



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των
διαγνωστικών δοκιμασιών αντιγόνων για COVID-19**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Ι. ΤΑΠΑΡΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπεύθυνος

Μπράλιου Γεωργία

Επίκουρη καθηγήτρια

Λαμία, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY

SCHOOL OF SCIENCE

**COMPUTER SCIENCE AND BIOMEDICAL
INFORMATICS DEPARTMENT**

**Systematic review and meta-analysis of COVID-19
antigen diagnostic tests**

ANASTASIA I. TAPARI

GRADUATE WORK

Supervisor

Braliou Georgia

Lamia, 2021

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις ⁽¹⁾, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.

Δέχομαι ότι η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.

Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ορθώσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια

4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία:/...../20.....

Ο – Η Δηλ.

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

**Συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση των
διαγνωστικών δοκιμών αντιγόνων για τον COVID-19**

Αναστασία Ι. Τάπαρη

Τριμελής Επιτροπή:

Μπράλιου Γεωργία, Επίκουρη Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Μπάγκος Παντελεήμων, Καθηγητής

Χατζηγεωργίου Άρτεμις, Καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί ορόσημο για την ολοκλήρωση του κύκλου των προπτυχιακών μου σπουδών. Ένας όμορφος κύκλος ο οποίος έφτασε στο τέλος του και με εφοδίασε με γνώσεις και ηθικές αξίες. Μέσω της πτυχιακής μου εργασίας κατάφερα να ασχοληθώ με τον τομέα της έρευνας που πάντα ήθελα και ανακάλυψα τις δυνατότητες και τα όρια μου. Αυτό, ωστόσο, δεν θα συνέβαινε χωρίς την συμβολή και την συμβουλή της επίκουρης καθηγήτριας, κυρίας Γεωργίας Μπράλιου. Η κυρία Μπράλιου στάθηκε δίπλα μου σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει σε τυχόν προβλήματα που συναντούσα. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου που με βοήθησε να έρθω σε επαφή με αυτό που αγαπάω και να ανακαλύψω τον εαυτό μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και τον καθηγητή κύριο Παντελεήμων Μπάγκο που στάθηκε αρωγός στην υλοποίηση της παρούσα πτυχιακής εργασίας. Η βοήθεια του ήταν πολύτιμη και χωρίς αυτόν δεν θα υπήρχε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές μου, από τους οποίους αποκόμισα πολλά εφόδια, τόσο στο κομμάτι της γνώσης, όσο και στο κομμάτι της ηθικής, καθώς οι καθηγητές αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας που πρέπει να διέπεται από ισχυρές ηθικές αξίες. Διδάχτηκα την αξία της ομαδικότητας, του σεβασμού και της αγάπης προς την επιστήμη, και τους ευχαριστώ ιδιαίτερα για αυτό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους ανθρώπους που μου στάθηκαν κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών και που χωρίς αυτούς δεν θα τα είχα καταφέρει. Είμαι ευγνώμων για όλους όσους είναι δίπλα μου και χαίρονται για τις επιτυχίες μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1. ΙΟΣ SARS-COV-2.....	15
1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	15
1.2. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ.....	15
1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ.....	16
1.4. ΤΡΟΠΟΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ	16
1.5. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ.....	18
1.5.1. ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	18
1.5.2. m RNA ΕΜΒΟΛΙΑ	19
1.5.3. ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ	20
1.5.4. ΕΜΒΟΛΙΑ ΙΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ	20
1.6. ΔΟΜΗ ΙΟΥ.....	21
1.6.1. ΝΟΥΚΛΕΟΚΑΨΙΔΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ.....	23
1.6.2. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ.....	23
1.6.3. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΚΙΔΑ	24
1.6.4. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑΤΟΣ	25
1.7. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ SARS-COV-2 26	
1.7.1 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ.....	27
1.7.2. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	28
1.7.3. ΚΑΜΠΥΛΗ ROC	28
1.7.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (GOLD STANDARD)	30
1.8. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	31
1.8.1. ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ	32
1.8.2. ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ.....	33
1.8.3 ΜΕΣΑΙΟ ΕΝΡΙΝΟ ΣΤΡΟΒΙΛΟΕΙΔΗ	34
1.8.4 ΠΡΟΣΘΙΟ ΡΙΝΙΚΟ.....	34
1.8.5 ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΗ ΠΛΥΣΗ / ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ (ΡΙΝΙΚΗ ΠΛΥΣΗ / ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ)	35
1.8.6 ΣΙΕΛΟΣ.....	36

1.8.7	ΠΤΥΕΛΑ	36
1.8.8	ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΠΛΥΣΗ	37
1.8.9	ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ ΤΡΑΧΕΙΑΣ	38
1.8.10	ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ.....	39
1.8.11	ΒΙΟΨΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	40
1.9.	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ SARS-COV-2.....	41
1.9.1.	ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	43
1.9.1.1	RT-PCR	43
1.9.1.2	ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION-NASBA)	44
1.9.1.3	ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΒΡΟΧΟΥ (LAMP)	45
1.9.1.4	SPECIFIC HIGH SENSITIVITY ENZYMATIC REPORTER UNLOCKING (SHERLOCK).....	45
1.9.1.5	DETECTR.....	46
1.9.2.	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ	46
1.9.2.1	ΜΕΘΟΔΟΣ LFIA	47
1.9.2.2.	ΜΕΘΟΔΟΣ FIA.....	49
1.9.2.3.	ΜΕΘΟΔΟΣ CLEIA.....	50
1.9.3.	ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	51
1.9.3.1	ELISA	51
1.10.	ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ	53
1.11.	ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	54
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.1.	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	56
2.1.1.	ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ	56
2.1.2.	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ.....	56
2.2.	ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ (QUADAS)	59
2.3.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA	60
2.3.1.	ΕΝΤΟΛΕΣ ΣΤΟ STATA	60
2.3.2.	ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΕΝΤΟΛΩΝ	61
2.4	ΠΟΛΥ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ	79
2.5.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	81
2.5.1.	ΜΕΓΕΘΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ	81
2.5.5.1.	ΤΥΠΙΚΗ ΜΕΣΗ ΔΙΑΦΟΡΑ	82
2.5.5.2.	ΛΟΓΟΣ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (ODD RATIO)	82

2.5.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ.....	83
2.5.2. ΘΕΤΙΚΗ-ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	83
2.5.3 ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ.....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	88
3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΛΕΤΩΝ	89
3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ.....	98
3.4. QUADAS.....	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	114
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Το νέο στέλεχος κορονοϊού, SARS-CoV-2, ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το Δεκέμβριο του 2019 στην περιοχή Γιουχάν της Κίνας και η λοίμωξη αναπνευστικού που προκαλεί ονομάστηκε νόσος COVID-19. Ο ιός SARS-CoV-2 εξαπλώθηκε παγκόσμια με ταχύτατους ρυθμούς προκαλώντας μια πανδημία, όπου γίνονται προσπάθειες αντιμετώπισης της μέσω ποικίλων τρόπων, όπως η χρήση μάσκας, η απομόνωση, τα ατομικά μέσα προστασίας και απολύμανσης, και τέλος μέσω της ανάπτυξης εμβολίων. Η μετάδοση πραγματοποιείται από άνθρωπο σε άνθρωπο είτε μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων που αποβάλλονται μέσω βήχα ή πταρμού, είτε με άμεση ή έμμεση επαφή με εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος (δηλαδή μέσω μολυσμένων χεριών όταν αυτά έρχονται σε επαφή με το στόμα, τη μύτη ή τα μάτια ή με επιμολυσμένες επιφάνειες). Ο μέσος χρόνος επώασης της νόσου, δηλαδή το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της μόλυνσης και της εκδήλωσης των συμπτωμάτων, είναι 5-6 ημέρες, ενώ κυμαίνεται από 2 έως 14 ημέρες [1].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο μια συστηματική ανασκόπηση των διαθέσιμων διαγνωστικών δοκιμασιών για την ανίχνευση των αντιγόνων του ιού SARS-CoV-2 και έπειτα πραγματοποιήθηκε μια μετα-ανάλυση προκειμένου να γίνει η αξιολόγηση αυτών των διαγνωστικών δοκιμασιών αναφορικά με την ευαισθησία τους (sensitivity) και την ειδικότητα τους (specificity). Οι παράμετροι που λήφθηκαν υπόψιν για την καταγραφή των δεδομένων και την εξαγωγή των αποτελεσμάτων σχετίζονται με το είδος του δείγματος που εξεταζόταν κάθε φορά (ρινοφαρυγγικό, ρινικό, φαρυγγικό, σίελος), με το αντιγόνο που ανιχνευόταν (nucleoprotein, spike protein, envelope protein), με την επιμέρους ανοσολογική μεθοδολογία, καθώς και με τους κύκλους της ποσοτικής q-PCR (cycle threshold), η οποία είναι η μέθοδος αναφοράς. Επιπλέον, έγινε μετα-ανάλυση διαστρωμάτωσης συμπτωματικούς και ασυμπτωματικούς ασθενείς .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Από την βιβλιογραφική αναζήτηση ανασύρθηκαν συνολικά 3735 άρθρα (αφού έγινε η αφαίρεση των διπλότυπων), εκ των οποίων τα 55 πληρούσαν όλα τα κριτήρια για την εισαγωγή τους και την επεξεργασία τους στην μετα-ανάλυση. Η μετα-ανάλυση έδειξε πως τα διαγνωστικά τεστ αντίγονων καθώς συγκρίνονται με τα αποτελέσματα qPCR για κάτω από 30 κύκλους παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία

σε σχέση με τα αποτελέσματα που συγκρίνονται με αυτά που λαμβάνονται με 40 κύκλους της qPCR, ενώ η ειδικότητα δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η διαγνωστική δοκιμασία αντιγόνων για τον ιό SARS-CoV-2 είναι μια καλή εναλλακτική συγκριτικά με την μοριακή μέθοδο της PCR, καθώς είναι μια μέθοδος πιο γρήγορη, λιγότερο δαπανηρή και συγκαταλέγεται στην αυτοδιάγνωση με αποτέλεσμα την έγκαιρη πρόληψη και τη μείωση της διασποράς του ιού. Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή όταν ο ιός είναι σε υψηλή συγκέντρωση, με αποτέλεσμα να υπάρχουν λανθασμένα αποτελέσματα στην αρχή της επώασης του ιού, καθώς και στην εξασθένησή του.

Λέξεις κλειδιά: SARS-CoV-2, COVID-19, αντιγόνο, κύκλος PCR, συστηματική ανασκόπηση, μετα-ανάλυση

ABSTRACT

INTRODUCTION: The new strain of coronavirus, SARS-CoV-2, was first detected in December 2019 in the Wuhan region of China and the respiratory infection it causes was named COVID-19 disease. The SARS-CoV-2 virus has spread rapidly worldwide causing a pandemic, with efforts being made to address it through a variety of means, including mask use, isolation, personal protection and disinfection, and finally through the development of vaccines. Human-to-human transmission is either through respiratory droplets excreted through coughing or sneezing, or through direct or indirect contact with respiratory secretions (ie through infected hands when they come in contact with the mouth, nose or eyes or with contaminated surfaces). The average incubation time of the disease, ie the time interval between the infection and the onset of symptoms, is 5-6 days, while it ranges from 2 to 14 days [1].

MATERIAL AND METHODS: In the present study, a systematic review of the available diagnostic tests for the detection of SARS-CoV-2 antigens was performed in the first stage and then a meta-analysis was performed to evaluate these diagnostic tests in terms of their sensitivity. and their specificity. The parameters taken into account for recording the data and extracting the results are related to the sample taken each time (nasopharyngeal, nasal, pharyngeal, saliva), to the antigen detected (nucleoprotein, spike protein, envelope protein), with the manufacturing technology, as well as the PCR (cycle threshold) cycles, where is the reference method. In addition, a categorization was made regarding the symptomatic and the asymptomatic.

RESULTS: A total of 3735 articles were retrieved from the literature search (after the duplicates were removed), of which 55 met all the criteria for their introduction and processing in the meta-analysis. The meta-analysis showed that the diagnostic antigen tests as compared to the qPCR results for less than 30 cycles are more sensitive than the results compared to those obtained with 40 qPCR cycles, while the specificity does not differ significantly.

CONCLUSIONS: The SARS-CoV-2 antigen diagnostic test is a good alternative to the molecular PCR method, as it is a faster, less expensive method and is included in the self-diagnosis resulting in early prevention and reduction of the spread of the virus. However, the results are more accurate when the virus is in high concentration, resulting

in erroneous results at the beginning of the incubation of the virus, as well as in its attenuation.

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, antigen, PCR cycle, systematic review, meta-analysis

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Πίνακας 1 Συντομογραφίες που εμφανίζονται

Nsp	Nasopharyngeal, nasal
Ts	Throat saliva, sputum, oropharyngeal
Ct	Cycle threshold
N	Nucleoprotein/ Nucleocapsid protein
S	Spike protein
LFIA	Lateral Flow Immunochromatographic Assay
FIA	fluorescence immuno assay
CLEIA	chemiluminescent enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Ag	Antigen
CI	Confidence Interval
Kb	Κιλοβάσεις
M	Membrane protein
E	Envelope protein

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΟΣ SARS-COV-2

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο SARS-CoV-2 είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας του κορονοϊού, το οποίο ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά τον Δεκέμβριο του 2019 στην πόλη Γιουχάν της Κίνας [2]. Έχουν υπάρξει πολλά περιστατικά πνευμονίας, ειδικά στην πόλη Γιουχάν, στην επαρχία Χουμπέι της Κίνας. Οι κινεζικές υγειονομικές αρχές ανακοίνωσαν στις 9 Ιανουαρίου 2020 ότι αντιμετώπιζαν ένα νέο στέλεχος του κορονοϊού. Περίπου το ένα τρίτο των λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού στους ανθρώπους προκαλούνται από κορονοϊούς [3].

Ο κορονοϊός ανήκει σε μια μεγάλη οικογένεια ιών που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ζώα. Όταν ένα άτομο μολυνθεί με τον νέο κορονοϊό, τα συμπτώματα μπορεί να κυμαίνονται από ήπια (όπως ρινική καταρροή, πονόλαιμος, πυρετός, βήχας) έως πιο σοβαρά (πνευμονία, δυσκολία στην αναπνοή). Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Τα άτομα με υποκείμενα νοσήματα (διαβήτης, καρδιαγγειακές παθήσεις) και οι ηλικιωμένοι ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου και ως εκ τούτου κινδυνεύουν από τα πιο σοβαρά συμπτώματα [2].

1.2. ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ

Ο ιός SARS-CoV-2 εξαπλώθηκε γρήγορα σε όλο τον κόσμο προκαλώντας μια πανδημία. Αυτό οφείλεται στην ευκολία με την οποία μεταδίδεται ο ιός. Ο ιός μπορεί να προκαλέσει αναπνευστικές ασθένειες που μπορούν να μεταδοθούν από άτομο σε άτομο, ειδικά μέσω της στενής επαφής με κάποιο άτομο που νοσεί [2]. Πιο συγκεκριμένα, η μετάδοση μεταξύ των ατόμων δύναται να πραγματοποιηθεί είτε μέσω των αναπνευστικών σταγονιδίων που αποβάλλονται στον αέρα και προκαλούνται από τον βήχα ή τον παρμό, είτε με άμεση ή έμμεση επαφή των εκκρίσεων του αναπνευστικού συστήματος (δηλαδή μέσω μολυσμένων χεριών όταν αυτά έρχονται σε επαφή με το στόμα, τη μύτη ή τα μάτια ή με επιμολυσμένες επιφάνειες). Η μέση περίοδος επώασης της νόσου, δηλαδή ο χρόνος μεταξύ της μόλυνσης και της εμφάνισης των συμπτωμάτων, είναι 5-6 ημέρες, ενώ κυμαίνεται μεταξύ 2 και 14 ημερών.

Περισσότερο μεταδοτικό θεωρείται ένα περιστατικό όταν εμφανίζονται τα συμπτώματα. Ωστόσο, η μόλυνση είναι πιθανό να μεταδοθεί ακόμα και 1-4 ημέρες πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων. Η κύρια μετάδοση του ιού συμβαίνει κατά την συμπτωματική φάση. Το περιστατικό θεωρείται ότι δεν μεταδίδει πλέον την νόσο ένα 24ωρο μετά την εξασθένιση των συμπτωμάτων [1].

1.3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Η νόσος COVID-19 επηρεάζει τα άτομα με ποικίλους τρόπους. Η πλειοψηφία των ατόμων που θα νοσήσουν, θα αναπτύξουν ήπια συμπτώματα και η ανάρρωσή τους θα επέλθει χωρίς να χρειαστεί να νοσηλευτούν.

Τα πιο συχνά παρατηρούμενα συμπτώματα είναι παρόμοια με αυτά του κοινού κρυολογήματος και περιλαμβάνουν πυρετό, ξηρό βήχα και κόπωση.

Τα συμπτώματα που έχουν παρατηρηθεί λιγότερο είναι πόνοι, πονόλαιμος, διάρροια, φλόγωση της μεμβράνης των βλεφάρων, πονοκέφαλος, απώλεια γεύσης ή οσμής, εξάνθημα στο δέρμα ή αποχρωματισμός των δακτύλων στα χέρια ή στα πόδια.

Τα πιο σοβαρά συμπτώματα είναι η δυσκολία στην αναπνοή ή δύσπνοια, πόνος ή πίεση στο στήθος και απώλεια λόγου ή κίνησης.

Στην περίπτωση που εκδηλωθούν σοβαρά συμπτώματα θα πρέπει να ζητηθεί άμεσα ιατρική βοήθεια.

Στην περίπτωση που το άτομο παρουσιάζει ήπια συμπτώματα, συστήνεται απομόνωση και διαχείριση των συμπτωμάτων στο σπίτι.

Η μέση διάρκεια εκδήλωσης συμπτωμάτων από τη στιγμή που κάποιος μολυνθεί με τον ιό SARS-CoV-2 είναι 5-6 μέρες. Ωστόσο, μπορεί να χρειαστούν έως και 14 μέρες για να εκδηλωθούν [4].

1.4. ΤΡΟΠΟΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Η προστασία από τον κορονοϊό έγκειται κατά πολύ στα ατομικά μέσα προστασίας και στην ατομική ευθύνη. Το κάθε άτομο πρέπει να τηρεί κάποια απαραίτητα μέτρα προστασίας, ώστε να προστατευτεί στο μέγιστο.

Αρχικά, το πιο αποτελεσματικό μέτρο προστασίας είναι η χρήση μάσκας. Η χρήση μάσκας σε εσωτερικούς χώρους θεωρείται απαραίτητη. Όσον αφορά τους εξωτερικούς χώρους δεν είναι απαραίτητη η χρήση της, ωστόσο συστήνεται η χρήση της σε εξωτερικούς χώρους όπου υπάρχει συνωστισμός, καθώς και κατά τη διάρκεια άσκησης αν απαιτείται στενή επαφή με άλλους. Ακόμα, είναι απαραίτητη η χρήση της σε όλα τα μέσα μαζικής μεταφοράς. Γενικά, η χρήση μάσκας μπορεί να προστατεύσει από την διασπορά σταγονιδίων και την εξάπλωση του ιού και για αυτό η χρήση της σε κλειστούς και εσωτερικούς χώρους είναι απαραίτητη.

Επίσης, συστήνεται η διατήρηση αποστάσεων μεταξύ των ατόμων. Συγκεκριμένα, συστήνεται η διατήρηση δύο μέτρων απόστασης μεταξύ των ατόμων, τόσο σε εξωτερικούς χώρους, όσο και σε εσωτερικούς χώρους. Απαραίτητη θεωρείται η διατήρηση αποστάσεων από ένα άτομο το οποίο έχει συμπτώματα ή είναι άρρωστο. Με τον τρόπο της διατήρησης των αποστάσεων αποφεύγεται η στενή επαφή και κατ' επέκταση η διασπορά του ιού.

Επιπλέον, το σωστό πλύσιμο χεριών και η απολύμανση είναι απαραίτητα. Συνίσταται το πλύσιμο χεριών για τουλάχιστον είκοσι δευτερόλεπτα, ειδικά μετά από παρουσία του ατόμου σε κάποιον δημόσιο χώρο. Είναι απαραίτητο το πλύσιμο των χεριών πριν την επαφή των χεριών με το πρόσωπο, το στόμα ή τα μάτια, πριν την κατανάλωση φαγητού, μετά τον χειρισμό της μάσκας, μετά από τη χρήση της τουαλέτας, μετά από πταρμό ή βήχα και μετά την επαφή με ζώα. Σε περίπτωση που δεν είναι διαθέσιμη η χρήση σαπουνιού και νερού προτείνεται η χρήση αντισηπτικού με περιεκτικότητα τουλάχιστον 60% σε αλκοόλ. Συνίσταται ακόμη, η καθημερινή απολύμανση επιφανειών, όπως το χερούλι της πόρτας, οι διακόπτες για τα φώτα, τα γραφεία και οι πάγκοι της κουζίνας. Αυτό συμβαίνει σε περίπτωση που κάποιο άτομο που νοσεί έχει αγγίξει κάποια επιφάνεια και έχει αφήσει υπολείμματα του ιού.

Αν ο πταρμός ή ο βήχας πραγματοποιηθούν ενώ το άτομο φοράει μάσκα, τότε συνίσταται η αλλαγή μάσκας. Αν πραγματοποιηθούν χωρίς το άτομο να φοράει μάσκα, συνίσταται η χρήση του χεριού, ώστε να εμποδιστούν τυχόν σταγονίδια, και το πλύσιμο των χεριών έπειτα.

Σε περίπτωση εμφάνισης κάποιου συμπτώματος πρέπει να διενεργηθεί κάποια από τις διαθέσιμες διαγνωστικές δοκιμασίες για τον κορονοϊό.

Τέλος, έχουν αναπτυχθεί εμβόλια κατά του κορονοϊού, όπου συνίσταται η πραγματοποίησή τους, για την καλύτερη προστασία του ατόμου [5].

Να σημειωθεί πως όλα τα παραπάνω μέτρα προστασίας λειτουργούν συνδυαστικά και δεν αναιρεί το ένα το άλλο.

1.5. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΙΟΥ

1.5.1. ΤΡΟΠΟΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Για να γίνει αντιληπτός ο τρόπος λειτουργίας των εμβολίων, πρέπει πρώτα να γίνει κατανοητό πως λειτουργεί το σώμα μας ενάντια στον ιό.

Όταν τα μικρόβια εισέρχονται στον οργανισμό, επιτίθενται στον οργανισμό και πολλαπλασιάζονται. Η εισβολή των μικροβίων στον οργανισμό του ατόμου καλείται μόλυνση και είναι υπεύθυνη για την δημιουργία της ασθένειας. Ωστόσο, το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να προστατεύσει το άτομο από την ασθένεια.

Το αίμα περιλαμβάνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την μεταφορά οξυγόνου στους μύες και τα όργανα. Επίσης, περιλαμβάνει τα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση της μόλυνσης και κατ' επέκταση της ασθένειας. Υπάρχουν τρία είδη λευκών αιμοσφαιρίων για την καταπολέμηση της μόλυνσης.

Τα μακροφάγα καταπίνουν και χωνεύουν μικρόβια και νεκρά κύτταρα. Αφήνουν πίσω τους τα τμήματα των μικροβίων που έχουν εισβάλλει στο οργανισμό, τα οποία ονομάζονται αντιγόνα. Ο οργανισμός αναγνωρίζει τα αντιγόνα ως επικίνδυνα και διεγείρει αντισώματα για να επιτεθούν.

Τα Β-λεμφοκύτταρα έχουν αμυντικό ρόλο. Παράγουν αντισώματα που προσβάλλουν τα τμήματα του ιού που αφήνουν πίσω τους τα μακροφάγα.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι ένας άλλος τύπος αμυντικών λευκών αιμοσφαιρίων. Προσβάλλουν κύτταρα που έχουν ήδη μολυνθεί.

Την πρώτη φορά που ένα άτομο μολύνεται με τον ιό που προκαλεί την νόσο COVID-19, μπορεί να χρειαστούν αρκετές ημέρες ή εβδομάδες για να φτιάξει ο οργανισμός εργαλεία καταπολέμησης των μικροβίων που απαιτούνται για να ξεπεραστεί η μόλυνση. Μετά τη

μόλυνση, το ανοσοποιητικό σύστημα του ατόμου θυμάται τον τρόπο προστασίας του οργανισμού από αυτήν την ασθένεια. Το σώμα διατηρεί μερικά T-λεμφοκύτταρα, που ονομάζονται «κύτταρα μνήμης», τα οποία τίθενται σε δράση γρήγορα εάν το σώμα συναντήσει ξανά τον ίδιο ιό. Όταν εντοπιστούν τα γνωστά αντιγόνα, τα B-λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα για να τα επιτεθούν.

Διαφορετικοί τύποι εμβολίων λειτουργούν με διαφορετικούς τρόπους για να προσφέρουν τη μέγιστη προστασία. Με όλους τους τύπους εμβολίων, ο οργανισμός διατηρεί μια ποσότητα T-λεμφοκυττάρων «μνήμης» καθώς και B-λεμφοκυττάρων που θα θυμούνται πώς να καταπολεμήσουν αυτόν τον ιό στο μέλλον. Συνήθως χρειάζονται μερικές εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό για να παράγει ο οργανισμός T-λεμφοκύτταρα και B-λεμφοκύτταρα. Επομένως, είναι πιθανό ένα άτομο να μολυνθεί από τον ιό που προκαλεί τον COVID-19 λίγο πριν ή αμέσως μετά τον εμβολιασμό και στη συνέχεια να αρρωστήσει επειδή το εμβόλιο δεν είχε αρκετό χρόνο για να παράσχει προστασία. Μερικές φορές μετά τον εμβολιασμό, η διαδικασία οικοδόμησης ανοσίας μπορεί να προκαλέσει συμπτώματα, όπως πυρετό. Αυτά τα συμπτώματα είναι φυσιολογικά και είναι σημάδια ότι το σώμα χτίζει ανοσία.

Υπάρχουν τρία είδη εμβολίων, τα mRNA εμβόλια, τα εμβόλια υπομονάδας πρωτεΐνης και τα εμβόλια ιικών φορέων [6].

1.5.2. mRNA ΕΜΒΟΛΙΑ

Τα mRNA εμβόλια είναι ένας νέος τύπος εμβολίων για την προστασία από μολυσματικές ασθένειες. Τα συμβατικά εμβόλια εισάγουν ένα εξασθενημένο ή αδρανοποιημένο μικρόβιο στο σώμα μας. Τα mRNA εμβόλια διδάσκουν τα κύτταρά μας πώς να φτιάχνουν μια πρωτεΐνη - ή ακόμα και μόνο ένα κομμάτι πρωτεΐνης - που προκαλεί μια ανοσολογική απάντηση μέσα στο σώμα μας. Αυτή η ανοσοαπόκριση, η οποία παράγει αντισώματα, είναι αυτό που μας προστατεύει από τη μόλυνση εάν ο πραγματικός ιός εισέλθει στο σώμα μας.

Τα εμβόλια mRNA κατά της νόσου COVID-19 δίνουν οδηγίες στα κύτταρά μας με το πως να φτιάξουν ένα ακίνδυνο κομμάτι από αυτό που ονομάζεται «πρωτεΐνη αιχμής» (spike protein). Η πρωτεΐνη αιχμής βρίσκεται στην επιφάνεια του ιού που προκαλεί την νόσο COVID-19.

Αρχικά, εμβόλια mRNA COVID-19 χορηγούνται στον μυ του άνω βραχίονα. Μόλις οι οδηγίες (mRNA) βρεθούν μέσα στα μυϊκά κύτταρα, τα κύτταρα χρησιμοποιούν αυτές τις οδηγίες για να φτιάξουν το κομμάτι πρωτεΐνης. Αφού παρασκευαστεί το κομμάτι πρωτεΐνης, το κύτταρο διασπά τις οδηγίες και τις ξεφορτώνεται. Στη συνέχεια, το κύτταρο εμφανίζει το κομμάτι πρωτεΐνης στην επιφάνειά του. Το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει ότι η πρωτεΐνη δεν ανήκει εκεί και αρχίζει να δημιουργεί μια ανοσοαπόκριση και να παράγει αντισώματα, όπως συμβαίνει σε φυσικές λοιμώξεις κατά του COVID-19. Στο τέλος της διαδικασίας, ο οργανισμός έχει μάθει πώς να προστατεύεται από μελλοντική μόλυνση.

Οι ερευνητές μελετούν και εργάζονται με εμβόλια mRNA εδώ και δεκαετίες. Το ενδιαφέρον για αυτά τα εμβόλια έχει αυξηθεί επειδή μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον χρησιμοποιώντας άμεσα διαθέσιμα υλικά. Αυτό σημαίνει ότι η διαδικασία μπορεί να τυποποιηθεί και να κλιμακωθεί, καθιστώντας την ανάπτυξη του εμβολίου ταχύτερη από τις παραδοσιακές μεθόδους παρασκευής συμβατικών εμβολίων.

Η μελλοντική τεχνολογία εμβολίου mRNA μπορεί να επιτρέψει σε ένα εμβόλιο να παρέχει προστασία για πολλαπλές ασθένειες, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των εμβολίων που απαιτούνται για την προστασία από κοινές ασθένειες που μπορούν να προληφθούν με εμβόλια [7].

1.5.3. ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΕΜΒΟΛΙΑ

Τα εμβόλια υπομονάδας πρωτεΐνης περιλαμβάνουν ακίνδυνα κομμάτια (πρωτεΐνες) του ιού που προκαλεί τη νόσο COVID-19 αντί για ολόκληρο το μικρόβιο. Μόλις εμβολιαστεί το άτομο, ο οργανισμός αναγνωρίζει ότι η πρωτεΐνη δεν πρέπει να είναι εκεί και δημιουργεί T-λεμφοκύτταρα και αντισώματα που θα θυμούνται πώς να καταπολεμήσουν τον ιό που προκαλεί τον COVID-19 εάν μολυνθεί από αυτόν στο μέλλον [6].

1.5.4. ΕΜΒΟΛΙΑ ΙΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

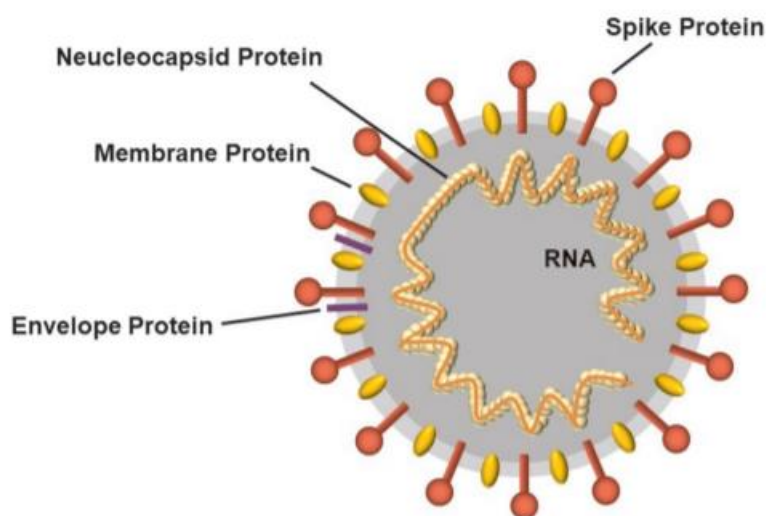
Τα εμβόλια ιικών φορέων χρησιμοποιούν μια τροποποιημένη έκδοση διαφορετικού ιού (φορέας) για να παρέχουν σημαντικές οδηγίες στα κύτταρά μας.

Αρχικά, ο φορέας (όχι ο ιός που προκαλεί τον COVID-19, αλλά ένας διαφορετικός, αβλαβής ιός) θα εισέλθει σε ένα κύτταρο στο σώμα και στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσει τη μηχανή του κυττάρου για να παράγει ένα ακίνδυνο κομμάτι του ιού που προκαλεί τον

COVID-19. Αυτό το κομμάτι είναι γνωστό ως πρωτεΐνη αιχμής και βρίσκεται μόνο στην επιφάνεια του ιού που προκαλεί τον COVID-19. Στη συνέχεια, το κύτταρο εμφανίζει την πρωτεΐνη αιχμής στην επιφάνειά του και το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει ότι δεν ανήκει εκεί. Αυτό ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να αρχίσει να παράγει αντισώματα και να ενεργοποιεί άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού για να καταπολεμήσει αυτό που πιστεύει ότι είναι λοίμωξη. Στο τέλος της διαδικασίας, ο οργανισμός έχει μάθει πώς να προστατευτεί από μελλοντική μόλυνση με τον ιό που προκαλεί τον COVID-19 [8].

1.6. ΔΟΜΗ ΙΟΥ

Ο κορονοϊός υπάγεται στην υποοικογένεια Coronavirinae που είναι της οικογένειας των Coronaviridae και η υποοικογένεια περιέχει τέσσερα είδη: τον Άλφα κορονοϊό, τον Βήτα κορονοϊό, τον Γάμα κορονοϊό και τον Δέλτα κορονοϊό. Το γονιδίωμα των κορονοϊών κυμαίνεται από 27 έως 32 κιλοβάσεις (kb) και είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικού προσανατολισμού (+ssRNA) το οποίο είναι μεγαλύτερο από οποιοδήποτε άλλο ιό RNA. Η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη (N) σχηματίζει το καψίδιο έξω από το γονιδίωμα και το γονιδίωμα συσκευάζεται περαιτέρω σε ένα φάκελο που αποτελείται από τρεις δομικές πρωτεΐνες: πρωτεΐνη μεμβράνης (M), πρωτεΐνη ακίδα (S) και πρωτεΐνη περιβλήματος (E) [9][38].



