγάλη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Ωστόσο κατά την χρήση των δύο μεθόδων για την ανίχνευση των IgMαντισωμάτων, παρατηρήθηκε παρέμβαση από τον ρευματοειδή παράγοντα IgM (rheumatoid factor IgM, RF-IgM). Ο RF-IgMείναι IgM αντιπυρηνικό αντίσωμα ,το οποίο είναι ειδικό έναντι του σταθερού τμήματος του αντισώματος IgG και συναντάται σε άτομα ρευματοειδή αρθρίτιδα[20].

Οι ερευνητές Qiangetal., το 2020,χρησιμοποίησαν για την έρευνά τους ορούς 86 ασθενών, πασχόντων από λοιμώξεις και χρόνια νοσήματα. Ειδικότερα οι οροί προέρχονταν από 5 ασθενείς με τον ιό της γρίπης A, 5 ασθενείς με τον ιό της γρίπης B, 5 ασθενείς με *Mycoplasma pneumoniae*, 5 ασθενείς με *Legionella pneumophila*, 6 ασθενείς με HIV, 36 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, 5 άτομα με υπέρταση και 5 άτομα με σακχαρώδη διαβήτη. Τα άτομα αυτά δεν είχαν κανένα κλινικό σύμπτωμα της νόσου COVID-19. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε συλλογή ορών από 14 ασθενείς με COVID-19. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε 3 με 7 ημέρες μετά την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων. Τέλος είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, εκτός από τους 36 θετικούς ορούς με RF-IgM, στους υπόλοιπους 50 ορούς, ο RF-IgM ήταν κάτω από 20.00 IU/ml[20].

Οι οροί αυτοί ελέγχθηκαν ,για την ανίχνευση IgM αντισωμάτων, με την μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας και της ELISA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα rapidtest σε δείγμα ορών από τους ασθενείς με τα διάφορα παθογόνα ή τις χρόνιες παθήσεις ήταν θετικό. Επιπρόσθετα από τα 39 δείγματα ορών με RF-IgM τα 22 ήταν θετικά, ενώ όλα τα δείγμα των ασθενών με COVID-19 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, αλλά η ειδικότητα πρέπει να βελτιωθεί. Επιπρόσθετα μόνο τα δείγματα με RF-IgMέδωσαν ψευδώς θετικό αποτέλεσμα[20].

**Πίνακας 10:** Ανίχνευση IgMαντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2, σε διάφορες ομάδες ασθενών, με την χρήση ανοσοχρωματογραφίας και ELISA[20].

Ομάδες ασθενών	Αριθμός ασθενών	Θετικά αποτελέσματα με rapidτεστ	Θετικά αποτελέσματα με ELISA
Με τον ιό της γρίπης Α	5	0	0
Με τον ιό της γρίπης Β	5	0	0
Με <i>Mycoplasma Pneumoniae</i>	5	0	0
Με <i>Legionella pneumophila</i>	5	0	0
Με υπέρταση	5	0	0
Με σακχαρώδη διαβήτη	5	0	0
Με HIV	6	0	0
Με RF-IgM	36	22	22
COVID-19	14	14	14

Παράλληλα οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι, εάν η συγκέντρωση των RF-IgMείναι λιγότερο από 70 IU/mlυπάρχει σημαντικά μικρότερη πιθανότητα το δείγμα να βγει ψευδώς θετικό, σε αντίθεση με δείγμα ορού όπου η συγκέντρωση του RF-IgMείναι πάνω 70 IU/ml.Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι οφείλεται στην αντίδραση του RF-IgMμε το ανασυνδυασμένο αντιγόνο του SARS-CoV-2 που βρίσκεται στην λωρίδα του τεστ της ανοσοχρωματογραφίας, καθώς και με τα anti-humanIgM[20].

Η λύση που έχει προταθεί για τον περιορισμό του φαινομένου, είναι η προσθήκη ουρίας κατά τη διενέργεια του rapidτεστ. Αναλυτικότερα 100μlορού αίματος προστέθηκαν σε 1 ml διάλυμα αραίωσης. Στη συνέχεια 100μl από το αραιωμένο δείγμα προστέθηκαν στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος του rapidτεστ. Την στιγμή που το δείγμα, το οποίο κινείται με πλευρική ροή κατά μήκος της λωρίδας, φτάσει στο ανώτατο σημείο της λωρίδας, γίνεται η προσθήκη 100μl διαλύματοςPBS που περιέχουν 6 molουρίας[20].

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την προσθήκη 6 molουρίας από τα 22 δείγματα ορών με RF-IgM που ήταν θετικά, τα 21 έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ τα 14 δείγματα ορών των ασθενών με COVID-19 παρέμειναν θετικά. Συνεπώς συμπεραίνουμε ότι με αυτή την τεχνική η ειδικότητα του τεστ αυξάνεται, χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί η ευαισθησία του[27].

**Πίνακας 11 :** Εξέταση ορών ασθενών με RF-IgM και COVID-19 με την μέθοδο της ανοσοχρωματογραφίας, μετά την προσθήκη 6 mol ουρίας[20].

Εξέταση ορών με rapid τεστ μετά την προσθήκη 4 mol ουρίας			
Οροί ασθενών	Αριθμός ορών	Αρνητικά	Θετικά
RF-IgM	22	21	1
SARS-CoV-2 IgM	14	0	14



**Εικόνα 11.** Αποτελέσματα των rapid τεστ για την ανίχνευση του IgM αντισώματος έναντι του SARS-CoV-2, πριν και μετά την προσθήκη ουρίας[20].

Με την προσθήκη 4 mol/Λουρίας, οι 19 από τους 22 RF-IgM θετικούς ορούς, που έδωσαν πριν την προσθήκη ουρίας ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα. Παράλληλα τα αποτελέσματα των 14 ορών από τους ασθενείς με COVID-19 δεν επηρεάστηκαν[20].

**Πίνακας 12 :** Εξέταση ορών ασθενών με RF-IgM και COVID-19 με την μέθοδο ELISA, μετά την προσθήκη 4 mol ουρίας [20].

Εξέταση ορών ασθενών με ELISA μετά την προσθήκη ουρίας			
Οροί ασθενών	Αριθμός ορών	Αρνητικά	Θετικά
RF-IgM	22	19	3
SARS-CoV-2 IgM	14	0	14

#### **1.4.ΑνοσοδοκιμασίαΧημειοφωταύγειας**

Η ανοσοδοκιμασία της χημειοφωταύγειας (CLIA-Chemiluminescent Immunoassay), είναι μια ανοσολογική μέθοδος ποσοτικής ανίχνευσης αντισωμάτων. Η συνεχής ανίχνευση συγκέντρωσης αντισωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εξέλιξης της COVID-19 σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο [21,22].

Στην CLIA ο ιχνηθέτης είναι ένα φθορίζον μόριο. Γενικά ο φθορισμός είναι η εκπομπή ορατής ή περίπου ορατής ( $\lambda=300-800$  nm) ακτινοβολίας, η οποία επιτυγχάνεται με την μεταπήδηση ενός ηλεκτρονίου από μια διεγερμένη κατάσταση στην θεμελιώδη με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή φωτός[21].

Η πιο ευρέως διαδομένη μέθοδος CLIA είναι η ετερογενής μέθοδος, ενώ η CLIA μπορεί να είναι άμεση, χρησιμοποιώντας φωτοφόρους δείκτες ή έμμεση χρησιμοποιώντας ενζυμικούς δείκτες. Επιπρόσθετα κάθε μέθοδος μπορεί να είναι ανταγωνιστική ή μη-ανταγωνιστική[21].

Οι ερευνητές Shaoetal, το 2020,επέλεξαν 65 ασθενείς, ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα και το ιστορικό έκθεσης στον ιό. Κάθε ασθενής υποβλήθηκε σε διαγνωστικό έλεγχο RT-PCR για να επιβεβαιωθεί η λοίμωξη από τον SARS-COV-2. Από τους 65 ασθενείς, οι 15 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και αποτέλεσαν την ομάδα των ασθενών και οι 50 ασθενείς που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου [22].

Για να αξιολογηθεί η διαγνωστική αξία των ειδικών IgMκαι IgGαντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2,έγινε λήψη 105 ορών αίματος και από τις δύο ομάδες. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν για τον έλεγχο των ορών, την έμμεση ανοσοδοκιμασία δύο βημάτων CLIA.Η αντίδραση της χημειοφωταύγειας μετρήθηκε με μονάδες μέτρησης φωτός (RLUs relative light units). Υπάρχει μια άμεση σχέση μεταξύ των anti-SARS-CoV-2 IgMή IgGαντισωμάτων σε ένα δείγμα και των RLUsπου ανιχνεύονται από το οπτικό σύστημα[22].

Η τιμή απόρριψης σύμφωνα με τους ερευνητές ήταν  $<10.00$  AU(Arbitrary units)/mL. Όταν η συγκέντρωση των IgM ή IgGαντισωμάτων σε ένα δείγμα ήταν  $<10.00$  AU/mL, τότε το δείγμα ήταν αρνητικό. Δείγμα συγκέντρωση των αντισωμάτων μεγαλύτερη ή ίση του  $10.00$  AU/mLθεωρούνταν θετικό[22].

Στην ομάδα ελέγχου, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των ειδικών αντισωμάτων IgMκαι IgGστους ορούς, ήταν  $0,46$  AU/mLκαι  $0,74$ /mLαντίστοιχα. Η διάμεση τιμή των IgM και IgGαντισωμάτων στην ομάδα των ασθενών ήταν  $17,86$  AU/mLκαι  $69,23$

AU/mL, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων στην ομάδα των ασθενών με COVID-19, ήταν σαφώς μεγαλύτερη από αυτή της ομάδας ελέγχου [22].

Επιπρόσθετα υπολογίστηκε η ευαισθησία και η ειδικότητα για την ανίχνευση των IgM αντισωμάτων σε 60% και 100% αντίστοιχα, ενώ για την ανίχνευση των IgG αντισωμάτων ήταν 86,67% και 100% αντίστοιχα. Η διαγνωστική ευαισθησία των IgM ήταν αρκετά χαμηλότερη από αυτή των IgG αντισωμάτων (60% vs 86,67%)[22].

Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή διαγνωστική αποτελεσματικότητα των IgG, οι ερευνητές επέλεξαν την ημέρα όπου η συγκέντρωση των IgGαντισωμάτων θα ήταν κοντά στο 10.00 AU/mL για να συλλέξουν νέα δεδομένα για τα IgMαντισώματα και να επιλέξουν μια νέα τιμή απόρριψης. Όταν η τιμή απόρριψης για τα IgMτέθηκε στο 1,83 AU/mL, τότε παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα για αυτά με ποσοστό 93,33% και 98% αντίστοιχα[22].

**Πίνακας 13 :** Το ποσοστό της ευαισθησίας και της ειδικότητας της CLIA για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των IgMαντισωμάτων στις τιμές απόρριψης 1,83 AU/mLκαι 10.00 AU/mLαντίστοιχα [22].

<b>Ευαισθησίακαι ειδικότητα CLIA για IgMαντισώματα</b>			
<b>Ευαισθησία IgMμε τιμή απόρριψης &lt;1,83 AU/mL</b>	<b>Ευαισθησία IgM με τιμή απόρριψης &lt;10.00 AU/mL</b>	<b>Ειδικότητα IgMμε τιμή απόρριψης &lt;1,83 AU/mL</b>	<b>Ειδικότητα IgMμε τιμή απόρριψης &lt;10.00 AU/mL</b>
93,33%	98%	98%	100%

**Πίνακας 14:** Το ποσοστό της ευαισθησίας και της ειδικότητας της CLIA για την ανίχνευση της συγκέντρωσης των IgG αντισωμάτων με τιμή απόρριψης τα 10.00 AU/MI [22].

