



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2 στον πληθυσμό της Θεσσαλίας

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Πετεινάκη Ευθυμία: Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας, Επιβλέπουσα
- Ματθιόπουλος Κώστας: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
- Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Πτυχίου της σχολής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρταλίδης Φίλιππος του Βασιλείου

Λάρισα, Οκτώβριος 2020

Μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2 στον πληθυσμό της Θεσσαλίας

Molecular diagnosis of SARS-CoV-2 in the population of Thessaly

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Πετεινάκη Ευθυμία: Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας και Διευθύντρια του Τμήματος Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

Συνεπιβλέπων καθηγητής: Μαθιόπουλος Κώστας: Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλος: Καρούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλλαν και μου συμπαραστάθηκαν στην υλοποίηση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά, ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κυρία Πετεινάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναλάβω το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο της. Η υποστήριξή της ήταν διαρκής καθ' όλη τη διάρκεια της Διπλωματικής μου εργασίας και οι συμβουλές της υπήρξαν καθοριστικές για την εκπλήρωση αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την κυρία Φλώρου για την βοήθεια, την υπομονή καθώς και τη συμπάρασταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και τον αδερφό μου για την υποστήριξη και τη συμπάρασταση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή - Γενικό μέρος	11
1.1 Εισαγωγή – Ιστορικά δεδομένα	11
1.2. Επιδημιολογία	11
1.3. Ταξινόμηση - Βιολογία του SARS-CoV2.....	12
1.4. Μετάδοση - Συμπτώματα	13
1.5. Κύκλος ζωής του ιού	14
1.6. Ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στον SARS-CoV-2.....	16
1.7. Μορφολογία του SARS-CoV2	17
1.8. Γονιδίωμα του SARS-CoV2	19
1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά και οργάνωση γονιδιώματος	19
1.8.2. Γονίδια του SARS-CoV 2	20
1.9. Μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2.....	24
1.9.1. Διάγνωση μέσω τεχνικών που βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων του ιού	24
1.9.2. Διάγνωση μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV 2	25
1.9.3. Άμεση ανίχνευση στο κλινικό δείγμα των αντιγόνων του ιού.....	26
1.10. Σκοπός.....	26
2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.1. RT-PCR ή PCR-πραγματικού χρόνου.....	27
2.2. Εκχύλιση RNA.....	29
2.3. Ανίχνευση του SARS-CoV-2.....	30
3. Αποτελέσματα	33
4. Συζήτηση	35
Βιβλιογραφία	37

Περίληψη

Ο SARS-CoV-2 ανήκει στην οικογένεια των κορονοϊών με το MERS και το SARS να είναι οι γενετικά πιο συγγενείς σ' αυτή την οικογένεια. Όπως οι υπόλοιποι κορονοϊοί, ο SARS-CoV-2 είναι ένας θετικής πολικότητας RNA ιός, εικοσαεδρικής συμμετρίας που εκτός από νουκλεοκαψίδιο διαθέτει και ιικό περίβλημα. Μεταδίδεται μέσω αναπνευστικών εκκρίσεων, όπως το σάλιο και τα σταγονίδια. Τα συμπτώματα του COVID-19 περιλαμβάνουν πυρετό, βήχα, μυαλγία και διάρροια, καθώς επίσης έχει παρατηρηθεί η έλλειψη οσμής και γεύσης, ακόμη και νοητική σύγχυση σε μολυσμένα άτομα. Ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη νόσο ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό μολυσμένων ατόμων είναι ασυμπτωματικά, δυσχεραίνοντας έτσι τη διάγνωσή τους, με αποτέλεσμα να γίνεται ακόμη πιο δύσκολος ο περιορισμός μετάδοσης του ιού. Μολύνει ένα αρκετά μεγάλο εύρος ιστών-κυττάρων, όπως καρδιά, νεφρά, έντερο, με κύριο στόχο να αποτελούν τα κύτταρα του πνεύμονα έχοντας ως επακόλουθη συνέπεια την εμφάνιση πνευμονίας.