Εικόνα 1 Δομή του SARS-CoV-2

Ως μέλος της οικογένειας του κορονοϊού, το μέγεθος του γονιδιώματος του SARS-CoV-2 είναι περίπου 29,9 kb [10]. Ο SARS-CoV-2 περιέχει τέσσερις δομικές πρωτεΐνες (S, E, M και N) και δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1–16). Η Nsp1 έχει κυρίαρχο ρόλο ως αναστολέας της μετάφρασης του ξενιστή. Είναι επίσης διαμεσολαβητής της επεξεργασίας και της αντιγραφής του RNA. Η Nsp2 διαμορφώνει την οδό σηματοδότησης επιβίωσης του κυττάρου ξενιστή. Η Nsp3 δρα ως πρωτεύουσα στον διαχωρισμό της μεταφρασμένης πολυπρωτεΐνης στα συστατικά της. Η Nsp4 θεωρείται πως εδραιώνει το σύμπλεγμα αντιγραφής-μεταγραφής ιού σε τροποποιημένες μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου του κυττάρου ξενιστή. Η Nsp5 συμμετέχει στη διαδικασία επεξεργασίας της ιικής πολυπρωτεΐνης κατά την αντιγραφή. Η Nsp6 πιθανολογείται πως είναι ένας διαμεμβρανικός τομέας. Η παρουσία των nsp7 και nsp8 συμβάλει στην αντιγραφή και στην αναπαραγωγή του ιού, αντίστοιχα. Η Nsp9 λειτουργεί ως πρωτεΐνη δέσμευσης ssRNA, καθώς συμμετέχει στην αντιγραφή του ιού. Η Nsp10 παίζει ουσιαστικό ρόλο στην μεθυλίωση των ικών mRNAs. Η Nsp12 περιέχει την εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση RNA (RdRp), η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή καθώς και για την μεταγραφή του κορονοϊού. Η Nsp13 δεσμεύεται με το ATP και ο τομέας σύνδεσης ψευδαργύρου (Zinc-binding domain) συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μεταγραφής. Η Nsp14 δρα σε κατεύθυνση 3' προς 5' και έχει επιδιορθωτική δράση όσον αφορά την εξωριβονουκλεάση. Η Nsp15 έχει εξαρτώμενη δραστηριότητα από το $Mn^{(2+)}$ της ενδοριβονουκλεάσης. Η Nsp16 είναι μια μεθυλοτρανσφεράση η οποία μεσολαβεί στην μεθυλίωση mRNA της 2'-Οριβόζης [11][12].

Μια μελέτη δείχνει ότι υπάρχουν ορισμένες επιδράσεις που προκαλούνται από τα NSP1, NSP8, NSP9 και NSP16 στο μάτισμα, τη μετάφραση και τη διακίνηση πρωτεϊνών για την αναστολή της άμυνας του ξενιστή. Μετά τη μόλυνση SARSCoV-2, το NSP16 δεσμεύει τους τομείς αναγνώρισης mRNA των sn1RNA των U1 και U2 του κυττάρου ξενιστή για την καταστολή του ματίσματος mRNA. Το NSP1 συνδέεται με το ριβοσωμικό RNA 18S στο κανάλι εισόδου mRNA του ριβοσώματος για να επηρεάσει τη μετάφραση του mRNA. Τα NSP8 και NSP9 συνδέονται με το RNA 7SL που βρίσκεται στο σωματίδιο αναγνώρισης σήματος για να διακόψει τη διακίνηση πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη [12][13][123].

1.6.1. ΝΟΥΚΛΕΟΚΑΨΙΔΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Οι νουκλεοκαψιδικές πρωτεΐνες του κορονοϊού είναι πρωτεΐνες οι οποίες συνδέουν το RNA πολλών τομέων και έχουν πρωταρχικό ρόλο σε πολλές πτυχές του κύκλου ζωής του ιού. Η πρωτεΐνη SARS-CoV-2 N μοιράζεται ουσιαστική διατήρηση αλληλουχίας με άλλες πρωτεΐνες νουκλεοκαψιδίου κορωνοϊών. Οι διάφορες μελέτες σχετικά με την N πρωτεΐνη από μια σειρά μοντέλων κορονοϊών έδειξαν ότι η N πρωτεΐνη υφίσταται αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, αλλά και αλληλεπίδραση με RNA. Η πρωτεΐνη SARS-CoV-2 N μπορεί να χωριστεί σε πέντε τομείς: μια προβλεπόμενη N-τερματική περιοχή (N-terminal domain, NTD), μια περιοχή σύνδεσης RNA (RNA-binding domain-RBD), μια προβλεπόμενη κεντρική σύνδεση (central linker-LINK), μια περιοχή διμερισμού και μία περιοχή τερματικού C (C-terminal domain, CTD).

Παρόλο που ο SARS-CoV-2 είναι ένας νέος κορονοϊός, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές εργασίες τις προηγούμενες δεκαετίες σε μοντέλα κορονοϊών (συμπεριλαμβανομένου του κορονοϊού SARS) και έχει αποκαλυφθεί μια σειρά χαρακτηριστικών που αναμένεται να ισχύουν στην πρωτεΐνη N του SARS-CoV-2. Αξίζει να σημειωθεί πως και οι πέντε τομείς προβλέπεται να δεσμεύσουν το RNA, και ενώ η περιοχή διμερισμού διευκολύνει το σχηματισμό καλά καθορισμένων στοιχειομετρικών διμερών, αναμένεται ακόμη να συμβεί ολιγομερισμός υψηλότερης τάξης ανεξάρτητος από το RNA. Είναι σημαντικό ότι οι θέσεις αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - πρωτεΐνης και πρωτεΐνης - RNA έχουν χαρτογραφηθεί στις περιοχές NTD, LINK και CTD [14].

1.6.2. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ

Η γλυκοπρωτεΐνη M είναι μία δομική πρωτεΐνη των κορονοϊών που αφήνει ένα μέρος μιας τερματικής περιοχής NH₂ έξω από τον ιό και ένα μακρύ άκρο COOH μέσα στο ιοσωματίδιο. Η πρωτεΐνη M έχει την ικανότητα να συνδεθεί με όλες τις άλλες δομικές πρωτεΐνες. Η σύνδεση με πρωτεΐνη M βοηθά στη σταθεροποίηση των N πρωτεϊνών και προάγει την ολοκλήρωση της ιικής συναρμολόγησης με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του συμπλέγματος N πρωτεΐνης-RNA, μέσα στο εσωτερικό ιοσωματίδιο.

Καθώς η πρωτεΐνη M συνεργάζεται με την πρωτεΐνη S, οι μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν την προσκόλληση και την είσοδο των ιών στα κύτταρα ξενιστές. Η

πρωτεΐνη S του ιού γλυκοζυλιώνεται και αυτή η τροποποίηση μπορεί να βοηθήσει στην ανοσοαποφυγή [15]. Η ανοσοαποφυγή είναι μία στρατηγική που χρησιμοποιούν οι παθογόνοι οργανισμοί και οι όγκοι, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα μετάδοσης σε έναν νέο ξενιστή [124].

Μέσω *in silico* αναλύσεων της πρωτεΐνης M του SARS-CoV-2 που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο Protter (εργαλείο ανοιχτού κώδικα για την απεικόνιση πρωτόμορφων και τη διαδραστική ενσωμάτωση σχολιασμένων και προβλεπόμενων χαρακτηριστικών αλληλουχίας μαζί με πειραματικά πρωτεομικά στοιχεία) έγινε γνωστό ότι έχει μια τριπλή έλικα και σχηματίζει μία ενιαία διαμεμβρανική περιοχή. Επιπλέον, η γλυκοπρωτεΐνη M έχει μια μικρή αμινοτελική περιοχή εκτός του ικού περιβλήματος και μια μακρά καρβοξυτελική τερματική περιοχή μέσα στον ικό φάκελο. Η βάση δεδομένων και το online εργαλείο SWISS-MODEL προέβλεψαν τη γλυκοπρωτεΐνη M ως μέλος της οικογένειας των SWEET2b πρωτεϊνών (οικογένεια αμφίδρομων μεταφορέων σακχάρων). Ωστόσο, η πρωτεΐνη M έχει μόνο 3 διαμεμβρανικές έλικες και όχι τις 6 ή 7 διαμεμβρανικές έλικες που παρατηρούνται στους SWEET μεταφορείς σακχάρων των ευκαρυωτικών. Ως εκ τούτου, η δομή M γλυκοπρωτεΐνης του SARS-CoV-2 μπορεί να θεωρηθεί ως SemiSWEET [15][125].

1.6.3. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΑΚΙΔΑ

Η πρωτεΐνη ακίδα (spike protein) έχει μέγεθος 180-200 kDa, αποτελείται από ένα εξωκυτταρικό N-άκρο, μια διαμεμβρανική περιοχή (transmembrane domain, TM) εδραιωμένη στην ική μεμβράνη και ένα μικρό ενδοκυτταρικό C-τελικό άκρο. Η S βρίσκεται κανονικά σε μια ενεργειακή κατάσταση που έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τις συνηθισμένες διεγερμένες καταστάσεις και που έχει γενικά μικρότερη διάρκεια ζωής από τη χαμηλότερη. Από τη στιγμή που ο ιός αλληλεπιδράσει με το κύτταρο ξενιστή, εντοπίζεται μια εκτεταμένη δομική αναδιάταξη της πρωτεΐνης S, επιτρέποντας έτσι στον ιό να συγχωνευθεί με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Οι αιχμές είναι επικαλυμμένες με μόρια πολυσακχαρίτη για να τα καμουφλάρουν, αποφεύγοντας την αντίχενυση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή κατά την είσοδο.

Το συνολικό μήκος της πρωτεΐνης αυτής είναι 1273 aa και αποτελείται από ένα πεπτίδιο σήματος (αμινοξέα 1-13) που βρίσκεται στο N-άκρο, την υπομονάδα S1 (υπολείμματα 14-685) και την υπομονάδα S2 (υπολείμματα 686- 1273). Οι δύο τελευταίες περιοχές

(S1, S2) είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση στον υποδοχέα του ξενιστή (ACE2 πρωτεΐνη) και τη σύντηξη των μεμβρανών, αντίστοιχα.

Στην υπομονάδα S1, υπάρχει μια N-τελική περιοχή (14-305 υπολείμματα) και μια περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD, 319-541 υπολείμματα).

Η υπομονάδα S2 περιλαμβάνει το πεπτιδίο σύντηξης (FP) (υπολείμματα 788-806), την επταπεπτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 1 (HR1) (υπολείμματα 912-984), την επταπεπτιδική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 2 (HR2) (υπολείμματα 1163-11213), μία διαμεμβρανική περιοχή TM (υπολείμματα 1213-1373) και την κυτταροπλασματική περιοχή (υπολείμματα 1237- 1273).

Τα τριμερή πρωτεΐνης S σχηματίζουν οπτικά ένα χαρακτηριστικό βολβώδες φωτοστέφανο που μοιάζει με κορώνα που περιβάλλει το ικό σωματίδιο. Με βάση τη δομή των μονομερών πρωτεΐνης S του κορονοϊού, οι υπομονάδες S1 και S2 σχηματίζουν την περιοχή του βολβώδους κεφαλιού και του μίσχου. Η δομή της τριμερικής S πρωτεΐνης SARS-CoV-2 έχει προσδιοριστεί με μικροσκοπία κρυσταλλογραφίας σε ατομικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας διαφορετικές διαμορφώσεις του τομέα S της RBD σε ανοικτές και κλειστές διαμορφώσεις και τις αντίστοιχες λειτουργίες της.

Στην φυσική κατάσταση, η πρωτεΐνη S των κορονοϊών υπάρχει ως ανενεργός πρόδρομος. Κατά τη διάρκεια της ιογενούς μόλυνσης, οι πρωτεάσες κυττάρων στόχων ενεργοποιούν την πρωτεΐνη S διασπώντας την σε υπομονάδες S1 και S2, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της περιοχής σύντηξης της μεμβράνης μετά την είσοδο του ιού στα κύτταρα στόχους. Παρόμοια με άλλους κορονοϊούς, η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 διασπάται σε υπομονάδες S1 και S2 από κυτταρικές πρωτεάσες και η πρωτεάση σερίνης TMPRSS2 λειτουργεί ως πρωτεϊνικός εκκινητής σύντηξης. Αν και η θέση διάσπασης του S των ιών SARS-CoV είναι γνωστή, αυτή του SARS-CoV-2 δεν έχει ακόμη αναφερθεί [16].

1.6.4. ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑΤΟΣ

Η πρωτεΐνη περιβλήματος (envelope protein, E) του SARS-CoV-2 αποτελείται από 75 αμινοξέα και έχει την δυνατότητα να παλμιτοϋλιωθεί και να γλυκοζυλιωθεί in vivo. Για την διερεύνηση και την ταυτοποίηση της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης

πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο μια εκτεταμένη μοντελοποίηση χονδροειδούς (CG) μη τροποποιημένης πρωτεΐνης E και σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις σε ατομικό επίπεδο μη τροποποιημένης πρωτεΐνης και μοντελοποίηση χονδροειδούς CG της πρωτεΐνης με τροποποιήσεις.

Οι προσεγγιστικές απεικονίσεις αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη είναι πολύ εύκαμπτη χωρίς ιδιαίτερη τριτοταγή δομή. Η principal component analysis (ανάλυση κύριων συστατικών, PCA) δείχνει ότι τα δύο πρώτα συστατικά περιγράφουν το μεγαλύτερο μέρος της δομικής διακύμανσης και αντιστοιχούν στις κινήσεις των ελίκων H2 και H3 μεταξύ τους και TMD (transmembrane domains) κοντά στην επιφάνεια της μεμβράνης.

Οι προσεγγιστικές απεικονίσεις σε ατομικό επίπεδο δείχνουν επίσης ότι ενώ η δευτερογενής δομή της πρωτεΐνης E διατηρείται σε μεγάλο βαθμό, οι αμφιπαθείς α-έλικες H2 και H3 ενδέχεται να ξεδιπλώνονται μερικώς, με την H2 να είναι πιο παραμορφωμένη [17].

1.7. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ SARS-COV-2

Κάθε φορά που δημιουργείται μια δοκιμασία για τον έλεγχο μιας ασθένειας, για την ανίχνευση μιας ανωμαλίας ή για τη μέτρηση μιας φυσιολογικής παραμέτρου, πρέπει να καθοριστεί πόσο έγκυρη είναι αυτή η δοκιμή, δηλαδή πρέπει να μετρηθεί η ακρίβεια της δοκιμασίας αυτής. Υπάρχουν πολλοί διαθέσιμοι παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να συνδυαστούν για την περιγραφή της εγκυρότητας μιας δοκιμασίας. Δύο από αυτούς τους παράγοντες είναι η ευαισθησία και η ειδικότητα.

Σε κλινικό περιβάλλον, οι διαγνωστικές δοκιμασίες χρησιμοποιούνται για να γίνει γνωστό ποιοι ασθενείς είναι πιο πιθανό να έχουν μια πάθηση. Συχνά υπάρχει μια δοκιμασίας αναφοράς, που καλείται πρότυπο αναφοράς (gold standard) και θεωρείται το καλύτερο διαγνωστικό μέσο, καθώς είναι το πιο ακριβές. Το πρότυπο αναφοράς, σε σύγκριση με άλλες επιλογές, είναι πιο πιθανό να προσδιορίσει σωστά τα άτομα με τη νόσο (ευαισθησία) και να προσδιορίσει σωστά εκείνους που δεν έχουν τη νόσο (ειδικότητα)[18].

1.7.1 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Ως ευαισθησία ορίζεται η ικανότητα μιας διαγνωστικής δοκιμασίας να ταξινομεί και να αξιολογεί σωστά ένα άτομο που έχει την νόσο. Είναι στην ουσία η πιθανότητα θετικού αποτελέσματος εξέτασης όταν υπάρχει ασθένεια.

Για τον υπολογισμό της ευαισθησίας πρέπει να ληφθεί υπόψιν ο παρακάτω 2x2 πίνακας (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 2x2 πίνακας για τον υπολογισμό της ειδικότητας και της ευαισθησίας

		Αποτελέσματα πρότυπου αναφοράς	
		Θετικό (+)	Αρνητικό (-)
Αποτέλεσμα διαγνωστικής δοκιμασίας	Θετικό (+)	TP True positive Αληθώς θετικοί	FP False Positive Ψευδώς αρνητικοί
	Αρνητικό (-)	FN False Negative Ψευδώς αρνητικοί	TN True Negative Αληθώς αρνητικοί

Ως TP (true positive), δηλαδή ως αληθώς θετικά ορίζονται εκείνοι όπου η διαγνωστική δοκιμασία διέγνωσε σωστά την ασθένεια, όπως καθορίζεται από το πρότυπο αναφοράς.

Ως FN (false negative), δηλαδή ως ψευδώς αρνητικοί ορίζονται εκείνοι όπου νοσούν σύμφωνα με το πρότυπο αναφοράς, αλλά έχουν αρνητικό αποτέλεσμα στη διαγνωστική δοκιμασία.

Ως FP (false positive), δηλαδή ως ψευδώς θετικοί ορίζονται εκείνοι που δεν νοσούν σύμφωνα με το πρότυπο αναφοράς, αλλά έχουν θετικό αποτέλεσμα στη διαγνωστική δοκιμασία.

Ως TN (true negative), δηλαδή ως αληθώς αρνητικοί ορίζονται εκείνοι στους οποίους δεν διαγνώστηκε η νόσος ούτε με το πρότυπο αναφοράς, ούτε με την διαγνωστική δοκιμασία.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον Πίνακα 2 η ευαισθησία υπολογίζεται ως το πηλίκο των αληθώς θετικών προς το άθροισμα των αληθώς θετικών με τους ψευδείς αρνητικούς.

$$\text{Δηλαδή ευαισθησία (sensitivity)} = \frac{TP}{TP+FN} [19].$$

1.7.2. ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Ως ειδικότητα (specificity) ορίζεται η ικανότητα μιας διαγνωστικής δοκιμής να ταξινομεί και να αξιολογεί σωστά ένα άτομο ως απαλλαγμένο από μία ασθένεια. Είναι δηλαδή η πιθανότητα αρνητικού αποτελέσματος εξέτασης όταν το άτομο δεν νοσεί.

Λαμβάνοντας υπόψιν τον Πίνακα 2, η ειδικότητα υπολογίζεται ως το πηλίκο των αληθώς αρνητικών προς το άθροισμα των αληθώς αρνητικών με τους ψευδώς θετικούς.

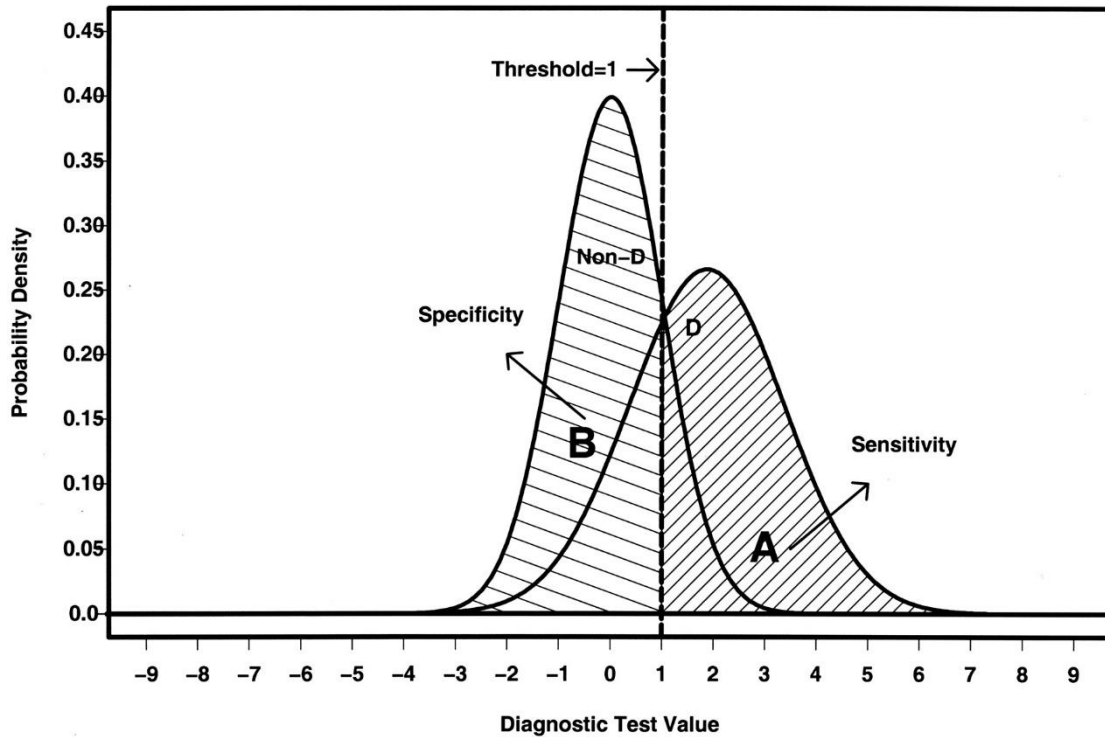
$$\text{Δηλαδή ειδικότητα (specificity)} = \frac{TN}{TN+FP} [19].$$

1.7.3. ΚΑΜΠΥΛΗ ROC

Η ανάλυση χαρακτηριστικών λειτουργίας δέκτη (Receiver Operating Characteristic - ROC) είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της απόδοσης των διαγνωστικών εξετάσεων και γενικότερα για την αξιολόγηση της ακρίβειας ενός στατιστικού μοντέλου που ταξινομεί τα άτομα σε 1 από 2 κατηγορίες, ασθενή ή μη. Η λειτουργία του ως ένα απλό γραφικό εργαλείο για την απεικόνιση της ακρίβειας μίας ιατρικής διαγνωστικής δοκιμασίας είναι μία από τις πιο γνωστές εφαρμογές της ανάλυσης καμπύλης ROC.

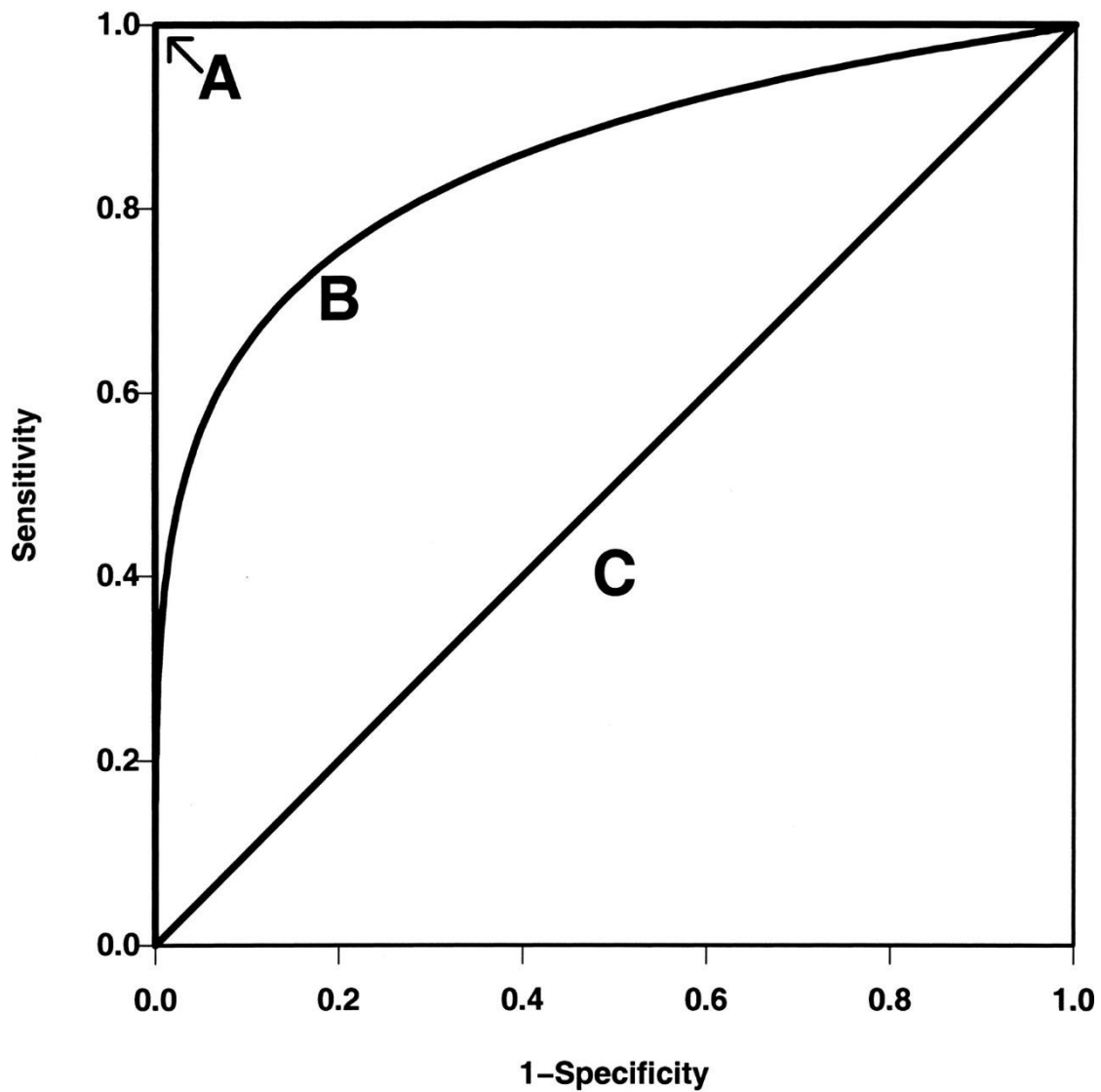
Μία διαγνωστική δοκιμασία ταξινόμησης συνήθως δίνει δυαδικά, κανονικά ή συνεχή αποτελέσματα. Ο πιο απλός τύπος αποτελεσμάτων είναι τα δυαδικά αποτελέσματα. Προκύπτουν από μια δοκιμασία προσυμπτωματικού ελέγχου όπου υποδεικνύεται εάν ο ασθενής δεν είναι άρρωστος ($Dx = 0$) ή είναι άρρωστος ($Dx = 1$). Στην ουσία η δοκιμασία διαλογής υποδεικνύει εάν ο ασθενής είναι πιθανό να είναι άρρωστος ή όχι.

Η ακρίβεια τέτοιων διαγνωστικών δοκιμών δυαδικής αξίας εκτιμάται ως προς την πιθανότητα η δοκιμή να ταξινομήσει σωστά ένα μη άρρωστο άτομο ως αρνητικό, γνωστό ως ειδικότητα (επίσης γνωστή ως πραγματικό αρνητικό ποσοστό) και την πιθανότητα ότι το τεστ ταξινομεί σωστά έναν ασθενή ως θετικό, δηλαδή την ευαισθησία (γνωστό και ως πραγματικό θετικό ποσοστό).



Εικόνα 2 Λειτουργίες πυκνότητας πιθανότητας μιας υποθετικής διαγνωστικής δοκιμής

Μια καμπύλη ROC είναι μια γραφική παράσταση ευαισθησίας στον άξονα y έναντι (1 – ειδικότητα) στον άξονα x για μεταβαλλόμενες τιμές του κατωφλίου t . Η διαγώνια γραμμή 45° στην Εικόνα 3 που συνδέει το σημείο (0,0) με (1,1) είναι η καμπύλη ROC που αντιστοιχεί σε τυχαία πιθανότητα. Η καμπύλη ROC για το χ πρότυπο αναφοράς είναι η γραμμή που συνδέει το (0,0) με (0,1) και το (0,1) με (1,1). Γενικά, οι καμπύλες ROC βρίσκονται μεταξύ αυτών των δύο άκρων. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC είναι ένα συνοπτικό μέτρο που ουσιαστικά υπολογίζει τον μέσο όρο της διαγνωστικής ακρίβειας σε όλο το φάσμα των τιμών δοκιμής [20].



Εικόνα 3 Τρεις υποθετικές καμπύλες ROC που αντιπροσωπεύουν τη διαγνωστική ακρίβεια του χρυσού προτύπου

1.7.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ (GOLD STANDARD)

Η μέθοδος αναφοράς ή χρυσό πρότυπο είναι το καλύτερο μεμονωμένο τεστ (ή συνδυασμός δοκιμών) και συνήθως θεωρείται η τρέχουσα προτιμώμενη μέθοδος διάγνωσης μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Όλες οι άλλες μέθοδοι διάγνωσης της ασθένειας αυτής, συμπεριλαμβανομένης κάθε νέας δοκιμής, πρέπει να συγκριθούν με αυτό το «χρυσό» πρότυπο. Το χρυσό πρότυπο είναι διαφορετικό για διαφορετικές ασθένειες. Το χρυσό πρότυπο για την ασθένεια που μελετάται μπορεί να θεωρείται ξεπερασμένο ή ανεπαρκές, αλλά κάθε νέα δοκιμή που έχει σχεδιαστεί για να

αντικαταστήσει το χρυσό πρότυπο πρέπει αρχικά να επικυρωθεί έναντι του χρυσού προτύπου [19].

Το χρυσό πρότυπο μπορεί να είναι διαθέσιμο από κλινική παρακολούθηση, χειρουργική επαλήθευση και νεκροτομή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κρίνεται από επιτροπή εμπειρογνομόνων.

Ωστόσο, κατά την επιλογή του χρυσού προτύπου, προκύπτουν 2 πιθανά προβλήματα: προκατάληψη επαλήθευσης και σφάλμα μέτρησης. Η προκατάληψη επαλήθευσης προκύπτει όταν η ακρίβεια μιας δοκιμής αξιολογείται μόνο μεταξύ εκείνων με γνωστή κατάσταση ασθένειας. Μπορεί να προκύψει σφάλμα μέτρησης όταν ένα πραγματικό χρυσό πρότυπο απουσιάζει ή ένα ατελές πρότυπο χρησιμοποιείται για σύγκριση [20].

Όσον αφορά την νόσο COVID-19 το πρότυπο αναφοράς είναι η μέθοδος RT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction). Πιο συγκεκριμένα, η ανίχνευση ιικού νουκλεϊκού οξέος μέσω RT-PCR θεωρείται ως ο χρυσός τυπικός ικός διαγνωστικός προσδιορισμός. Ακόμη αξίζει να σημειωθεί πως η χρήση αυτοματοποιημένων δοκιμασιών RT-PCR για την μαζική εξέταση ατόμων για SARS-CoV-2 έχει το πλεονέκτημα του ελάχιστου χρόνου μη αυτοματοποιημένων ενεργειών και της ακρίβειας των αποτελεσμάτων σε σχέση με το συμβατικό RT-PCR.

Μία παράμετρος που λαμβάνουμε από την RT-PCR και παίζει σημαντικό ρόλο στην έγκαιρη διάγνωση είναι οι τιμές Cycle threshold (Ct). Οι τιμές κατωφλίου κύκλου (Ct) στην μέθοδο RT-PCR έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ενίσχυσης που απαιτείται για το ιικό γονίδιο στόχο ώστε να περάσει το κατώφλι και σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με το ιικό φορτίο [21].

1.8. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η συλλογή του κατάλληλου δείγματος την κατάλληλη στιγμή και η μεταφορά του στο εργαστήριο υπό κατάλληλες συνθήκες παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εκτέλεση της διαγνωστικής δοκιμασίας. Ο τύπος του δείγματος που συλλέγεται θα εξαρτηθεί σε κάποιο βαθμό από την εγκεκριμένη ιογενή δοκιμή SARS-CoV-2.. Η αρχική άμεση ανίχνευση ιών πραγματοποιείται συνήθως χρησιμοποιώντας δείγμα ανώτερης αναπνευστικής οδού. Τέτοια δείγματα μπορεί να περιλαμβάνουν συλλεγμένο ρινοφαρυγγικό, στοματοφαρυγγικό, μεσαίο ένρινο στροβιλοειδή, πρόσθιο ρινικό,

ρινοφαρυγγική πλύση/αναρρόφηση ή ρινική πλύση/αναρρόφηση καθώς και σάλιο. Εάν συλλέγονται και τα δύο επιχρίσματα ρινοφαρυγγικού και στοματοφαρυγγικού, μπορούν να συνδυαστούν σε έναν σωλήνα για να μεγιστοποιηθεί η ευαισθησία στη δοκιμή.

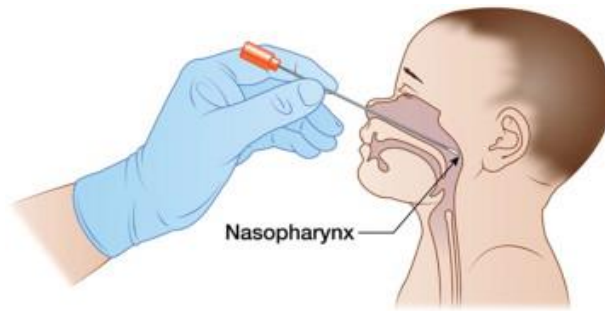
Συλλογή δειγμάτων κατώτερης αναπνευστικής οδού όπως πτύελα, βρογχοκυψελιδική πλύση, αναρρόφηση τραχείας, υπεζωκοτικό υγρό ή βιοψία πνεύμονα μπορεί να δικαιολογείται σε ορισμένες περιπτώσεις [22][23].

1.8.1. ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Η διαδικασία λήψης ρινοφαρυγγικού δείγματος πραγματοποιείται από εξειδικευμένο προσωπικό υγείας και είναι η ακόλουθη.