<b>Ευαισθησία και ειδικότητα της CLIA για τα IgGαντισώματα</b>	
<b>Ευαισθησία IgG (10.00 AU/mL)</b>	<b>Ειδικότητα IgG (10.00 AU/mL)</b>
86,67%	100%

Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι το ελάχιστο χρονικό διάστημα για να ανιχνευτούν τα IgM ήταν 1,5 ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων και μέγιστο χρονικό διάστημα ήταν 7 ημέρες. Το ελάχιστο χρονικό διάστημα για να ανιχνευτούν τα αντισώματα IgG ήταν 2 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων και το μέγιστο χρονικό διάστημα ήταν 8 ημέρες. Ο δείκτης θετικότητας για τα IgMκαι IgG συνολικά ήταν 96,36% και 94,55% αντίστοιχα. Στις 8-14 ημέρες, μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, ο δείκτης θετικότητας των IgM και IgG αντισωμάτων έφτασε το 100%. Ο δείκτης θετικότητας διατηρήθηκε σε αυτό το ποσοστό μέχρι και την τέταρτη εβδομάδα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων[22].



### 1.5. Μέθοδος ανοσοφθορισμού για την διάγνωση του SARS-CoV-2

Η μέθοδος ανασυνδιασμένου ανοσοφθορισμού (rIFA) αξιολογεί την ύπαρξη IgΓαντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2. Η μέθοδος Rifaχρησιμοποιεί ολόκληρη την πρωτεΐνη ακίδα του SARS-CoV-2 για την ανίχνευση των αντισωμάτων IgG στους ορούς των ασθενών [23].

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Meyer et.al., το έτος 2020, για να διαπιστωθεί ο επιπολασμός σύμφωνα με την rIFA, ελέγχθηκαν 326 ασθενείς αρνητικοί στον SARS-CoV-2 και 181 ασθενείς θετικοί στον SARS-CoV-2. Τα αποτελέσματα έδειξαν 326 αρνητικά δείγματα, υποδεικνύοντας 100% ειδικότητα. Ανάμεσα στους ασθενείς με COVID-19 υπήρχαν, 165 θετικά δείγματα, 16 αρνητικά δείγματα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ευαισθησία της μεθόδου είναι 91,2%. Επιπρόσθετα η οροθετικότητα φαίνεται να είναι χαμηλή έως και 12,5% την πρώτη μέχρι την 10<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων ή της διάγνωσης. Ωστόσο η οροθετικότητα αυξήθηκε στο 92,0% κατά την 11<sup>η</sup>-20<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων ή την διάγνωση, ενώ κατά την 21<sup>η</sup>-39<sup>η</sup> ημέρα η οροθετικότητα έφτασε το 100%. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα είναι ασφαλές να πούμε ότι η rIFA είναι μια ικανή μέθοδος για την ανίχνευση του IgΓαντισώματος ειδικού για την πρωτεΐνη ακίδα [23].

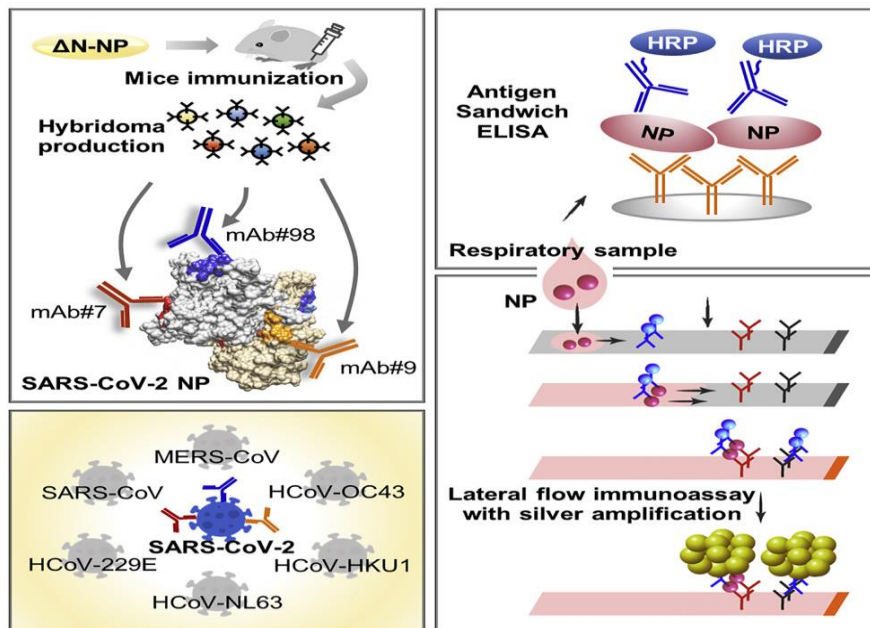
**Πίνακας 14:** Ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου rIFA για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 [23].

	rIFA	
<b>Αριθμός ασθενών αρνητικών στον SARS-CoV-2</b>	<b>Αριθμός ασθενών αρνητικών στον SARS-CoV-2</b>	<b>Ειδικότητα</b>
326	326	100%
<b>Αριθμός ασθενών αρνητικών στον SARS-CoV-2</b>	<b>Αριθμός ασθενών αρνητικών στον SARS-CoV-2</b>	<b>Ευαισθησία</b>
181	165	91,2%

### **1.6. Ανάπτυξη ανοσολογικών δοκιμασιών για την ανίχνευση της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης N.**

Το νουκλεϊκό οξύ του SARS-CoV-2 περιβάλλεται από μια νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη N, 50 kDa, η οποία παρέχει προστασία έναντι των RNA νουκλεασών, καθώς και την συμπίεση του, ώστε να χωρέσει μέσα στο ιικό σωματίο. Επιπρόσθετα έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν 720 με 2200 νουκλεοκαψιδικά μονομερή για κάθε αντίγραφο ιικού RNA σε κάθε ιικό σωματίο. Το γεγονός αυτό την καθιστά ικανό στόχο για την διάγνωση του SARS-CoV-2, ειδικά στα αρχικά στάδια της λοίμωξης από τον ιό. Όμως ο αριθμός των νουκλεοκαψιδικών είναι σχετικά χαμηλός στον ορό των ασθενών, ωστόσο σε ρινοφαρυγγικό δείγμα και σε δείγμα των οπισθίων μοιρών των ρινικών κοιλοτήτων ανευρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες. Τέλος ένας σημαντικός λόγος που καθιστά την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη σπουδαίο διαγνωστικό αντιγόνο είναι η μεγάλη σταθερότητα της. Ωστόσο για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχο[24].

Αρχικά τα αντισώματα αυτά παρήχθησαν με την τεχνολογία υβριδώματος, με ανοσοποίηση ποντικών με ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη N, με στόχο την ανάπτυξη υβριδώματος. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη N προέρχεται από την βακτηριακή πλασμιδιακή έκφραση της BL21 DE3 pLysE.coli (Escherichiacoli). Ωστόσο επειδή η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη σχηματίζει ολιγομερή μεγάλου μοριακού βάρους σε συγκεντρώσεις NaCl κάτω των 300 mM είναι απαραίτητος ο καθαρισμός της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης σε διηθητική στήλη Superdex 200 gel σε 500 mM NaCl. Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη είναι αντιγονική και προκαλεί την έκφραση πολυκλωνικών αντισωμάτων. Από τα ποντίκια που ανοσοποιήθηκαν με την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη, έγινε συλλογή του σπλήνα για την παραγωγή υβριδωμάτων. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές διαγνωστικές μεθόδους όπως ELISA, Western Blot και IFA[24].



**Εικόνα 12:** Παραγωγή αντισωμάτων με την τεχνολογία υβριδώματος[24].

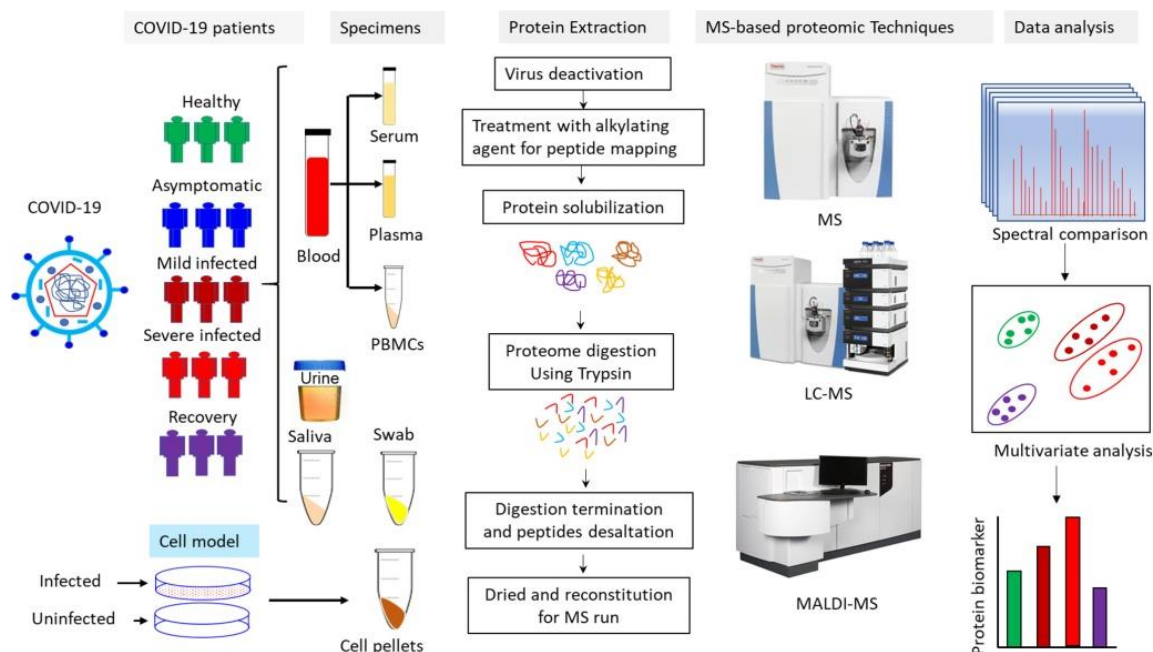
Παράλληλα τα μονοκλωνικά αντισώματα ελέγχθηκαν για διασταυρούμενη αντίδραση με τους κορωνοϊούς του κοινού κρυολογήματος και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά, ενώ πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση των αλληλουχιών των βαριών και ελαφριών αλυσίδων των αντισωμάτων. Τέλος πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση των αντιγονικών επιτόπων των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης N[24].

### 1.7. Φασματομετρία μάζας

Η μακροπρόθεσμη προτεραιότητα για την παρακολούθηση της COVID-19 είναι η ενσωμάτωση ορολογικών και ολιγονουκλεοτιδικών τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί, σε πολλαπλές «ομικές-omics» προσεγγίσεις, οι οποίες θα βοηθήσουν τους κλινικούς γιατρούς και ερευνητές στο να παρακολουθούν πιο αποτελεσματικά υγιείς, άρρωστους, καθώς και ασθενείς που βρίσκονται σε ανάρρωση. Οι ενσωματωμένες «ομικές» που βασίζονται στη φασματομετρία μάζας (MS-Massspectrometry), περιλαμβάνουν πρωτεομικές, γλυκομικές, μεταβολομικές και λιπιδιομικές έρευνες που παρέχουν μια συνολική εικόνα για τις αλλαγές που προκαλούνται από το παθογόνο στον ξενιστή, μετά την μόλυνση, εισβολή, ανθεκτικότητα και παθογένεια, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση θεραπευτικών στόχων με σκοπό την αποτροπή ή στην ελάττωση της σοβαρότητας της νόσου. Η μόλυνση από παθογόνο μπορεί να μελετηθεί μέσω της χειραγώγησης του μεταβολισμού του ξενιστή από το παθογόνο. Η προσαρμογή του παθογόνου στον μεταβολισμό του ξενιστή είναι προαπαιτούμενο για τον πολλαπλασιασμό, ανάπτυξη και υπεροχή του από άλλα γειτονικά κύτταρα τα οποία εισβάλλουν.