Προς το παρόν, ο πιο αξιόπιστος τρόπος διάγνωσης του ιού SARS-CoV-2 είναι η ανίχνευσή του με μοριακή μέθοδο και κυρίως με την μέθοδο ανάστροφης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time- RT-PCR). Υπάρχουν διάφοροι στόχοι για τη μοριακή διάγνωση του ιού στην PCR όπως περιοχές του γονιδίου N, E, S, και RdRP. Στο παρόν πρωτόκολλο μοριακής διάγνωσης, ως μοριακοί στόχοι για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 αποτέλεσαν περιοχές του γονιδίου της πρωτεΐνης του ιικού φακέλου E και του γονιδίου της RNA-εξαρτώμενης-RNA-πολυμεράσης. Συγκεκριμένα το E χρησιμοποιείται προκειμένου να διακρίνει τους β-κορωνοϊούς από τους υπόλοιπους κορωνοϊούς και το RdRP για ανιχνεύσει εξειδικευμένα το SARS-CoV-2.

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να αξιολογηθεί ο χρόνος που απαιτείται ώστε θετικά δείγματα για SARS-CoV-2 να αρνητικοποιηθούν. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 87 ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που ελήφθησαν από 35 ασθενείς θετικούς για COVID-19 σε διάφορες χρονικές περιόδους.

Abstract

SARS-CoV-2 belongs to the coronavirus family, with MERS and SARS being the most genetically related to this family. Like other coronaviruses, SARS-CoV-2 is a positively sense RNA virus of icosahedral symmetry that has a nucleocapsid and a viral envelope. It is transmitted through respiratory secretions such as saliva and droplets. The symptoms of COVID-19 include fever, cough, myalgia, diarrhea, lack of smell and taste as well as mental confusion has been observed in infected people. Of particular importance is that in this disease a large percentage of infected people are asymptomatic. This makes it difficult to be diagnosed and makes the restriction of virus transmission even more difficult. It infects a fairly large range of tissue cells, such as heart, kidneys, intestine and the main target are the lung cells that results in the symptoms of pneumonia.

Currently the most reliable way to diagnose SARS-CoV-2 virus is to detect it by molecular methods and mainly by the method of real time reverse chain reaction polymerase (Real-time-RT-PCR). There are several targets for the molecular diagnosis of the virus in PCR such as regions of the N, E, S, and RdRP genes and the RNA-dependent-RNA-polymerase gene. Specifically, E is used to distinguish β -coronaviruses from other coronaviruses and RdRP is used to specifically detect SARS-CoV-2.

The purpose of this study was to evaluate the time required for positive samples for SARS-CoV-2 to be negative. Specifically, 87 nasopharyngeal samples were studied from 35 COVID-19 positive patients at various times.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