Αρχικά, το εξειδικευμένο προσωπικό που πραγματοποιεί την δειγματοληψία πρέπει να γείρει το κεφάλι του ασθενούς προς τα πίσω 70 μοίρες. Έπειτα να εισάγει απαλά και αργά μια μπατονέτα με εύκαμπτο άξονα (σύρμα ή πλαστικό) μέσα από το ρουθούνι παράλληλα με τον ουρανίσκο (όχι προς τα πάνω) μέχρι να εμφανιστεί αντίσταση ή η απόσταση να ισοδυναμεί με εκείνη από το αυτί στο ρουθούνι του ασθενούς, υποδεικνύοντας επαφή με το ρινοφάρυγγα. Σε αυτό το στάδιο το άτομο που πραγματοποιεί την δειγματοληψία οφείλει να τρίψει απαλά με την μπατονέτα (μάκτρο) το σημείο και να αφήσει το στυλέο στη θέση του για αρκετά δευτερόλεπτα για να απορροφήσει τις εκκρίσεις. Έπειτα αφαιρείται αργά το μάκτρο ενώ περιστρέφεται. Τα δείγματα μπορούν να συλλεχθούν και από τις δύο πλευρές χρησιμοποιώντας τον ίδιο στυλέο, αλλά δεν είναι απαραίτητο να συλλεχθούν δείγματα και από τις δύο πλευρές εάν το άκρο είναι κορεσμένο με υγρό από την πρώτη συλλογή (Εικόνα 4).

Εάν ένα παρεκκλίνον διάφραγμα ή απόφραξη δημιουργεί δυσκολία στην απόκτηση του δείγματος από το ένα ρουθούνι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ίδιος στυλέος για να ληφθεί το δείγμα από το άλλο ρουθούνι [23].



Εικόνα 4 Λήψη ρινοφαρυγγικού δείγματος

1.8.2. ΣΤΟΜΑΤΟΦΑΡΥΓΓΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Η διαδικασία λήψης στοματοφαρυγγικού δείγματος πραγματοποιείται από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό και είναι η ακόλουθη.

Αρχικά, ο στυλεός εισέρχεται στον οπίσθιο φάρυγγα και στις αμυγδαλές. Στο σημείο εκείνο θα τριφτεί ο στυλεός, τόσο στους πυλώνες αμυγδαλών όσο και στον οπίσθιο στοματοφάρυγγα με την αποφυγή επαφής με την γλώσσα, τα δόντια και τα ούλα (Εικόνα 5) [23][24].



Εικόνα 5 Λήψη στοματοφαρυγγικού δείγματος

1.8.3 ΜΕΣΑΙΟ ΕΝΡΙΝΟ ΣΤΡΟΒΙΛΟΕΙΔΗ

Η δειγματοληψία μεσαίου ένρινου στροβιλοειδή πραγματοποιείται είτε από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, είτε από τον ίδιο τον ασθενή κατόπιν οδηγιών για τον τρόπο λήψης. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη.

Αρχικά ο ασθενής πρέπει να γείρει το κεφάλι του προς τα πίσω 70 μοίρες. Έπειτα, ενώ περιστρέφεται απαλά ο κωνικός στυλεός, τοποθετείται σε απόσταση μικρότερη των δύο εκατοστών στο ρουθούνι παράλληλα με τον ουρανίσκο (όχι προς τα πάνω) μέχρι να επιτευχθεί αντίσταση στα στροβιλοειδή. Στο σημείο εκείνο ο στυλεός περιστρέφεται αρκετές φορές στο ρινικό τοίχωμα και επαναλαμβάνεται η διαδικασία στο άλλο ρουθούνι χρησιμοποιώντας το ίδιο στυλεό (Εικόνα 6) [23][25].

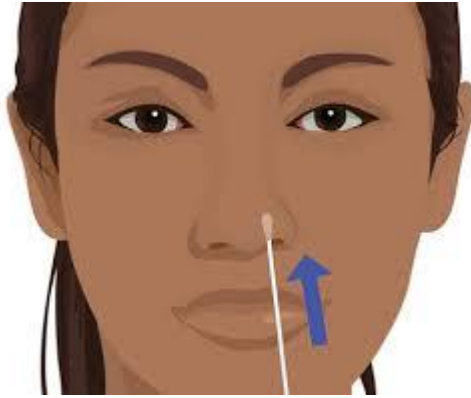


Εικόνα 6 Λήψη μεσαίου ένρινου στροβιλοειδούς δείγματος

1.8.4 ΠΡΟΣΘΙΟ ΡΙΝΙΚΟ

Η δειγματοληψία πρόσθιου ρινικού πραγματοποιείται είτε από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, είτε από τον ίδιο τον ασθενή κατόπιν οδηγιών για τον τρόπο λήψης. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη.

Αρχικά, εισάγεται ολόκληρο το άκρο συλλογής του στυλεού που παρέχεται μέσα στο ρουθούνι. Έπειτα, περιστρέφεται ο στυλεός σε μια κυκλική διαδρομή ενάντια στο ρινικό τοίχωμα τουλάχιστον 4 φορές. Πρέπει να αφιερωθούν περίπου 15 δευτερόλεπτα για την συλλογή του δείγματος. Τέλος, επαναλαμβάνεται η διαδικασία και στο άλλο ρουθούνι χρησιμοποιώντας τον ίδιο στυλεό (Εικόνα 7) [23][26].

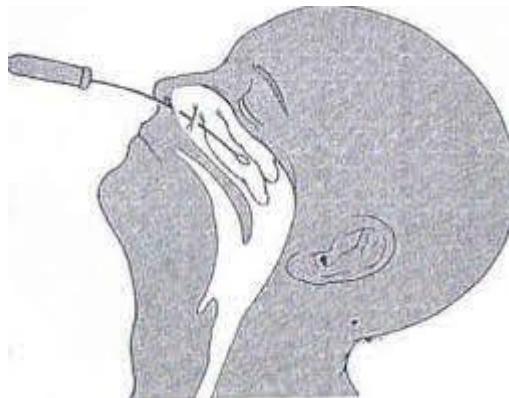


Εικόνα 7 Λήψη πρόσθιου ρινικού δείγματος

1.8.5 ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΙΚΗ ΠΛΥΣΗ / ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ (ΡΙΝΙΚΗ ΠΛΥΣΗ / ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ)

Η δειγματοληψία ρινοφαρυγγικής πλύσης / αναρρόφησης (ρινική πλύση αναρρόφηση) πραγματοποιείται από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό και είναι η ακόλουθη.

Αρχικά, πρέπει να συνδεθεί ο καθετήρας στη συσκευή αναρρόφησης και ο ασθενής να γείρει το κεφάλι του προς τα πίσω 70 μοίρες. Έπειτα, γίνεται ενστάλαξη 1 mL-1,5 mL μη βακτηριοστατικού φυσιολογικού ορού (pH 7,0) σε ένα ρουθούνι. Στη συνέχεια, τοποθετείται ο σωλήνας στο ρουθούνι παράλληλα με τον ουρανίσκο (όχι προς τα πάνω). Ο καθετήρας πρέπει να φτάνει σε βάθος ίσο με την απόσταση από τα ρουθούνια μέχρι το εξωτερικό άνοιγμα του αυτιού. Σε αυτό το σημείο ξεκινά ήπια αναρρόφηση και αφαιρείται ο καθετήρας ενώ περιστρέφεται απαλά (Εικόνα 8) [23][27].



Εικόνα 8 Λήψη ρινοφαρυγγικής πλύσης

1.8.6 ΣΙΕΛΟΣ

Η δειγματοληψία σίελου (σάλιου) πραγματοποιείται από τον ίδιο τον ασθενή, χωρίς να είναι απαραίτητη η επίβλεψη του κατά την διάρκεια της συλλογής. Η διαδικασία είναι η ακόλουθη.

Συλλέγεται 1-5 mL σάλιου σε ένα αποστειρωμένο δοχείο με βιδωτό καπάκι στεγανό και δεν απαιτείται συντηρητικό. Είναι πιθανό να υπάρχουν πρόσθετες οδηγίες από τον πάροχο υγειονομικής περίθαλψης ή τον κατασκευαστή (Εικόνα 9) [23][28].



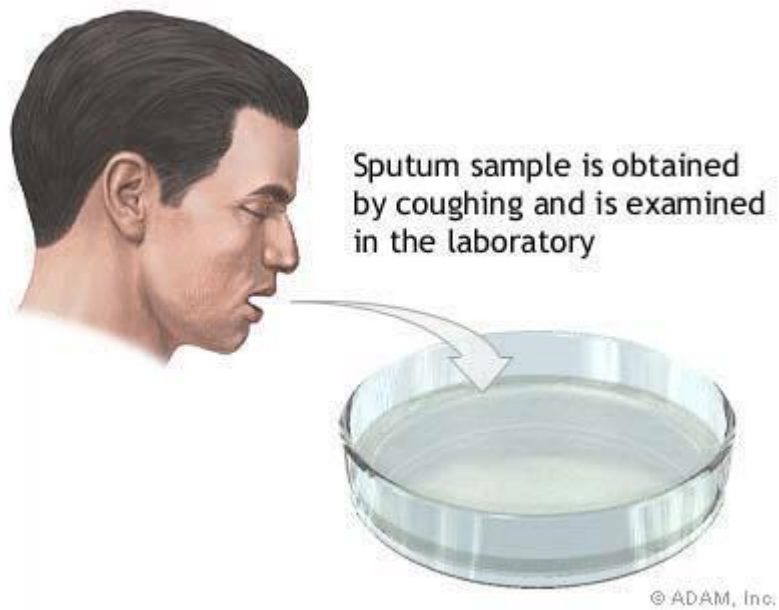
Εικόνα 9 Δειγματοληψία σίελου

1.8.7 ΠΤΥΕΛΑ

Η δειγματοληψία πτύελων πραγματοποιείται υπό την επίβλεψη εξειδικευμένου ιατρικού προσωπικού και είναι η ακόλουθη.

Για ασθενείς που αναπτύσσουν παραγωγικό βήχα, τα πτύελα μπορούν να συλλεχθούν και να ελεγχθούν όταν είναι διαθέσιμα για τον ιό SARS-CoV-2. Ωστόσο, η επαγωγή πτύελων δεν συνιστάται. Ο ασθενής πρέπει να εκπαιδευτεί ώστε να αντιληφθεί τη διαφορά μεταξύ πτύελων (που προέρχονται από βαθύ βήχα) και στοματικών εκκρίσεων (σάλιο/πτύσμα).

Αρχικά, ο ασθενής ξεπλένει το στόμα με νερό και στη συνέχεια αποβάλλει πτύελα μέσω βαθύ βήχα απευθείας σε ένα αποστειρωμένο, ανθεκτικό σε διαρροές, κύπελλο συλλογής με βιδωτό πόμα ή αποστειρωμένο ξηρό δοχείο (Εικόνα 10) [23][29].



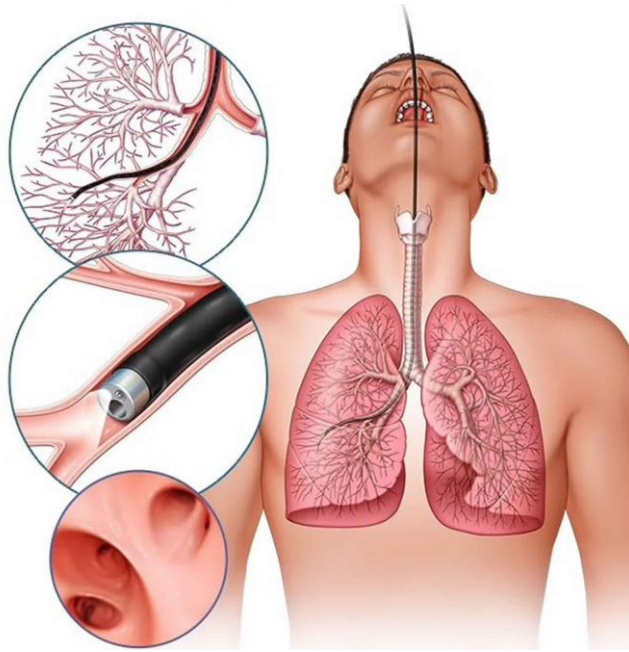
Εικόνα 10 Δειγματοληψία πτύελων

1.8.8 ΒΡΟΓΧΟΚΥΨΕΛΙΔΙΚΗ ΠΛΥΣΗ

Η δειγματοληψία βρογχοκυψελιδικής πλύσης πραγματοποιείται από ειδικούς στο χώρο του νοσοκομείου.

Οι πλύσεις συλλέγονται σε 2-3 mL σε ένα αποστειρωμένο, ανθεκτικό σε διαρροές, κύπελλο συλλογής πτυέλων ή αποστειρωμένο ξηρό δοχείο (Εικόνα 11).

Ωστόσο θέλει ιδιαίτερη προσοχή καθώς λόγω της ανάγκης για αυξημένες τεχνικές δεξιότητες και εξοπλισμό, η συλλογή δειγμάτων εκτός από πτύελα από την κάτω αναπνευστική οδό μπορεί να περιοριστεί σε ασθενείς που παρουσιάζουν σοβαρότερη νόσο, συμπεριλαμβανομένων των ατόμων που εισάγονται στο νοσοκομείο ή/και θανατηφόρων περιπτώσεων [23][30].



Εικόνα 11 Δειγματοληψία βρογχοκυψελιδικής πλύσης

1.8.9 ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΗ ΤΡΑΧΕΙΑΣ

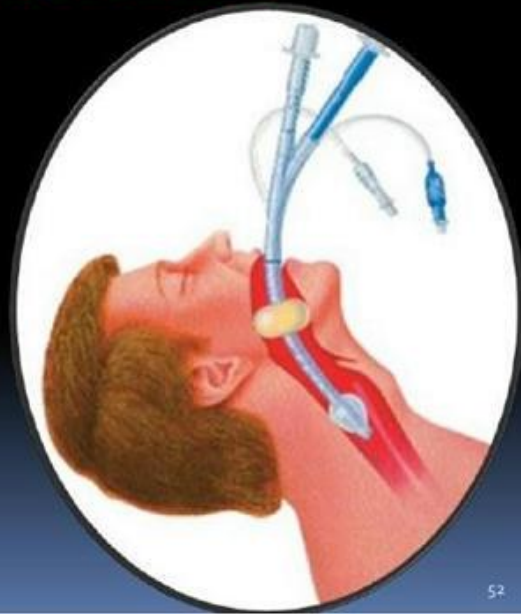
Η δειγματοληψία αναρρόφησης τραχείας πραγματοποιείται από ειδικούς στο χώρο του νοσοκομείου.

Η διαδικασία συλλογής έχει ως εξής. Αρχικά, το δείγμα συλλέγεται μέσω τραχειοστομίας. Έπειτα συνδέεται ένας καθετήρας σε μια παγίδα Lukens και ο καθετήρας τοποθετείται στην τραχεία. Σε αυτό το σημείο γίνεται η αναρρόφηση του δείγματος και τέλος το δείγμα τοποθετείται σε ένα αποστειρωμένο δοχείο (Εικόνα 12).

Ωστόσο πρέπει να τονιστεί πως είναι μία τεχνική που απαιτεί αυξημένες δεξιότητες, οπότε χρίζει ιδιαίτερης προσοχής [23][31][121].

Tracheal aspirates are valuable specimens

- A reliable tracheal aspirate Gram stain can be used to direct initial empiric antimicrobial therapy and may increase the diagnostic value of the CPIS
- A negative tracheal aspirate (absence of bacteria or inflammatory cells) in a patient without a recent (within 72 hours) change in antibiotics has a strong negative predictive value (94%) for VAP and should lead to a search for alternative sources of fever

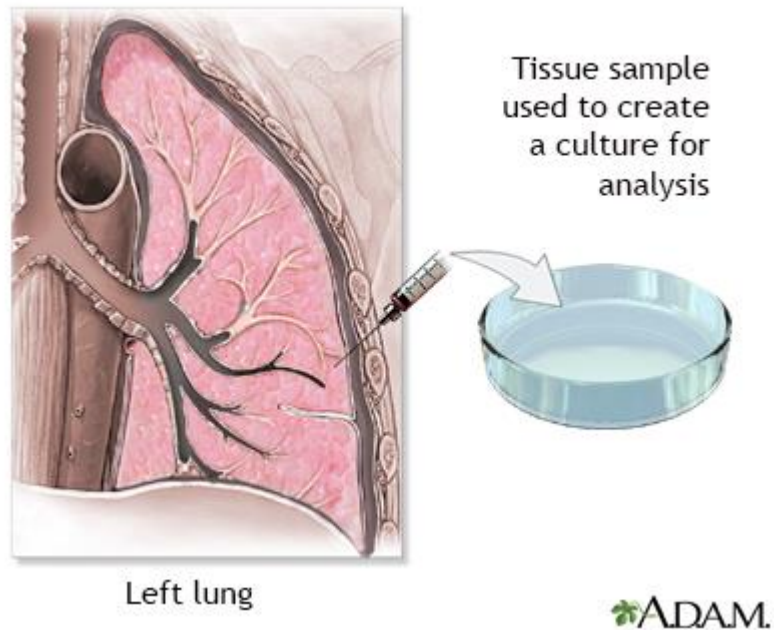


Εικόνα 12 Δειγματοληψία αναρρόφησης τραχείας

1.8.10 ΥΠΕΖΩΚΟΤΙΚΟ ΥΓΡΟ

Η δειγματοληψία υπεζωκοτικού υγρού πραγματοποιείται από ειδικούς στο χώρο του νοσοκομείου, καθώς είναι μία τεχνική υψηλών δεξιοτήτων και χρειάζεται ειδικός εξοπλισμός.

Για την συλλογή του δείγματος τοποθετείται μία βελόνα στην περιοχή του στήθος και γίνεται συλλογή του υπεζωκοτικού υγρού (Εικόνα 13) [23][32].



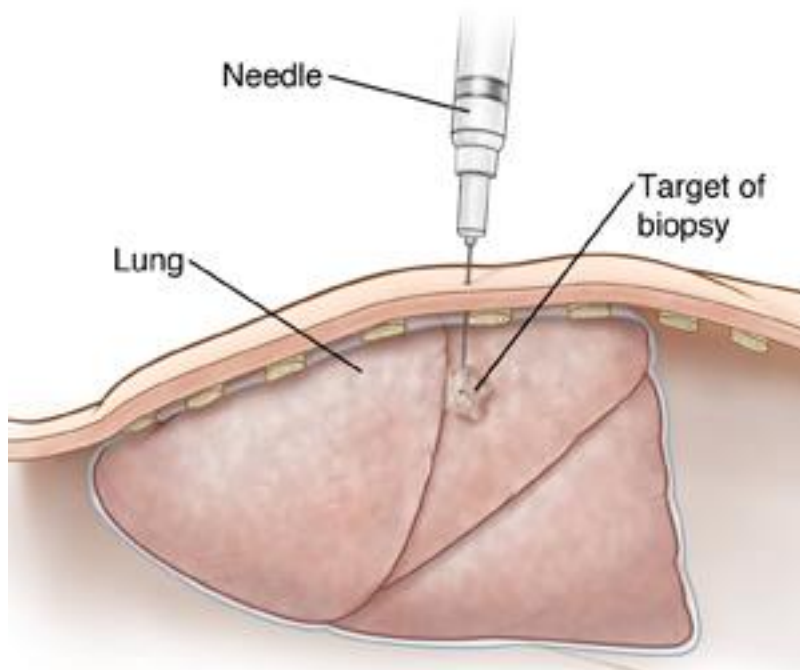
Εικόνα 13 Δειγματοληψία υπεζωκοτικού υγρού

1.8.11 ΒΙΟΨΙΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η δειγματοληψία βιοψίας πνεύμονα πραγματοποιείται από ειδικούς στο χώρο του νοσοκομείου.

Για την συλλογή του δείγματος αυτού αφαιρείται ένα πολύ μικρό δείγμα από τον πνεύμονα με τη χρήση βελόνας προκειμένου να εξεταστεί περαιτέρω (Εικόνα 14).

Να σημειωθεί πως η διαδικασία απαιτεί υψηλά καταρτισμένο προσωπικό [23][33].



Εικόνα 14 Λήψη για βιοψία πνεύμονα

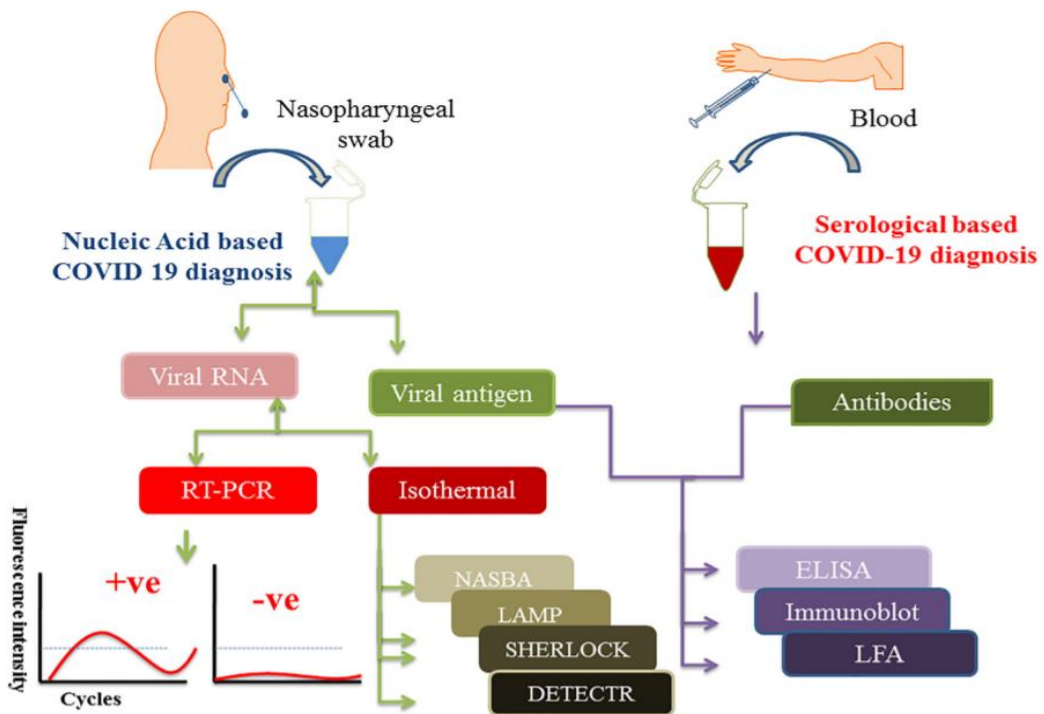
1.9. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΟ SARS-COV-2

Υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη για την ανίχνευση του ίδιου του ιού SARS-CoV-2, τα οποία συγκαταλέγονται στις διαγνωστικές εξετάσεις και στις δοκιμασίες αντισωμάτων (Εικόνα 15).

Όσον αφορά τις διαγνωστικές εξετάσεις, αυτές μπορούν να δείξουν εάν το άτομο έχει ενεργή λοίμωξη Covid-19, ούτως ώστε να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα για την καραντίνα ή την απομόνωση από τους άλλους. Στις διαγνωστικές εξετάσεις συγκαταλέγονται οι μοριακές εξετάσεις και οι δοκιμασίες αντιγόνου. Τα δείγματα για διαγνωστικές εξετάσεις συλλέγονται συνήθως είτε με ένα στυλεό από τη μύτη ή το λαιμό ή το σάλιο είτε συλλέγεται με το φτύσιμο σε ένα σωλήνα.

Όσον αφορά τις δοκιμασίες αντισωμάτων, αυτές αναζητούν αντισώματα στο ανοσοποιητικό σύστημα του ατόμου. Συγκεκριμένα, αναζητούνται τα αντισώματα που παράγονται ως απάντηση στον SARS-CoV-2, τον ιό που προκαλεί την νόσο COVID-19. Οι δοκιμασίες αντισωμάτων δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση μιας

ενεργού λοίμωξης COVID-19. Τα αντισώματα αναπτύσσονται από μερικές ημέρες έως και αρκετές εβδομάδες μετά τη μόλυνση και μπορεί να παραμείνουν στο αίμα για αρκετές εβδομάδες ή και περισσότερο μετά την ανάρρωση. Τα δείγματα για δοκιμασίες αντισωμάτων αντλούνται συνήθως από αίμα από ένα δάχτυλο ή αίμα που λαμβάνεται από το κατάλληλο ιατρικό προσωπικό [35].



Εικόνα 15 Σύνοψη διαγνωστικών δοκιμασιών

Οι διαγνωστικές δοκιμασίες έχουν αναπτυχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να υπάρχουν και αρκετές εναλλακτικές επιλογές. Συγκεκριμένα, υπάρχουν οι γρήγορες διαγνωστικές εξετάσεις στο σημείο φροντίδας, όπου χρησιμοποιείται δείγμα βλέννας από τη μύτη ή το λαιμό. Τα δείγματα μπορούν να αναλυθούν στο ιατρείο ή την κλινική όπου συλλέγεται το δείγμα και τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαθέσιμα σε λίγα λεπτά. Οι δοκιμές που πραγματοποιούνται σε σημεία φροντίδας μπορεί να είναι είτε μοριακές είτε αντιγονικές. Υπάρχουν επίσης τα συνδυαστικά τεστ, τα οποία έχουν την δυνατότητα να ελέγξουν ταυτόχρονα την γρίπη και τον κορονοϊό.

Ακόμη, υπάρχει η συλλογή από το σπίτι. Σε αυτή την κατηγορία συναντώνται αρκετές υποκατηγορίες. Η απλή δοκιμή συλλογής στο σπίτι συνίσταται με το δείγμα να

συλλέγεται στο σπίτι αλλά να αναλύεται στο εργαστήριο. Μια υποκατηγορία είναι η απευθείας δοκιμή στον καταναλωτή, όπου το δείγμα συλλέγεται στο σπίτι, χωρίς όμως η δοκιμασία να απαιτεί την χορήγηση ιατρικής συνταγής, και έπειτα αναλύεται στο εργαστήριο. Υπάρχουν επίσης οι δοκιμές στο σπίτι όπου ο καταναλωτής ολοκληρώνει τη συλλογή και τη δοκιμή του δείγματος στο σπίτι. Τέλος σε αυτή την κατηγορία, υπάρχει η Over the Counter δοκιμασία, όπου ο καταναλωτής ολοκληρώνει τη συλλογή και τη δοκιμή του δείγματος στο σπίτι, χωρίς να απαιτείται ιατρική συνταγή.

Οι διαγνωστικές εξετάσεις όπου το δείγμα είναι το σάλιο, επιτρέπουν σε έναν ασθενή να φτύσει σε ένα σωλήνα αντί να ληφθεί το δείγμα από την μύτη ή τον λαιμό με στυλεό. Τα τεστ σάλιου μπορεί να είναι πιο άνετα για μερικούς ανθρώπους και μπορεί να είναι ασφαλέστερα για τους εργαζόμενους στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης που μπορούν να βρίσκονται σε σχετική απόσταση κατά τη συλλογή του δείγματος [34].

1.9.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Οι μοριακές διαγνωστικές δοκιμασίες είναι κατάλληλες σε σύγκριση με άλλες προσεγγίσεις διαγνωστικών δοκιμασιών, καθώς η μοριακή διάγνωση στοχεύει στο γονιδίωμα ή το πρωτέωμα του παθογόνου παράγοντα, καθιστώντας το έτσι μια αξιόπιστη μέθοδο διάγνωσης. Η απελευθέρωση ολόκληρης της αλληλουχίας γονιδιώματος του ιού SARS-CoV-2 σε δημόσιες βάσεις δεδομένων διευκόλυνε την επιστημονική κοινότητα στη διεξαγωγή της εργαστηριακής διάγνωσης της νόσου COVID-19. Αφού πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση του ιού, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) συνέστησε την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (σε πραγματικό χρόνο RT-PCR), η οποία είναι μια τεχνική που βασίζεται σε ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού, ως την κύρια διαγνωστική προσέγγιση για τον εντοπισμό του ιού SARS-CoV-2 σε ύποπτους ασθενείς.

1.9.1.1 RT-PCR

Η RT-PCR είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική και έχει την ικανότητα να ανιχνεύσει την μόλυνση σε ελάχιστα επίπεδα παθογόνου που υπάρχουν στο δείγμα του ασθενούς. Είναι μια τεχνική βασισμένη σε νουκλεϊκό οξύ που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση ενός γονιδίου-στόχου που υπάρχει σε ένα δείγμα, το οποίο βοηθά στην ανίχνευση ενός

συγκεκριμένου παθογόνου παράγοντα και τον διακρίνει από άλλα σχετικά παθογόνα. Στη δοκιμή ενός σταδίου εκτελείται η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση PCR σε έναν μόνο σωλήνα καθιστώντας έτσι τη διαδικασία της ανίχνευσης γρήγορη και αναπαραγώγιμη. Στη δοκιμή δυο σταδίων, οι δυο παραπάνω διεργασίες εκτελούνται σε διαφορετικούς σωλήνες καθιστώντας την τεχνική πιο ευαίσθητη.

Το RT-PCR είναι ένα ευαίσθητο και γρήγορο εργαλείο ανίχνευσης στη μοριακή διάγνωση. Μπορεί να ανιχνεύσει και να ενισχύσει ακόμη και μερικά αντίγραφα συγκεκριμένης γονιδιωματικής αλληλουχίας σε μια ποικιλία δειγμάτων, αλλά εξαρτάται από ορισμένες παραμέτρους για την παροχή αξιόπιστων αποτελεσμάτων όπως η σωστή συλλογή, μεταφορά, αποθήκευση και επεξεργασία δειγμάτων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφόρων ιών όπως ο Αδενοϊός, ο Ροταϊός, οι Αστροϊοί και πολλοί εντερικοί ιοί που έχουν απομονωθεί από δείγματα κοπράνων. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η ανάγκη για ένα άρτια εξοπλισμένο εργαστήριο και τεχνικό προσωπικό για τον χειρισμό του πειράματος, το οποίο δεν μπορεί να μετριάσει την αυξημένη ζήτηση ταχείων δοκιμών κατά τη διάρκεια πανδημικών καταστάσεων όπως ο COVID-19. Τα κιτ που βασίζονται σε RT-PCR είναι πολύ ακριβά και χρειάζονται πολύ χρόνο για να δώσουν αποτελέσματα, καθιστώντας έτσι απαραίτητη την αναζήτηση άλλων γρήγορων και αξιόπιστων διαγνωστικών μεθόδων [35].

1.9.1.2 ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (NUCLEIC ACID SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION-NASBA)

Η ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος είναι μια διαδικασία ενίσχυσης *in vitro* που διεξάγεται σε ισοθερμικές συνθήκες. Είναι μια διαδικασία ενίσχυσης δύο σταδίων όπου το πρώτο βήμα είναι η μετουσίωση και το δεύτερο βήμα είναι μια εξαρτώμενη από πολυμεράση ενίσχυση που πραγματοποιείται ισοθερμικά. Τα φθοροχρώματα προστίθενται επίσης στην αντίδραση προκειμένου να γίνει μια παρατήρηση που βασίζεται σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η τεχνική έχει τροποποιηθεί περαιτέρω ως μια πολλαπλή διαδικασία που ονομάζεται πολλαπλή ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο (Real Time -Nucleic Acid Sequence Based Amplification/ RT-NASBA), η οποία μπορεί να βοηθήσει στην ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών ιογενών λοιμώξεων. Το RT NASBA έχει αποδειχθεί ότι είναι 10–100 φορές πιο ευαίσθητο από το Multiplex RT-PCR, λόγω των ισοθερμικών συνθηκών όπου δεν καταναλώνεται χρόνος στη θέρμανση και ψύξη και η

παραγωγή αντιγράφων είναι ταχύτερη από την RT-PCR. Το RT-NASBA έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την ανίχνευση λοιμώξεων από SARS-CoV και η ευαισθησία και η ειδικότητα τους φάνηκε ότι είναι ανάλογη με αυτή της διάγνωσης με RT-PCR. Αυτή η τεχνική μπορεί να είναι μια επιλογή για την ταχεία διάγνωση του COVID-19 κατά τη διάρκεια της τρέχουσας πανδημίας [35].

1.9.1.3 ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΒΡΟΧΟΥ (LAMP)

Η ισοθερμική ενίσχυση βρόχου είναι μια διαγνωστική τεχνική που είναι συγκριτικά λιγότερο δαπανηρή, πολύ πιο ευαίσθητη και πιο γρήγορη από την RT-PCR. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την εκλεκτική ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων στόχων σε σταθερή θερμοκρασία, συνήθως στους 60 ° C. Σε αυτήν την τεχνική χρησιμοποιούνται 4 έως 6 ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές για την ανίχνευση διακριτών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων, επιπλέον δεν υπάρχει απαίτηση αρχικής μετουσίωσης του προτύπου και ο χρόνος αντίδρασης ελαχιστοποιείται έως και 30 λεπτά χρησιμοποιώντας πολυμεράσες μετατόπισης κλώνου. Για μια χρωματομετρική ανάλυση, το μείγμα αντίδρασης LAMP προστίθεται με μπλε υδροξυνεπθόλη (HNB) πριν από την ενίσχυση, αποφεύγοντας έτσι τη διασταυρούμενη μόλυνση στο μέλλον. Η τεχνική LAMP αποφεύγει τη χρήση δαπανηρών αντιδραστηρίων και οργάνων, βοηθώντας έτσι στη μείωση του κόστους της διάγνωσης με γρήγορα αποτελέσματα. Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει την εφαρμογή της τεχνικής LAMP στην ανίχνευση λοιμώξεων από κορονοϊό σε δείγματα ασθενών. Παρατηρήθηκε περαιτέρω ότι 9 έως 10 αντίγραφα ιικού RNA ανά αντίδραση ήταν επαρκή για την ανίχνευση λοίμωξης δίνοντας 100 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την RT-PCR. Η πρόκληση που σχετίζεται με τη μέθοδο LAMP είναι η βελτιστοποίηση του εκκινητή και οι συνθήκες αντίδρασης [35].

1.9.1.4 SPECIFIC HIGH SENSITIVITY ENZYMATIC REPORTER UNLOCKING (SHERLOCK)

Με βάση την αρχή του LFIA, ορισμένες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί ειδικά για την ανίχνευση παθογόνων ιών. Το Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking (SHERLOCK) είναι μια τέτοια τεχνική που αναπτύχθηκε από το εργαστήριο του Feng Zheng [36]. Αυτή η τεχνική είναι πολύ οικονομικά αποδοτική και γρήγορη στη διάγνωση ιικών παθογόνων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού Ζίκα και Δάγκειου πυρετού σε δείγματα ασθενών.