Συνεπώς η κατανόηση του ρόλου του μεταβολισμού στην ιική παθογονικότητα είναι πολύτιμη για την ανάπτυξη θεραπειών νέας γενιάς[25].

Η πρωτεομική ανάλυση που στηρίζεται σε φασματομετρικές μεθόδους, όπως η χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC)-MS και η τεχνική MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), εφαρμόστηκαν επιτυχώς σε κλινικό περιβάλλον ως διαγνωστικό εργαλείο για την έρευνα του ιού και της παθογονικότητάς του. Σύμφωνα με έρευνα στην οποία έγινε χρήση φασματομετρίας μάζας, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση 332 αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών του ξενιστή και του SARS-CoV-2, οι οποίες αποτελούν θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση της COVID-19 [25].



**Εικόνα 13:** Η πρωτεομική ανάλυση που στηρίζεται σε φασματομετρικές μεθόδους[25].

Επιπρόσθετα με τη χρήση σταθερού σεσημασμένου ισότοπου Tandem Mass Tag (TMT) MS βασισμένο στην πρωτεομική, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση απορρύθμισης πολλαπλών απολιποπρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων τις APOA1, APOA2, APOH, APO11, APOD και APOM στον ορό ασθενών. Παράλληλα με τη χρήση LC-MS σε ούρα ασθενών με COVID-19, βρέθηκε ότι τα ούρα ασθενών με ήπια και σοβαρά συμπτώματα, με συννοσηρότητα, ήταν διαφοροποιημένα σε σχέση με αυτά των υγιών ατόμων[25].

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Yanchang Li et al., το 2020, πραγματοποιήθηκε εξέταση 40 δειγμάτων ούρων με την χρήση της MS βασισμένη στην πρωτεομική. Τα 32 από τα 40 δείγματα προέρχονταν από υγιή άτομα και αποτέλεσαν την ομάδα control. Τα 6 από τα 40 προέρχονταν από ασθενείς με COVID-19 και 2 από άτομα τα οποία αναρρώνουν από την ασθένεια. Όλοι η

ασθενείς είχαν συννοσηρότητα. Ειδικότερα 4 ασθενείς είχαν υπέρταση, 1 ασθενής είχε υπέρταση και διαβήτη και 1 ασθενής είχε πολλαπλές μεταστάσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου. Αυτοί οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελούνταν από 3 ασθενείς που είχαν βαριά νόσηση COVID-19 και 3 ασθενείς που είχαν ήπια συμπτώματα[26].

Μετά την εξέταση των ούρων, ταυτοποιήθηκαν συνολικά, 2,656 πρωτεΐνες στα ούρα της ομάδα των υγιών ατόμων. Παράλληλα ταυτοποιήθηκαν συνολικά 1380 πρωτεΐνες στις ομάδα των ατόμων με COVID-19 και 1,641 πρωτεΐνες στα άτομα τα οποία αναρρώνουν. Υπήρχαν 1008 κοινές πρωτεΐνες ανάμεσα στα υγιή άτομα, τα άτομα με COVID-19 και τα άτομα που αναρρώνουν. Ωστόσο 221 πρωτεΐνες ήταν μοναδικές στα άτομα με COVID-19 και 63 πρωτεΐνες ήταν μοναδικές στα άτομα που αναρρώνουν[26].

Παράλληλα βρέθηκε ότι ο ενδοκυτταρικός μεταφορέας χοληστερίνης 2 (NPC2), η APOA1 και η cubilin (CUBN) ήταν μειορρυθμισμένες σε άτομα με σοβαρή νόσηση COVID-19. Ωστόσο πρωτεΐνη CREB3 (cyclicAMP-responsive element-binding protein 3), η πρωτεΐνη 3 (CREB3L3), η πρωτεΐνη 1 που αυξορρυθμίζεται από την υποξία (HYOU1), ο συμπαράγοντας ηπαρίνης 2 (SERPIND1) και το συστατικό C3 του συμπληρώματος, είχαν αυξορρυθμιση σε ασθενείς COVID-19 με ήπια ή σοβαρά συμπτώματα. Επιπρόσθετα με τη χρήση orbitrap MS ανιχνεύτηκαν πεπτίδια πρωτεϊνών του SARS-CoV-2 που καταλύθηκαν από την θρυψίνη (NCAP, VME1), τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διάγνωση του SARS-CoV-2. Με την χρήση LC-MS για την COVID-19, ταυτοποιήθηκαν 27 πρωτεΐνες, οι οποίες συσχετίζονται με την νοσηρότητα της νόσου [25].

**Πίνακας 16.** Πρωτεΐνες οι οποίες αναλύθηκαν, κατά την πρωτεομική ανάλυση της COVID-19, με την χρήση της LC-MS και σχετίζονται με την νοσηρότητα της νόσου[26].

<b>Πρωτεομική Ανάλυση της COVID-19</b>	
<b>Αυξορρυθμισμένες πρωτεΐνες</b>	C3, CREB3L3, HYOU1, SERPIND1, A1BG, ACTB, C1R, C1S, C8A, CD14, CFB, CFH, CFI, CRP, FGA, FGB, FGG, HP, ITIH3, ITIH4, LBP, LGALS3BP, LRG1, SAA1, SAA2, SERPINA10, πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων.
<b>Μειορρυθμισμένες πρωτεΐνες</b>	APOA1, APOA2, APOH, APOL1, APOD, APOM, NPC2, APOA1, CUBN, ALB, APOA1, APOC1, TF, GSN.

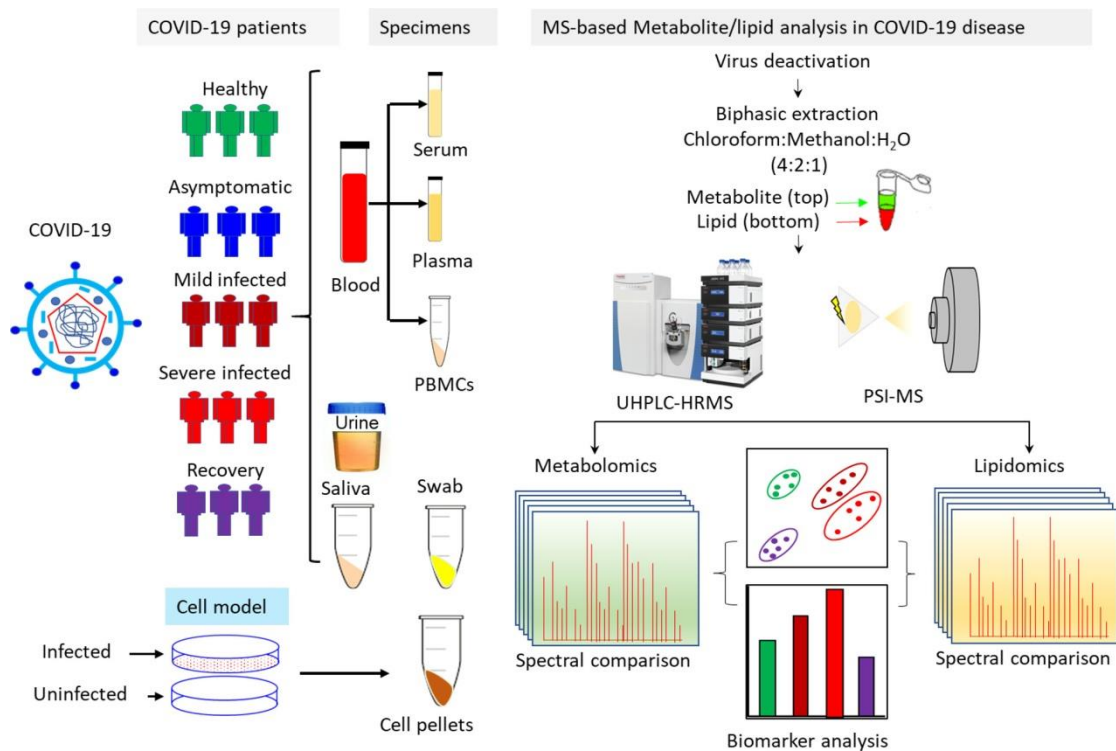
Από τις 27 πρωτεΐνες οι 22 είχαν αυξορρύθμιση, ενώ οι υπόλοιπες 5 ήταν μειορρυθμισμένες. Παράλληλα η MALDI-MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική διαγνωστική μέθοδος για τον διαχωρισμό του SARS-CoV-2 από τους άλλους ιούς. Συμπερασματικά η LC και η MALDI-MS έχουν αρκετές δυνατότητες, ωστόσο είναι σημαντική η δοκιμή τους σε μεγαλύτερες κλινικές δοκιμές, καθώς και η ανάπτυξη πιο γρήγορων και ευαίσθητων μεθόδων[25].

Σε μια άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε με την χρήση της LC-MS, η λοίμωξη από SARS-CoV-2, έδειξε ότι οι γλυκάνες μιμούνται τον πολυπετιδικό επίτοπο που ρυθμίζει της αλληλεπιδράσεις της ακίδας με τους ACE2 υποδοχείς. Οι γλυκάνες συσχετίζονται με το μικρό έλυτρο, καθώς και με το RBD[25].

Οι MS βασισμένες στην λιποδομική αναλύουν στοχευμένα λιπίδια ή ολόκληρο το λιπιδικό προφίλ του ξενιστή (λιπαρά οξέα, γλυκεροφωσfolιπίδια, σφινγγολιπίδια, γλυκερολιπίδια, γλυκολιπίδια, στεροειδή) και τη διαταραχή τους σε μια λοίμωξη ή νόσο. Οι λιποδομικές έχουν τρομερή επίδραση στις έρευνες των αναδυόμενων παθογόνων. Τα λιπίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στα διάφορα στάδια αλληλεπίδρασης του ξενιστή με το παθογόνο, καθώς και της παθογονικότητας. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε με την χρήση LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry), έγινε γνωστό ότι τα διγλυκερίδια (DGs- diglycerides), FA και τα τριγλυκερίδια, υπάρχουν σε μεγαλύτερη ποσότητα και συνδέονται με αυξημένη θνησιμότητα, καθώς και με την αυξημένη πιθανότητα επιδείνωσης της νόσου, ενώ η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), βρέθηκε ότι ήταν μειωμένη. Γενικά κατά την έρευνα διαπιστώθηκε δυσλιπιδαιμία σε ασθενείς με COVID-19. Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης και της 21-υδροξυπρεγνενολόνης, οι οποίες παίζουν ρόλο στην σύνθεση της κορτικοστερόνης, ήταν αυξημένα. Ωστόσο τα μειωμένα επίπεδα του γλυκεροφωσfolιπιδίου και η μειορρύθμιση των σφινγγολιπιδίων παρατηρήθηκε και σε ασθενείς με μη σοβαρή νόσηση από COVID-19, αλλά και σε ασθενείς με σοβαρή νόσηση από COVID-19. Τέλος η υπολιπιδαιμία σε ασθενείς με COVID-19 συσχετίζεται με την σοβαρότητα της νόσου[25].