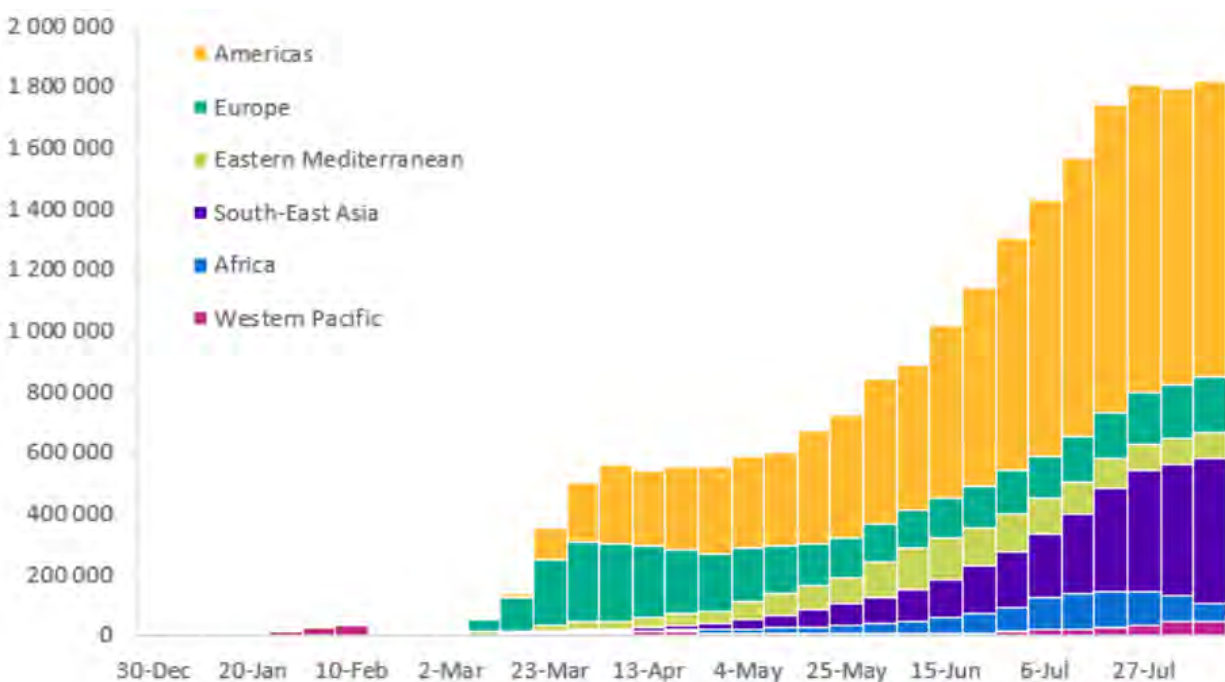
1.1 Εισαγωγή – Ιστορικά δεδομένα

Στα τέλη του Δεκεμβρίου του 2019, αρκετές περιπτώσεις ασθενών με πνευμονία που οφείλονταν σε έναν μη αναγνωρισμένο μικροβιακό παράγοντα καταγράφηκαν σε νοσοκομεία της Wuhan (Επαρχία Χουμπέι, Κίνα). Ένας νέος κορονοϊός αναγνωρίστηκε στη συνέχεια ως ο αιτιολογικός παράγοντας, ο οποίος χαρακτηρίστηκε με την κωδική ονομασία 2019-nCoV. Η ασθένεια ονομάστηκε ως COVID-19 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) και μπορεί να εκδηλωθεί ως ασυμπτωματική λοίμωξη ή ήπια έως σοβαρή πνευμονία. Το υπεύθυνο στέλεχος παρουσιάζει γενετική συσχέτιση τόσο με αυτό της νόσου MERS, αλλά ιδιαίτερα με αυτό της SARS, εξηγώντας τη μετονομασία του ιού σε SARS-CoV 2.^[1]

1.2. Επιδημιολογία

Παγκόσμια επιδημιολογικά δεδομένα

Μέχρι τις 16 Αυγούστου 2020 πάνω από 1,8 εκατομμύρια νέα κρούσματα COVID-19 και 39.000 νέοι θάνατοι έχουν αναφερθεί στον ΠΟΥ. Συνολικά έχουν καταγραφεί 21,2 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα COVID-19 συμπεριλαμβανομένων 761.000 θανάτων. Τις τελευταίες επτά ημέρες, ο αριθμός των αναφερόμενων ημερήσιων περιπτώσεων αυξήθηκε γρήγορα με μέσο όρο 260.000 κρούσματα και 5.500 θανάτους.^[2]



Εικόνα 1: Αριθμός επιβεβαιωμένων κρουσμάτων παγκοσμίως και ανά χώρα



α)



β)

Εικόνα 2: Α) Επιδημιολογικός χάρτης COVID-19 Β) Συνολικός αριθμός θανάτων παγκοσμίως και ανα χώρα

1.3. Ταξινόμηση - Βιολογία του SARS-CoV2

Ο SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) είναι το στέλεχος του κορονοϊού που προκαλεί τη νόσο COVID-19. Ως προς την ταξινόμηση του ιού, ο SARS-CoV-2 ανήκει στην τάξη των Nidovirales, οικογένεια Coronaviridae και στο γένος των Betacoronavirus. Είναι μια ομάδα ζωνόσων ιών που αρχικά βρέθηκαν σε θηλαστικά και πτηνά και περιστασιακά μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες και στον άνθρωπο. Αντίστοιχα παραδείγματα είναι το SARS και MERS. Όπως και οι υπόλοιποι κορονοϊοί, ο SARS-CoV-2 είναι ένας σχετικά μεγάλος σε μέγεθος ιός (περίπου 80–220 nm σε διάμετρο), εικοσαεδρικής συμμετρίας που διαθέτει εξωτερικό ιικό περίβλημα με χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές "ακίδες" που δίνουν το σχήμα της κορώνας. Με βάση το γενετικό του υλικό κατατάσσεται στην ομάδα IV, δηλαδή διαθέτει ένα μονόκλωνο μη τεμαχισμένο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους ≈ 30 kb (29903 nt).^{[3][4]}