Το SHERLOCK μπορεί να ανιχνεύσει τουλάχιστον 200 αντίγραφα/ml ορού/ούρων για ιό RNA Zika. Ένα πρωτόκολλο έχει αναπτυχθεί για διάγνωση του COVID-19 χρησιμοποιώντας το SHERLOCK. Είναι μια διαγνωστική διαδικασία τριών σταδίων. Η ισοθερμική ενίσχυση, η ανίχνευση και η οπτική ανάγνωση είναι τα τρία βήματα διάγνωσης που χρειάζονται λιγότερο από μία ώρα για τα τελικά αποτελέσματα [35][36].

Ωστόσο, αυτό το πρωτόκολλο δεν συνίσταται να χρησιμοποιείται για κλινικούς σκοπούς [36].

1.9.1.5 DETECTR

Ο Broughton και η ομάδα [37] είχαν καταλήξει σε μια μέθοδο ανίχνευσης βασισμένη στο CRISPR Cas12, την οποία ισχυρίζονται ότι είναι η πιο γρήγορη τεχνική μεταξύ της τεχνικής που βασίζεται σε ισοθερμικό νουκλεϊκό οξύ. Αυτή η τεχνική που βασίζεται στο CRISPR Cas12 και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του SARSCoV-2 από εξαγόμενα δείγματα RNA υπόπτων ασθενών. Αυτή η τεχνική έχει σχεδιαστεί για την εκτέλεση ταυτόχρονης αντίστροφης μεταγραφής και ισοθερμικής ενίσχυσης χρησιμοποιώντας RT-LAMP στο RNA που εξάγεται από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα ακολουθούμενη από ανίχνευση ιού με τη μεσολάβηση Cas12. Η τεχνική έχει ονομαστεί δοκιμασία στοχευμένης ενδονουκλεάσης DNA CRISPR trans reporter (DETECTR). Ο προσδιορισμός DETECTR έδειξε συγκρίσιμη ακρίβεια που σχετίζεται με την RT-PCR. Μερικά βασικά πλεονεκτήματα αυτής της δοκιμασίας είναι η ισοθερμική ενίσχυση αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη θερμικού κυκλοποιητή (μηχανήματος PCR), εύχρηστα συστήματα όπως οι ταινίες πλάγιας ροής (lateral flow), αποφεύγοντας τη χρήση πολύπλοκης εργαστηριακής υποδομής. Αυτή η τεχνική μπορεί εύκολα να διευκολύνει τη διαδικασία διάγνωσης της νόσου COVID-19 [35].

1.9.2. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

Κυρίαρχο ρόλο στον περιορισμό της πανδημίας έχει η έγκαιρη διάγνωση και απομόνωση των ατόμων που είναι πιθανόν μολυσματικοί. Αυτό συμβαίνει για να προληφθεί η διασπορά του ιού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το πρότυπο αναφοράς για την διάγνωση του ιού SARS-CoV-2 είναι η εξέταση μέσω RT-PCR. Ωστόσο, η χρήση ταχέων διαγνωστικών δοκιμασιών αντιγόνου συμπληρώνει την διάγνωση μέσω RT-PCR. Αυτό συνέβη καθώς υπάρχει μεγάλη ανάγκη σε αύξηση των αριθμών των δοκιμασιών που πραγματοποιούνται ημερησίως. Ακόμη, η ανάγκη για εξειδικευμένες εργαστηριακές

εγκαταστάσεις και η παγκόσμια ζήτηση για αντιδραστήρια περιορίσει την ικανότητα των γρήγορα δοκιμασιών μέσω RT-PCR. Αντίθετα, οι διαγνωστικές δοκιμασίες αντιγόνου είναι λιγότερο ακριβές, παρέχουν αποτελέσματα πολύ πιο γρήγορα και δεν απαιτούν την ίδια τεχνική εξειδίκευση ή εξειδικευμένες εγκαταστάσεις που τα καθιστούν πιο ελκυστικά. Ένα μεγάλο μειονέκτημα τους όμως είναι πως πολλές φορές δεν είναι ικανά να ανιχνεύσουν μια πολύ μικρή ποσότητα του ιού, όπως γίνεται μέσω της RT-PCR.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) δήλωσε τον Απρίλιο του 2020 ότι «δεν συνιστά τη χρήση γρήγορων διαγνωστικών τεστ ανίχνευσης για τη φροντίδα των ασθενών, αν και η έρευνα σχετικά με την απόδοσή τους και τη δυνητική διαγνωστική χρησιμότητά τους ενθαρρύνεται ιδιαίτερα». Σε αυτήν την κρίση του ΠΟΥ η κύρια αδυναμία των δοκιμών αντιγόνου είναι η χαμηλή ευαισθησία, με αποτέλεσμα πολλές ψευδώς αρνητικές απαντήσεις.

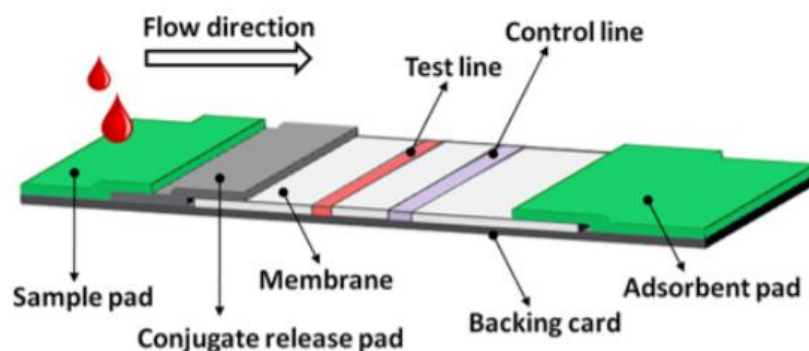
Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τον διχασμό των επιστημόνων με ορισμένους να υποστηρίζουν πως οι διαγνωστικές δοκιμασίες αντιγόνου πρέπει να λειτουργούν συμπληρωματικά με την διάγνωση από το πρότυπο αναφοράς και με κάποιους άλλους να υποστηρίζουν πως η χρήση δοκιμασιών αντιγόνου μπορεί να σταθεί μόνη της στη διάγνωση της μόλυνσης SARS-CoV-2 για τον έλεγχο της εξάπλωσης της λοίμωξης.

Έχουν δημοσιευθεί διάφορες άλλες αναφορές σχετικά με την απόδοση των εμπορικά διαθέσιμων ταχέων δοκιμών αντιγόνου και ένα γενικό συμπέρασμα είναι πως οι δοκιμές αντιγόνου έχουν γενικά χαμηλή ευαισθησία και υψηλή ειδικότητα [38][39].

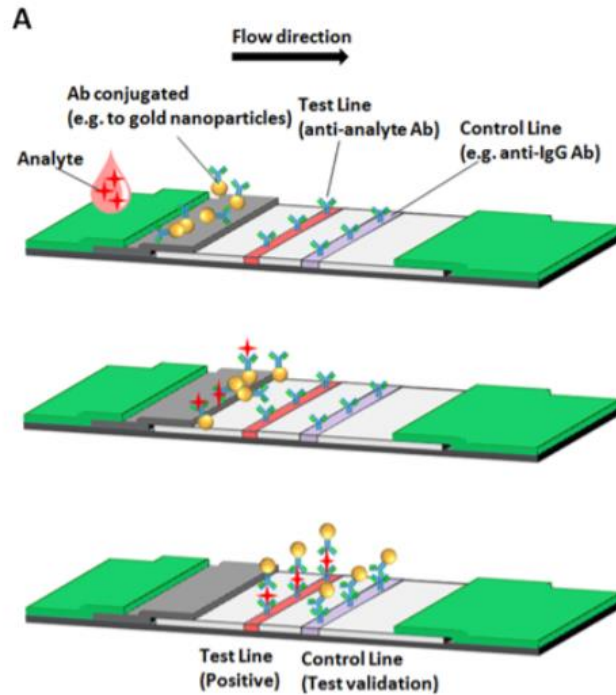
1.9.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ LFIA

Ο τρόπος λειτουργίας της μεθόδου αυτής είναι αρκετά απλός. Το υγρό δείγμα (ή το εκχύλισμά του) που περιέχει την ενδιαφέρουσα αναλυόμενη ουσία (αντίγονο) περνά μέσα από διάφορες ζώνες μιας ταινίας πολυμερούς στις οποίες έχουν προσκολληθεί μόρια που συνδέονται με την αναλυόμενη ουσία, χωρίς τη βοήθεια εξωτερικών δυνάμεων. Μια τυπική ανοσοχρωματογραφική ταινία δοκιμής (Εικόνα 16) αποτελείται από μια μεμβράνη προσαρτημένη σε μια πλάκα στήριξης για βελτιωμένη σταθερότητα και χειρισμό. Η μεμβράνη είναι επικαλυμμένη με διάφορα μόρια σε ιδιαίτερα σημεία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17, το δείγμα εφαρμόζεται στη μία πλευρά μιας λωρίδας προσροφητικής μεμβράνης πολυμερούς (περιοχή δείγματος) το οποίο είναι εμποτισμένο με ρυθμιστικά άλατα και επιφανειοδραστικές ουσίες που καθιστούν το δείγμα

κατάλληλο για αλληλεπίδραση με το σύστημα ανίχνευσης. Η περιοχή δείγματος διασφαλίζει ότι ο αναλύτης (αντιγόνο) που υπάρχει στο δείγμα μπορεί να συνδεθεί με τα συζευγμένα αντιδραστήρια σύλληψης (προσδεμένο τεχνητά παρασκευασμένο αντίσωμα) στη μεμβράνη. Το επεξεργασμένο δείγμα μεταναστεύει μέσω του συζευγμένου επιθέματος απελευθέρωσης, που είναι ειδικό για το αντιγόνο. Η μεμβράνη περιέχει χρωματιστά ή φθορίζοντα σωματίδια, κυρίως λάτεξ και αντισώματα συνδεδεμένα με κολλοειδείς μικροσφαίρες χρυσού. Η τριχοειδής δύναμη του υλικού της λωρίδας προκαλεί τη ροή του υγρού μέσω της συσκευής και ένα απορροφητικό στρώμα συνδέεται στο άκρο της λωρίδας για να διατηρηθεί αυτή η κίνηση. Το δείγμα ταξιδεύει με τη βοήθεια των τριχοειδών κατά μήκος της λωρίδας στην περιοχή ανίχνευσης που φέρει συζευγμένο αντίσωμα και συνδέεται με τον αναλυτή στόχο (αντιγόνο). Η μεμβράνη είναι πορώδης (αποτελείται κυρίως από νιτροκυτταρίνη) και πάνω της στερεώνονται σε σειρά συγκεκριμένα βιολογικά συστατικά (κυρίως αντισώματα ή αντιγόνα). Η αναγνώριση της αναλυόμενης ουσίας από το δείγμα οδηγεί σε σωστή απόκριση στη γραμμή δοκιμής και η απόκριση στη γραμμή ελέγχου υποδεικνύει τη σωστή ροή ρευστού μέσω της λωρίδας. Οι αναγνώσεις που αντιπροσωπεύονται από γραμμές που εμφανίζονται σε διαφορετικές εντάσεις μπορούν να κριθούν οπτικά ή με ειδικό αναγνώστη. Η λειτουργία του μαξιλαριού απορρόφησης στο τέλος της μεμβράνης είναι να απορροφά περίσσεια αντιδραστηρίων και να αποτρέπει την αντίστροφη ροή υγρού [113].



Εικόνα 16 Δομή LFIA



Εικόνα 17 Εμβάθυνση δομής LFIA

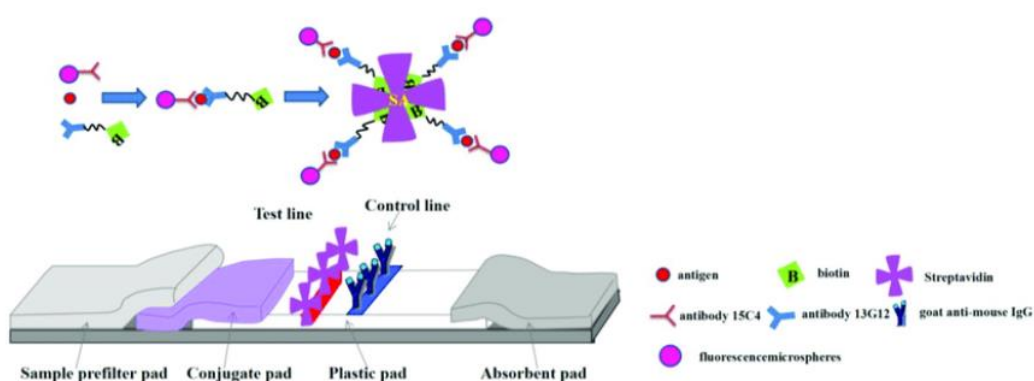
Επάνω: το δείγμα εναποτίθεται στην προσροφητική μεμβράνη και μετακινείται προς το συζυγές. Μέση: τα συζευγμένα αντισώματα δεσμεύουν τον αναλύτη στόχο και (κάτω) μεταναστεύουν στη γραμμή δοκιμής, όπου συλλαμβάνεται ο δεσμευμένος αναλύτης στόχος.

1.9.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ FIA

Ο ανοσοπροσδιορισμός φθορισμού (FIA) αποτελεί μια απλή, γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση πολλών ενώσεων όπως φάρμακα, ορμόνες και πρωτεΐνες. Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται ευρέως στη βιομηχανία διαγνωστικών *in vitro*.

Ο ανοσοπροσδιορισμός είναι μια εκλεκτική βιοαναλυτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα ή ένα αντιγόνο ως παράγοντα βιοανάγνωσης για τη μέτρηση της παρουσίας ή της συγκέντρωσης ενός αναλύτη που περιέχει μακρομόρια και μικρά μόρια σε διάλυμα. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην εξειδίκευση του αντισώματος έναντι του αντιγόνου. Οι φθορίζοντες ανιχνευτές ως ανιχνεύσιμα σήματα χρησιμοποιούνται ευρέως σε ανοσοπροσδιορισμούς. Οι φθορίζοντες ανιχνευτές έχουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των ανιχνεύσιμων σημάτων, όπως η υψηλή ευαισθησία και διάφορες μετρήσιμες ιδιότητες όπως η ένταση εκπομπών, ο προσανατολισμός, η κυματομορφή και η διάρκεια ζωής. Η κλασική FIA χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρωστικές που διεγείρονται στο ορατό

φως αλλά εκπέμπουν στο υπεριώδες . Η εμφάνιση φθορίζοντος χρώματος δηλώνει την ειδική σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος. Οι φθορίζουσες χρωστικές ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη και ροδαμίνη λιθαμίνη φθορίζουν μπλε-πράσινο και πορτοκαλί-κόκκινο, αντίστοιχα, κάτω από το υπεριώδες φως μικροσκοπίου φθορισμού. Τα οφέλη της μεθόδου FIA περιλαμβάνουν πιο ευαίσθητη ανίχνευση του αναλύτη (αντιγόνου), με παρόμοια με την LFIA απλοποιημένα αντιδραστήρια και απλό σχεδιασμό δοκιμής [114][115].

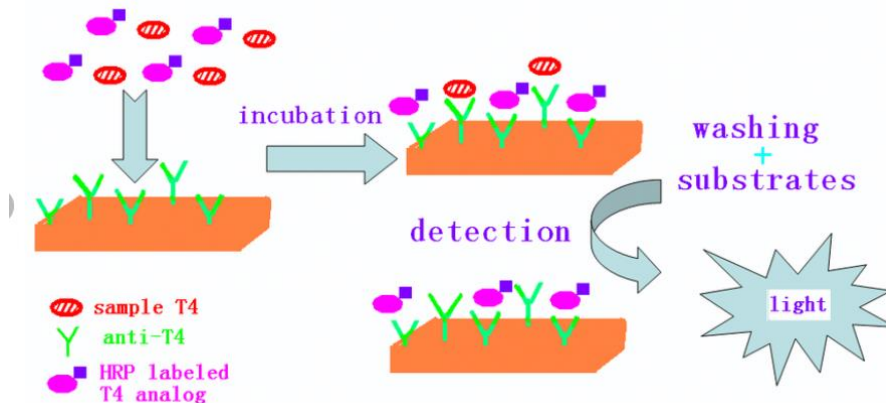


Εικόνα 18 Τρόπος λειτουργίας FIA σε ακινητοποιημένη μεμβράνη με τη μέθοδο της χρωματογραφίας πλάγιας ροής

1.9.2.3. ΜΕΘΟΔΟΣ CLEIA

Η χημειοφωταύγεια (CLEIA) ορίζεται ως η παραγωγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (υπεριώδης, ορατή ή υπέρυθη) που παρατηρείται όταν μια χημική αντίδραση παράγει ένα ηλεκτρόνιο παραγόμενο προϊόν ή ενδιάμεσο προϊόν. Η χημειοφωταύγεια είναι η παραγωγή φωτός από μια χημική αντίδραση. Δύο χημικές ουσίες αντιδρούν παράγοντας ένα διεγερμένο (υψηλής ενέργειας) ενδιάμεσο, το οποίο διασπάται απελευθερώνοντας μερική από την ενέργειά του ως φωτόνια καθώς μεταπίπτει στη βασική του κατάσταση. Το φως αυτό μπορεί να μετρηθεί από κάποιον ανιχνευτή, να ποσοτικοποιηθεί και να δοθεί ποσοτικό αποτέλεσμα, όσον αφορά τη συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας της χημειοφωταύγειας είναι πως δεν απαιτείται εξωτερική πηγή φωτός, γεγονός που δίνει έμφαση στην απλοποίηση του βασικού εξοπλισμού και των απαιτούμενων οπτικών.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν δημοσιευτεί αρκετά βιβλία, κεφάλαια και κριτικές σχετικά με την ανίχνευση χημειοφωταύγειας, τις αρχές και τις εφαρμογές ανάλυσης υγρών φάσεων, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης οργάνων και της χρήσης της μεθόδου αυτής ως μέθοδο ανίχνευσης ροής (lateral flow) [116][117].



Εικόνα 19 Τρόπος λειτουργίας CLEIA

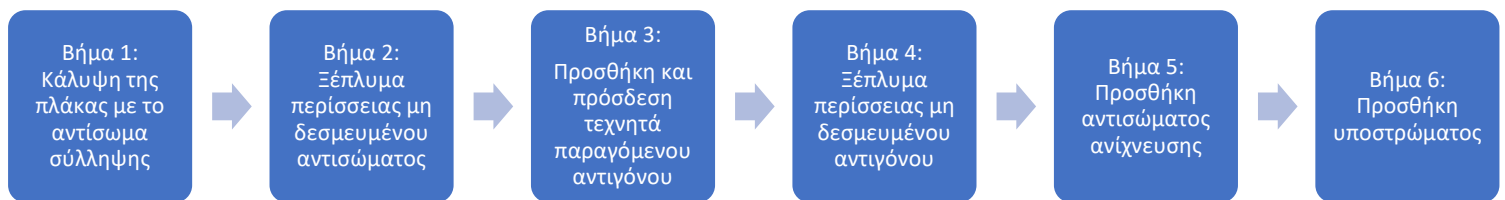
1.9.3. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Ο έλεγχος των αντισωμάτων αποτελεί μια γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι κάποιο αντιγόνου του ιού SARS-CoV-2 (πρωτεΐνη ακίδα, πρωτεΐνη μεμβράνης ή πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου). Υπάρχουν τέσσερις διαθέσιμοι κύριοι τύποι δοκιμασιών αντισωμάτων: ταχεία διαγνωστική δοκιμή, ανοσοπροσροφητική δοκιμασία με ένζυμο (ELISA), δοκιμή εξουδετέρωσης (ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης είναι μια ισχυρή τεχνική για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής επίδρασης αντισωμάτων μικρών μορίων απευθείας στον ιό) και ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταύγειας. Οι τρέχουσες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας συνιστούν την λήψη δειγμάτων αίματος κατά την πρώτη εβδομάδα της ασθένειας και μέτρηση των αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 3-4 εβδομάδες αργότερα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αποδεκτές τυπικές δοκιμασίες αντισωμάτων προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση της ευαισθησίας ή της ειδικότητας του ιού SARS-CoV-2 [118].

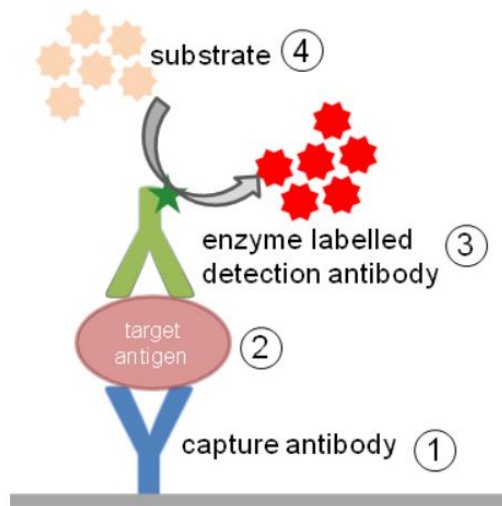
1.9.3.1 ELISA

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) αποτελεί μια ανοσολογική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση αντισωμάτων, αντιγόνων, πρωτεϊνών και

γλυκοπρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Οι δοκιμές ELISA εκτελούνται συνήθως σε πλάκες 96 «πηγαδιών» και έχουν την δυνατότητα να μετρήσουν πολλά δείγματα σε ένα μόνο πείραμα. Αυτές οι πλάκες πρέπει να είναι ειδικές πλάκες προσρόφησης προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το αντίσωμα ή το αντιγόνο προσκολλάται στην επιφάνεια.. Η ELISA που παρουσιάζεται στην Εικόνα 20 είναι γνωστή ως ELISA σάντουιτς, όπου δύο ομάδες αντισωμάτων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση εκκριτικών προϊόντων. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι συγκεκριμένα και είναι τα ακόλουθα [119]:



Σχήμα 1 Βήματα παραλαβής αντισωμάτων



Εικόνα 20 Τρόπος λειτουργίας ELISA

1.10. ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Ως μετα-ανάλυση ορίζεται ένας ποσοτικός, επίσημος, επιδημιολογικός σχεδιασμός μελέτης που στοχεύει τη συστηματική αξιολόγηση προηγούμενων ερευνητικών μελετών για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με αυτό το σύνολο της έρευνας. Τα αποτελέσματα μιας μετα-ανάλυσης είναι δυνατό να περιλαμβάνουν μια πιο ακριβή εκτίμηση της επίδρασης της θεραπείας ή του παράγοντα κινδύνου για ασθένειες ή άλλες επιδράσεις από οποιαδήποτε μεμονωμένη μελέτη που συμβάλλει στην ομαδική ανάλυση. Ο έλεγχος για την μεταβλητότητα ή την ετερογένεια στα αποτελέσματα της μελέτης είναι επίσης ένα κρίσιμο αποτέλεσμα.

Τα οφέλη της μετα-ανάλυσης περιλαμβάνουν μια περιεκτική και ποσοτική ανασκόπηση ενός μεγάλου όγκου βιβλιογραφικών δεδομένων. Η περιγραφή του επιστημονικού ερωτήματος και οι υποθέσεις που ελέγχονται διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στη διεξαγωγή μετα-αναλύσεων, καθώς και για μια ευαίσθητη βιβλιογραφική αναζήτηση. Η αποτυχία προσδιορισμού της πλειοψηφίας των υφιστάμενων μελετών μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Ωστόσο, υπάρχουν μέθοδοι εξέτασης δεδομένων για τον εντοπισμό των πιθανών ελλείψεων μελετών. Η ανάγκη ενσωμάτωσης ευρημάτων από πολλές μελέτες διασφαλίζει ότι η μετα-αναλυτική έρευνα είναι επιθυμητή και το μεγάλο σύνολο ερευνών που δημιουργούνται τώρα καθιστά εφικτή τη διεξαγωγή αυτής της έρευνας [120].

1.11. ΣΚΟΠΟΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συσχέτισης της ευαισθησίας και της ειδικότητας με τα διαφορετικά είδη διαγνωστικών δοκιμασιών αντιγόνων, καθώς και με τους κύκλους της RT-PCR, που όπως έχει αναφερθεί είναι το πρότυπο αναφοράς.

Συγκεκριμένα θα διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ των δειγμάτων, των κύκλων της RT-PCR και της μεθόδου. Ακόμη, θα γίνει μία συσχέτιση σχετικά με την απόδοση των διαγνωστικών δοκιμασιών μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ατόμων.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι που θα μελετηθούν είναι η LFIA, η FIA και η CLEIA. Οι μέθοδοι θα μελετηθούν τόσο αθροιστικά, όσο και μεμονωμένα, ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν ορθά συμπεράσματα.

Οι διαθέσιμοι τύποι δειγμάτων που θα ερευνηθούν είναι τα ρινοφαρυγγικά, τα λαρυγγικά και ο συνδυασμός αυτών των δύο.

Όσον αφορά τις τιμές που αντλούμε από τους κύκλους της RT-PCR μελετάμε δείγματα που έχουν: κάτω από 20 κύκλους (0-20), κάτω από 30 κύκλους (0-30), κάτω από 40 κύκλους (0-40), καθώς και διαστήματα όπως το διάστημα κύκλων 20-30 και το διάστημα 30-40.

Έχοντας αυτά ως δεδομένα, πραγματοποιούνται όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί μεταξύ των μεθόδων, των δειγμάτων και των τιμών της RT-PCR, προκειμένου να εξαγάγουμε ένα σωστό συμπέρασμα σχετικά με την ευαισθησία και την ειδικότητα των διαγνωστικών δοκιμασιών του αντιγόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

2.1.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο όρος "μετα-ανάλυση" προηγείται της έννοιας της συστηματικής ανασκόπησης. Ο όρος αυτός δημιουργήθηκε από τον Glass το 1976 και μέσω αυτού καθορίστηκε ένα σύνολο από στατιστικές διαδικασίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών που αφορούσαν ωστόσο τις ίδιες ερωτήσεις μελέτης.

Το Συνεργατικό Πρόγραμμα Cochrane ορίζει τη "συστηματική ανασκόπηση" ως την ενσωμάτωση των αποτελεσμάτων αρκετών μεγάλων μελετών που χρησιμοποιούν τεχνικές οι οποίες μειώνουν τον κίνδυνο της προκατάληψης και των τυχαίων σφαλμάτων. Η μετα-ανάλυση περιορίζεται στην ανάλυση δεδομένων από μία μόνο συστηματική ανασκόπηση [40].

Οι συστηματικές ανασκοπήσεις και οι μετα-αναλύσεις είναι βασικά στοιχεία της ιατρικής καθώς βασίζονται σε αποδεικτικά στοιχεία, ενώ παραμένουν λίγο ασαφή. Για να κατανοηθεί πλήρως η έννοια της συστηματικής ανασκόπησης θα παρουσιαστούν συνοπτικά τα πέντε βήματα της μεθόδου πίσω από την ανασκόπηση [41].



Σχήμα 2 Βήματα συστηματικής ανασκόπησης

2.1.2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ

Η σωστή και προσεκτική διατύπωση του ερωτήματος αποτελεί ένα βασικό στάδιο, καθώς παρέχει το πεδίο της συστηματικής ανασκόπησης καθορίζοντας, με αυτόν τον τρόπο, τον τύπο των ασθενών, την παρέμβαση, τον συγκριτή και τα αποτελέσματα που θα τεθούν προς αξιολόγηση.

Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο το ερώτημα να είναι συγκεκριμένο, ώστε να είναι πιο σωστά εστιασμένη η βιβλιογραφική αναζήτηση. Σε αυτό το στάδιο συναντάται η στρατηγική αναζήτησης, καθώς αυτή θα καθορίσει το εύρος της ανασκόπησης. Όσο πιο εξαντλητική είναι η αναζήτηση, τόσο μεγαλύτερη είναι η προσπάθεια που απαιτείται για τη συστηματική ανασκόπηση, αλλά η επανεξέταση που προκύπτει είναι γενικά υψηλότερης ποιότητας.

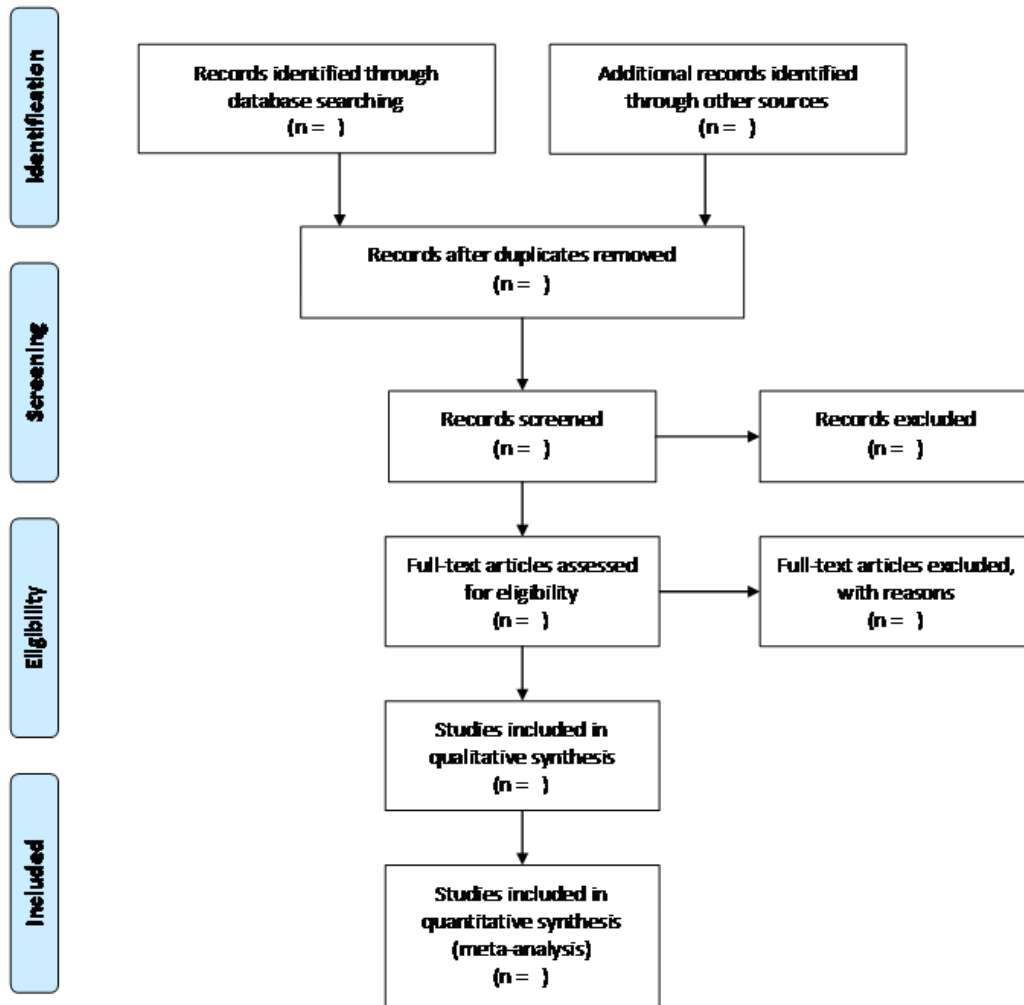
Η αναζήτηση του ερωτήματος στις βάσεις δεδομένων πραγματοποιείται με κάποιες λέξεις κλειδιά, οι οποίες είναι [OR, AND, NOT]. Η βάση δεδομένων που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί κάθε φορά για τη συστηματική ανασκόπηση εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον τομέα της ιατρικής στην οποία θα πραγματοποιηθεί η αναζήτηση. Οι πιο διαδεδομένες βάσεις δεδομένων περιλαμβάνουν τις PubMed, MEDLINE, Embase και τη βιβλιοθήκη Cochrane.

Ωστόσο, κυριαρχεί μια προκατάληψη στις συστηματικές ανασκοπήσεις, η οποία οφείλεται στην μη απάντηση του αρχικού ερωτήματος που είχε τεθεί [42].

Τα στάδια της αναζήτησης και της αξιολόγησης της βιβλιογραφίας προς μελέτη, συνοψίζονται σε ένα διάγραμμα ροής, το οποίο είναι γνωστό ως PRISMA-2009 flow diagram [43].



PRISMA 2009 Flow Diagram



Εικόνα 21 PRISMA Flow Diagram

Όσον αφορά την ποιοτική εκτίμηση των μελετών ένα αρκετά γνωστό εργαλείο αξιολόγησης μελετών διαγνωστικών δοκιμασιών που χρησιμοποιείται ευρέως είναι το QUADAS (Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies) [44].