Η μεταβολομική μελετά μεταβολίτες και την διαταραχή τους σε μια νόσο ή λοίμωξη. Οι μεταβολίτες είναι ουσίες που σχηματίζονται κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό και δείκτες της βιοχημικής δραστηριότητας, συνεπώς τα επίπεδα τους είναι ευαίσθητα σε μια σειρά από διαταραχές που συνδέονται με την έναρξη ασθενειών, την λοίμωξη, ή/και την παθογονικότητα. Η MS έχει χρησιμοποιηθεί για την ανακάλυψη βιοδεικτών που βασίζονται στον μεταβολισμό για την διάγνωση ασθενειών[32]. Σε ασθενείς με COVID-19, με την χρήση LC-ESI-MS/MS, το μηλικό οξύ του κύκλου του κιτρικού οξέως, το καρβαμυλ φωσφορικό του κύκλου της ουρίας και η μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) της νουκλεοτιδικής βιοσύνθεσης, ήταν τελείως τροποποιημένα σε ασθενείς με θανατηφόρα COVID-19[32]. Σε μια

άλλη έρευνα στην οποία πραγματοποιήθηκε μοριακό profiling σε ορό ασθενή με COVID-19, ταυτοποιήθηκε σημαντική ενεργοποίηση της κυνoureνικής οδού, με υψηλή κυνoureνίνη και 8-μεθοξικυνoureνικό σε ασθενείς με COVID-19[32]. Αντίθετα σε μια άλλη έρευνα βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα χολίνης και της παράγωγου της φωσφοχολίνης, καθώς και της καταστολής των αμινοξέων και των παραγώγων τους. Τα μειωμένα επίπεδα βρέθηκαν σε ασθενείς με επιβαρυσμένη εικόνα, αλλά και σε ασθενείς με μη σοβαρή κλινική εικόνα. Ταυτόχρονα βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα μεταβολισμού του αζώτου, συμπεριλαμβανομένων της κρεατίνης, πολυαμίνης και κυκλοφορούντα αμινοξέα, σε ασθενείς με COVID-19. Ο ικός πολλαπλασιασμός και η κυτταρική ομοιοστάση του ξενιστή εξαρτώνται από τα συνένζυμα δινουκλεοτίδια νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD-Nicotinamide adenine dinucleotide), NAD<sup>+</sup>, NADH, NADP<sup>+</sup> και NADPH, που είναι οι κεντρικοί καταλύτες του μεταβολισμού. Με την χρήση LC-ESI-MS/MS, βρέθηκε απορρύθμιση των NAD σε κυτταρικά μοντέλα μολυσμένα με SARS-CoV-2[25].



**Εικόνα 14:** Λιποδομική και Μεταβολομική φασματομετρική μέθοδος[25].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ SARS-CoV-2

---

### 2.1 RT-qPCR

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μοριακές μέθοδοι για την ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος. Η πιο σημαντική τεχνική ή gold standard αποτελεί η ποσοτική PCRαντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription quantitative PCR, RT-qPCR), η οποία στοχεύει διαφορετικά γονίδια. Οι περισσότερες RT-qPCRστοχεύουν το γονίδιο Ετου ελύτρου, ενώ οι RT-qPCRπου στοχεύουν τα γονίδια RdRp (RNA dependent RNA polymerase) ή/και του N νουκλεοκαψιδίου αποτελούν επιβεβαιωτικά τεστ[12].

Η απομόνωση του RNAαποτελεί το πρώτο βήμα για κάθε μέθοδο RT-qPCR. Παράλληλα αποτελεί το πιο κρίσιμο βήμα, το οποίο θα κρίνει την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια του αποτελέσματος που θα δώσει η μέθοδος. Το RNA, σε αντίθεση με το DNA, είναι ευαίσθητο στην αποδόμηση. Συνεπώς η αποθήκευση του δείγματος, ο χειρισμός και η απομόνωση του RNAπρέπει να πραγματοποιείται βάση πρωτοκόλλων τα οποία ελαχιστοποιούν την απώλεια RNA, λόγω αποδόμησης, σε κάθε βήμα της μεθόδου. Το RNAτο οποίο έχει απομονωθεί πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας, χωρίς την παρουσία νουκλεασών ή άλλων συστατικών τα οποία θα εμποδίσουν την σύνθεση του cDNA. Η προσθήκη πρωτεΐνάσης K και διθειοθρεϊτόλης (DTT) φαίνεται να αυξάνουν την ποιότητα απομόνωσης του RNA[12].

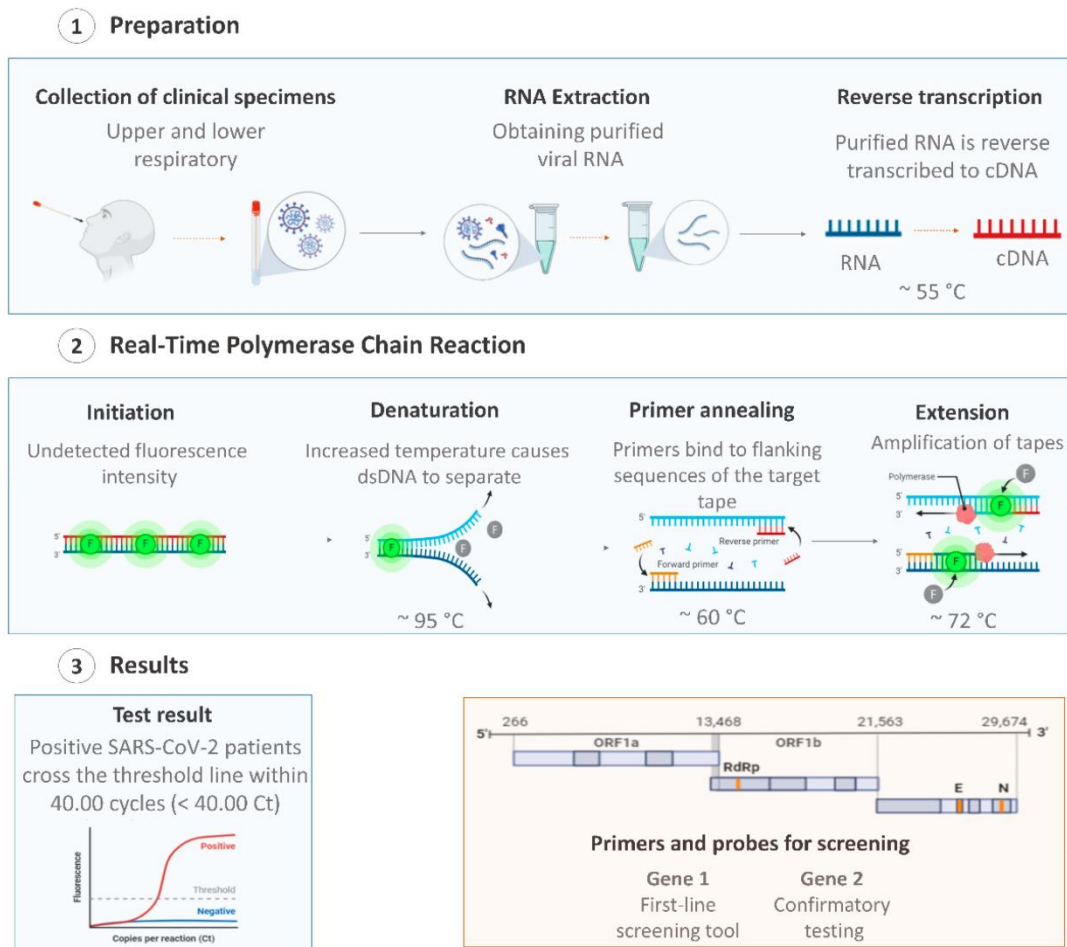
Στην RT-qPCRγίνεται χρήση εκκινητών-όλιγο-dT, ειδικών για ένα γονίδιο ή μη ειδικών για κάποια θέση του γονιδίου. Ο τύπος εκκινητή εξαρτάται από την ειδικότητα της μεθόδου, την απόδοση του cDNAκαι τον τύπο του RNA. Η χρήση όλιγο-dt εκκινητών δεν συνίσταται για την ιική μεταγραφή, ενώ οι μη ειδικοί εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές δεν είναι ειδικοί σε κάποια θέση του μορίου και μπορούν να συνδεθούν σε πολλαπλές θέσεις κατά την μεταγραφή του ιικού RNA. Ωστόσο οι μη ειδικοί εκκινητές έχουν την μεγαλύτερη απόδοση παραγωγής cDNAκαι μπορούν συνδεθούν με διάφορα είδη RNA, όπως το rRNA, το ικόRNA και RNAμε δευτεροταγή δομή. Το είδος αυτό εκκινητών θα εξασφαλίσει ότι το ικόRNAτου SARS-CoV-2 καθώς και το RNA του ξενιστή θα μεταγραφεί και το cDNAθα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την qPCR[12].

Η RT-qPCRχρησιμοποιεί για εκκινητές-ανιχνευτές δύο περιοχές του νουκλεοκαψιδικού γονιδίου (N1 και N2) του SARS-CoV-2. Ένας τρίτος εκκινητής, ο οποίος έχει ως στόχο το ανθρώπινο γονίδιο *RNAaseP*, λειτουργεί ως μάρτυρας για την εξαγωγή του RNA και την σύνθεση του cDNA[12].



Η σύνθεση του cDNA γίνεται με την χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, το οποίο μετατρέπει το απομονωμένο RNA σε cDNA. Το cDNA στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως καλούπι για την ενίσχυση και ανίχνευση των γονιδίων στόχων (γονίδιο E ελύτρου, γονίδιο N νουκλεοκαψιδίου ή του γονιδίου της RdRp). Ειδικότερα γίνεται χρήση 2 ειδών αντίστροφης μεταγραφάσης. Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση προέρχεται από τον ιό της μυελοβλάστωσης των πτηνών (AMV-RT) και προσφέρει την διεκπεραίωση της αντίδρασης σε μεγαλύτερη θερμοκρασία, μειώνοντας τα προβλήματα που αφορούν την δευτεροταγή δομή του RNA. Η δεύτερη αντίστροφη μεταγραφάση προέρχεται από τον ιό λευχαιμίας ποντικού (MMLV-RT) και προσφέρει καλύτερη απόδοση μεγαλύτερου μεγέθους cDNA. Οι συνθήκες αντίδρασης για την RT-qPCR εξαρτάται από το γονίδιο στόχο, τους εκκινητές, την αντίστροφη μεταγραφάση, την Taq DNA πολυμεράση και τους θερμικούς κύκλους [12].

Η RT-PCR χρησιμοποιεί ως control για την ποιότητα εξαγωγής του RNA του δείγματος, το γονίδιο της ριβονουκλεάσης P (RNaseP). Μαζί με την απομόνωση του ιικού RNA, πραγματοποιείται και η απομόνωση του mRNA της ριβονουκλεάσης P, το οποίο μετατρέπεται και αυτό σε cDNA και ενισχύεται από τους ανιχνευτές του, με αποτέλεσμα την ανίχνευση από την RT-qPCR. Οι τιμές Ct της RT-PCR για την ανίχνευση του RNaseP mRNA πρέπει να είναι λιγότερο από 40. Αποτυχία ανίχνευσης του RNaseP γονιδίου υποδηλώνει αποτυχία εξαγωγής του RNA, αποδόμηση του RNA, απουσία ικανού ανθρώπινου κυτταρικού υλικού λόγω κακής δειγματοληψίας, δυσλειτουργίας του εξοπλισμού ή των αντιδραστηρίων. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η υψηλή παρουσία ανθρώπινου RNaseP mRNA μπορεί να μειώσει την ευαισθησία της σύνθετης RT-PCR για την ανίχνευση πολλών γονιδίων του SARS-CoV-2 [12].