1.4. Μετάδοση - Συμπτώματα

Η μετάδοση του SARS-CoV-2 μπορεί να συμβεί μέσω άμεσης ή στενής επαφής με μολυσμένα άτομα μέσω μολυσμένων εκκρίσεων, όπως σάλιο και αναπνευστικές εκκρίσεις ή αναπνευστικά σταγονίδια, τα οποία αποβάλλονται όταν ένα μολυσμένο άτομο εμφανίζει τα αντίστοιχα αναπνευστικά συμπτώματα (βήχας, φτάρνισμα). Τα σταγονίδια που περιλαμβάνουν ιό μπορούν να φτάσουν στο στόμα, τη μύτη ή τα μάτια ενός ευπαθούς ατόμου και μπορεί να οδηγήσουν σε μόλυνση. Επιπλέον, μπορεί να είναι δυνατή η μετάδοση έμμεσης επαφής που περιλαμβάνει την επαφή ενός ευπαθούς ξενιστή με μολυσμένο αντικείμενο ή επιφάνεια. Η μετάδοση του ιού είναι, επίσης, δυνατή μέσω έμμεσης επαφής, στην οποία το άτομο μπορεί να έρθει σε επαφή με τον ιό μέσω ενός μολυσμένου αντικειμένου ή επιφάνειας.^[23]

Όσον αφορά την αερομεταφερόμενη μετάδοση, δηλαδή την εξάπλωση ενός μολυσματικού παράγοντα από τη διάδοση σταγονιδίων (aerosols) που παραμένουν στον αέρα για μεγάλο χρόνο και αποστάσεις, αυτή φαίνεται να είναι δυνατή στην περίπτωση του SARS-CoV-2 κατά τη διάρκεια ιατρικών διαδικασιών, στις οποίες παράγονται αερολύματα (aerosols), ή σε μικρούς ανερπάρκως αεριζόμενους χώρους. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση δεν είναι ακόμα επιβεβαιωμένη.

Σχετικά με την μετάδοση του COVID-19 εκτός των αναπνευστικών εκκρίσεων, προς το παρόν, παρόλο που ο ιός έχει βρεθεί σε βιολογικά υλικά, όπως ούρα και κόπρανα μολυσμένων ατόμων, δεν υπάρχουν σχετικές αναφορές μετάδοσης με αυτόν τον τρόπο.^[5]

Ο SARS-CoV-2 προσβάλλει κυρίως τα κύτταρα των πνευμόνων λόγω υψηλής έκφρασης του ACE-2 υποδοχέα, μέσω του οποίου ο ιός προσδένεται και εισάγεται στα αντίστοιχα κύτταρα. Ωστόσο, ο ACE-2 πέρα από τα κύτταρα των πνευμόνων εκφράζεται σε διάφορα όργανα και ιστούς όπως η καρδιά, έντερο, νεφρά και νευρικό σύστημα, γεγονός το οποίο εξηγεί και την ευρεία συμπτωματολογία του COVID-19.^{[4][18]}

Το COVID-19, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζει ένα ευρύ προφίλ κλινικών εικονών. Είναι μια νόσος της οποίας η εμφάνιση συμπτωμάτων καθώς και η σοβαρότητα αυτών έχει άμεση σχέση με παράγοντες όπως η ηλικία και η παρουσία ή μη υποκείμενων νοσημάτων, ενώ είναι σημαντικό να τονιστεί ότι χαρακτηρίζεται και από ένα σημαντικό ποσοστό ασυμπτωματικών ασθενών, με αποτέλεσμα να γίνεται ακόμη πιο δύσκολος ο περιορισμός της νόσου.^{[22][29]}

Ο μέσος χρόνος επώασης είναι 5,1 μέρες και κυμαίνεται από δυο μέχρι δεκατέσσερις μέρες. Τα συμπτώματα κυμαίνονται από ήπια έως μέτρια λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος με τη μορφή πυρετού με σχετιζόμενη κόπωση, βήχα και πονόλαιμο, ενώ σε περίπου 15% των ασθενών παρατηρούνται μη αναπνευστικά συμπτώματα όπως, κεφαλαλγία, υδαρή διάρροια, κοιλιακό άλγος, ναυτία και έμετο να προηγούνται των αναπνευστικών συμπτωμάτων. Ασθενείς με σοβαρή περίπτωση της νόσου παρουσιάζουν τρία από τα παρακάτω κριτήρια: αναπνευστική ανεπάρκεια, σηπτικό σοκ και ανεπάρκεια πολλαπλών οργάνων. Οι κύριες αιτίες θανάτου στην περίπτωση του COVID-19 είναι το

σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, το σηπτικό σοκ καθώς και η διάδοση της ενδοαγγειακής πήξης και η αποτυχία πολλαπλών οργάνων.^{[6][18]}