2.2. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ (QUADAS)

Η αξιολόγηση της ποιότητας σε μια συστηματική ανασκόπηση των μελετών διαγνωστικής ακρίβειας είναι εξίσου σημαντική όσο και σε άλλες ανασκοπήσεις. Ωστόσο, οι μελέτες διαγνωστικής ακρίβειας διαθέτουν ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά σχεδιασμού τα οποία τα κάνουν να διαφέρουν που από τις τυπικές επεμβατικές εκτιμήσεις. Σκοπός τους είναι ο καθορισμός του πόσο καλή είναι μια συγκεκριμένη δοκιμή στην ανίχνευση συνθηκών στόχου και έχει την ακόλουθη βασική δομή: Μια σειρά ασθενών υποβάλλεται σε μία διαγνωστική δοκιμασία καθώς και σε μια δοκιμασία η οποία είναι γνωστή ως πρότυπο αναφοράς. Έπειτα, τα αποτελέσματα της διαγνωστικής δοκιμασίας συγκρίνονται με τα τυπικά και αναμενόμενα αποτελέσματα του προτύπου αναφοράς. Ο καλύτερος διαθέσιμος τρόπος για να προσδιοριστεί εάν ένας ασθενής βρίσκεται σε αυτήν την κατάσταση είναι τα κριτήρια παραπομπής. Αυτά δύναται να είναι ένα μόνο τεστ, μία κλινική παρακολούθηση ή ακόμη και ένας συνδυασμός δοκιμασιών. Ο όρος "δοκιμασία" χρησιμοποιείται για να γίνει αναφορά σε οποιαδήποτε διαδικασία χρησιμοποιείται για τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με την υγεία ενός ατόμου. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να αποτελούνται από εργαστηριακές εξετάσεις, χειρουργικές εξετάσεις, εργαστηριακές εξετάσεις, απεικονιστικές εξετάσεις, ερωτηματολόγια και παθολογία. Ομοίως, η "κατάσταση" ορίζει οποιαδήποτε κατάσταση υγείας, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης μίας ασθένειας, μίας εγκυμοσύνης ή τα διάφορα στάδια ασθένειας (για παράδειγμα την έξαρση κάποιας ασθένειας). Η έρευνα διαγνωστικής ακρίβειας επιτρέπει τον υπολογισμό ορισμένων ποικιλία στατιστικών στοιχείων που υποδεικνύουν την "απόδοση της δοκιμασίας". Η απόδοση μιας δοκιμασίας υποδεικνύει πόσο καλή είναι η δοκιμή ευρητηρίου στην ανίχνευση της κατάστασης του στόχου. Αυτές οι στατιστικές περιλαμβάνουν ευαισθησία, ειδικότητα, θετικούς και αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες, θετικούς και αρνητικούς λόγους πιθανότητας, διαγνωστικούς λόγους πιθανότητας και καμπύλες χαρακτηριστικών λειτουργιών δέκτη (ROC) [44].

Item		Yes	No	Unclear
1.	Was the spectrum of patients representative of the patients who will receive the test in practice?	()	()	()
2.	Were selection criteria clearly described?	()	()	()
3.	Is the reference standard likely to correctly classify the target condition?	()	()	()
4.	Is the time period between reference standard and index test short enough to be reasonably sure that the target condition did not change between the two tests?	()	()	()
5.	Did the whole sample or a random selection of the sample, receive verification using a reference standard of diagnosis?	()	()	()
6.	Did patients receive the same reference standard regardless of the index test result?	()	()	()
7.	Was the reference standard independent of the index test (i.e. the index test did not form part of the reference standard)?	()	()	()
8.	Was the execution of the index test described in sufficient detail to permit replication of the test?	()	()	()
9.	Was the execution of the reference standard described in sufficient detail to permit its replication?	()	()	()
10.	Were the index test results interpreted without knowledge of the results of the reference standard?	()	()	()
11.	Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test?	()	()	()
12.	Were the same clinical data available when test results were interpreted as would be available when the test is used in practice?	()	()	()
13.	Were uninterpretable/ intermediate test results reported?	()	()	()
14.	Were withdrawals from the study explained?	()	()	()

Εικόνα 22 Ερωτήσεις για την αξιολόγηση μιας συστηματικής ανασκόπησης

2.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟ ΠΑΚΕΤΟ STATA

Η στατιστική ανάλυση της παρούσας μετα-ανάλυσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο STATA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η έκδοση 13.0. Το στατιστικό πακέτο STATA αποτελεί ένα λογισμικό το οποίο δημιουργήθηκε από την εταιρεία StataCorp και πρώτη φορά δημοσιεύτηκε το 1985 στο συνέδριο του Αμερικανικού Συλλόγου Οικονομικών στο Ντάλας των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. Η πρώτη του έκδοση (STATA 1.0) αποτελούσε ένα πακέτο παλινδρόμησης με απλές υπολογιστικές πράξεις, ενώ με την πάροδο των χρόνων έγινε η συμπερίληψη και άλλων τεχνικών στατιστικής. Το STATA είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για τη στατιστική ανάλυση δεδομένων σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς όπως την ψυχολογία, την επιδημιολογία, τα οικονομικά και την ιατρική [45]

2.3.1. ΕΝΤΟΛΕΣ ΣΤΟ STATA

Σε αυτή την υποενότητα θα επεξηγηθούν οι εντολές που χρησιμοποιήθηκαν στο στατιστικό μοντέλο STATA.

Πίνακας 3 Επεξήγηση εντολών STATA

Εντολές	Επεξήγηση εντολών
generate (gen)	Δημιουργία νέων μεταβλητών [46]
replace	Αντικαθιστά την τιμή μιας υπάρχουσας μεταβλητής [46]
set	Καθορίζει μια μεταβλητή ή ένα μέγεθος [47]
mvmeta	Εκτελεί περιορισμένη μέγιστη πιθανότητα και μέγιστη εκτίμηση πιθανότητας στην περίπτωση πολλαπλών μεταβλητών [48]
nlcom	Υπολογίζει εκτιμήσεις σημείων, τυπικά σφάλματα, στατιστικά δοκιμών, επίπεδα σημασίας και (πιθανώς) διαστήματα εμπιστοσύνης για μη γραμμικούς συνδυασμούς της εκτίμησης παραμέτρων μετά τον προσδιορισμό της εργασίας εκτίμησης στατικών, συμπεριλαμβανομένης της εκτίμησης της έρευνας [49]

Ακολουθεί ένας πίνακας (Πίνακας 4) με την επεξήγηση ειδικών χαρακτήρων και συμβόλων που χρησιμοποιήθηκαν στις εντολές.

Πίνακας 4 Επεξήγηση ειδικών χαρακτήρων/ συμβόλων

Ειδικός χαρακτήρας/ Σύμβολο	Επεξήγηση ειδικού χαρακτήρα/συμβόλου
==	Ισότητα [46]
	Ή [46]
&	Και [46]
+	Πρόσθεση [46]
/	Διαίρεση [46]

2.3.2. ΕΚΤΕΛΕΣΗ ΕΝΤΟΛΩΝ

Οι εντολές που πραγματοποιήθηκαν με τη σειρά μέσω του στατιστικού πακέτου STATA παραθέτονται παρακάτω.

```

gen b1=log(tp/fn)
gen b2=log(fp/tn)
gen V11=1/tp+1/fn
gen V22=1/tn+1/fp
replace b1=log((tp+0.5)/(fn+0.5)) if tp==0 |fn==0
replace b2=log((fp+0.5)/(tn+0.5)) if fp==0 |tn==0
replace V11=1/(tp+0.5)+1/(fn+0.5) if tp==0 |fn==0
replace V22=1/(fp+0.5)+1/(tn+0.5) if fp==0 |tn==0
gen V12=0
set matsize 800
mvmeta b V, vars(b1 b2)

```

Αντιστοιχεί στην ευαισθησία:

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Αντιστοιχεί στην ειδικότητα:

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20",
vars(b1) mm

```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20",
vars(b2) mm

```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30-40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20", vars(b1  
b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30", vars(b1  
b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="40", vars(b1  
b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30-40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```


Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b2) mm
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="LFIA" & cutoff=="30-40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="20",  
vars(b1) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="20",
vars(b2) mm*

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="30",
vars(b1) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="30",
vars(b2) mm*

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="20-30",
vars(b2) mm*

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="LFIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό μεθόδων, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="40",  
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό μεθόδων, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο LFIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "LFIA" & cutoff=="30-40",  
vars(b1 b2) mm
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "FIA" & cutoff=="20",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1]) / (1 + exp(_b[b1])) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "FIA" & cutoff=="30",  
vars(b1) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1]) / (1 + exp(_b[b1])) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "FIA" & cutoff=="30",  
vars(b2) mm
```

```
nlcom 1 - ( exp(_b[b2]) / (1 + exp(_b[b2])) )
```

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "FIA" & cutoff=="40",  
vars(b1 b2) mm
```

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1 b2) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30-40",
vars(b2) mm*

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατόφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="20", vars(b1
b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατόφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30", vars(b1
b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατόφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="40", vars(b1
b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1 b2) mm
```

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30-40",  
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 20 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="20",  
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="40",  
vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1- ( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="20-30",  
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="FIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20", vars(b1
b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="30", vars(b1
b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="40", vars(b1
b2) mm*

**Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30
έχουμε:**

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1 b2) mm*

**Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40
έχουμε:**

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20", vars(b1
b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="FIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο FIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "FIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20",
vars(b1 b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="30",
vars(b1 b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1 b2) mm*

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="30",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="30",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method == "CLEIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με N αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="N" & method=="CLEIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="CLEIA" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="20-30",
vars(b1 b2) mm*

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 20 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="20",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 30 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="30",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κατώφλι 40 έχουμε:

*mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="40",
vars(b1 b2) mm*

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο CLEIA και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method == "CLEIA" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="40", vars(b1) mm

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="40", vars(b2) mm

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για ρινοφαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method == "other" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

nlcom (exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1])))

nlcom 1- (exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2])))

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για λαρυγγικό δείγμα, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="30-40", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 20 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="20", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 40 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="40", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 20-30 έχουμε:

mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="20-30", vars(b1 b2) mm

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κύκλους PCR 30-40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S" & method=="other" & cutoff=="30-40",
vars(b1 b2) mm
```

Για συνδυασμό δειγμάτων, με S+E+M αντιγόνο, μέθοδο άλλη και κατώφλι 40 έχουμε:

```
mvmeta b V if sample=="nsp-ts" & ag=="S+E+M" & method=="other" &
cutoff=="40", vars(b1 b2) mm
```

```
nlcom ( exp(_b[b1])/(1+exp(_b[b1] ) ) )
```

```
nlcom 1-( exp(_b[b2])/(1+exp(_b[b2] ) ) )
```

2.4 ΠΟΛΥ ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

Μια πολύ μεταβλητή μετα-ανάλυση συνδυάζει τις εκτιμήσεις από πολλές σχετικές παραμέτρους πολλών μελετών. Για παράδειγμα, αυτές οι παράμετροι μπορούν να εμφανίσουν πολλαπλά αποτελέσματα ή συγκρίσεις μεταξύ περισσότερων από δύο ομάδων.

Ακολουθεί το μαθηματικό μοντέλο της πολύ μεταβλητής μετά ανάλυσης, σύμφωνα με το οποίο εκτελείται και η εντολή mvmeta.

Υποθέτουμε πως έχουμε το εξής μοντέλο (Εικόνα 23):

$$\begin{aligned}
 y_i &\sim N(\mu_i, S_i) \\
 \mu_i &\sim N(\mu, \Sigma) \\
 \Sigma &= \begin{pmatrix} \tau_1^2 & \kappa_{12}\tau_1\tau_2 & \cdot \\ \kappa_{12}\tau_1\tau_2 & \tau_2^2 & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \end{pmatrix}
 \end{aligned}$$

Εικόνα 23 Μαθηματικό μοντέλο

όπου y_i είναι η εκτίμηση σημείου και S_i είναι η διακύμανση εντός της μελέτης (μήτρα συνδιακύμανσης).

Επίσης, πιο συγκεκριμένα οι μεταβλητές y_i , μ_i και μ είναι $p \times 1$ διανύσματα και οι μεταβλητές S_i και Σ είναι $p \times p$ πίνακες. Η διακύμανση εντός της μελέτης, S_i , υποθέτουμε πως είναι γνωστή. Ο στόχος είναι να εκτιμηθούν οι μεταβλητές μ και Σ .

Θέτουμε $W_i = (\Sigma + S_i)^{-1}$, σημειώνοντας υπάρχει εξάρτηση από τον άγνωστο Σ . Αν το Σ ήταν γνωστό (ή θεωρείται πως είναι ο μηδενικός πίνακας, όπως στη μετα-ανάλυση σταθερών αποτελεσμάτων), τότε θα είχαμε (Εικόνα 24)

$$\hat{\mu} = \left(\sum_i W_i \right)^{-1} \left(\sum_i W_i y_i \right)$$

Εικόνα 24 Υπολογισμός μεταβλητής μ

Όσον αφορά την εκτίμηση της μεταβλητής Σ , οι μέθοδοι που προτείνονται στο περιβάλλον πολλαπλών μεταβλητών περιλαμβάνουν επεκτάσεις της μεθόδου Cochran, της μεθόδου DerSimonian και Laird για διαγώνιο W_i και μεθόδους βάσει πιθανότητας. Ωστόσο, χρησιμοποιείται η τελευταία μέθοδος λόγω των ιδιοτήτων γενικότητας και βελτιστοποίησης τους. Αντίστοιχα, η πιθανότητα και η περιορισμένη πιθανότητα είναι η ακόλουθη (Εικόνα 25):

$$\begin{aligned} -2L &= \sum_i \{ \log |\Sigma + S_i| + (y_i - \mu)' W_i (y_i - \mu) \} + np \log 2\pi \\ -2RL &= -2L + \log \left| \sum W_i \right| - p \log 2\pi \end{aligned}$$

Εικόνα 25 Υπολογισμός πιθανότητας και περιορισμένης πιθανότητας

όπου W_i είναι η συνάρτηση του αγνώστου Σ .

Πραγματοποιείται μεγιστοποίηση της περιορισμένης πιθανότητας σύμφωνα με τον αλγόριθμο Newton-Raphson. Για να διασφαλιστεί ότι το Σ είναι μη αρνητικό (για παράδειγμα, στη διμεταβλητή περίπτωση, για να διασφαλιστεί ότι οι διαφορές μεταξύ των μελετών είναι μη αρνητικές και ότι ο συσχετισμός μεταξύ των μελετών βρίσκεται μεταξύ -1 και 1), οι βασικές παράμετροι μοντέλου λαμβάνονται ως στοιχεία του Cholesky της αποσύνθεσης του Σ [48].

2.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δεδομένα τα οποία παρουσιάζονται σε ένα προεπιλεγμένο φύλλο Microsoft Excel. Έχουν εξαχθεί οι ακόλουθες πληροφορίες από κάθε μελέτη: επώνυμο του πρώτου συγγραφέα, τύπος αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε, τύπος δείγματος, μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε και τμήμα ή εύρος τιμών στις οποίες τα δείγματα αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας qPCR. Επιπλέον, η μέθοδος δοκιμής αντιγόνου καταχωρείται με τη μάρκα και τον κατασκευαστή του κιτ / μεθόδου που χρησιμοποιείται. Επίσης καταγράφηκαν συμπτωματικές και ασυμπτωματικές περιπτώσεις καθώς και η αναλογία ανδρών / γυναικών, εάν υπάρχουν. Για να ληφθούν οι μετρήσεις ευαισθησίας και ειδικότητας, δημιουργήθηκε ένας πίνακας πιθανοτήτων 2x2. Ως εκ τούτου καταγράφηκαν θετικά (TP), ψευδώς αρνητικά (FN), αληθινά αρνητικά (TN) και ψευδώς θετικά (FP) αποτελέσματα. Σε περιπτώσεις όπου δεν χρησιμοποιήθηκε κανένας έλεγχος, χρησιμοποιήσαμε μόνο τιμές TP και FN.

2.5.1. ΜΕΓΕΘΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

Το μέγεθος επίδρασης είναι μια στατιστική έννοια που μετρά τη δύναμη της σχέσης μεταξύ δύο μεταβλητών σε αριθμητική κλίμακα. Κατά τον έλεγχο υποθέσεων, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του μεγέθους του αποτελέσματος, του μεγέθους του δείγματος και του επιπέδου κρίσιμης σημασίας. Σε μια μετα-ανάλυση, το μέγεθος του αποτελέσματος σχετίζεται με διάφορες μελέτες και στη συνέχεια όλες οι μελέτες συνδυάζονται σε μία ανάλυση. Στη στατιστική ανάλυση, το μέγεθος του αποτελέσματος μετريέται συνήθως με τρεις τρόπους: την τυπική μέση διαφορά, τον λόγο σχετικών πιθανοτήτων και τέλος τον συντελεστή συσχέτισης [50].

2.5.5.1. ΤΥΠΙΚΗ ΜΕΣΗ ΔΙΑΦΟΡΑ

Όταν μια ερευνητική μελέτη βασίζεται στη μέση πληθυσμιακή και τυπική απόκλιση, χρησιμοποιείται η ακόλουθη μέθοδος για τον προσδιορισμό του μεγέθους του αποτελέσματος:

$$\theta = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma}$$

Το μέγεθος επίδρασης του πληθυσμού μπορεί να προσδιοριστεί διαιρώντας τη μέση διαφορά πληθυσμού με την τυπική απόκλιση [50].

2.5.5.2. ΛΟΓΟΣ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΠΙΘΑΝΟΤΗΤΩΝ (ODD RATIO)

Ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων είναι η πιθανότητα επιτυχίας στην ομάδα θεραπείας σε σύγκριση με την πιθανότητα επιτυχίας στην ομάδα ελέγχου. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου τα δεδομένα είναι δυαδικά. Για παράδειγμα, εάν χρησιμοποιηθεί ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 5):

Πίνακας 5 Μεγέθη για τον υπολογισμό του λόγου σχετικών πιθανοτήτων

	Συχνότητα	
	Επιτυχία	Αποτυχία
Ομάδα Θεραπείας	a	b
Ομάδα Ελέγχου	c	d

Για να μετρήσουμε το μέγεθος επίδρασης του παραπάνω πίνακα, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Effect size} = \frac{ad}{bc} [50].$$

2.5.5.3 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ

Ο συντελεστής συσχέτισης ή αλλιώς συσχέτιση Pearson (r) αναπτύχθηκε από τον Carl Pearson και χρησιμοποιείται κυρίως στη στατιστική. Η ισχύς του φαινομένου συσχέτισης Pearson κυμαίνεται μεταξύ -1 και 1. Σύμφωνα με τον Cohen το μέγεθος του αποτελέσματος είναι μικρό όταν η τιμή του r είναι περίπου 0,1, το μέσο όταν το r είναι περίπου 0,3 και μεγάλο όταν το r είναι μεγαλύτερο από 0,5. Ο συσχετισμός Pearson υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο (Εικόνα 26):

$$r = \frac{N \sum xy - \sum (x)(y)}{\sqrt{N \sum x^2 - \sum (x^2)} \sqrt{N \sum y^2 - \sum (y^2)}}$$

Εικόνα 26 Υπολογισμός συντελεστή συσχέτισης (r)

όπου, r ο συντελεστής συσχέτισης, N ο αριθμός των ζευγαριών, $\sum xy$ το σύνολο προϊόντων των ζευγαριών, $\sum x$ το άθροισμα τιμών x , $\sum y$ το άθροισμα των τιμών y , $\sum x^2$ το άθροισμα των τετραγώνων του x και $\sum y^2$ το άθροισμα των τετραγώνων y [50].

2.5.2. ΘΕΤΙΚΗ-ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Για να γίνει κατανοητός ο τρόπος υπολογισμού της θετικής προγνωστικής αξίας θα χρησιμοποιηθεί ο πίνακας 2x2 (Πίνακας 2) που εμφανίζεται και στο κεφάλαιο της Ειδικότητας-Εναισθησίας.

		Αποτελέσματα πρότυπου αναφοράς	
		Θετική (+)	Αρνητική (-)
Αποτελέσματα διαγνωστικής δοκιμασίας	Θετική (+)	TP True positive Αληθώς θετικοί	FP False Positive Ψευδώς αρνητικοί
	Αρνητική (-)	FN False Negative	TN True Negative

		Ψευδώς αρνητικοί	Αληθώς αρνητικοί
--	--	------------------	------------------

Η θετική προγνωστική αξία, καθώς και η αρνητική προγνωστική αξία αποτελούν βασικά μέτρα διαγνωστικής ακρίβειας. Η ευαισθησία και η ειδικότητα σχετίζονται με τον επιπολασμό της νόσου (π). Η θετική προγνωστική αξία σηματοδοτεί την πιθανότητα να υπάρχει η ασθένεια με θετικό αποτέλεσμα δοκιμής [52].

Όσον αφορά τον υπολογισμό της θετικής προγνωστικής αξίας (Positive Predictive Value-PPV) ισχύει πως $PPV = \frac{TP}{TP+FP}$ [51].

Ο υπολογισμός της θετικής προγνωστικής αξίας συναρτήσει του επιπολασμού υπολογίζεται ως εξής [52]:

$$PPV = \frac{Sensitivity * \pi}{Sensitivity * \pi + (1 - specificity) * (1 - \pi)}$$

Εικόνα 27 Υπολογισμός θετικής προγνωστικής αξίας συναρτήσει επιπολασμού (π)

Αντίστοιχα, η αρνητική προγνωστική αξία σηματοδοτεί την πιθανότητα να υπάρχει αρνητικό αποτέλεσμα δοκιμής[52].

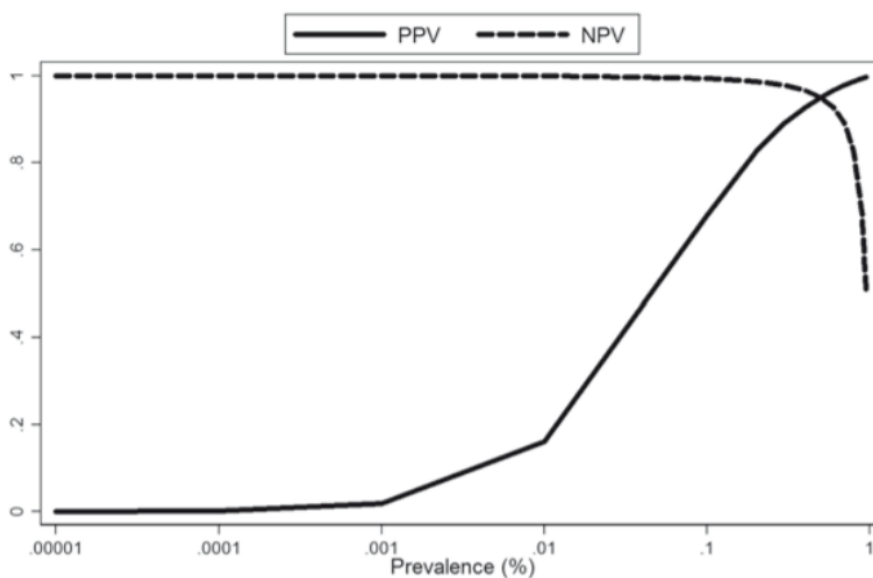
Όσον αφορά τον υπολογισμό της αρνητικής προγνωστικής αξίας (Negative Predictive Value-NPV) ισχύει πως $NPV = \frac{TN}{TN+FN}$ [51].

Ο υπολογισμός της αρνητικής προγνωστικής αξίας συναρτήσει του επιπολασμού υπολογίζεται ως εξής [52]:

$$NPV = \frac{Specificity * (1 - \pi)}{Specificity * (1 - \pi) + (1 - sensitivity) * \pi}$$

Εικόνα 28 Υπολογισμός αρνητικής προγνωστικής αξίας συναρτήσει επιπολασμού (π)

Ακολουθεί το διάγραμμα όπου φαίνεται η επίδραση του επιπολασμού τόσο στην θετική, όσο και στην αρνητική προγνωστική αξία [52].



Εικόνα 29 Διάγραμμα επίδρασης επιπολασμού στις προγνωστικές αξίες

2.5.3 ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ

Το διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval-CI) αποτελεί ένα στατιστικό μέτρο που μπορεί να θεωρηθεί ως μια σειρά τιμών οι οποίες υπολογίζονται από ένα δείγμα παρατηρήσεων όπου είναι πιθανό να περιέχεται το πραγματικό μέγεθος του πληθυσμού αλλά με κάποια αβεβαιότητα. Παρόλο που το διάστημα εμπιστοσύνης παρέχει μια εκτίμηση ενός άγνωστου συντελεστή πληθυσμού, το χρονικό διάστημα που υπολογίζεται από ένα δεδομένο δείγμα δεν περιέχει απαραίτητα την πραγματική τιμή του συντελεστή. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται διαστήματα εμπιστοσύνης με το επίπεδο εμπιστοσύνης που επιλέγει ο χρήστης. Το πιο συχνό διάστημα εμπιστοσύνης

είναι το 95%. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η διαδικασία εκτίμησης πρέπει να επαναλαμβάνεται ξανά και ξανά με δείγματα από τον ίδιο πληθυσμό και ότι 95 περίοδοι των υπολογισμένων περιόδων έχουν πραγματική αξία. Να σημειωθεί πως το συγκεκριμένο επίπεδο εμπιστοσύνης καθορίζεται από τον χρήστη και δεν εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του δείγματος. Αν και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, είναι δυνατό να υπολογιστεί το διάστημα εμπιστοσύνης με ένα ορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης, για παράδειγμα 90% ή 99%. Τα δύο άκρα του διαστήματος εμπιστοσύνης καλούνται όριο ή σύνορο. Το διάστημα εμπιστοσύνης δύναται να είναι μονόπλευρο ή διπλής όψης. Ένα διάστημα εμπιστοσύνης δύο όψεων περικλύει την παράμετρο πληθυσμού τόσο από κάτω (κάτω όριο) όσο και από πάνω (άνω όριο). Αντίθετα, ένα μονόπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης παρέχει ένα όριο για την παράμετρο πληθυσμού είτε από πάνω είτε από κάτω και έτσι παρέχει είτε ένα ανώτερο είτε ένα κατώτερο όριο στο μέγεθός της.

Οι τύποι για τον υπολογισμό του διαστήματος εμπιστοσύνης έχουν τη γενική μορφή:

CI = Εκτίμηση σημείου ± Περιθώριο σφάλματος

Εκτίμηση σημείου ± Κρίσιμη τιμή (z) × Τυπικό σφάλμα σημείου εκτίμησης

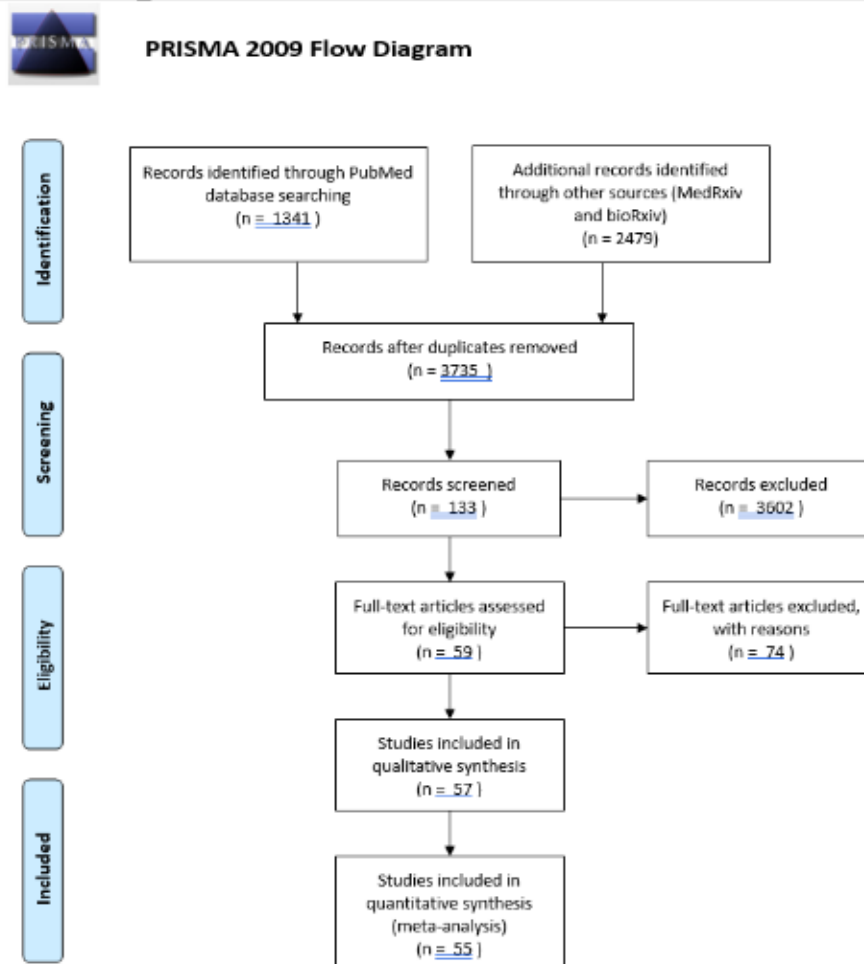
Η εκτίμηση σημείου αναφέρεται στη στατιστική που υπολογίζεται από δείγματα δεδομένων. Η κρίσιμη τιμή ή η τιμή z εξαρτάται από το επίπεδο εμπιστοσύνης και προέρχεται από τα μαθηματικά της τυπικής κανονικής καμπύλης. Το τυπικό σφάλμα εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος και τη διασπορά στη μεταβλητή που μας ενδιαφέρει [53].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Όσον αφορά την παρούσα μετα-ανάλυση και συστηματική ανασκόπηση, η αναζήτηση για την βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκε στην βάση δεδομένων PUBMED όπου το ερώτημα (query) ήταν (SARS-CoV-2 OR "Coronavirus disease 2019" OR COVID-19) AND antigen.

Μετά τη βιβλιογραφική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις 4 Δεκεμβρίου 2020 στις ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων Pubmed, MedRxiv και BioRxiv, λήφθηκαν 3.735 μοναδικά άρθρα (Εικόνα 30). Μετά την αναζήτηση περιλήψεων, την εξέταση των άρθρων και τον έλεγχο των κριτηρίων επιλογής, συναντήσαμε 55 άρθρα που συμπεριλάμβαναν 7.898 ατόμων με SARS-CoV-2 και 23.716 άτομα χωρίς SARS-CoV-2 (συνολικός αριθμός 31.614).