**Εικόνα 15:** Αρχή μεθόδου RT-qPCR [27].

Τα θετικά και αρνητικά control της PCR χρησιμοποιούνται για να εξασφαλιστεί η ποιότητα της μεθόδου. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε multi-well στα οποία είναι επιρρεπή από μολυσματικά σταγονίδια. Το αρνητικό control αποτελείται από νερό ελεύθερο νουκλεασών και δεν πρέπει να δώσει σήμα ανίχνευσης. Στο θετικό control πραγματοποιείται *in vitro* σύνθεση αντιγράφων RNA με Ct ανάλογα με τις οδηγίες [12].

## 2.2. RT-qPCR για την διάγνωση του SARS-CoV-2.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Green et al., το 2020, έγινε λήψη ρινοφαρυγγικού δείγματος σε 22.338 ασθενείς, ενώ πραγματοποιήθηκαν 27.337 μοριακά τεστ. Η πλειονότητα των RT-PCR τεστ πραγματοποιήθηκε στο Cobas 6800 της εταιρίας Roche Diagnostics. Ειδικότερα η ανίχνευση RT-PCR σε Cobas στηρίζεται στην ενίσχυση του ORF1ab στην μη δομική περιοχή, η οποία είναι μοναδική για τον SARS-CoV-2 και στο γονίδιο της δομικής πρωτεΐνης E, η οποία είναι κοινή για όλα τα μέλη του υπογένους *Sarbecovirus* στο οποίο ανήκει και ο

SARS-CoV-2. Η μοριακή ανίχνευση RT-PCR της εταιρίας Cepheid Diagnostics έχει ως στόχο την ανίχνευση του N2 γονιδίου, το οποίο είναι μοναδικό για τον SARS-CoV-2 καθώς και του γονιδίου που κωδικοποιεί την δομική πρωτεΐνη E. Παράλληλα η μοριακή μέθοδος PR-PCT της εταιρίας Panther Fusion στηρίζεται στην ανίχνευση της ORF1ab περιοχής. Επιπρόσθετα η μοριακή μέθοδος του CDC στηρίζεται στην ενίσχυση 2 περιοχών του γονιδίου N. Τέλος η Abbot ID χρησιμοποιεί, για την ανίχνευση του SARS-COV-2, ισοθερμική ενίσχυση της μοναδικής περιοχής του νουκλεϊκού οξέος της RNA- εξαρτώμενης-RNA πολυμεράσης[28].

**Πίνακας 16:** Μέθοδοι RT-qPCR που έχουν αναπτυχθεί από εταιρίες και οργανισμούς για τη διάγνωση του SARS-CoV-2, καθώς και οι περιοχές του ιικού γονιδιώματος που στοχεύουν[28]

Μέθοδος RT-qPCR που έχουν αναπτυχθεί	Στόχος γενώματος SARS-CoV-2
Cobas	ORF1ab, γονίδιο E
Cepheid Diagnostics	Γονίδιο N2, γονίδιο E
Panther Fusion	ORF1ab
CDC	2 περιοχές του γονιδίου N
Abbot, IDNow	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η πλειονότητα των μεθόδων έγινε στον Cobas 6800, ενώ συνολικά πραγματοποιήθηκαν 27.377 μοριακοί έλεγχοι. Από αυτούς οι 18.906 έλεγχοι αφορούν την ομάδα των ασθενών που εξετάστηκαν μόνο μια φορά και δεν υποβλήθηκαν σε επανέλεγχο. Παράλληλα 8.471 μοριακοί μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σε 3.432 ασθενείς, όπου η επανάληψη των τεστ πραγματοποιήθηκε κατά το διάστημα 1ης και 49ης ημέρας μεταξύ των μεθόδων. Ειδικότερα από τα 3.432 άτομα, υπήρχαν 2.630 ασθενείς που είχαν αρχικό αρνητικό, απροσδιόριστο αποτέλεσμα, ενώ 802 ασθενείς είχαν αρχικό θετικό αποτέλεσμα. Τα άτομα τα οποία επανέλαβαν το τεστ τους, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους ασθενείς, οι οποίοι είχαν αρχικό θετικό αποτέλεσμα και συνεπώς επανέλαβαν το τεστ για να εξακριβωθεί η ανάρρωση τους και η μη-μολυσματικότητά τους, ενώ η δεύτερη ομάδα αποτελείται από τα άτομα που είχαν αρχικό αρνητικό, απροσδιόριστο τεστ, αλλά υπήρχε κλινική υποψία για COVID-19[28].

**Πίνακας 17:** Αριθμός μοριακών ελέγχων RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν στις 2 ομάδες ασθενών [28].

Συνολικός Αριθμός τεστ	Αριθμός τεστ στην ομάδα ασθενών που εξετάστηκαν μια φορά.	Αριθμός τεστ στην ομάδα ασθενών που έγινε επαναληπτικός έλεγχος
27.377	18.906	8.471

Σύμφωνα με την ίδια έρευνα που αναφέρθηκε προηγουμένως, από τους ασθενείς που επανελέγχθηκαν (σύνολο 3.432 ασθενείς) το 23,4% είχε θετικό το πρώτο τεστ. Επιπρόσθετα τα αρνητικά τεστ επανελέγχθηκαν την ίδια μέρα, με συλλογή καινούργιων δειγμάτων (εκτός από 3 που έγιναν με το ίδιο δείγμα), με αποτέλεσμα ο ρυθμός θετικότητας να ανέλθει στο 27,7%. Η συνολική θετικότητα της ομάδας των ασθενών που υποβλήθηκαν σε επανέλεγχο είναι 39,9%, ενώ η θετικότητα των ασθενών που ελέγχθηκαν μια φορά είναι 49,0%. Όταν τα απροσδιόριστα τεστ προς μετρήθηκαν ως θετικά, το 42,9% των ασθενών που επανεξετάστηκαν ήταν θετικό κατά την διάρκεια της έρευνας, σε αντίθεση με την ομάδα των ασθενών, που εξετάστηκαν μια φορά, όπου το 50% έδωσε θετικό αποτέλεσμα[28].

Ωστόσο πρέπει να αναφέρουμε ότι υπάρχουν και τα απροσδιόριστα αποτελέσματα. Ένα τεστ είναι απροσδιόριστο όταν ο ειδικός στόχος για τον SARS-CoV-2 είναι αρνητικός, ενώ ο στόχος για το υπογένος Sarbecovirus είναι θετικός. Στην ομάδα των ασθενών που είχαν επανελεγχθεί και είχαν απροσδιόριστο αρχικό αποτέλεσμα, το 53,9% έδωσαν θετικό τελικό αποτέλεσμα, το 39,1% έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ το 7% παρέμεινε απροσδιόριστο. Τέλος τα απροσδιόριστα αποτελέσματα εμφανίζουν υψηλότερους κύκλους αντιγραφής Ct. Αν για τον γονίδιο-στόχο της PCR, που είναι μοναδικό για τον SARS-CoV-2, οι κύκλοι αντιγραφής είναι περισσότεροι από 30 τότε υποδηλώνει μικρότερα ιικά φορτία[28].

**Πίνακας 18:** Ταποσοστά των αποτελεσμάτων του επαναληπτικού ελέγχου των ατόμων που είχαν απροσδιόριστο αποτέλεσμα στον πρώτο έλεγχο[28].

Ποσοστό ατόμων με απροσδιόριστο πρώτο αποτέλεσμα και θετικό δεύτερο.	Ποσοστό ατόμων με απροσδιόριστο πρώτο αποτέλεσμα και αρνητικό δεύτερο.	Ποσοστό ατόμων με απροσδιόριστο πρώτο αποτέλεσμα και απροσδιόριστο δεύτερο.
53,9%	39,1%	7%

Το αποτέλεσμα "άκυρο" είναι αποτέλεσμα της αποτυχίας ενίσχυσης του εσωτερικού control, της κακής δειγματοληψίας ή της ανεπάρκειας εξαγωγής του RNA λόγω του ιξώδους του δείγματος. Από τα άτομα που είχαν άκυρο τεστ, το 52,3% τελικά έδωσε θετικό τεστ, το 1,3% απροσδιόριστο, ενώ το 46% αρνητικό, κατά τον επανέλεγχο. [28].

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τον επανέλεγχο των αρχικά απροσδιόριστων, αρνητικών και άκυρων αποτελεσμάτων που έγινε την ίδια μέρα, το 5,6% έδωσε θετικό αποτέλεσμα, ενώ συνολικά με την διενέργεια ενός μόνο πρώτου τεστ δεν ανιχνεύτηκαν το 17% των ασθενών που τελικά ήταν θετικοί. Το ποσοστό των ψευδώς αρνητικών οφείλεται σε προαναλυτικά σφάλματα, όπως λανθασμένη τεχνική λήψης δείγματος ή ανεπάρκεια δείγματος [28].

Εν απουσία πρότυπου διαγνωστικού τεστ, δεν γνωρίζουμε πόσα αρνητικά τεστ είναι ψευδώς αρνητικά, λόγω του μεγάλου ποσοστού των μολυσμένων που είναι είτε ασυμπτωματικοί, είτε εμφανίζουν ήπια συμπτώματα, με αποτέλεσμα μόνο οι θετικοί ασθενείς να διαμορφώνουν την κλινική ευαισθησία της RT-PCR. Αν υποθέσουμε ωστόσο ότι όλα τα αρνητικά αποτελέσματα, είναι αληθώς αρνητικά (δηλαδή ειδικότητα 100%), τότε το ανώτερο όριο της κλινικής ευαισθησίας της RT-PCR κυμαίνεται περίπου στο 94,6% και αν γίνει επανέλεγχος την ίδια μέρα η ευαισθησία μπορεί να πλησιάσει το 96%. Η κλινική ευαισθησία της RT-PCR υπολογίζεται στο 57,9% με 94,6% αν πραγματοποιηθεί ένα μόνο τεστ, ή 69,3% με 96,0% αν γίνει επανέλεγχος την ίδια μέρα [28].

**Πίνακας 19:** Η ευαισθησία και η ειδικότητα της RT-PCR. Ο επαναληπτικός έλεγχος την ίδια μέρα με το πρώτο τεστ αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου [28].

Ευαισθησία RT-PCR χωρίς επανέλεγχο	Ευαισθησία RT-PCR με επανέλεγχο την ίδια μέρα με το πρώτο τεστ.	Ειδικότητα RT-PCR
57,9% με 94,6%	69,30% με 96%	100%

Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις στις οποίες γίνονται αντιληπτοί οι λόγοι που οδηγούν σε χαμηλή ευαισθησία την RT-PCR τις πρώτες ημέρες της λοίμωξης. Η πρώτη περίπτωση αφορά την αύξηση του ιικού φορτίου σε συνάρτηση με το χρόνο, οπότε στον επανέλεγχο μπορεί να εντοπιστεί το γονιδίωμα του ιού. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται στον μικρό αριθμό Ct των δύο γονιδίων-στόχων της PCR. Η δεύτερη περίπτωση αναφέρεται στην καλύτερη λήψη ρινοφαρυγγικού δείγματος, ενώ η τρίτη περίπτωση αναφέρει ότι οι ασθενείς όντως ήταν αληθώς αρνητικοί και κόλλησαν τον SARS-CoV-2 ενδονοσοκομειακά κατά την εισαγωγή τους. Η τρίτη περίπτωση ωστόσο φαίνεται λιγότερο πιθανή, διότι οι περισσότεροι εξεταζόμενοι δεν ήταν νοσηλευόμενοι, υπήρχε λιγότερο χρονικό διάστημα μεταξύ του πρώτου τεστ και της εισαγωγής, ενώ ο χρόνος παραμονής τους στο νοσοκομείο ήταν

λιγότερος σε σχέση με αυτούς που το επαναληπτικό τους τεστ παρέμεινε αρνητικό. Παράλληλα το μέσο διάστημα μεταξύ του αρχικού αρνητικού τεστ και του πρώτου θετικού αποτελέσματος έχει υπολογιστεί στις 9,4 ημέρες. Συνεπώς η πιθανότητα η μοριακή διάγνωση να δώσει θετικό αποτέλεσμα, σε ασθενή, στον οποίο υπάρχει υποψία για COVID-19, αυξάνεται γραμμικά με το πέρασμα της κάθε μέρας, με 25% πιθανότητα την 20<sup>η</sup> ημέρα[28].