Η μόλυνση με COVID έφερε στο προσκήνιο την περίπλοκη αλληλεπίδραση και ισορροπία μεταξύ των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων. Επιπλέον, η βάση για την ασυμφωνία της συμπτωματολογίας και τη σοβαρότητά τους μπορεί να βρίσκεται εντός των γενετικών και επίκτητων διαφορών στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Τα παθολογικά χαρακτηριστικά, όπως η διείσδυση στον μολυσμένο ιστό από μακροφάγα, και η παρουσία λεμφοπενίας και ουδετεροφιλίας κατά την αιματολογική εξέταση, χρησιμεύουν ως έμμεση ένδειξη ισχυρού ανοσολογικού συστατικού αυτής της μόλυνσης. Ως εκ τούτου, η κατανόηση της παθογένεσης μπορεί να αποτελέσει τη βάση καθοδήγησης στρατηγικών θεραπειών και σχεδιασμού εμβολίων.^[4]

1.5. Κύκλος ζωής του ιού

Ως μέλος της τάξης Nidovirales, ο SARS-CoV2 μπορεί να μεταδοθεί από ζώα, όπως οι νυχτερίδες, και μεταξύ ανθρώπων. Η είσοδος του επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων ACE2 που βρίσκονται σε διάφορα όργανα όπως καρδιά, πνεύμονες, νεφρά και γαστρεντερική οδός. Η διαδικασία της εισόδου στο κύτταρο-ξενιστή ξεκινά μέσω της σύνδεσης της S γλυκοπρωτεΐνης του ιού στον υποδοχέα ACE2 στα κύτταρα ξενιστές (όπως σε πνευμονοκύτταρα τύπου II στους πνεύμονες). Αυτή η προσκόλληση παρατηρείται στην επικράτεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 που μπορεί να συνδεθεί ισχυρά με τον ACE2 του ανθρώπου και τον ACE2 της νυχτερίδας. Μετά την σύνδεση του ιού στο κύτταρο ακολουθεί η σύντηξη της ιικής μεμβράνης και αυτής του κυττάρου ξενιστή.^[3]

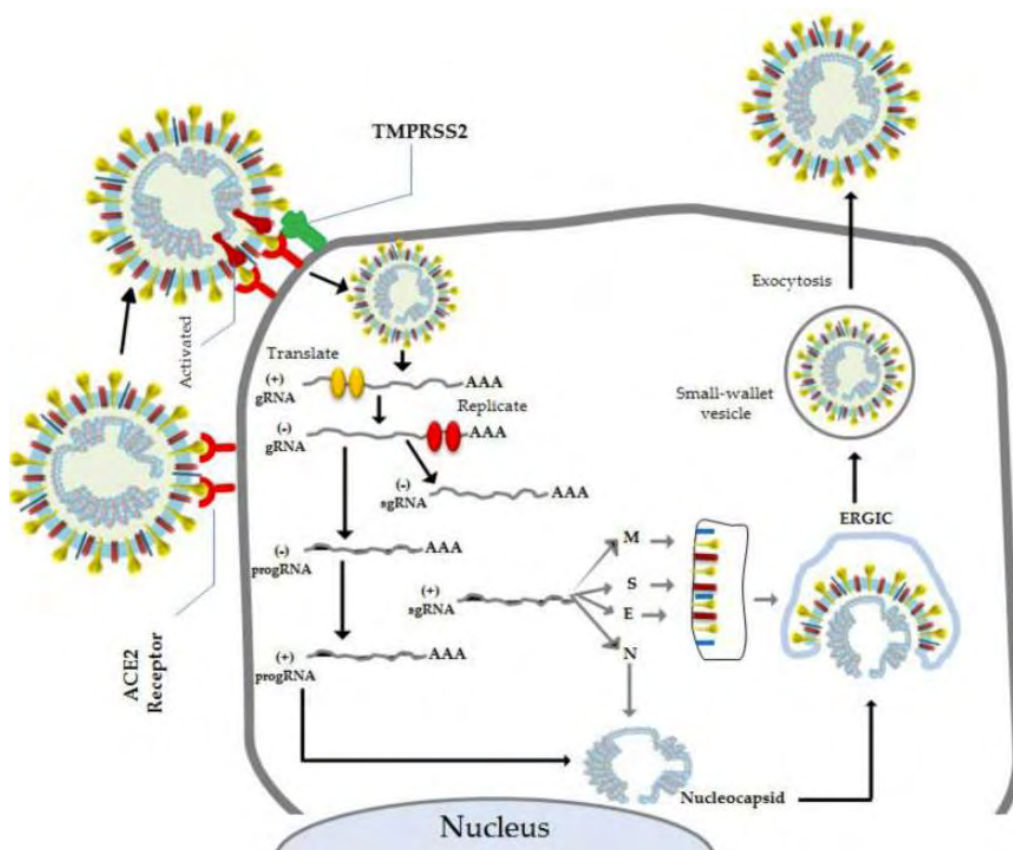
Αφού συμβεί η σύντηξη, η πρωτεάση διαμεμβρανικής σερίνης τύπου II (TMPRSS2) που υπάρχει στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή θα κόψει τον ACE2, ενεργοποιώντας τις πρωτεΐνες S που συνδέονται με τον υποδοχέα. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών S οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσής τους και επιτρέπει στον ιό να εισέλθει στα κύτταρα. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες (TMPRSS2 και ACE2) είναι οι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες για την είσοδο του ιού στο κύτταρο.^[19] Τα επιθηλιακά κύτταρα της ρινικής οδού, συγκεκριμένα τα κυπελλοειδή / εκκριτικά κύτταρα και τα βλεφαριδοφόρα κύτταρα, εμφανίζουν την υψηλότερη έκφραση ACE2 σε όλη την αναπνευστική οδό. Στη συνέχεια, αφού ο SARS-CoV-2 εισέλθει στο κύτταρο, θα απελευθερώσει το γενετικό του υλικό στο κυτταρόπλασμα, όπου και θα μεταφραστεί.^[28]