Εικόνα 30 PRISMA Flow Diagram

3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΛΕΤΩΝ

Από τις πενήντα πέντε μελέτες που συμπεριλήφθηκαν για την συστηματική ανασκόπηση και την μετα-ανάλυση, πενήντα μία μελέτες ([54]-[105]) περιλάμβαναν δεδομένα τόσο για τις περιπτώσεις όσο και για τις ομάδες ελέγχου, ενώ τέσσερις μελέτες ([106]-[109]) ανέφεραν αποτελέσματα μόνο για άτομα με λοίμωξη SARS-CoV-2. Ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 6) δείχνει τα χαρακτηριστικά των μελετών που περιλαμβάνονται. Όλες οι μελέτες ανέφεραν ότι η μόλυνση SARS-CoV-2 επιβεβαιώθηκε με qPCR της πρωτεΐνης E / S ή N σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Σε όλες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι για τον εντοπισμό ή τον ποσοτικό προσδιορισμό του αντιγόνου SARS-CoV-2. Πενήντα μία μελέτες μετρούσαν αθροιστικά αντιγόνο νουκλεοπρωτεΐνης (N), αντιγόνο 4 ακίδων (S) και 1 (ένα) S, E (φάκελο) M (μεμβράνη) αντιγόνο. Οι περισσότερες από τις μελέτες επικεντρώθηκαν σε ταχείες δοκιμές POC όπως ο ανοσοπροσδιορισμός πλάγιας ροής (LFIA) (43 μελέτες) ή ο ανοσοπροσδιορισμός φθορισμού (FIA) (11 μελέτες). Η χημειοφωταύγεια, μια γρήγορη μέθοδος που απαιτεί συνήθως ανάγνωση με τη βοήθεια ειδικού ανιχνευτή σε διαγνωστικό εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε σε τρεις μελέτες. Έξι μελέτες χρησιμοποίησαν τα ίδια δείγματα για να συγκρίνουν διαφορετικά κιτ από διαφορετικές εταιρείες. Τέλος, τρεις μελέτες χρησιμοποίησαν τέσσερις καινοτόμες μοναδικές τεχνικές που ανέπτυξαν τα ίδια τα εργαστήρια ([91], [102], [104]). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε όλες τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν είτε ο συνδυασμός στοματικών και ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων, είτε μόνο ρινοφαρυγγικών, είτε μόνο ρινικών, είτε μόνο λαρυγγικών, καθώς και δείγματα σάλιου ή πτυέλων. Σε σαράντα εννιά μελέτες ήταν σαφής ο διαχωρισμός του τύπου των δειγμάτων, ενώ σε επτά μελέτες συναντήθηκε ο συνδυασμός τύπων δειγμάτων, χωρίς να υπάρχουν δεδομένα για τον κάθε τύπο δείγματος ξεχωριστά. Τέλος, δεδομένα από 10 μελέτες σε ασυμπτωματικά άτομα και 10 μελέτες σε συμπτωματικά άτομα χρησιμοποιήθηκαν επίσης για να εξετασθούν οι διαφορές στη διαγνωστική ακρίβεια μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 6 Χαρακτηριστικά μελετών που συμπεριλήφθηκαν στην μετα-ανάλυση

Author	Country	Ag	Sample	Method	Kit name/Kit company	Cut off data	Rapid/Analyzer	Total	Cases	Controls
Gannon CK Mak	China	N	1.nsp 2.ts	1.LFIA 2.LFIA 3.LFIA	1. COVID-19 Ag Respi-Strip/ Coris Bioconcept, Belgium 2.NADAL COVID-19 Ag Test/Nal Von Minden GmbH, Germany 3.Standard Q COVID-19 Ag/SD Biosensor, Korea	up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30/30-40	Rapid	35	35	NA
Genay Pilarowski	San Francisco	N	Nsp	LFIA	BinaxNOWTM COVID-19 Ag Card (referred as Binax-CoV2)/ Abbott Diagnostics Scarborough, Inc, USA	Up to 30/up to 40/30-40	Rapid	878	26	852
Manuel Linares	Spain	N	Nsp	LFIA	Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Germany	Up to 40	Rapid	255	60	NA
Ankesh Gupta	India	N	Nsp	LFIA	Standard Q rapid antigen detection test/SD Biosensor, Inc., Gurugram	Up to 40	Rapid	330	77	253
Florence Fenollar	France	N	Nsp	LFIA	PANBIO COVID - 19 Ag rapid test device/Abbott, USA	Up to 40	Rapid	341	204	137
Aminah Nalumansi	Uganda	N	Nsp	LFIA	STANDARD Q COVID-19 Ag Test/SD - Biosensor, Republik of Korea	Up to 30/up to 40/30-40	Rapid	262	90	172
Parada-Ricart E	Spain	N	Nsp	FIA	2019-nCoV Antigen Rapid Test Kit (FIA)/ Shenzhen Bioeasy	Up to 40	Rapid/Analyzer	172	26	146

					Biotechnology CO LTD, China					
Jong-Hwan Lee	Korea	S	Nsp	LFIA	In-house test	Up to 40	Rapid/Analyzer	8	3	5
Francesco Cerutti	Italy	N	Nsp	LFIA	STANDARD Q COVID19 Ag/SD- Biosensor, RELAB, I	Up to 40	Rapid	330	109	221
<u>Bo Diao</u>	China	N	Nsp	FIA	In-house test	Up to 40	Rapid/Analyzer	502	356	146
Stephen Young	USA	N	Nsp	1.LFIA 2.FIA	1. BD Veritor™ System/Veritor 2. Sofia 2 SARS Antigen FIA/Quidel	Up to 40	1.Rapid/optiona l 2.Rapid/Analyze r	612	81	531
Flora Marzia Liotti	Italy	N	Nsp	FIA	STANDARD F COVID19 Ag (FIA)/ SD Biosensor, Suwon, South Korea	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20	Rapid/Analyzer	359	104	255
医薬・生 活衛生局 医療機器 審査管理 課 (Γραφείο Φαρμακευ τικής και Υγιεινής Ζωής Τμήμα διαχείριση ς εξετάσεων ιατρικών συσκευών)	Japan	N	Nsp	CLEIA	Lumipulse SARS- CoV-2 Ag/Fujirebio, Tokyo, Japan	Up to 40	Analyzer	325	24	301
Yosuke Hirotzu	Japan	N	Nsp	CLEIA	LUMIPULSE SARS-CoV-2 Ag kit/Fujirebio, Inc. (Tokyo, Japan)	Up to 40	Analyzer	313	58	255
Mayu Nagura- Ikeda	Japan	N	Ts	LFIA	Espline SARS- CoV-2/Fuji Rebio Inc	Up to 40	Rapid	103	84	19

Gannon CK Mak	Hong Kong	N	1.nsp/ts 2.ts	LFIA	BIOCREDIT COVID-19 Ag kit/RapiGEN Inc.	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30	Rapid/optional	160	51	109
Pascal Mertens	Belgium	N	Nsp	LFIA	COVID-19 Ag RespiStrip/Coris BioConcept	Up to 30/up to 40	Rapid	328	132	196
Laurent Blairon	Belgium	N	Nsp	LFIA	COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris Bioconcept, Gembloux, Belgium	Up to 40	Rapid	774	159	615
Lorena Porte	Chile	N	nsp/ts	FIA	2019-nCoV Antigen Rapid Test Kit (FIA)/ Bioeasy Biotechnology Co., Shenzhen, China	Up to 30	Rapid/Analyzer	127	82	45
Anaïs Scohy	Belgium	N	Nsp	LFIA	COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris BioConcept, Gembloux, Belgium	Up to 40	Rapid	148	106	62
Sidonie Lambert-Niclot	France	N	Nsp	LFIA	COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris BioConcept, Gembloux, Belgium	Up to 40	Rapid	138	94	44
Bo Diao	China	N	Nsp	FIA	In-house test	Up to 30/up to 40/30-40	Rapid	239	208	31
Thomas Weitzel	Chile	N	nsp/ts	1.LFIA 2.LFIA 3.FIA 4.FIA	1. Biocredit One Step SARS-CoV-2 Antigen Test/RapiGen 2. COVID-19 Antigen Rapid Test Device StrongStep® COVID-19	Up to 40/20-30	1.Rapid 2.Rapid 3.Rapid/Analyzer 4.Rapid/Analyzer	111	80	31

					Antigen Test/Liming bio 3. Huaketai New Coronavirus (SARS-CoV-2) N Protein Detection Kit (FIA)/ Savant 4. 2019- Novel Coronavirus (2019- nCoV) Ag Test (FIA)/ Bioeasy					
Eric T. Beck	Milwaukee	N	Nsp	FIA	Sofia SARS FIA test (SOFIA)/ Quidel, San Diego, CA	Up to 40	Rapid/Analyzer	346	61	285
Alexander Krüttgen	Germany	N	nsp	LFIA	SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test/Roche, Switzerland	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30/30-40	Rapid	150	75	75
Eliseo Albert	Spain	N	Nsp	LFIA	Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott Diagnostic GmbH, Jena, Germany	Up to 40	Rapid	412	54	358
Chutikarn Chaimayo	Thailand	N	nsp/ts	LFIA	Standard Q COVID-19 Ag test/SD Biosensor®, Chuncheongbuk-do, Republic of Korea	Up to 40	Rapid	454	60	394
Lukas Lanser	Austria	N	Nsp	LFIA	Panbio™ COVID-19 Ag Rapid test/Abbott, Chicago, Illionis	Up to 30/up to 40/30-40	Rapid	53	51	2
Mar Masiá	Spain	N	1.nsp 2.ts	LFIA	Panbio COVID-19 antigen Rapid Test Device (RTD)/ Abbott Rapid Diagnostic	Up to 40	Rapid	904	195	709

					Jena GmbH, Jena, Germany					
Hendrik Gremmels	The Netherlands/Aruba	N	Nsp	LFIA	Panbio COVID-19 Ag rapid test device/Abbott, Lake Country, IL, U.S.A	Up to 40	Rapid	2948	202	2746
Ignacio Torres	Spain	N	Nsp	LFIA	Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott Diagnostics, Jena, Germany	Up to 40	Rapid	634	79	555
L.J. Krüger	Germany	N	Nsp	LFIA	Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott Diagnostics, Jena, Germany	Up to 30/up to 40	Rapid	1108	106	1002
Pavel Drevinek	Czech Republic	N	Nsp	1.LFIA 2.FIA	1. Panbio Covid-19 Ag Rapid Test/Abbott, Germany 2. Standard F Covid-19 Ag FIA/SD Biosensor, Republic of Korea	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30/30-40	1.Rapid 2.Rapid/Analyzer	591	223	368
Jean Marc Schwob	Switzerland	N	Nsp	1.LFIA 2.LFIA 3.LFIA	1. STANDARD Q COVID-19 Ag Test/SD - Biosensor, Republik of Korea 2. Panbio COVID-19 Ag Test/Abbott, Germany 3. COVID-VIRO/AAZ-LMB	Up to 40	Rapid	928	372	556
Alice Berger	Switzerland	N	Nsp	1.LFIA 2.LFIA	1. Panbio Covid-19 Ag Rapid Test device/Abbott Rapid Diagnostics 2. Standard Q Ag-RDT/SD Biosensor, Roche	Up to 40	Rapid	1064	315	749
Paloma Merino-Amador	Spain	N	Nsp	LFIA	Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott	Up to 40	Rapid	958	359	599

					Diagnostic GmbH, Jena, German					
Zsófia Iglói	The Netherlands	N	Nsp	LFIA	SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test/Roche (SD Biosensor)	Up to 40	Rapid	970	186	784
Victor M. Corman	Germany	N	nsp	1.LFIA 2.LFIA 3.LFIA 4.LFIA 5.LFIA 6.LFIA 7.LFIA	1. Panbio COVID-19 Ag Test/Abbott, Germany 2. BIOCREDIT COVID-19 Ag kit/RapiGEN Inc. 3. Coronavirus Ag Rapid Test Cassette (swab)/ Healgen 4. COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris Bioconcept, Gembloux, Belgium 5. RIDA®QUICK SARS-CoV-2 antigen/R-Biopharm 6. NADAL COVID19-Ag Test/NAL von minden 7. SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test/Roche/SD Biosensor	Up to 40	Rapid	150	115	35
Oana Bulilete	Spain	N	Nsp	LFIA	Panbio™ Ag-RDT/Abbott Diagnostic GmbH, Jena, Germany	Up to 40	Rapid	1362	140	1222
Keying Guo	Jeddah	S	1.nsp 2.ts	OECT	In-house	Up to 40	Rapid	26	12	14
Abdulkarim Abdulrahman	Bahrain	N	Nsp	LFIA	Panbio COVID 19 antigen rapid test device/Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Germany	Up to 30	Rapid	4183	733	3450

<u>Isao Yokota</u>	Japana	N	Nsp,ts	1.LFIA 2.CLEIA	1. Espline SARS-CoV-2/Fujirebio, Tokyo, Japan 2. Lumipulse SARS-CoV-2 Ag kit/Fujirebio, Tokyo, Japan	Up to 30/up to 40/20-30	1.Rapid 2.Analyzer	34	34	NA
Beatrice Nash	USA/Brazil	1.N 2.S	Nsp	LFIA	In-house	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30/30-40	Rapid	311	172	139
Andrea Alemany	Spain	N	nsp	LFIA	Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device/Abbott Diagnostic GmbH, Jena, German	Up to 20/up to 30/0-20/20-30/30-40	Rapid	1406	951	455
L.Courtelle mont	France	N	Nsp	LFIA	COVID-VIRO®/AAZ, Boulogne Billancourt, France	Up to 30/up to 40	Rapid	226	117	109
Andreas K. Lindner	Germany	N	Nsp	LFIA	STANDARD Q COVID-19 Ag Test/SD Biosensor, Inc. Gyeonggi-do, Korea	Up to 40	Rapid	578	78	500
N. Van der Moeren	The Netherlands	N	Nsp	LFIA	BD Veritor™ System/Veritor	Up to 20/up to 30/up to 40/0-20/20-30	Rapid/Optional	351	17	334
Lorena Porte	Chile	N	nsp/ts	1.FIA 2.FIA	1. SOFIA SARS Antigen FIA/Quidel Corporation, San Diego, CA, USA	Up to 30/up to 40/30-40	Rapid/Analyzer	91	59	32

					2. STANDARD® F COVID-19 Ag FIA/SD Biosensor Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea					
Andrew Pekosz	Maryland	N	Nsp	LFIA	BD Veritor™ System/Veritor	Up to 40	Rapid/Optional	251	28	223
L.J. Krüger	Germany/UK	N	nsp/ts	1.FIA 2.LFIA 3.LFIA	1. 2019-nCoV Ag Fluorescence Rapid Test Kit/Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co. Ltd., Guangdong Province, China 2. COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris Bioconcept, Gembloux, Belgium 3. STANDARD Q COVID-19 Ag Test/SD Biosensor, Inc. Gyeonggi-do, Korea	Up to 30/up to 40/30-40	1.Rapid/Analyzer 2.Rapid 3.Rapid	2407	72	2335
Naveen K. Singh	San Diego	S	Nsp	ECGLuS	In-house	Up to 40	Rapid	24	16	8
Nicolas Veyrenchea	France	N	nsp	LFIA	COVID-19 Ag Respi-Strip/Coris BioConcept®, Gembloux, Belgium	Up to 30/up to 40	Rapid	65	45	20
Bartolomeo Della Ventura	Italy	S+E +M	Nsp/ts	CBS	In-house	Up to 40	Analyzer	94	45	49
Victor Herrera	Florida	N	Nsp	LFIA	AdventHealth Centra Care	Up to 40	Rapid	1669	486	1183
Katsuhito Kashiwagi	Japan	N	1.nsp 2.ts	LFIA	Espline SARS-CoV-2/Fujirebio Inc., Tokyo	Up to 40	Rapid	16	16	NA

3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΔΟΣΕΩΝ

Η διαγνωστική απόδοση ταχείων δοκιμών LFIA (έναντι του αντιγόνου της νουκλεοπρωτεΐνης N) σε θετικά δείγματα PCR με ίσους ή λιγότερους από 20 κύκλους qPCR αξιολογήθηκε σε 12 μελέτες, με 21-30 κύκλους σε 15 μελέτες και με 31-40 κύκλους σε 10 μελέτες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3α (και στον Πίνακα 7), η ευαισθησία των δοκιμών LFIA από ρινοφαρυγγικά (NSP) δείγματα που ήταν PCR θετικά μετά από λιγότερο από 20 κύκλους ήταν 0,963 (95% CI: 0,942, 0,984) και σε δείγματα που ήταν θετικά για 20-30 κύκλους ήταν 0,830(95% CI: 0,742, 0,912). Ωστόσο, μειώθηκε σημαντικά στο 0,256 (95% CI: 0,006, 0,507) για 30-40 κύκλους. Όσον αφορά την ευαισθησία μέχρι τους 30 κύκλους αυτή ήταν 0,867(95% CI: 0,821, 0,912) και όπως είναι αναμενόμενο μειώνεται μέχρι τους 40 κύκλους όπου είναι 0,702(95% CI: 0,648, 0,756). Οι γρήγορες δοκιμές LFIA χρησιμοποιώντας δείγματα λαρυγγικά ή σάλιου (TS) έχουν χειρότερη απόδοση όσον αφορά την ευαισθησία με υψηλότερη τιμή 0,765 (95% CI: 0,522, 1,000) για δείγματα θετικά μέχρι 20 κύκλους qPCR και χαμηλότερη 0,074 (95% CI: 0,000, 0,173) όταν οι κύκλοι qPCR ήταν περισσότεροι από 30. Όσον αφορά την ευαισθησία κάτω από 30 κύκλους αυτή παραμένει χαμηλή και ίση με 0,517(95% CI: 0,230, 0,803) και γίνεται ακόμα πιο χαμηλή κάτω από τους 40 κύκλους με τιμή 0,327 (95% CI: 0,194, 0,460). Η ειδικότητα που βασίζεται σε δείγματα NSP (Σχήμα 3β) είναι πολύ υψηλή σε όλους τους κύκλους qPCR, που κυμαίνονται από 0,994 (95% CI: 0,979, 1,00) έως 0,911 (95% CI: 0,852, 0,970). Η ειδικότητα δεν μπορούσε να εκτιμηθεί πλήρως σε δείγματα TS επειδή οι σχετικές μελέτες έδωσαν πληροφορίες μόνο για άτομα με λοίμωξη SARS-CoV-2. Η μόνη πληροφορία που αντλούμε για την ειδικότητα σε δείγματα TS προέρχεται από μελέτες με όριο κύκλων τους 40 και έχει τιμή ίση με 0,998 (95% CI: 0,991, 1,000) (Σχήμα 3β).

Αναφορικά με την μέθοδο FIA διαθέτουμε δεδομένα για ρινοφαρυγγικά δείγματα, καθώς και για συνδυαστικά δείγματα (ρινοφαρυγγικά-λαρυγγικά). Όσον αφορά τα αμιγώς ρινοφαρυγγικά δείγματα, παρουσιάζεται μεγάλη ευαισθησία στους 20 και στους 30 κύκλους με τιμές 0,921 (95% CI: 0,851, 0,991) και 0,931 (95% CI: 0,823, 1,000), αντίστοιχα. Όπως είναι αναμενόμενο η τιμή της ευαισθησίας πέφτει στους 40 κύκλους καθώς και στο διάστημα 30-40 με τιμές 0,740(95% CI: 0,649, 0,831) και 0,311(95% CI: 0,000, 0,767), αντίστοιχα (Σχήμα 4α). Η ειδικότητα κυμαίνεται σε υψηλές τιμές από

0.984 (95% CI: 0.941, 1.000) μέχρι 0.981 (95% CI: 0.958, 1.000) (Σχήμα 4β). Σχετικά με το συνδυασμό δειγμάτων, λαμβάνουμε δεδομένα μόνο για τους 30 και τους 40 κύκλους, όπου οι τιμές της ευαισθησίας για το διάστημα 0-30 είναι 0.311 (95% CI: 0.00, 0.767), για το διάστημα 0-40 είναι 0.945 (95% CI: 0.905, 0.985) και τέλος για το διάστημα 30-40 είναι 0.786 (95% CI: 0.473, 1.000) (Σχήμα 4α). Η ειδικότητα κυμαίνεται σε υψηλές τιμές από 0,984 (95% CI: 0.941, 1.000) έως και 0,937 (95% CI: 0.920, 0.954) (Σχήμα 4β).

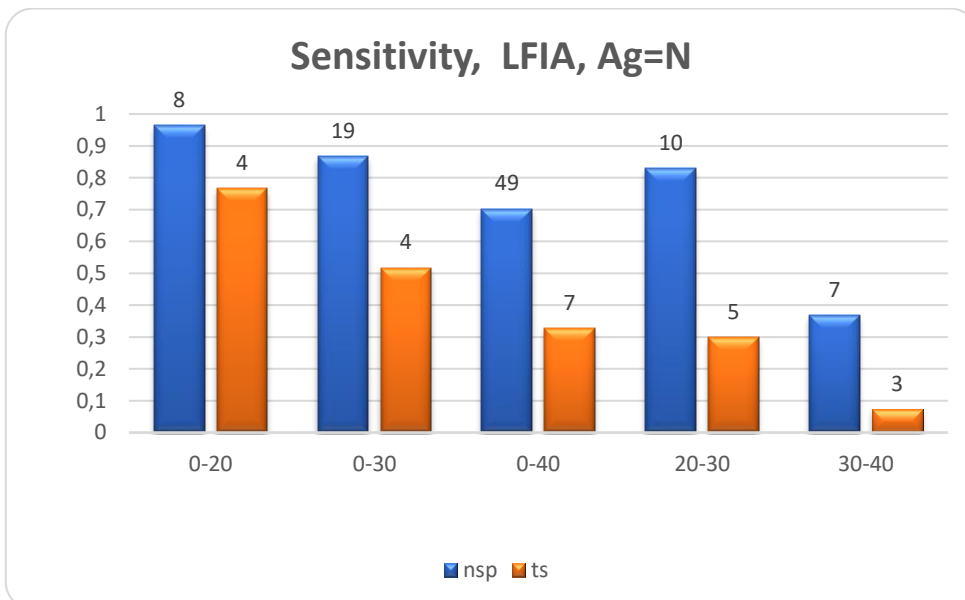
Τα δεδομένα για άλλες μεθόδους δοκιμής αντιγόνου (CLEIA, καινοτόμες εργαστηριακοί μέθοδοι) ήταν ελλιπή ως προς τους κύκλους της PCR για να επιτρέψουν αναλύσεις.

Πίνακας 7 Αποτελέσματα μετα-ανάλυσης

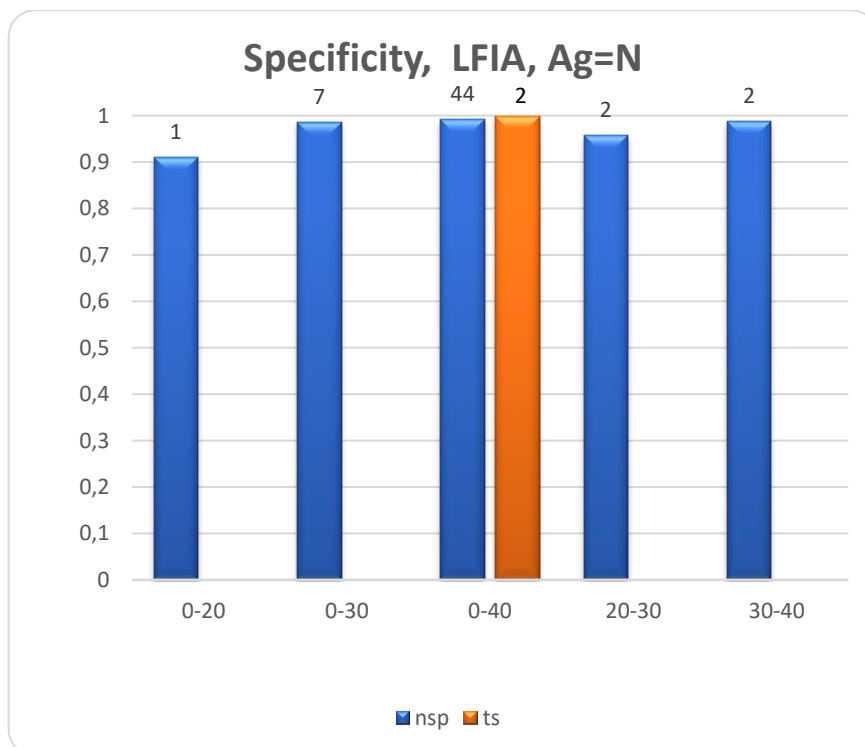
Sample	Ag	Method	Cut off	Studies/Patients/Controls	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	studies w/o controls
nsp	N	LFIA	0-20	8/463/90	0.963 (0.942, 0.984)	0.911 (0.852, 0.970)	7
nsp	N	LFIA	0-30	19/7336/4919	0.867 (0.821, 0.912)	0.986 (0.972, 1.000)	12
nsp	N	LFIA	0-40	49/19584/14881	0.702 (0.648, 0.756)	0.992 (0.988, 0.996)	5
nsp	N	LFIA	20-30	10/1913/545	0.830 (0.742, 0.918)	0.957 (0.890, 1.000)	8
nsp	N	LFIA	30-40	10/1263/942	0.256 (0.006, 0.507)	0.994 (0.979, 1.00)	5
ts	N	LFIA	0-20	4/42/NA	0.765 (0.522, 1.000)	NA	4
ts	N	LFIA	0-30	4/43/NA	0.517 (0.230, 0.803)	NA	4
ts	N	LFIA	0-40	7/846/509	0.327 (0.194, 0.460)	0.998 (0.991, 1.000)	5
ts	N	LFIA	20-30	5/91/NA	0.298 (0.052, 0.544)	NA	5
ts	N	LFIA	30-40	3/9/NA	0.074 (0.000, 0.173)	NA	3
nsp-ts	N	LFIA	0-30	3/91/NA	0.726 (0.283, 1.000)	NA	3
nsp-ts	N	LFIA	0-40	5/2243/2049	0.627 (0.381, 0.873)	0.977 (0.956, 0.998)	0

nsp-ts	N	LFIA	20-30	2/58/10	0.072 (0.000, 0.145)	0.900 (0.714, 1.000)	1
nsp-ts	N	LFIA	30-40	2/34/NA	0.589 (0.421, 0.756)	NA	2
nsp	S	LFIA	0-40	2/129/54	0.849 (0.768, 0.929)	0.862 (0.771, 0.954)	0
nsp	N	FIA	0-20	2/56/NA	0.921 (0.851, 0.991)	NA	2
nsp	N	FIA	0-30	3/269/31	0.931 (0.823, 1.000)	0.984 (0.941, 1.000)	2
nsp	N	FIA	0-40	8/2570/1549	0.740 (0.649, 0.831)	0.981 (0.958, 1.000)	0
nsp	N	FIA	30-40	2/246/31	0.311 (0.00, 0.767)	0.984 (0.941, 1.000)	1
nsp-ts	N	FIA	0-30	4/195/77	0.945 (0.905, 0.985)	0.975 (0.944, 1.000)	1
nsp-ts	N	FIA	0-40	5/929/775	0.786 (0.473, 1.000)	0.937 (0.920, 0.954)	1
nsp-ts	N	FIA	30-40	3/72/32	0.792 (0.434, 1.000)	0.969 (0.926, 1.000)	0
nsp	N	CLEIA	0-40	3/655/556	0.859 (0.606, 1.000)	0.983 (0.955, 1.000)	0
ts	S	Other	0-40	2/39/15	0.852 (0.488, 1.000)	0.941 (0.829, 1.000)	1
nsp-ts	S+E+M	Other	0-40	1/94/49	0.947 (0.909, 0.986)	0.963 (0.926, 0.999)	1

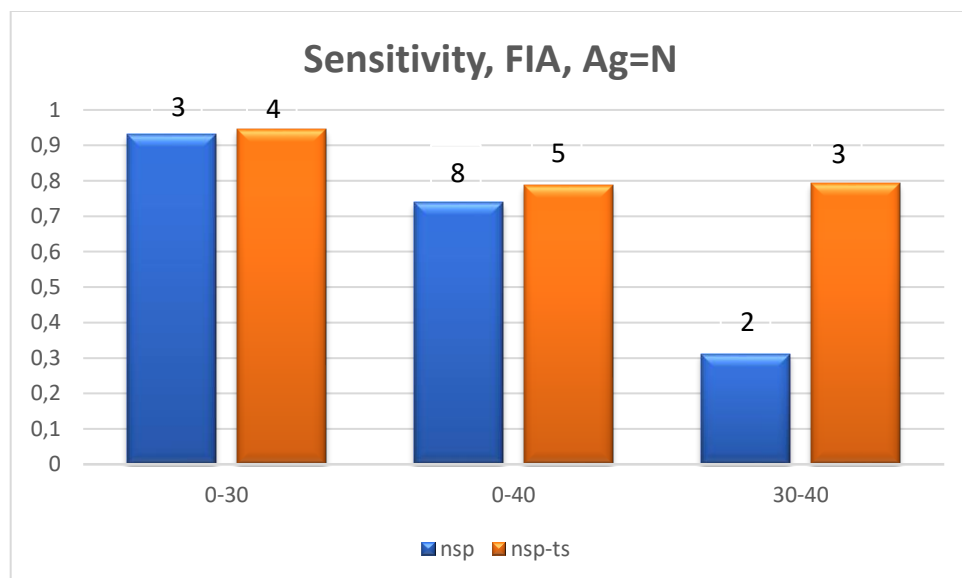
Σχήμα 3α Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ευαισθησία σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



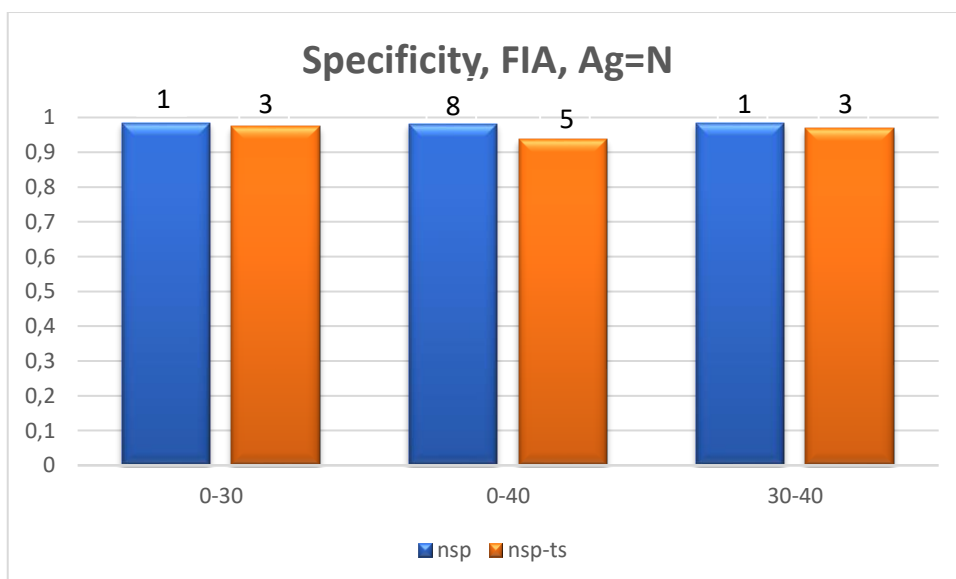
Σχήμα 4β Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ειδικότητα σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Σχήμα 4α Απόδοση του FIA όσον αφορά την ευαισθησία σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Σχήμα 4β Απόδοση του FIA όσον αφορά την ειδικότητα σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



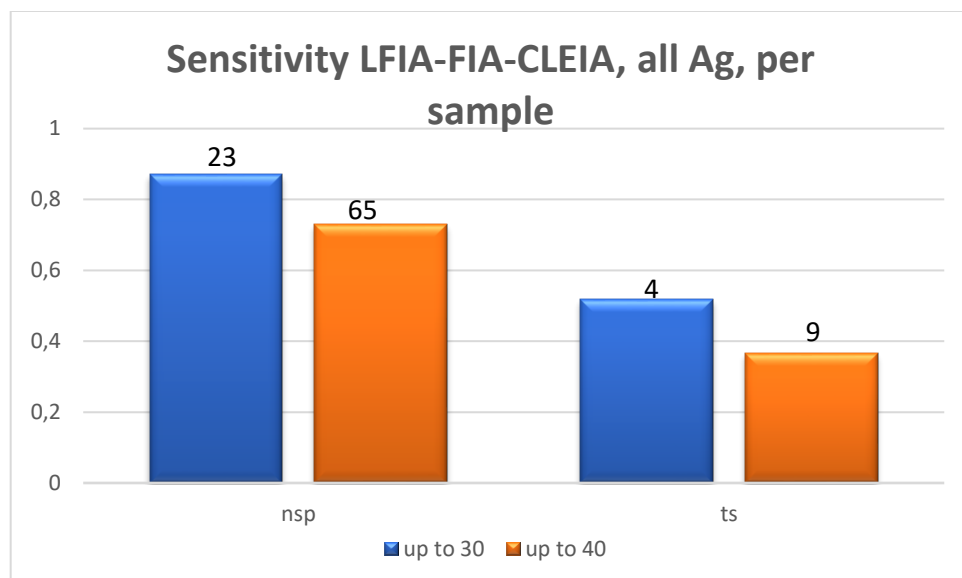
Η μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε αθροιστικά με τις μεθόδους LFIA, FIA και CLEIA, μετρώντας και τα αντιγόνα N και S και στρωματοποιήθηκε σύμφωνα με δύο τιμές αποκοπής (30 και 40), έδειξε ότι οι δοκιμές αντιγόνου παρουσίασαν την υψηλότερη ευαισθησία (0,870, 95% CI 0,831, 0,910) σε δείγματα NSP βρέθηκαν θετικά με PCR και ≤ 30 κύκλους. Η αθροιστική συνολική ευαισθησία συμπεριλαμβανομένων των κύκλων

≤ 40 είναι σημαντικά χαμηλότερη (0,729, 95% CI 0,680, 0,777) υποδηλώνοντας ότι οι δοκιμές αντιγόνου είναι πιο αξιόπιστες όταν τα δείγματα περιέχουν υψηλότερα ιικά φορτία. Και πάλι, η δοκιμή αντιγόνου των δειγμάτων NSP ξεπέρασε αυτή των δειγμάτων TS. Η ειδικότητα ήταν υψηλή (περίπου 99%) σε όλες τις περιπτώσεις όπου υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα (Σχήμα 5α, Σχήμα 5β, Πίνακας 8). Ο Πίνακας 8 περιλαμβάνει τα αποτελέσματα των μελετών μόνο για όρια αποκοπής 30 και 40, καθώς περιλαμβάνει και συνδυασμούς των μεθόδων.