Σύμφωνα με την έρευνα για να δώσει ένα άτομο , το οποίο είχε εξεταστεί στο παρελθόν και είχε δώσει αρνητικό αποτέλεσμα, θετικό αποτέλεσμα χρειάζονται περίπου 15 με 20 ημέρες από την διενέργεια του πρώτου τεστ, ή 20-30 ημέρες από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επαναληπτική διενέργεια RT-PCR τεστ, πριν της 15<sup>ης</sup> ημέρα δεν θα δώσει συχνά αρνητικό αποτέλεσμα (μόνο το 10%), χωρίς ωστόσο να μπορούμε να πούμε εάν η θετικότητα του τεστ οφείλεται σε ενεργή λοίμωξη ή σε ιικά θραύσματα[27].

Υποστηρίζεται, ότι τα χαμηλά επίπεδα του SARS-CoV-2 στον ρινοφάρυγγα, καθώς και η πιθανότητα ο ασθενής να βρίσκεται στα τελευταία στάδια της λοίμωξης από τον SARS-CoV-2, είναι υπεύθυνα για το απροσδιόριστο αποτέλεσμα κατά το αρχικό έλεγχο για τον SARS-CoV-2 με την μοριακή τεχνική RT-PCR. Αντίθετα το άκυρο αποτέλεσμα θεωρείται ότι οφείλεται στην αυξημένη παρουσία βλέννας στο δείγμα[28].

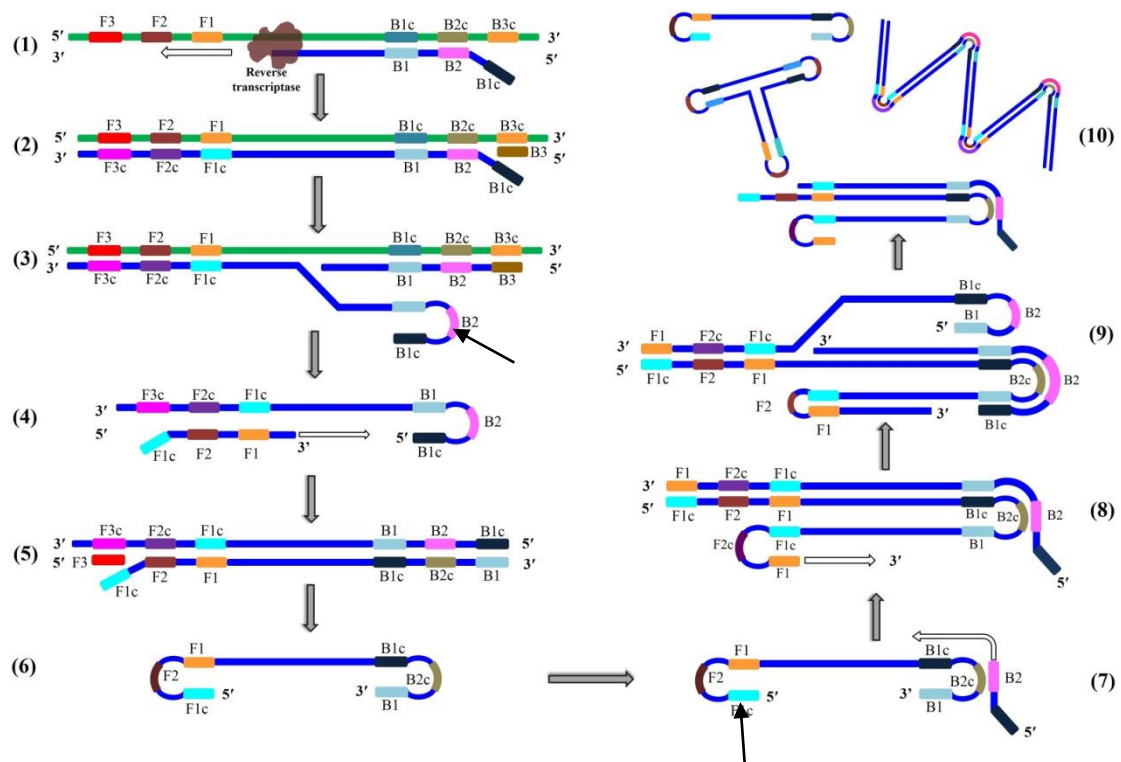
### **2.3. RT-LAMP**

HRT-LAMP(Reverse Transcriptional Loop Mediated Isothermal Amplification)είναι μέθοδος ισοθερμικής ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος σε ένα σωληνάριο. Πραγματοποιείται σε μια θερμοκρασία που ενισχύει τα κομμάτια του DNA που μας ενδιαφέρουν με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Η αντίδραση LAMP μπορεί να παρακολουθηθεί οπτικά με την χρήση χρωματομετρικών ή φθορίζουσών χρώσεων[21] και δύναται να ενισχύσει τον αριθμό των τμημάτων DNA σε 10<sup>9</sup> αντίγραφα σε χρόνο μικρότερο από μια ώρα.[12]

Αναλυτικότερα η μέθοδος χρησιμοποιεί μια DNA πολυμεράση και 4 εκκινητές σχεδιασμένους να αναγνωρίζουν ένα σύνολο από 6 διακριτές αλληλουχίες του DNA στόχου. Οπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής που περιέχει αλληλουχίες για την κωδική και μη-κωδική αλυσίδα του DNA, εκκινεί την LAMP. Πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο αλυσίδων και με καλούπι την μια από τις 2 αλυσίδες πραγματοποιείται σύνθεση μιας αλυσίδας DNA με προσανατολισμό 5' ->3'. Στη συνέχεια τοποθετείται στην αρχή την νέας αλυσίδας ο εξωτερικός εκκινητής και την χρησιμοποιεί ως καλούπι για την σύνθεση ενός μονόκλωνου DNA. Το μονόκλωνο DNA εκτοπίζεται και υβριδοποιείται σε αυτό ο οπίσθιος εσωτερικός εκκινητής που την χρησιμοποιεί ως καλούπι για την σύνθεση μια νέας αλυσίδας DNA με προσανατολισμό 3' ->5'.

Επιπρόσθετα ο B3 εκκινητής υβριδοποιείται στο οπίσθιο άκρο της αλυσίδας και πραγματοποιεί σύνθεση αλυσίδας DNA με προσανατολισμό 3'→5'. [12,29]

Οι μονόκλωνες αλυσίδες χρησιμοποιούνται ως καλούπι για την σύνθεση DNA από έναν δεύτερο εσωτερικό και εξωτερικό εκκινητή οι οποίοι υβριδοποιούνται στο τέλος κάθε αλυσίδας DNA, από έναν εσωτερικό και έναν εξωτερικό εκκινητή, δημιουργώντας 2 βρόγχους DNA. Ως συνέπεια του κύκλου LAMP, προκύπτει ένας νέος κλώνος διπλάσιο από τον αρχικό. Ο κύκλος LAMP συνεχίζεται μέχρι την δημιουργία  $10^9$  αντιγράφων. Τα τελικά προϊόντα αποτελούνται από DNA που περιέχει στελέχη-βρόγχους που το καθένα έχει διαφορετικό μήκος στελέχους [12,29].



**Εικόνα 16:** Μέθοδος RT-LAMP. Τα βελιάκια δείχνουν το στέλεχος και τον βρόγχο του DNA. [28]

Οι ερευνητές C.Yan, et.al, το 2020, κάνοντας χρήση 103 γονιδιωμάτων του SARS-CoV-2, ανέπτυξαν μια μέθοδο LAMP, η οποία χρησιμοποιεί εκκινητές ειδικούς για τα γονίδια ORF1ab και S. Επίσης η μέθοδος δεν είχε καμία διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα 60 παθογόνα του αναπνευστικού και επιβεβαιώθηκε από 103 COVID-19 θετικά RNA δείγματα, τα οποία είχαν εξεταστεί προηγουμένως με την RT-qPCR. Η μέθοδος έχει 100% ευαισθησία και 98,7% ειδικότητα και έδωσε αποτέλεσμα μέσα σε 30 λεπτά [12].

Οι ερευνητές Baek et.al., το 2020, ανέπτυξαν μια μέθοδο RT-LAMP που στοχεύει το γονίδιο της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης με το όριο ανίχνευσης να συγκρίνεται με αυτό της RT-qPCR. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με τον έλεγχο 156 κλινικών δειγμάτων και έδωσε 100% ευαισθησία και 98,7% ειδικότητα[12].

Παράλληλα μια άλλη μέθοδος RT-LAMP, η οποία ονομάζεται iLACO (isothermal LAMP-based method for COVID-19), κάνει χρήση μιας νέας χρώσης νουκλεϊκού οξέως, που ονομάζεται Gene finder, η οποία χαρακτηρίζεται από το ενισχυμένο φθορίζων σήμα, και με ευαισθησία που μπορεί να ανιχνεύσει μέχρι και 10 αντίγραφα του ORF1ab γονιδίου. Από τα 248 COVID-19 RNA θετικά δείγματα, η Ilaco εντόπισε τα 223(89,9%). Τα 25 ψευδώς αρνητικά δείγματα ελέγχθηκαν από την Taqman RT-PCR και διαπιστώθηκε ότι είχαν μικρή συγκέντρωση ιικού RNA με τιμές Ct πάνω από 35[12].

Τέλος η LAMP συνδυάστηκε με την τεχνολογία αλληλούχισης νανοπόρων, για την ανάπτυξη της μεθόδου LAMPore, η οποία θα μπορεί να ανιχνεύει το ιικό RNA. Είναι μια μέθοδος multiplex και στοχεύει τρεις περιοχές του ιικού γονιδιώματος, το γονίδιο ORF1a και τα γονίδια N και E και διαθέτει ένα control για την ανθρώπινη ακτίνη[12].

## **ΚΕΦΆΛΑΙΟ 3: Σύγκριση μοριακών και ανοσολογικών δοκιμασιών.**

### **3.1. RT-qPCR και RT-LAMP**

Η RT-qPCR είναι η πιο σημαντική μέθοδος, η οποία συστήνεται και χρησιμοποιείται από τις περισσότερες χώρες για τη διάγνωση του SARS-CoV-2. Η μέθοδος αυτή εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα. Ωστόσο εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα. Ανεπαρκή ή εσφαλμένη δειγματοληψία μπορεί να οδηγήσει στην λήψη μικρής ποσότητας βιολογικού υλικού, το οποίο απαιτείται για την απομόνωση του ιικού RNA. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ο στυλεός πρέπει να εισέλθει μέσω των ρωθώνων παράλληλα με την υπερώα, μέχρι να βρεθεί αντίσταση. Ο στυλεός πρέπει να βρίσκεται σε βάθος ίση με την απόσταση των ρωθώνων με είσοδο του έξω ακουστικού πόρου[12].

Παράλληλα το CDC συνιστά την χρήση στυλεών με συνθετική ίνα και με πλαστική ή μεταλλική λαβή. Οι στυλεοί που περιέχουν αλγινικό ασβέστιο ή έχουν ξύλινη λαβή, είναι γνωστό ότι περιέχουν αναστολείς της PCR, που μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επίσης είναι σημαντικό ότι μετά την συλλογή του δείγματος, το υλικό πρέπει να διαλυθεί τελείως μέσα στο ιικό θρεπτικό υλικό, το οποίο και αυτό πρέπει να είναι ελεύθερο από αναστολείς της PCR[12].



Η αίμη και το χουμικό οξύ, το οποίο είναι συστατικό αρκετών φαρμάκων, είναι οι πιο συχνοί αναστολείς της PCR. Επίσης αντικατάστατα φάρμακα όπως το Acyclovir, έχουν αναφερθεί ότι αναστέλλουν την δράση της *Taq* DNA πολυμεράσης. Δείγματα από ασθενείς με ιστορικό χορήγησης τέτοιων φαρμάκων, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να δώσει ψευδώς αρνητικό PCR τεστ[12].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η δειγματοληψία για τη διενέργεια της RT-qPCR πραγματοποιείται σε εξωτερικούς χώρους και κινητές μονάδες, μακριά από τα κλινικά εργαστήρια στα οποία θα πραγματοποιηθεί η εξέταση. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου, διότι οι συνθήκες αποθήκευσης του δείγματος μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα. Ειδικότερα τα δείγματα οποία βρίσκονται σε υικό θρεπτικό υλικό μπορεί να αποθηκεύονται στους 2-8 °C για 72 ώρες και στους -70 °C για μεγαλύτερη διάρκεια. Λανθασμένη αποθήκευση του υλικού μπορεί να οδηγήσει σε αποδόμηση του RNA του ιού και σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα[12].

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χρόνος συλλογής του δείγματος από τον ασθενή, σε συνάρτηση με της ημέρα έναρξης των συμπτωμάτων του, είναι σημαντικός για την μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Η πιθανότητα ανίχνευσης του SARS-CoV-2 από ρινοφαρυγγικό δείγμα με τη μέθοδο RT-qPCR, μειώνεται με τον χρόνο, από την έναρξη των συμπτωμάτων. Όσο μεγαλύτερο το χρονικό διάστημα από την έναρξη των συμπτωμάτων, μέχρι την εξέταση του ασθενή, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα η μέθοδος να δώσει ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα[12].

Σύμφωνα με αναφορά, από τους ερευνητές του Πανεπιστημίου του John Hopkins, Kucirka et.al., το 2020, κατά την διάρκεια των πρώτων τεσσάρων ημερών της λοίμωξης από SARS-CoV-2, πριν την έναρξη των συμπτωμάτων, η πιθανότητα ψευδώς αρνητικού δείγματος, μειώθηκε από το 100% την πρώτη ημέρα στο 61% την τέταρτη ημέρα. Η πιθανότητα ψευδώς αρνητικού δείγματος την ημέρα της έναρξης των συμπτωμάτων, δηλαδή την ημέρα 5, ήταν 35%. Η πιθανότητα μειώθηκε στο 26% την ημέρα 8 (τρεις μέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων) και στη συνέχεια άρχισε να αυξάνεται στην ημέρα 9 στο 27% και στο 61% την ημέρα 21[12].

Στις περιπτώσεις που το δείγμα λαμβάνεται από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα π.χ. πτύελα, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το δείγμα να βγει ψευδώς αρνητικό, λόγω της δυσκολίας της εξαγωγής του ιικού RNA. Αυτό συμβαίνει λόγω της βλέννας και συνίσταται η ομογενοποίηση της, ενώ η προσθήκη πρωτεϊνάσης K και διθειοθρεϊτόλης (DTT) αυξάνουν την ευαισθησία της μεθόδου. Η DTT μειώνει τους δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν στην βλέννη με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται ομογενοποίηση της βλέννας. Η προσθήκη πρωτεϊνάσης K και DNase I είναι άλλη μια αποτελεσματική μέθοδος για την μείωση των ψευδώς

αρνητικών αποτελεσμάτων και είχε εφαρμοστεί για την διάγνωση του MERS σε δείγματα πτυέλων. [12].

RT-qPCR		RT-LAMP	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλή Ευαισθησία	Χρήση συγκεκριμένων υλικών για τους στυλεούς	Υψηλή ευαισθησία	Δεν έχει λάβει έγκριση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και το F.D.A.
	Εκπαίδευση προσωπικού για σωστή δειγματοληψία	Υψηλή ειδικότητα	
	Αντικά φάρμακα μπορεί να μειώσουν την αποτελεσματικότητα της.	Γρήγορη Μέθοδος	
	Συγκεκριμένες συνθήκες συντήρησης, αποθήκευσης και μεταφοράς του υλικού	Απλή διαδικασία	
Υψηλή Ειδικότητα	Συγκεκριμένο χρονικό διάστημα από την έναρξη των συμπτωμάτων για την δειγματοληψία	Εύκολη εγκατάσταση του εξοπλισμού	
	Απαραίτητη η σωστή επεξεργασία των πτυέλων		
	πρωτοκόλλα χρονοβόρα και περίπλοκα		
	Ειδικός εξοπλισμός και ειδικευμένο προσωπικό		

**Πίνακας 20:** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της RT-qPCR και της RT-LAMP [21,29].

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο η RT-LAMP αποτελεί ισοθερμική ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος σε ένα σωληνάριο. Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Είναι αποτελεσματική, απλή σε διαδικασία μέθοδος, της οποίας ο εξοπλισμός είναι εύκολο να εγκατασταθεί σε ένα χώρο. Παράλληλα η RT-LAMP εμφανίζει παρόμοια ευαισθησία με την RT-qPCR. Αυτό μετατρέπει την LAMP σε μια ελκυστική διαγνωστική διαδικασία για διάφορα παθογόνα, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες [12].

Παρά το γεγονός ότι η RT-qPCR αποτελεί το gold-standard για την διάγνωση του SARS-CoV-2, τα πρωτοκόλλα της είναι χρονοβόρα, περίπλοκα, χρειάζεται για την

διεκπεραίωση της μεθόδου ειδικός εξοπλισμός και εκπαιδευμένο προσωπικό. Μια επικυρωμένη μέθοδος RT-LAMP για τον SARS-CoV-2, θα ήταν πιο γρήγορη, απλή και θα είχε την ίδια ευαισθησία με την RT-qPCR. Για την ανίχνευση RNA ιών, όπως του MERS, η αντίστροφη μεταγραφάση έχει αποτελεσματικά συνδυαστεί με την LAMP, για την δημιουργία της RT-LAMP, η οποία έχει αξιολογηθεί και εγκριθεί, πολύ νωρίτερα από την πανδημία του SARS-CoV-2. Ωστόσο δεν είχε λάβει έγκριση από τον Π.Ο.Υ και το F.D.A. (Food and Drug Administration) για την ανίχνευση του SARS-CoV-2.[12,29].

**Πίνακας 21:** Ευαισθησία και Ειδικότητα της RT-qPCR και της RT-LAMP[12,28].

RT-qPCR		RT-LAMP	
Ευαισθησία	Ειδικότητα	Ευαισθησία	Ειδικότητα
94,6% με 96%	100%	100%	98,7%

### 3.2. Ανοσολογικές δοκιμασίες: πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Παρά την μικρή θνησιμότητα, ο SARS-CoV-2 εμφανίζει μεγάλο ρυθμό αναπαραγωγής ( $R_0$ ), κάτι που τον καθιστά ιδιαίτερα μεταδοτικό. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της ανοσοχρωματογραφίας για την ανίχνευση των αντισωμάτων είναι η αποφυγή σφαλμάτων, διότι χρησιμοποιείται ως δείγμα αίμα, ορός ή πλάσμα, το οποία εξασφαλίζουν την ομοιογένεια του δείγματος. Πρόσφατα rapid τεστ για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 χρησιμοποιούν τριχοειδή αίμα ως δείγμα, το οποίο αφαιρεί την ανάγκη αποθήκευσης ή μεταφοράς των δειγμάτων και συνεπώς την πιθανότητα αποδόμησης τους. Ωστόσο το άτομο το οποίο πραγματοποιεί το τεστ πρέπει να έχει εκπαιδευτεί σωστά, ώστε να αποφεύγονται κοινά λάθη, όπως τη χρήση αίματος που περιέχει θρόμβους ή χρήση λιγότερης ποσότητας αίματος για την διενέργεια του τεστ[12].

Διαφορετικοί τύποι αντισωμάτων εμφανίζονται σε διαφορετικά στάδια της λοίμωξης σε ένα μολυσμένο ασθενή. Τα IgM αντισώματα εμφανίζονται περίπου 5-9 ημέρες μετά την μόλυνση από τον ιό και ακολουθούν τα IgG αντισώματα που εμφανίζονται 10-14 ημέρα μετά. Συνεπώς το τεστ πρέπει να διενεργείται σύμφωνα με το στάδιο της λοίμωξης ή την ημέρα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Τέλος τεστ να οποία μπορούν να διαχωρίζουν τα αντισώματα έναντι του SARS-CoV-1, από αυτά του SARS-CoV-2, πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό SARS-CoV-1[12].

Παράλληλα είναι ποιοτική μέθοδος, ως εκ τούτου δεν υπολογίζεται η συγκέντρωση των αντισωμάτων, ωστόσο αυτό μπορεί να διεκπεραιωθεί από την ELISA. Επιπρόσθετα αν η συγκέντρωση των αντισωμάτων είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, τότε η μέθοδος θα δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Επιπλέον η ανοσολογική απόκριση είναι διαφορετική σε κάθε ασθενή, ενώ η συγκέντρωση των

αντισωμάτων IgM μειώνεται ή/και εξαφανίζεται μετά από δύο εβδομάδες. Επιπλέον η ύπαρξη του RF-IgM, μειώνει αισθητά την ειδικότητα της μεθόδου και συνεπώς είναι απαραίτητη η χρήση ουρίας. Τέλος η μέθοδος δεν μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη του ιού, αλλά την μόλυνση από αυτόν, συνεπώς συστήνεται ως συμπληρωματική διάγνωση μαζί με την RT-PCR[12,20].

Ωστόσο και η μέθοδος ELISA εμφανίζει μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι η μειωμένη ευαισθησία που εμφανίζεται στην ανίχνευση των IgA σε σχέση με αυτή των IgG. Επιπρόσθετα η ELISA μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα εάν η λήψη του δείγματος έχει πραγματοποιηθεί σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό SARS-CoV-1 και μάλιστα σε kit που χρησιμοποιούν ως αντιγόνο την πρωτεΐνη E, λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με το ιό SARS-CoV-1. Παράλληλα δεν παρέχει πληροφορίες για την κατάσταση της λοίμωξης του ασθενή. Τα πρώτα αντισώματα εμφανίζονται περίπου πέντε μέρες μετά την αρχή των συμπτωμάτων, ωστόσο ο ιός μπορεί να ανιχνευτεί στους στυλεούς πέντε μέρες πριν την αρχή των συμπτωμάτων. Επιπρόσθετα ανίχνευση των αντισωμάτων δεν σημαίνει και ενεργή λοίμωξη ή δυνατότητα μετάδοσης του ιού από τον ασθενή. Επίσης ο παράγοντας RF-IgM μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα όπως και στην περίπτωση της ανοσοχρωματογραφίας. Τέλος η ύπαρξη των αντισωμάτων δεν σημαίνει και ανοσία σε επαναμολύνσεις. Παράλληλα η ELISA μπορεί να δώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω αιμόλυσης ή επιμόλυνσης του αίματος από βακτήρια[12].