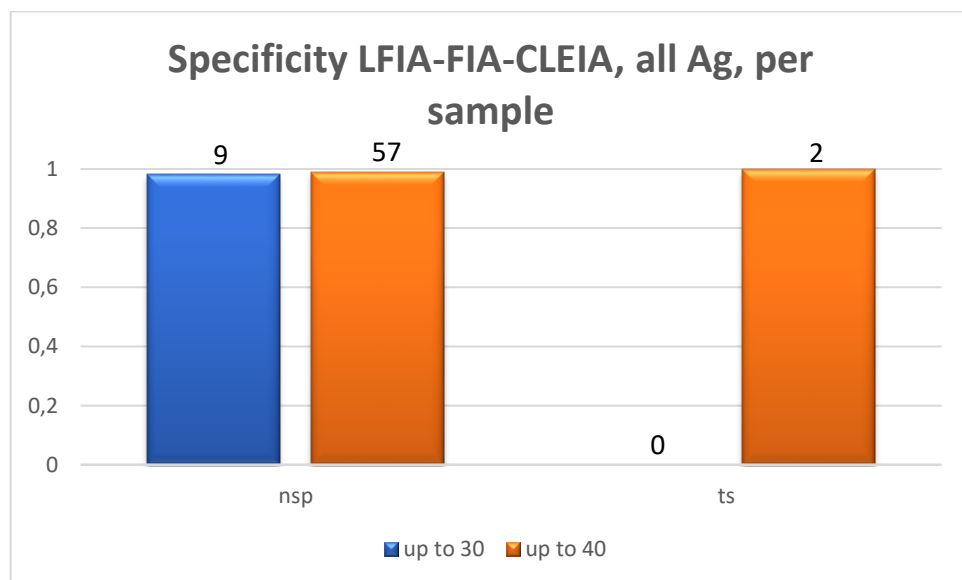
Πίνακας 8 Συνδυασμοί μεθόδων, δειγμάτων και ορίων αποκοπής

Sample	Ag	Method (LFIA, FIA, CLEIA)	Cutoff	Studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	studies w/o controls
Nsp	N,S	LFIA or FIA or CLEIA	30	23	0.870 (0.831, 0.910)	0.981 (0.960, 1.000)	14
Nsp	N,S	LFIA or FIA or CLEIA	40	65	0.729 (0.680, 0.777)	0.990 (0.986, 0.995)	8
Ts	N,S	LFIA or FIA or CLEIA	30	4	0.517 (0.230, 0.803)	-	4
Ts	N,S	LFIA or FIA or CLEIA	40	9	0.365 (0.225, 0.505)	0.998 (0.991, 1.000)	7
Nsp	N,S	LFIA or FIA	30	23	0.870 (0.831, 0.910)	0.981 (0.960, 1.000)	14
Nsp	N,S	LFIA or FIA	40	62	0.725 (0.676, 0.775)	0.990 (0.986, 0.995)	7
Ts	N,S	LFIA or FIA	30	4	0.517 (0.230, 0.803)	-	4
Ts	N,S	LFIA or FIA	40	8	0.316 (0.197, 0.436)	0.998 (0.991, 1.000)	6
Nsp	N,S	LFIA	30	20	0.865 (0.822, 0.909)	0.980 (0.958, 1.000)	12
Nsp	N,S	LFIA	40	54	0.723 (0.666, 0.779)	0.991 (0.987, 0.996)	7
Ts	N,S	LFIA	30	4	0.517 (0.230, 0.803)	-	4
Ts	N,S	LFIA	40	8	0.316 (0.197, 0.436)	0.998 (0.991, 1.000)	6
Nsp	N,S	FIA	30	3	0.931 (0.823, 1.000)	0.984 (0.941, 1.000)	2
Nsp	N,S	FIA	40	8	0.740 (0.649, 0.831)	0.981 (0.958, 1.000)	0
Ts	N,S	FIA	30	0	-	-	0
Ts	N,S	FIA	40	0	-	-	0
Nsp	N,S	CLEIA	30	0	-	-	0
Nsp	N,S	CLEIA	40	3	0.859 (0.606, 1.000)	0.983 (0.955, 1.000)	1
Ts	N,S	CLEIA	30	0	-	-	0
Ts	N,S	CLEIA	40	1	0.824 (0.642, 1.000)	-	1

Σχήμα 5α Απόδοση όλων των μεθόδων ως προς την ευαισθησία σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικά κλινικά δείγματα σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



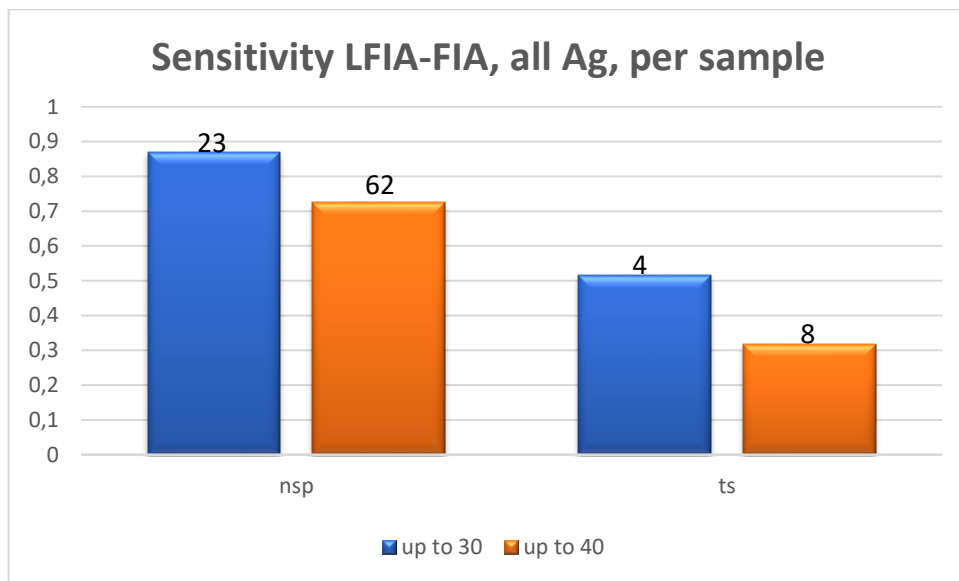
Σχήμα 5β Απόδοση όλων των μεθόδων ως προς την ειδικότητα σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικά κλινικά δείγματα σε διαφορετικές τιμές αποκοπής των κύκλων PCR. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



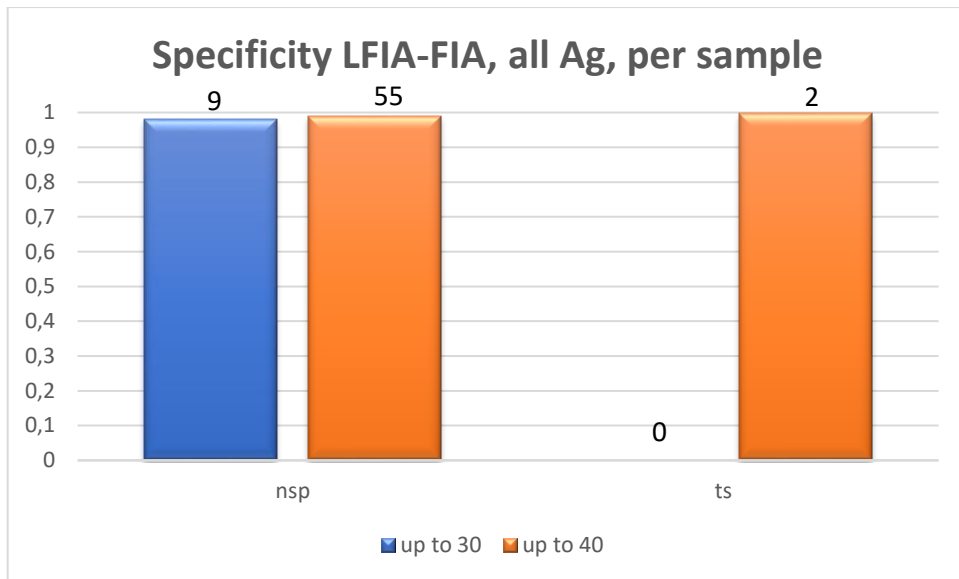
Από την μετα-ανάλυση που συμπεριλαμβάνει μεθόδους LFIA, FIA, έναντι και των δυο αντιγόνων συνολικά N και S και όρια αποκοπής 30 και 40, αποδείχθηκε ότι οι δοκιμές αντιγόνου παρουσίασαν την υψηλότερη ευαισθησία (0,870, 95% CI 0,831, 0,910) για \leq 30 κύκλους του qPCR και σε δείγματα NSP . Η αθροιστική συνολική ευαισθησία για

αριθμό κύκλων μέχρι και 40 είναι σημαντικά χαμηλότερη (0,725, 95% CI 0,676, 0,775) υποδηλώνοντας ότι οι δοκιμές αντιγόνου είναι πιο αξιόπιστες όταν τα δείγματα περιέχουν υψηλότερα ιικά φορτία. Και πάλι, η δοκιμή αντιγόνου των δειγμάτων NSP ξεπέρασε αυτή των δειγμάτων TS. Η ειδικότητα ήταν υψηλή (περίπου 99%) σε όλες τις περιπτώσεις όπου υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα (Σχήμα 6α, Σχήμα 6β).

Σχήμα 6α Απόδοση όλου του LFIA συν FIA όσον αφορά την ευαισθησία σε αντίθεση με την PCR σε διαφορετικά κλινικά δείγματα σε διαφορετικές τιμές αποκοπής Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



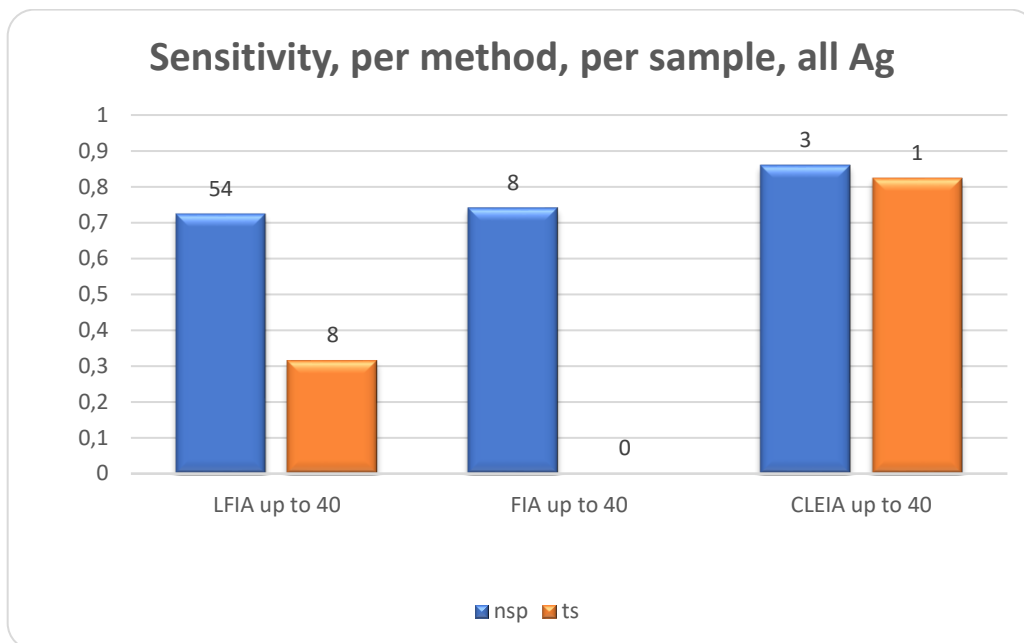
Σχήμα 6β Απόδοση όλου του LFIA συν FIA όσον αφορά την ειδικότητα σε αντίθεση με την PCR σε διαφορετικά κλινικά δείγματα σε διαφορετικές τιμές αποκοπής Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



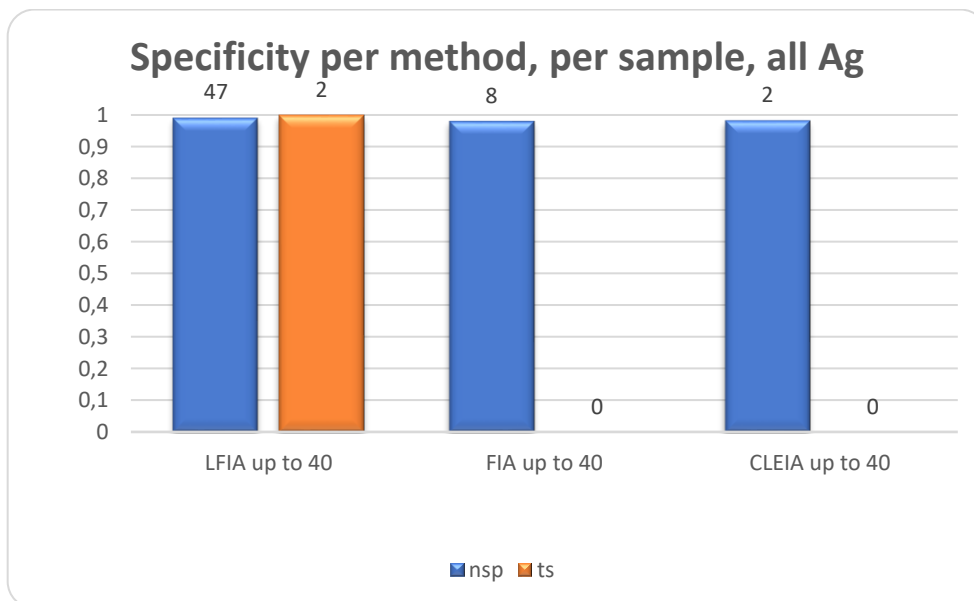
Για δείγματα με θετικά αποτελέσματα PCR και λιγότερους από 40 κύκλους σε ρινοφαρυγγικά δείγματα, η συνολική ευαισθησία του CLEIA (0.859, 95% CI: 0.606, 1.000) είναι καλύτερη από εκείνη του LFIA και FIA σε σύγκριση με ευαισθησία (0.702, 95% CI: 0.648, 0.756) και ευαισθησία (0.740, 95% CI: 0.649, 0,831), αντίστοιχα. Δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για την απόδοση του CLEIA σε θετικά δείγματα με PCR σε λιγότερο από 30 κύκλους. Η ειδικότητα ήταν και πάλι υψηλή σε όλες τις περιπτώσεις, αν και λόγω του μικρού αριθμού των συμπεριλαμβανόμενων μελετών σε ορισμένες υποομάδες, αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να έχουν κάποια αβεβαιότητα (Σχήμα 7α, Σχήμα 7β).

Ακόμη, να σημειωθεί πως στις καινούργιες εργαστηριακές μεθόδους που βρέθηκαν η ευαισθησία και η ειδικότητα παραμένουν υψηλά ακόμα και στους 40 κύκλους με τιμές να κυμαίνονται από 0,947 (95% CI: 0,909, 0,986) μέχρι και 0,852 (95% CI: 0,488, 1,00) για την ευαισθησία και από 0.963 (95% CI: 0.926, 0.999) μέχρι και 0.941 (95% CI: 0.829, 1.000) για την ειδικότητα.

Σχήμα 7α Σύγκριση της απόδοσης διαφορετικών μεθόδων με βάση το αντιγόνο (LFIA, FIA, CLEIA) όσον αφορά την ευαισθησία σε σύγκριση με την PCR σε 40 κύκλους. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Σχήμα 7β Σύγκριση της απόδοσης διαφορετικών μεθόδων (LFIA, FIA, CLEIA) όσον αφορά την ειδικότητα σε σύγκριση με την PCR σε 40 κύκλους. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Υπήρχαν δεδομένα για τον υπολογισμό της ευαισθησίας τεστ LFIA σε δείγματα NSP ξεχωριστά για συμπτωματικά και ασυμπτωματικά άτομα. Η μετα-ανάλυση έντεκα μελετών έδειξε ότι η ευαισθησία του LFIA σε συμπτωματικούς ασθενείς ήταν υψηλότερη από εκείνη σε ασυμπτωματικά άτομα, τόσο για θετικά δείγματα PCR με λιγότερους από 30 κύκλους όσο και με λιγότερους από 40 κύκλους [0,887 (95% CI: 0.828, 0.947) και 0,751 (95% CI: 0.654, 0.847) έναντι 0,613 (95% CI: 0.491, 0.734) και 0,551 (95% CI: 0.385, 0.716)] (Σχήμα 8α, Σχήμα 8β, Σχήμα 9α, Σχήμα 9β, Πίνακας 9α, Πίνακας 9β). Αυτές οι εκτιμήσεις βασίζονται σε μικρό αριθμό μελετών και συνεπώς υπόκεινται σε υψηλή αβεβαιότητα. Η ειδικότητα ήταν πολύ υψηλή (~ 99%).

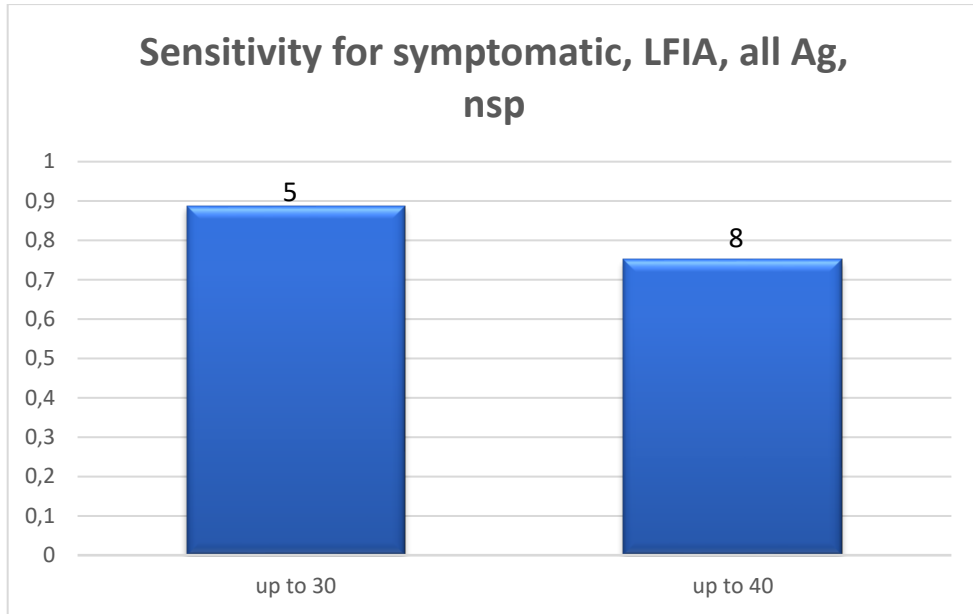
Πίνακας 9α Αποτελέσματα για συμπτωματικούς ασθενείς με διαφορετικές τιμές αποκοπής

Sample	Ag	Method	Cutoff	Studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Studies w/o controls
nsp	N	LFIA	30	5	0.887 (0.828, 0.947)	0.990 (0.965, 1.000)	3
nsp	N	LFIA	40	8	0.751 (0.654, 0.847)	0.992 (0.981, 1.000)	0

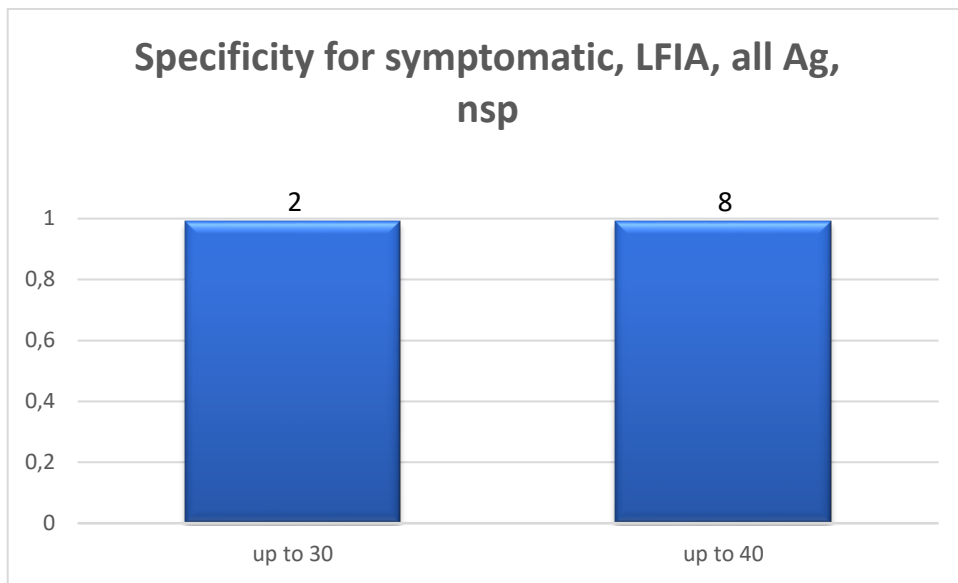
Πίνακας 9β Αποτελέσματα για ασυμπτωματικούς ασθενείς με διαφορετικές τιμές αποκοπής

Sample	Ag	Method	Cutoff	Studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Studies w/o controls
nsp	N	LFIA	30	2	0.613 (0.491, 0.734)	-	2
nsp	N	LFIA	40	8	0.551 (0.385, 0.716)	0.991 (0.977, 1.000)	1

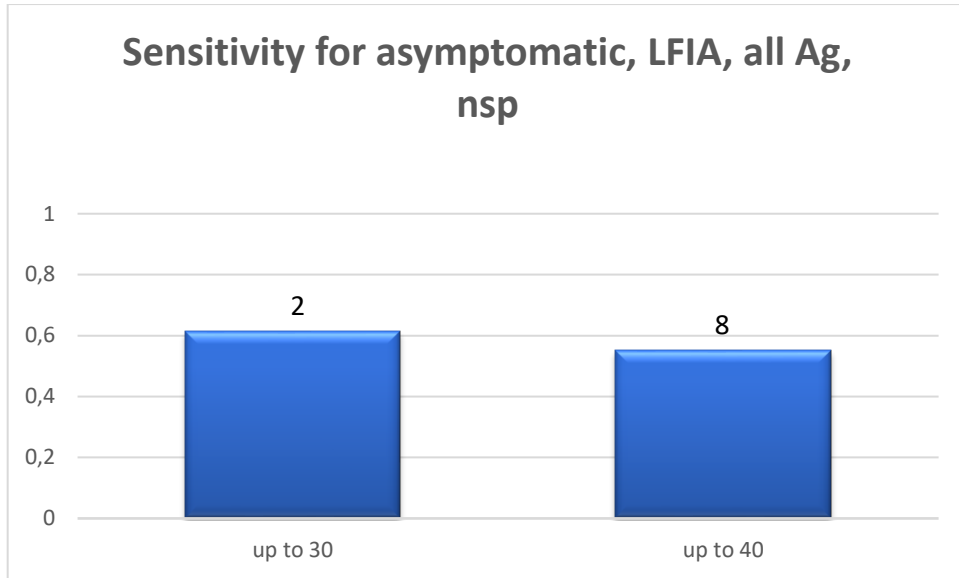
Σχήμα 8α Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ευαισθησία στα δείγματα NSP σε συμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



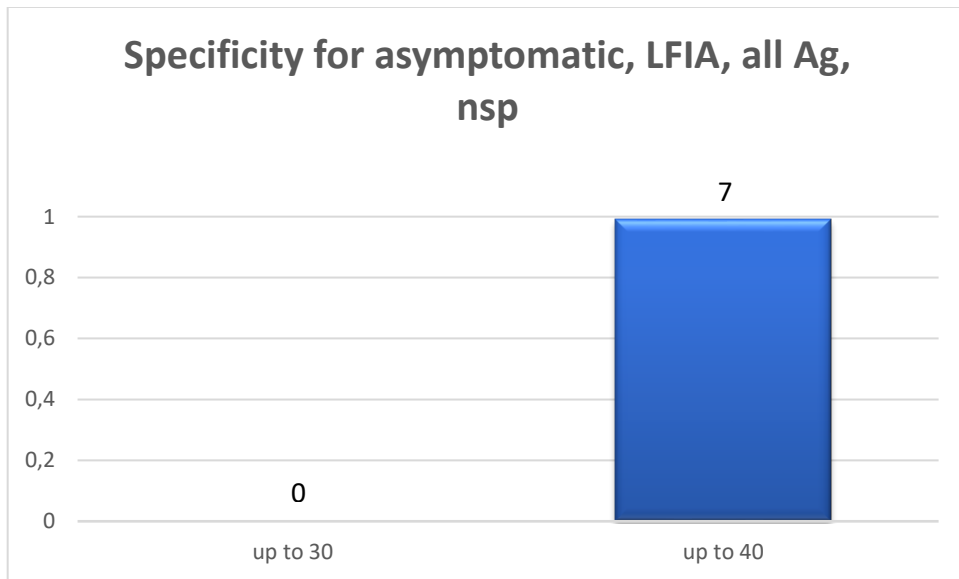
Σχήμα 8β Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ειδικότητα στα δείγματα NSP σε συμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



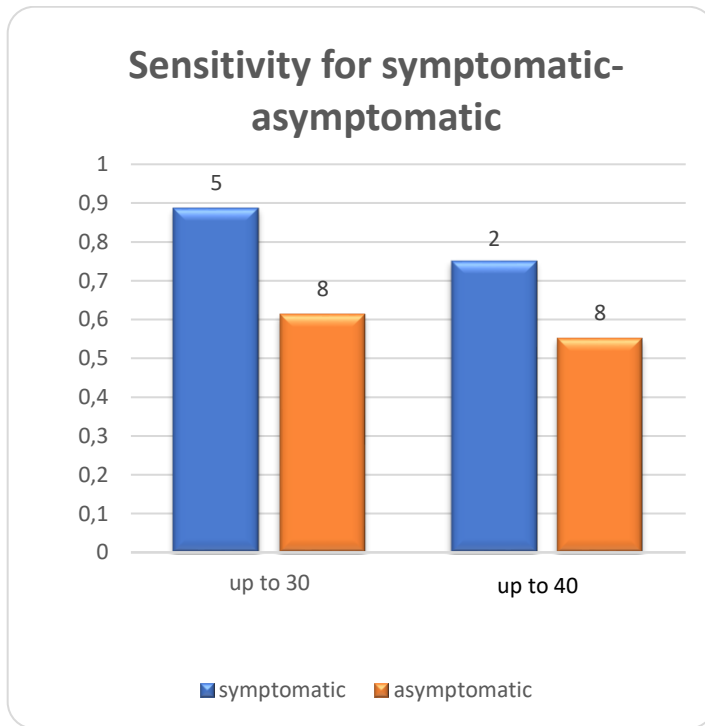
Σχήμα 9α Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ευαισθησία στα δείγματα NSP σε ασυμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



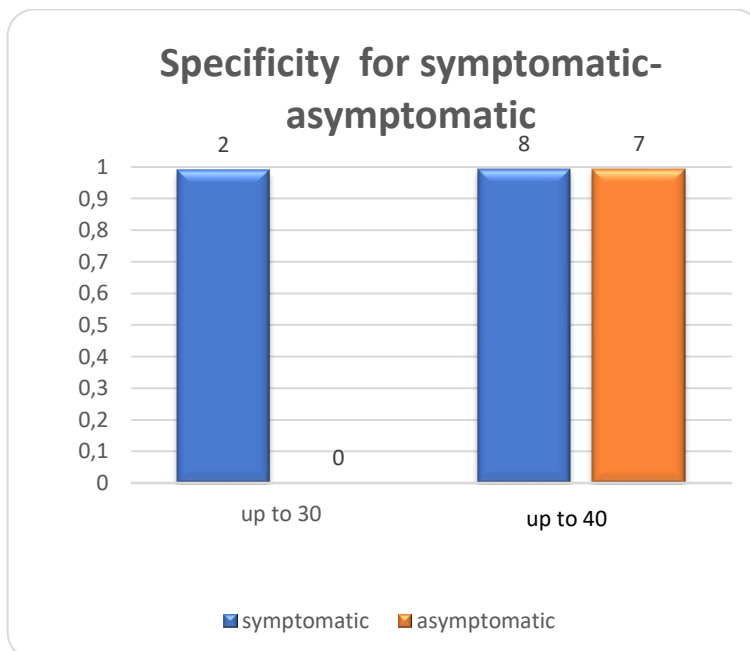
Σχήμα 9β Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ειδικότητα στα δείγματα NSP σε ασυμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Σχήμα 10α Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ευαισθησία στα δείγματα NSP σε συμπτωματικά και ασυμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



Σχήμα 10β Απόδοση του LFIA όσον αφορά την ειδικότητα στα δείγματα NSP σε συμπτωματικά και ασυμπτωματικά άτομα, σε σύγκριση με την PCR σε διαφορετικές τιμές αποκοπής. Οι τιμές πάνω από τις μπάρες δείχνουν τον αριθμό των μελετών με τις οποίες έγινε μετα-ανάλυση.



3.4. QUADAS

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2.2 το QUADAS είναι ένα εργαλείο για την ποιοτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της συστηματικής ανασκόπησης και της μετα-ανάλυσης. Ο κύριος λόγος που χρησιμοποιείται το QUADAS είναι για να αποφευχθούν φαινόμενα μεροληψίας. Στον Πίνακα 10 παρατηρούμε το QUADAS για τις μελέτες (55) που λήφθηκαν υπόψιν στην παρούσα μετα-ανάλυση.

Πίνακας 10 QUADAS

	YES	NO	UNCLEAR
1. Was the spectrum of patients representative of the patients who will receive the test in practice?	(55)	(-)	(-)
2. Were selection criteria clearly described?	(55)	(-)	(-)
3. Is the reference standard likely to correctly classify the target condition?	(55)	(-)	(-)
4. Is the time period between reference standard and index test short enough to be reasonably sure that the target condition did not change between the two tests?	(50)	(-)	(5)
5. Did the whole sample or a random selection of the sample, receive verification using a reference standard of diagnosis?	(55)	(-)	(-)
6. Did patients receive the same reference standard regardless of the index test result?	(32)	(10)	(13)
7. Was the reference standard independent of the index test (i.e., the index test did not form part of the reference standard)?	(55)	(-)	(-)
8. Was the execution of the index test described in sufficient detail to permit replication of the test?	(49)	(1)	(5)
9. Was the execution of the reference standard described in sufficient detail to permit its replication?	(42)	(2)	(11)
10. Were the index test results interpreted without	(22)	(1)	(32)

knowledge of the results of the reference standard?			
11. Were the reference standard results interpreted without knowledge of the results of the index test?	(17)	(1)	(37)
12. Were the same clinical data available when test results were interpreted as would be available when the test is used in practice?	(15)	(-)	(40)
13. Were uninterpretable/ intermediate test results reported?	(9)	(44)	(2)
14. Were withdrawals from the study explained?	(55)	(-)	(-)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το τρίπτυχο διαγνωστική δοκιμασία-ιχνηλάτηση-απομόνωση παραμένει θεμελιώδης στρατηγική για τον έλεγχο της μετάδοσης του SARS-CoV-2. Σε σύγκριση με τις μεθόδους PCR, οι δοκιμές ανίχνευσης αντιγόνου δεν απαιτούν εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό και είναι λιγότερο δαπανηρές, επιτρέποντας έτσι επαναλαμβανόμενους ελέγχους στα σημεία φροντίδας σε ευρεία κλίμακα. Η μετα-ανάλυσή μας δείχνει ότι η συνολική απόδοση των δοκιμών ταχείας ανίχνευσης αντιγόνου είναι συγκρίσιμη με αυτή του ποσοτικού rt-PCR, τουλάχιστον ως προς την ειδικότητα αφού οι τιμές που πήραμε από την μετα-ανάλυση αγγίζουν το 99%, ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η ευαισθησία είναι χαμηλότερη, φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ιού και αυξάνεται σε χαμηλότερους κύκλους PCR. Οι δοκιμές αντιγόνου είναι επίσης πιο ευαίσθητες όταν χρησιμοποιούνται δείγματα NSP και σε άτομα με συμπτώματα. Αυτά τα νέα ευρήματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες προσπάθειες για σύνοψη των στοιχείων σε αυτόν τον τομέα [110].

Η ευαισθησία των δοκιμών αντιγόνου είναι καλή αλλά όχι ιδανική, έτσι η rt-PCR παραμένει το χρυσό πρότυπο για τη διάγνωση. Δεδομένης της υποβέλτιστης ευαισθησίας των δοκιμών αντιγόνου, υπάρχει πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, τα οποία θα πρέπει να αντιμετωπιστούν ανάλογα με τις κλινικές και επιδημιολογικές συνθήκες. Γενικά, η επιβεβαίωση του αποτελέσματος της δοκιμής αντιγόνου με rt-PCR σε εργαστήριο είναι απαραίτητη όταν το αποτέλεσμα δεν είναι σύμφωνο με τις κλινικές και επιδημιολογικές πληροφορίες. Δεδομένης της υψηλότερης ευαισθησίας τους μεταξύ των συμπτωματικών ατόμων και σε εκείνους με υψηλότερο ιικό φορτίο (αριθμός κύκλων PCR <30), οι δοκιμές αντιγόνου αναμένεται να αποδίδουν καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της λοίμωξης SARS-CoV-2 σε άτομα με συμπτώματα, σε επαφές υψηλού κινδύνου, επιβεβαιωμένα κρούσματα ή σε ομάδες υψηλού κινδύνου που εργάζονται στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης με γνωστή έκθεση.

Η σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών ανίχνευσης αντιγόνου είναι σημαντική όχι μόνο για τη διάγνωση αλλά και για σκοπούς ελέγχου και επιτήρησης της νόσου covid-19. Φαίνεται ότι οι δοκιμές ανίχνευσης αντιγόνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον τακτικό έλεγχο ασυμπτωματικών ατόμων συγκεντρωτικά σε χώρους υψηλού κινδύνου, όπως γηροκομεία, καταφύγια αστέγων, καταστήματα

κράτησης κλπ. Η ταχεία ταυτοποίηση των πολύ μολυσμένων ατόμων σε αυτές τις εγκαταστάσεις χρησιμοποιώντας ταχείες δοκιμές αντιγόνου (point of care) POC θα βοηθήσει άμεσα στη λήψη αποφάσεων για εφαρμογή στρατηγικών και παρεμβάσεων πρόληψης και ελέγχου των λοιμώξεων, και κατά συνέπεια θα μειώσει σημαντικά την περαιτέρω μετάδοση. Λόγω της χαμηλότερης ευαισθησίας, ο προσυμπτωματικός έλεγχος ιδιαίτερα σε περιπτώσεις υψηλού κινδύνου, αλλά και ο μαζικός έλεγχος μπορεί να επιφέρουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Φαίνεται ωστόσο ότι οι δοκιμές αντιγόνου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επαναλαμβανόμενο, πληθυσμιακό έλεγχο, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η αποτελεσματικότητα του προσυμπτωματικού ελέγχου εξαρτάται περισσότερο από τη συχνότητα των δοκιμών και από το πόσο σύντομα θα αναφερθεί το περιστατικό παρά από την πολύ υψηλή ευαισθησία [111][112].

Όσον αφορά την ειδικότητα, οι δοκιμές αντιγόνου αποδίδουν εξαιρετικά καλά, παρόμοια με το rt-PCR, ελαχιστοποιώντας έτσι την πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, εμφανίζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ειδικά όταν ο επιπολασμός της μόλυνσης SARS-CoV-2 στις κοινότητες είναι χαμηλός. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη τόσο όσον αφορά τη διάγνωση όσο και κατά τον σχεδιασμό παρεμβάσεων δημόσιας υγείας ή μελετών επιπολασμού σε περιβάλλοντα χαμηλού επιπολασμού, επειδή τα ψευδώς θετικά έχουν ως αποτέλεσμα τη σπατάλη πόρων (περιττή απομόνωση των περιπτώσεων και ενέργειες παρακολούθησης) και ανακριβείς εκτιμήσεις.

Αυτή η μετα-ανάλυση υπόκειται στους περιορισμούς των μεμονωμένων μελετών. Η προκατάληψη και η σύγχυση σε επίπεδο μελέτης δεν μπορούν εύκολα να αντιμετωπιστούν ή να διορθωθούν στο στάδιο της μετα-ανάλυσης. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από την ποιοτική αξιολόγηση QUADAS (κεφάλαιο 3.4) η διαφάνεια των μελετών είναι υψηλή, οπότε τα αποτελέσματα της μετα-ανάλυσης μπορούν να θεωρηθούν σε έναν υψηλό βαθμό αξιόπιστα.

Τέλος, σίγουρα είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν κι άλλες μελέτες σχετικά με τις διαγνωστικές δοκιμασίες, ώστε να εξαχθούν καλύτερα συμπεράσματα σχετικά με το τρόπο λήψης του δείγματος, καθώς και για τις διαγνωστικές δοκιμασίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Οδηγίες για την διαχείριση ύποπτου κρούσματος COVID-19 σε τουριστικό κατάλυμα [Internet] Available from: <https://eody.gov.gr/odigies-gia-tin-diacheirisi-yproptooy-kroysmatos-covid-19-se-toyristiko-katalyma/?print=print>
2. ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ-ΑΠΑΝΤΗΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΟΝ 2019-nCoV [Internet] Available from: <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/02/2019-nCoV-faq.pdf>
3. Covid-19-Οδηγίες [Internet] Available from: <https://eody.gov.gr/neos-koronaivos-covid-19/>
4. World Health Organization, Coronavirus, Symptoms [Internet] Available from: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3
5. How to protect yourself & others, Centers for disease, control and prevention [Internet] Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html>
6. Understanding How COVID-19 Vaccines Work, Centers for disease, control and prevention [Internet] Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/how-they-work.html>
7. Understanding mRNA COVID-19 Vaccines, Centers for disease, control and prevention [Internet] Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/mRNA.html>
8. Understanding Viral Vector COVID-19 Vaccines, Centers for disease, control and prevention [Internet] Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/viralvector.html>
9. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 287, 1–30. doi: 10.1007/3-540-26765-4_1, Brian, D. A., and Baric, R. S. (2005).
10. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London England)* 395, 565–574. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30251-8, Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., et al. (2020).

11. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878, Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., et al. (2020).
12. SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell.* S0092-8674, 31310-6. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.004, Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., et al. (2020).
13. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 25 November 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.587269, Mei-Yue Wang, Rong Zhao, Li-Juan Gao, Xue-Fei Gao, De-Ping Wang and Ji-Min Cao (2020)
14. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA, *Nature Communications* volume 12, Article number: 1936 (2021), doi:10.1038/s41467-021-21953-3, Jasmine Cubuk, Jhullian J. Alston, J. Jeremías Incicco, Sukrit Singh, Melissa D. Stuchell-Breton, Michael D. Ward, Maxwell I. Zimmerman, Neha Vithani, Daniel Griffith, Jason A. Wagoner, Gregory R. Bowman, Kathleen B. Hall, Andrea Soranno, Alex S. Holehouse
15. Thomas, S. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. *Pathogens and Immunity.* 2020;5(1):342-363 PubMed PMID. doi: 10.20411/pai.v5i1.377
16. Huang, Y., Yang, C., Xu, Xf. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* 41, 1141–1149 (2020). Doi: 10.1038/s41401-020-0485-4
17. Alexander Kuzmin, Philipp Orekhov, Roman Astashkin, Valentin Gordeliy, Ivan Gushchin, Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer, doi: 10.1101/2021.03.10.434722
18. *Nat Struct Mol Biol* 27, 1202–1208 (2020). Doi: 10.1038/s41594-020-00536-8
19. Swift A, Heale R, Twycross A What are sensitivity and specificity? *Evidence-Based Nursing* 2020;23:2-4.
20. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Chandra Sekhar G, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol.* 2008

- Jan-Feb;56(1):45-50. doi: 10.4103/0301-4738.37595. PMID: 18158403; PMCID: PMC2636062.
21. Kelly H. Zou, A. James O'Malley, and Laura Mauri, Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluating Diagnostic Tests and Predictive Models, *Circulation*. 2007;115:654–657, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.594929
 22. Aranha, C, Patel, V, Bhor, V, Gogoi, D. Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2021; 1- 4. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>
 23. James J Dunn, Cameron A Brown, Joanna Jung, Laboratory Diagnostics and Testing Guidance for COVID-19, [Available online from]: <https://emedicine.medscape.com/article/2500138-overview#a2>
 24. Centers for Disease Control and Prevention, Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing, [Available online from]: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
 25. Geeky medics, Oropharyngeal swab-OSCE Guide, [Available online from]: <https://geekymedics.com/oropharyngeal-swab-osce-guide/>
 26. Centers for Disease Control and Prevention, NASAL MID TURBINATE (NMT) SPECIMEN COLLECTION STEPS, [Available online from]: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/lab/NMT-Specimen-Collection-Infographic.pdf>
 27. Centers for Disease Control and Prevention, How to Collect an Anterior Nasal Swab Specimen for COVID-19 Testing, [Available online from]: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/testing/How-To-Collect-Anterior-Nasal-Specimen-for-COVID-19.pdf>
 28. LMH Laboratory, Nasal/Nasopharyngeal Collection Instructions, [Available online from]: <https://www.testmenu.com/LMH/TestDirectory/SiteFile?fileName=sidebar%5CNasal-Nasopharyngeal%20Collection%20Instructions.pdf>

29. Everlywell, How to collect my saliva sample (with video), [Available online from]: <https://support.everlywell.com/article/100-how-to-collect-my-saliva-sample-with-video>
30. Scholz, Tamera & Midha, Prem & Anderson, Larry & Ku, David. (2010). PneumoniaCheck: A Device for Sampling Lower Airway Aerosols. *Journal of Medical Devices*. 4. 041005. 10.1115/1.4002760.
31. Health Jade, Bronchoalveolar lavage, [Available online from]: <https://healthjade.net/bronchoalveolar-lavage/>
32. Study IQ, Corona Virus Testing In India, [Available online from]: <https://blog.studyiq.com/corona-virus-testing-in-india-free-pdf/>
33. Mount Sinai, Pleural fluid culture, [Available online from]: <https://www.mountsinai.org/health-library/tests/pleural-fluid-culture>
34. Fairview, CT-Guided Lung Biopsy, [Available online from]: https://www.fairview.org/Patient-Education/Articles/English/c/t/g/u/i/CTGuided_Lung_Biopsy_41261
35. Coronavirus Disease 2019 Testing Basics, FDA U.S FOOD & DRUG ADMINISTRATION, [Internet] Available from: <https://www.fda.gov/media/140161/download>
36. Khursheed UI Islam and Jawed Iqbal, An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10 November 2020, doi: 10.3389/fcimb.2020.560616
37. Zhang, F., Abudayyeh, O.O., and Gootenberg, J. S. (2020). A Protocol for Detection of COVID-19 Using CRISPR Diagnostics. Available at: [https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf).
38. Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., et al. (2020). CRISPR–Cas12-Based Detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* April. 38, 870–874. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4
39. Kyosei Y, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S, Ito E. Antigen tests for COVID-19. *Biophys Physicobiol.* 2021;18:28-39. Published 2021 Feb 10. doi:10.2142/biophysico.bppb-v18.004

40. Jacqueline Dinnes, COVID-19 rapid antigen testing strategies require careful evaluation, COMMENTARY| VOLUME 70, 103491, AUGUST 01, 2021, doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103491
41. Delgado-Rodríguez M, Sillero-Arenas M. Systematic review and meta-analysis. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2018 Oct;42(7):444-453. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2017.10.003. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29169792.
42. Khan KS, Kunz R, Kleijnen J, Antes G. Five steps to conducting a systematic review. *J R Soc Med*. 2003;96(3):118-121. doi:10.1258/jrsm.96.3.118
43. Crowther M, Lim W, Crowther MA. Systematic review and meta-analysis methodology. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3140-6. doi: 10.1182/blood-2010-05-280883. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20656933.
44. Liberati A, Altman D G, Tetzlaff J, Mulrow C, GÅtzsche P C, Ioannidis J P A et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration *BMJ* 2009; 339 :b2700 doi:10.1136/bmj.b2700
45. Whiting, P., Rutjes, A.W., Reitsma, J.B. et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol* 3, 25 (2003). <https://doi.org/10.1186/1471-2288-3-25>
46. By E, Pinzon E. *Thirty Years with Stata : A Retrospective Thirty Years with Stata : A Retrospective*. 2017. 147 p.
47. Stata manual, 11. Creating new variables, [Available online from: <https://www.stata.com/manuals13/gsm11.pdf>]
48. Stata manual, Set command, [Available online from: <https://www.stata.com/manuals/rset.pdf>]
49. Multivariate random-effects meta-analysis, Ian R. White, *The Stata Journal*, Volume 9 Number 1: pp. 40-56, [Available online from: <https://www.stata-journal.com/article.html?article=st0156>]
50. Stata manual, nlcom command, [Available online from: <https://www.stata.com/manuals/rnlcom.pdf>]
51. Complete Dissertation by Statistics Solutions, Effect Size, [Available online from: <https://www.statisticssolutions.com/free-resources/directory-of-statistical-analyses/effect-size/>]

52. Robert Trevethan, Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice, *Front. Public Health*, 20 November 2017, doi: 10.3389/fpubh.2017.00307
53. Wong, Hwee & Lim, Gek Hsiang. (2011). Measures of Diagnostic Accuracy: Sensitivity, Specificity, PPV and NPV. *Proceedings of Singapore Healthcare*. 20. 316-318. 10.1177/201010581102000411.
54. Hazra A. Using the confidence interval confidently. *J Thorac Dis*. 2017;9(10):4125-4130. doi:10.21037/jtd.2017.09.14
55. Pilarowski G, Lebel P, Sunshine S, Liu J, Crawford E, Marquez C, Rubio L, Chamie G, Martinez J, Peng J, Black D, Wu W, Pak J, Laurie MT, Jones D, Miller S, Jacobo J, Rojas S, Rojas S, Nakamura R, Tulier-Laiwa V, Petersen M, Havlir DV; CLIAHUB Consortium, DeRisi J. Performance characteristics of a rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay at a public plaza testing site in San Francisco. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Nov 12:2020.11.02.20223891. doi: 10.1101/2020.11.02.20223891. Update in: *J Infect Dis*. 2021 Apr 8;223(7):1139-1144. PMID: 33173911; PMCID: PMC7654907.
56. Gupta A, Khurana S, Das R, Srigrayan D, Singh A, Mittal A, Singh P, Soneja M, Kumar A, Singh AK, Soni KD, Meena S, Aggarwal R, Sharad N, Aggarwal A, Kadnur H, George N, Singh K, Desai D, Trilangi P, Khan AR, Kiro VV, Naik S, Arunan B, Goel S, Patidar D, Lathwal A, Dar L, Trikha A, Pandey RM, Malhotra R, Guleria R, Mathur P, Wig N. Rapid chromatographic immunoassay-based evaluation of COVID-19: A cross-sectional, diagnostic test accuracy study & its implications for COVID-19 management in India. *Indian J Med Res*. 2020 Oct 31. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_3305_20. Epub ahead of print. PMID: 33146157.
57. Fenollar F, Bouam A, Ballouche M, Fuster L, Prudent E, Colson P, Tissot-Dupont H, Million M, Drancourt M, Raoult D, Fournier PE. Evaluation of the Panbio COVID-19 Rapid Antigen Detection Test Device for the Screening of Patients with COVID-19. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 21;59(2):e02589-20. doi: 10.1128/JCM.02589-20. PMID: 33139420; PMCID: PMC8111145.
58. Nalumansi A, Lutalo T, Kayiwa J, Watera C, Balinandi S, Kiconco J, Nakaseegu J, Olara D, Odwilo E, Serwanga J, Kikaire B, Ssemwanga D, Nabadda S, Ssewanyana I, Atwine D, Mwebesa H, Bosa HK, Nsereko C, Cotten M,

- Downing R, Lutwama J, Kaleebu P. Field evaluation of the performance of a SARS-CoV-2 antigen rapid diagnostic test in Uganda using nasopharyngeal samples. *Int J Infect Dis.* 2021 Mar;104:282-286. doi: 10.1016/j.ijid.2020.10.073. Epub 2020 Oct 30. PMID: 33130198; PMCID: PMC7836828.
59. Parada-Ricart E, Gomez-Bertomeu F, Picó-Plana E, Olona-Cabases M. Usefulness of the antigen for diagnosing SARS-CoV-2 infection in patients with and without symptoms. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2021 Aug-Sep;39(7):357-358. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2020.09.009. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33127162; PMCID: PMC7528889.
60. Lee JH, Choi M, Jung Y, Lee SK, Lee CS, Kim J, Kim J, Kim NH, Kim BT, Kim HG. A novel rapid detection for SARS-CoV-2 spike 1 antigens using human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2). *Biosens Bioelectron.* 2021 Jan 1;171:112715. doi: 10.1016/j.bios.2020.112715. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33099241; PMCID: PMC7560266.
61. Cerutti F, Burdino E, Milia MG, Alice T, Gregori G, Bruzzone B, Ghisetti V. Urgent need of rapid tests for SARS CoV-2 antigen detection: Evaluation of the SD-Biosensor antigen test for SARS-CoV-2. *J Clin Virol.* 2020 Nov;132:104654. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104654. Epub 2020 Sep 29. PMID: 33053494; PMCID: PMC7522649.
62. Diao B, Wen K, Zhang J, Chen J, Han C, Chen Y, Wang S, Deng G, Zhou H, Wu Y. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Feb;27(2):289.e1-289.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.057. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33031947; PMCID: PMC7534827.
63. Young S, Taylor SN, Cammarata CL, Varnado KG, Roger-Dalbert C, Montano A, Griego-Fullbright C, Burgard C, Fernandez C, Eckert K, Andrews JC, Ren H, Allen J, Ackerman R, Cooper CK. Clinical Evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 Point-of-Care Test Performance Compared to PCR-Based Testing and versus the Sofia 2 SARS Antigen Point-of-Care Test. *J Clin Microbiol.* 2020 Dec 17;59(1):e02338-20. doi: 10.1128/JCM.02338-20. PMID: 33023911; PMCID: PMC7771450.

64. Liotti FM, Menchinelli G, Lalle E, Palucci I, Marchetti S, Colavita F, La Sorda M, Sberna G, Bordi L, Sanguinetti M, Cattani P, Capobianchi MR, Posteraro B. Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. *Clin Microbiol Infect.* 2021 Mar;27(3):487-488. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.030. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32979567; PMCID: PMC7510559.
65. Pharmaceutical Safety Division, Ministry of Health, Labor, and Welfare (MLHW), Approval of diagnostic test for SARS-CoV-2 infection (Lumipulse G SARS-CoV-2 Ag), 2020 (Accessed on 17/Aug/2020). [Article in Japanese], <https://www.pmda.go.jp/files/000235412.pdf>.
66. Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, Sueki H, Hayakawa M, Mochizuki H, Tsutsui T, Kakizaki Y, Miyashita Y, Yagi S, Kojima S, Omata M. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis.* 2020 Oct;99:397-402. doi: 10.1016/j.ijid.2020.08.029. Epub 2020 Aug 12. PMID: 32800855; PMCID: PMC7422837.
67. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, Horiuchi M, Kato K, Imoto Y, Iwata M, Mimura S, Ito T, Tamura K, Kato Y. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020 Aug 24;58(9):e01438-20. doi: 10.1128/JCM.01438-20. PMID: 32636214; PMCID: PMC7448663.
68. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, Chan RC, Tsang DN. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol.* 2020 Aug;129:104500. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104500. Epub 2020 Jun 8. PMID: 32585619; PMCID: PMC7278630.
69. Mertens P, De Vos N, Martiny D, Jassoy C, Mirazimi A, Cuypers L, Van den Wijngaert S, Monteil V, Melin P, Stoffels K, Yin N, Mileto D, Delaunoy S, Magein H, Lagrou K, Bouzet J, Serrano G, Wautier M, Leclipteux T, Van Ranst M, Vandenberg O; LHUB-ULB SARS-CoV-2 Working Diagnostic Group. Development and Potential Usefulness of the COVID-19 Ag Respi-Strip

- Diagnostic Assay in a Pandemic Context. *Front Med (Lausanne)*. 2020 May 8;7:225. doi: 10.3389/fmed.2020.00225. PMID: 32574326; PMCID: PMC7227790.
70. Blairon L, Wilmet A, Beukinga I, Tré-Hardy M. Implementation of rapid SARS-CoV-2 antigenic testing in a laboratory without access to molecular methods: Experiences of a general hospital. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104472. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104472. Epub 2020 May 30. PMID: 32504944; PMCID: PMC7261076.
 71. Porte L, Legarraga P, Vollrath V, Aguilera X, Munita JM, Araos R, Pizarro G, Vial P, Iruretagoyena M, Dittrich S, Weitzel T. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis*. 2020 Oct;99:328-333. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.098. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32497809; PMCID: PMC7263236.
 72. Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol*. 2020 Aug;129:104455. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104455. Epub 2020 May 21. PMID: 32485618; PMCID: PMC7240272.
 73. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso AM, Le Goff J, Delaugerre C. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol*. 2020 Jul 23;58(8):e00977-20. doi: 10.1128/JCM.00977-20. PMID: 32404480; PMCID: PMC7383555.
 74. Bo Diao, Kun Wen, Jian Chen, Yueping Liu, Zilin Yuan, Chao Han, Jiahui Chen, Yuxian Pan, Li Chen, Yunjie Dan, Jing Wang, Yongwen Chen, Guohong Deng, Hongwei Zhou, Yuzhang Wu, Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.20032524>
 75. Thomas Weitzel, Paulette Legarraga, Mirentxu Iruretagoyena, Gabriel Pizarro, Valeska Vollrath, Rafael Araos, José M. Munita, Lorena Porte, Head-to-head comparison of four antigen-based rapid detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.27.119255>

76. Beck ET, Paar W, Fojut L, Serwe J, Jahnke RR. Comparison of the Quidel Sofia SARS FIA Test to the Hologic Aptima SARS-CoV-2 TMA Test for Diagnosis of COVID-19 in Symptomatic Outpatients. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 21;59(2):e02727-20. doi: 10.1128/JCM.02727-20. PMID: 33239376; PMCID: PMC8111148.
77. Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef MW, Imöhl M, Kleines M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *J Virol Methods*. 2021 Feb;288:114024. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.114024. Epub 2020 Nov 20. PMID: 33227341; PMCID: PMC7678421.
78. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, Martínez M, Poujois S, Forqué L, Valdivia A, Solano de la Asunción C, Ferrer J, Colomina J, Navarro D. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Mar;27(3):472.e7-472.e10. doi: 10.1016/j.cmi.2020.11.004. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33189872; PMCID: PMC7662075.
79. Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, Angkasekwina N, Sutthent R, Puangpunngam N, Tharmviboonsri T, Pongraweevan O, Chuthapisith S, Sirivatanauksorn Y, Kantakamalakul W, Horthongkham N. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virol J*. 2020 Nov 13;17(1):177. doi: 10.1186/s12985-020-01452-5. PMID: 33187528; PMCID: PMC7665091.
80. Lanser L, Bellmann-Weiler R, Öttl KW, Huber L, Griesmacher A, Theurl I, Weiss G. Evaluating the clinical utility and sensitivity of SARS-CoV-2 antigen testing in relation to RT-PCR Ct values. *Infection*. 2021 Jun;49(3):555-557. doi: 10.1007/s15010-020-01542-0. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33185807; PMCID: PMC7662025.
81. Mar Masiá, Marta Fernández-González, Manuel Sánchez, Mar Carvajal, José Alberto García, Nieves Gonzalo, Victoria Ortiz de la Tabla, Vanesa Agulló, Inmaculada Candela, Jorge Guijarro, José Antonio Gutiérrez, Carlos de Gregorio, Félix Gutiérrez, Nasopharyngeal Panbio COVID-19 antigen

- performed at point-of-care has a high sensitivity in symptomatic and asymptomatic patients with higher risk for transmission and older age, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.16.20230003>
82. Hendrik Gremmels, Beatrice M.F. Winkel, Rob Schuurman, Andert Rosingh, Nicolette A.M. Rigter, Olga Rodriguez, Johan Ubijaan, Annemarie M.J. Wensing, Marc J.M. Bonten, L.Marije Hofstra, Real-life validation of the Panbio COVID-19 Antigen Rapid Test (Abbott) in community-dwelling subjects with symptoms of potential SARS-CoV-2 infection, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.16.20214189>
 83. Ignacio Torres, Sandrine Poujois, Eliseo Albert, Javier Colomina, David Navarro, Real-life evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for SARS-CoV-2 detection in asymptomatic close contacts of COVID-19 patients, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.20241562>
 84. L.J. Krüger, M. Gaeddert, F. Tobian, F. Lainati, C. Gottschalk, J.A.F. Klein, P. Schnitzler, H.G. Kräusslich, O. Nikolai, A.K. Lindner, F.P. Mockenhaupt, J. Seybold, V.M. Corman, C. Drosten, N.R. Pollock, B. Knorr, A. Welker, M. de Vos, J.A. Sacks, C.M. Denking, Evaluation of the accuracy and ease-of-use of Abbott PanBio - A WHO emergency use listed, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostic test for SARS-CoV-2, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.27.20239699>
 85. Pavel Drevinek, Jakub Hurych, Zdenek Kepka, Ales Briksi, Michal Kulich, Miroslav Zajac, Petr Hubacek, The sensitivity of SARS-CoV-2 antigen tests in the view of large-scale testing, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.23.20237198>
 86. Jean Marc Schwob, Alix Miauton, Dusan Petrovic, Jean Perdrix, Nicolas Senn, Katia Jatou, Opota Onya, Alain Maillard, Gianni Minghelli, Jacques Cornuz, Gilbert Greub, Blaise Genton, Valérie D'Acromont, Antigen rapid tests, nasopharyngeal PCR and saliva PCR to detect SARS-CoV-2: a prospective comparative clinical trial, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.23.20237057>
 87. Alice Berger, Marie Therese Ngo Nsoga, Francisco Javier Perez-Rodriguez, Yasmine Abi Aad, Pascale Sattonnet-Roche, Angèle Gayet-Ageron, Cyril Jaksic, Giulia Torriani, Erik Boehm, Ilona Kronig, Jilian A. Sacks, Margaretha de Vos, Frédérique Jacqueroz Bausch, François Chappuis, Laurent Kaiser,

- Manuel Schibler, Isabella Eckerle, Diagnostic accuracy of two commercial SARS-CoV-2 Antigen-detecting rapid tests at the point of care in community-based testing centers, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.20.20235341>
88. Paloma Merino-Amador, Jesús Guinea, Irene Muñoz-Gallego, Patricia González-Donapetry, Juan-Carlos Galán, Nerea Antona, Gustavo Cilla, Silvia Hernáez-Crespo, José-Luis Díaz-de Tuesta, Ana Gual-de Torrella, Fernando González-Romo, Pilar Escribano, Miguel Ángel Sánchez-Castellano, Mercedes Sota-Busselo, Alberto Delgado-Iribarren, Julio García, Rafael Cantón, Patricia Muñoz, M Dolores Folgueira, Manuel Cuenca-Estrella, Jesús Oteo-Iglesias, Multicenter evaluation of the Panbio™ COVID-19 Rapid Antigen-Detection Test for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.20230375>
89. Zsófia Iglói, Jans Velzing, Janko van Beek, David van de Vijver, Georgina Aron, Roel Ensing, Kimberley Benschop, Wanda Han, Timo Boelsums, Marion Koopmans, Corine Geurtsvankessel, Richard Molenkamp, Clinical evaluation of the Roche/SD Biosensor rapid antigen test with symptomatic, non-hospitalized patients in a municipal health service drive-through testing site, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.20234104>
90. Victor M. Corman, Verena Claudia Haage, Tobias Bleicker, Marie Luisa Schmidt, Barbara Mühlemann, Marta Zuchowski, Wendy Karen Jó Lei, Patricia Tscheak, Elisabeth Möncke-Buchner, Marcel A. Müller, Andi Krumbholz, Jan Felix Drexler, Christian Drosten, Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid Point-of-Care Antigen tests, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.20230292>
91. Oana Bulilete, Patricia Lorente, Alfonso Leiva, Eugenia Carandell, Antonio Oliver, Estrella Rojo, Pau Pericas, Joan Llobera, Evaluation of the Panbio™ rapid antigen test for SARS-CoV-2 in primary health care centers and test sites, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.13.20231316>
92. Keying Guo, Shofarul Wustoni, Anil Koklu, Escarlet Díaz-Galicia, Maximilian Moser, Adel Hama, Ahmed A. Alqahtani, Adeel Nazir Ahmad, Fatimah Saeed Alhamlan, Iain McCulloch, Stefan T. Arold, Raik Grünberg, Sahika Inal, A nanobody-functionalized organic electrochemical transistor for the rapid

- detection of SARS-CoV-2 and MERS antigens at the physical limit, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.20228874>
93. Abdulkarim Abdulrahman, Fathi Mustafa, Abdulla I AlAwadhi, Qadar Alansari, Batool AlAlawi, Manaf AlQahtani, Comparison of SARS-COV-2 nasal antigen test to nasopharyngeal RT-PCR in mildly symptomatic patients, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.10.20228973>
 94. Isao Yokota, Takayo Sakurazawa, Junichi Sugita, Sumio Iwasaki, Keiko Yasuda, Naoki Yamashita, Shinichi Fujisawa, Mutsumi Nishida, Satoshi Konno, Takanori Teshima, Performance of qualitative and quantitative antigen tests for SARS-CoV-2 in early symptomatic patients using saliva, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.20227363>
 95. Beatrice Nash, Anthony Badea, Ankita Reddy, Miguel Bosch, Nol Salcedo, Adam R. Gomez, Alice Versiani, Gislaine Celestino Dutra Silva, Thayza Maria Izabel Lopes dos Santos, Bruno H. G. A. Milhim, Marilia M Moraes, Guilherme Rodrigues Fernandes Campos, Flávia Quieroz, Andreia Francesli Negri Reis, Mauricio L. Nogueira, Elena N. Naumova, Irene Bosch, Bobby Brooke Herrera, The impact of high frequency rapid viral antigen screening on COVID-19 spread and outcomes: a validation and modeling study, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.01.20184713>
 96. Andrea Alemany, Bàrbara Baro, Dan Ouchi, Maria Ubals, Marc Corbacho-Monné, Júlia Vergara-Alert, Jordi Rodon, Joaquim Segalés, Cristina Esteban, Gema Fernandez, Lidia Ruiz, Quique Bassat, Bonaventura Clotet, Jordi Ara, Martí Vall-Mayans, Camila G-Beiras, Ignacio Blanco, Oriol Mitjà, Analytical and Clinical Performance of the Panbio COVID-19 Antigen-Detecting Rapid Diagnostic Test, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.30.20223198>
 97. L. Courtellemont, J. Guinard, C. Guillaume, S. Giaché, V. Rzepecki, A. Seve, C. Gubavu, K. Baud, H. Doize, C. Le Helloco, C. Lebegue, A. Tay, G.N. Cassuto, G. Pialoux, L. Hocqueloux, T. Prazuck, Real-life performance of a novel antigen detection test on nasopharyngeal specimens for SARS-CoV-2 infection diagnosis: a prospective study, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.20220657>
 98. Andreas K. Lindner, Olga Nikolai, Franka Kausch, Mia Wintel, Franziska Hommes, Maximilian Gertler, Lisa J. Krüger, Mary Gaeddert, Frank Tobian,

- Federica Lainati, Lisa Köppel, Joachim Seybold, Victor M. Corman, Christian Drosten, Jörg Hofmann, Jilian A. Sacks, Frank P. Mockenhaupt, Claudia M. Denkinger, Head-to-head comparison of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid test with self-collected anterior nasal swab versus professional-collected nasopharyngeal swab, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.26.20219600>
99. N. Van der Moeren, V.F. Zwart, E.B. Lodder, W. Van den Bijllaardt, H.R.J.M. Van Esch, J.J.J.M. Stohr, J. Pot, I. Welschen, P.M.F. Van Mechelen, S.D. Pas, J.A.J.W. Kluytmans, PERFORMANCE EVALUATION OF A SARS-COV-2 RAPID ANTIGENTEST: TEST PERFORMANCE IN THE COMMUNITY IN THE NETHERLANDS, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.19.20215202>
 100. Lorena Porte, Paulette Legarraga, Mirentxu Iruretagoyena, Valeska Vollrath, Gabriel Pizarro, José M. Munita, Rafael Araos, Thomas Weitzel, Rapid SARS-CoV-2 antigen detection by immunofluorescence – a new tool to detect infectivity, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.04.20206466>
 101. Andrew Pekosz, Charles K. Cooper, Valentin Parvu, Maggie Li, Jeffrey C. Andrews, Yukari C. Manabe, Salma Kodsi, Jeffry Leitch, Devin S. Gary, Celine Roger-Dalbert, Antigen-based testing but not real-time PCR correlates with SARS-CoV-2 virus culture, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.02.20205708>
 102. L.J. Krüger, M. Gaeddert, L. Köppel, L. E. Brümmer, C. Gottschalk, I.B. Miranda, P. Schnitzler, H.G. Kräusslich, A.K. Lindner, O. Nikolai, F.P. Mockenhaupt, J. Seybold, V.M. Corman, C. Drosten, N.R. Pollock, A.I. Cubas-Atienzar, K. Kontogianni, A. Collins, A. H. Wright, B. Knorr, A. Welker, M. de Vos, J.A. Sacks, E.R. Adams, C.M. Denkinger, Evaluation of the accuracy, ease of use and limit of detection of novel, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostics for SARS-CoV-2, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.01.20203836>
 103. Naveen K. Singh, Partha Ray, Aaron F. Carlin, Celestine Magallanes, Sydney C. Morgan, Louise C. Laurent, Eliah S. Aronoff-Spencer, Drew A. Hall, Hitting the diagnostic sweet spot: Point-of-care SARS-CoV-2 salivary antigen testing with an off-the-shelf glucometer, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.24.20200394>
 104. Nicolas Veyrenche, Karine Bolloré, Amandine Pisoni, Anne-Sophie Bedin, Anne-Marie Mondain, Jacques Ducos, Michel Segondy, Brigitte Montes,

- Patrick Pastor, David Morquin, Alain Makinson, Vincent Le Moing, Philippe Van de Perre, Vincent Foulongne, Edouard Tuaille, Diagnosis value of SARS-CoV-2 antigen/antibody combined testing using rapid diagnostic tests at hospital admission, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.19.20197855>
105. Bartolomeo Della Ventura, Michele Cennamo, Antonio Minopoli, Raffaele Campanile, Sergio Bolletti Censi, Daniela Terracciano, Giuseppe Portella, Raffaele Velotta, Colorimetric Test for Fast Detection of SARS-CoV-2 in Nasal and Throat Swabs, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.15.20175489>
 106. Victor Herrera, Vincent Hsu, Ademola Adewale, Lee Johnson, Timothy Hendrix, Jeffrey Kuhlman, Neil Finkler, Testing Healthcare Workers Exposed to COVID19 using Rapid Antigen Detection, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.20172726>
 107. Mak GC, Lau SS, Wong KK, Chow NL, Lau CS, Lam ET, Chan RC, Tsang DN. Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the three rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol.* 2020 Dec;133:104684. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104684. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33176236; PMCID: PMC7598567.
 108. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, Romanyk J, Pérez-García F, Gómez-Herruz P, Arroyo T, Cuadros J. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol.* 2020 Dec;133:104659. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104659. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33160179; PMCID: PMC7561603.
 109. Isao Yokota, Takayo Sakurazawa, Junichi Sugita, Sumio Iwasaki, Keiko Yasuda, Naoki Yamashita, Shinichi Fujisawa, Mutsumi Nishida, Satoshi Konno, Takanori Teshima, Performance of qualitative and quantitative antigen tests for SARS-CoV-2 in early symptomatic patients using saliva, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.06.20227363>
 110. Katsuhito Kashiwagi, Yoshikazu Ishii, Kotaro Aoki, Shintaro Yagi, Tadashi Maeda, Taito Miyazaki, Sadako Yoshizawa, Katsumi Aoyagi, Kazuhiro Tateda, Immunochromatographic test for the detection of SARS-CoV-2 in saliva, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.20107631>
 111. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Domen J, Dretzke J,

- Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeflang MM, McInnes MD, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Mar 24;3(3):CD013705. doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub2. PMID: 33760236; PMCID: PMC8078597.
112. Larremore DB, Wilder B, Lester E, Shehata S, Burke JM, Hay JA, Tambe M, Mina MJ, Parker R. Test sensitivity is secondary to frequency and turnaround time for COVID-19 screening. *Sci Adv.* 2021 Jan 1;7(1):eabd5393. doi: 10.1126/sciadv.abd5393. PMID: 33219112; PMCID: PMC7775777.
 113. Smith RL, Gibson LL, Martinez PP, Ke R, Mirza A, Conte M, Gallagher N, Conte A, Wang L, Fredrickson R, Edmonson DC, Baughman ME, Chiu KK, Choi H, Jensen TW, Scardina KR, Bradley S, Gloss SL, Reinhart C, Yedetore J, Owens AN, Broach J, Barton B, Lazar P, Hennes D, Young T, Dunnett A, Robinson ML, Mostafa HH, Pekosz A, Manabe YC, Heetderks WJ, McManus DD, Brooke CB. Longitudinal Assessment of Diagnostic Test Performance Over the Course of Acute SARS-CoV-2 Infection. *J Infect Dis.* 2021 Sep 17;224(6):976-982. doi: 10.1093/infdis/jiab337. PMID: 34191025; PMCID: PMC8448437.
 114. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 2016;60(1):111-120. doi:10.1042/EBC20150012
 115. Creative BioLabs, Fluorescence Immunoassay, [Available online from: <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/diagnostics/fluorescence-immunoassay-fia.htm>]
 116. Cui, Qiyao & Sun, Honghao & Zhu, Hui. (2017). A novel strategy for rapid detection of NT-proBNP. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 231. 012124. 10.1088/1757-899X/231/1/012124.
 117. Gámiz-Gracia, L., García-Campana, A. M., Huertas-Pérez, J. F., & Lara, F. J. (2009). Chemiluminescence detection in liquid chromatography: Applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis—A review. *Analytica Chimica Acta*, 640(1-2), 7–28. doi:10.1016/j.aca.2009.03.017
 118. Dungchai, Wijitar & Lin, Jin-Ming & Chailapakul, Orawon & Lin, Si & Ying, Xitang. (2007). Development of a sensitive micro-magnetic chemiluminescence

- enzyme immunoassay for the determination of carcinoembryonic antigen. Analytical and bioanalytical chemistry. 387. 1965-71. 10.1007/s00216-006-0899-y.
119. Jonathan Kopel , Hemant Goyal , MD &Abhilash Perisetti , MD, Antibody tests for COVID-19, Pages 63-72 | Received 20 Aug 2020, Accepted 17 Sep 2020, Published online: 13 Oct 2020, doi: 10.1080/08998280.2020.1829261
 120. British Society fro Immunology, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), [Available online from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay>]
 121. Meta-analysis in medical research, Hippokratia 2010 Dec; (Supl11): 29-37, PubMedID: 21487488, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3049418/>
 122. TRACHEAL ASPIRATE CULTURE AND GRAM STAIN, [Available online from: <https://www.childrensmn.org/references/lab/microbioviral/tracheal-aspirate-culture-and-gram-stain.pdf>]
 123. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, et al. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. Cell. 2020;183(5):1325-1339.e21. doi:10.1016/j.cell.2020.10.004
 124. Nature portfolio, Immune evasion, [Available online from: <https://www.nature.com/subjects/immune-evasion>]
 125. Protter, [Available online from: <https://wlab.ethz.ch/protter/start/>]