**Πίνακας 22.** Η ευαισθησία και ειδικότητα των ανοσολογικών μεθόδων. Οι διαφορετικές αποκλίσεις στην ευαισθησία και στην ειδικότητα οφείλονται στην δειγματοληψία, την διαφορετική ανοσολογική απόκριση μεταξύ των ασθενών, το χρονικό διάστημα από την αρχή των συμπτωμάτων μέχρι την λήψη του δείγματος, διασταυρούμενες αντιδράσεις [12,22,23]

Ευαισθησία και Ειδικότητα ανοσολογικών μεθόδων		
	Ευαισθησία	Ειδικότητα
ELISA	77,94-94,12%	73,06%-100%
LFA	88,66%	90,63%
CLIA	60%-93,33%	100%
rIFA	91,2%	100%

## Συζήτηση

---

Ο SARS-CoV-2 ανήκει στους β-κορωνοϊούς και αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου COVID-19. Έχει RNA ως γενετικό υλικό και περιβάλλεται από έλυτρο, ενώ η ακίδα του ιού έχει ως στόχο τους υποδοχείς του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2. Από την αρχή της πανδημίας η αλληλουχία του γενετικού υλικού του SARS-CoV-2 χαρτογραφήθηκε με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει χρήση της μοριακής μεθόδου RT-qPCR για την διάγνωση των ασθενών, αλλά και της επιδημιολογικής επιτήρησης του γενικού πληθυσμού. Η RT-qPCR αν και θεωρείται η «goldstandard» μέθοδος για τη διάγνωση της COVID-19, εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα. Αρχικά είναι μια μέθοδος η οποία απαιτεί διαρκώς αντιδραστήρια, τα οποία εκτός του μεγάλου κόστους, είναι και δύσκολο να τα προμηθευτούν τα εργαστήρια, λόγω της αυξημένης ζήτησης, κατά την διάρκεια της πανδημίας. Επιπρόσθετα είναι απαραίτητος ειδικός εξοπλισμός και εξειδικευμένο προσωπικό, ενώ η μέθοδος πρέπει να διεκπεραιωθεί σε πιστοποιημένα εργαστήρια. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη γρήγορων και αποτελεσματικών ανοσολογικών μεθόδων, οι οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν και εκτός υγειονομικών εγκαταστάσεων, με χαμηλό κόστος και χωρίς ιδιαίτερα εκπαιδευμένο προσωπικό. Ωστόσο και οι ανοσολογικές μέθοδοι εμφανίζουν μειονεκτήματα, όπως οι περιπτώσεις μη ανιχνεύσιμων αντισωμάτων σε πολλούς ασθενείς, οι περιπτώσεις διασταυρούμενης αντίδρασης, καθώς και η μειωμένη ευαισθησία και ειδικότητα σε πολλά γαρίδτεστ. Αυτό που προτείνεται είναι ότι οι ανοσολογικές μέθοδοι έχουν συμπληρωματικό ρόλο και διενεργούνται μαζί με την PCR.

---

## Βιβλιογραφία

---

1. Yuxin Yan, Woo In Shin, Yoong Xin Pang, Yang Meng, Jianchen Lai, Chong You, Haitao Zhao, Edward Lester, Tao Wu and Cheng Heng Pang, The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment, International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, doi:10.3390/ijerph17072323
2. Ayslan Castro Brant, Wei Tian, Vladimir Majerciak, Wei Yang and Zhi Ming Zheng, SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication, Cell and Bioscience, 2021, doi: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>
3. Rajeswari Somasundaram, Ankit Choraria, Michael Antonysamy, An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review, MDPI, 2020 doi:<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106654>
4. Harrison Wein, Ph.D, Erin Bryant, Novel coronavirus structure reveals targets for vaccines and treatments, NIH, 2020
5. Image Library, Viruses/Bacteria, Center of Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/media/subtopic/images.htm>
6. Wanger Gouvea dos Santos, Natural History of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options, ScienceDirect, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110493>
7. Tarik Asselah, David Durantel, Eric Pasmant, George Lau, Raymond F., COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development, NCBI, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.031>
8. Seiya Yamayoshi, Yuko Sakai-Tagawa, Michiko Koga, Osamu Akasaka, Ichiro Nakachi, Hidefumi Koh, Kenji Maeda, Eisuke Adachi, Makoto Saito, Hiroyuki Nagai, Kazuhiko Ikeuchi, Takayuki Ogura, Rie Baba, Kensuke Fujita, Takahiro Fukui, Fumimaro Ito, Shin-ichiro Hattori, Kei Yamamoto, Takato Nakamoto, Yuri Furusawa, Atsuhiko Yasuhara, Michiko Ujie, Shinya Yamada, Mutsumi Ito, Hiroaki Mitsuya, Norio Omagari, Hiroshi Yotsuyanagi, Comparison of Rapid Antigen Tests for COVID-19, MDPI, 2020, doi:10.3390/v12121420

9. Avinash Premraj, Abi George Aleyas, Binita Nautiyal and Thaha J Rasool, **Nucleic Acid and Immunological Diagnostics for SARS-CoV-2: Processes, Platforms and Pitfalls**, MDPI, 2020, doi: [10.3390/diagnostics10110866](https://doi.org/10.3390/diagnostics10110866)

10. Kelvin Kai-Wang To, Owen Tak-Yin Tsang, Wai-Shing Leung, Anthony Raymond Tam, Tak-Chiu Wu, David Christopher Lung, Cyril Chik-Yan Yip, Jian-Piao Cai, Jacky Man-Chun Chan, Thomas Shiu-Hong Chik, Daphne Pui-Ling Lau, Chris Yau-Chung Choi, Lin-Lei Chen, Wan-Mui Chan, Kwok-Hung Chan, Jonathan Daniel Ip, Anthony Chin-Ki Ng, Rosana Wing-Shan Poon, Cui-Ting Luo, Vincent Chi-Chung Cheng, Jasper Fuk-Woo Chan, Ivan Fan-Ngai Hung, Zhiwei Chen, Honglin Chen, Kwok-Yung Yuen, **Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study**, Science Direct, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104882>

11. Karuma Gokam, **Molecular Biology Cloning of Mycobacterium smegmatis Exochelin MS genes fxbA, fxbC and exiT in Escherichia coli**, ResearchGate, 2020, Doi: [10.4172/2168-9547.1000176](https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000176).

12. Carina Conzelmann, Andrea Gilg, Rüdiger Groß, Desiree Schütz, Nico Preising, Ludger Ständker, Bernd Jahrsdörfer, Hubert Schrezenmeier, Konstantin M.J. Sparrer, Thomas Stamminger, Steffen Stenger, Jan Münch, Janis A. Müller, **An enzyme-based immunodetection assay to quantify SARS-CoV-2 infection**, Science Direct, 2020, doi: [10.1016/j.antiviral.2020.104882](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104882).

13. Anne J Jaaskelainen, Eliisa Kekalainen, Hannimari Kallio-Kokko, Laura Mannonen, Elisa Kortela, Olli Vapalahti, Satu Kurkela, Maija Lappalainen, **Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples**, Eurosurveillance, 2020, doi: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603)

14. Vicky Roy, Stephanie Fischinger, Caroline Atyeo, Matthew Slein, Carolin Loos, Alejandro Balazs, Corinne Luedemann, Michael Gerino Astudillo, Diane Yang, Duane R. Wesemann, Richelle Charles, A. John Lafrate, Jared Feldman, Blake Hauser, Tim Caradonna, Tyler E. Miller, Mandakolathur R. Murali, Lindsey Baden, Eric Nilles, Edward Ryan, Douglas Lauffenburger, Wilfredo Garcia Beltran, Galit Alter, **SARS-CoV-2-specific ELISA development**, September-October, Science Direct, 2020, doi: [10.1016/j.jim.2020.112832](https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112832)

15. Zhengtu Li, Yongxiang Yi, Xiaomei Luo, Nian Xiong, Yang Liu, Shaoqiang Li, Ruilin Sun, Yanqun Wang, Bicheng Hu, Wei Chen, Yongchen Zhang, Jing Wang, Baofu Huang, Ye Lin, Jiasheng Yang, Wensheng Cai, Xuefeng Wang, Jing Cheng, Zhiqiang Chen, Kangjun Sun, Weimin Pan, Zhifei Zhan, Liyan Chen, Feng Ye, **Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis**, Journal of Medical Virology, 2020, doi: [10.1002/jmv.25727](https://doi.org/10.1002/jmv.25727)

16. Yunbao Pan, Xinran Li, Gui Yang, Junli Fan, Yueting Tang, Jin Zhao, Xinghua Long, ShuangGuo, Ziwu Zhao, Yinjuan Liu, Hanning Hu, Han Xue, Yirong Li, Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients, *Journal of Infection*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.051>
17. Qiang Wang, Qin Du, Bin Guo, Daiyong Mu, Xiaolan Lu, Qiang Ma, YangliuGuo, Li Fang, Bing Zhang, Guoyuan Zhang, XiaolanGuoa, A Method To Prevent SARS-CoV-2 IgM False Positives in Gold Immunochromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, doi: [10.1128/JCM.00375-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00375-20).
18. Luigi Cinquanta, Desre' Ethel Fontana, Nicola Bizzaro, Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?, *NCBI*, 2017, doi: [10.1007/s13317-017-0097-2](https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2)
19. Luigi Cinquanta, Desre' Ethel Fontana, Nicola Bizzaro, Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?, *NCBI*, 2017, doi: [10.1007/s13317-017-0097-2](https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2)
20. B. Meyer , G. Torriani , S. Yerly , L. Mazza , A. Calame, I. Arm-Vernez, G. Zimmer, T. Agoritsas, J. Stirnemann , H. Spechbach , I. Guessous , S. Stringhini, , J. Pugin, P. Roux-Lombard, L. Fontao, C.-A. Siegrist, I. Eckerle, N. Vuilleumier, L. Kaiser, Validation of a commercially available SARS-CoV-2 serological immunoassay, *Elsevier*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.024>
21. Yutaro Yamaoka, Kei Miyakawa, Sundararaj Stanleyraj Jeremiah, Nobuhiko Okabe, Hideki Hasegawa, Akihide Ryo, Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein for antigen detection  $\tau\epsilon\sigma\tau\sigma$ , *Cell Report Medicine*, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100311>
22. Iqbal Mahmud and Timothy J. Garrett, Mass Spectrometry Techniques in Emerging Pathogens Studies: COVID-19 Perspectives, *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 2020, doi: [10.1021/jasms.0c00238](https://doi.org/10.1021/jasms.0c00238)
23. Yanchang Li, Yihao Wang , Huiying Liu, Wei Sun, Baoqing Ding, Yinghua Zhao , Peiru Chen , Li Zhu , Zhaodi Li , Naikang Li , Lei Chang, Hengliang Wang, Changqing Bai and Ping Xu, Urine Proteome of COVID-19 Patients, *MedRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.02.20088666>
24. Bruna Aparecida Souza Machado, Katharine Valéria Saraiva Hodel, Valdir Gomes Barbosa-Júnior, Milena Botelho Pereira Soares and Roberto Badaró, The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature, *MDPI*, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/v13010040>



25. Daniel A. Green, Jason Zucker, Lars F. Westblade, Susan Whittier, Hanna Rennert, PriyaVelu, Arryn Craney, Melissa Cushing, Dakai Liu, Magdalena E. Sobieszczyk, Amelia K. Boehme, Jorge L. Sepulveda, Clinical Performance of SARS-CoV-2 Molecular Tests, Journal of Clinical Microbiology, 2020, doi: 10.1128/JCM.00995-20

26. J.M.Abduljalil, Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations, Science Direct, 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100713