Το γενετικό υλικό που απελευθερώνεται από τον ιό είναι RNA θετικής πολικότητας που είναι έτοιμο να μεταφραστεί στα ριβοσώματα. Σχετικά με το γονιδιώμα του, αυτός ο ιός αποτελείται από 12 λειτουργικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF), καθένα από τα οποία κωδικοποιεί μια ποικιλία πρωτεϊνών, τόσο δομικών όσο και μη δομικών που διαδραματίζουν ρόλο στην επιβίωσή του καθώς και στη μολυσματικότητά του. Τα τμήματα του γονιδιώματος που κωδικοποιούν μη δομικές πολυπρωτεΐνες είναι αυτά που μεταφράζονται πρώτα σε ORF1a και ORF1b για να παραχθούν δύο μεγάλες επικαλυπτόμενες

πολυπρωτεΐνες, pp1a και pp1ab, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω αλλαγής ριβοσωμικού πλαισίου (ribosomal frameshift).[24] Το γονιδίωμα περιέχει γονίδια πρωτεασών. Συγκεκριμένα, εμπεριέχουν την πρωτεάση (PLpro) και πρωτεάση Mpro τύπου χυμοθρυψίνης (3CLpro) που κωδικοποιούνται από το *nsr3* και *nsr5*. Οι πρωτεάσες αυτές καταλύουν τη διάσπαση μεταξύ pp1a και pp1ab σε μη δομικές πρωτεΐνες (nsps) 1–11 και 1–16, αντίστοιχα.

Πολλές από τις μη δομικές πρωτεΐνες (nsps) στη συνέχεια σχηματίζουν σύμπλοκο ρεπλικάσης-μεταγραφάσης (RTC) σε κυστίδια διπλής μεμβράνης (DMVs), τα οποία αποτελούν ένα συγκρότημα που από RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) - και υπομονάδες που περιέχουν ελικάση, nsr 12 και nsr 9. Περαιτέρω, το σύμπλοκο “μεταγράφει” το γονιδίωμα του ιού σε μορφή αρνητικής πολικότητας και στη συνέχεια τα ενδιάμεσα προϊόντα μεταγράφονται σε mRNA θετικής πολικότητας από την RdRp.[16]

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μετάφραση των δομικών και βοηθητικών πρωτεϊνών όπως πρωτεΐνες M, S και E, οι οποίες στη συνέχεια απομονώνονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μετά μετακινούνται στο ενδιάμεσο διαμέρισμα ενδοπλασματικού δικτύου-Golgi (ERGIC). Παράλληλα, το γονιδίωμα που είχε αντιγραφεί μπορεί να συνδεθεί με τη N πρωτεΐνη σχηματίζοντας τη μορφή του νουκλεοκαψιδίου και να μετακινηθεί στο ERGIC. Σε αυτό το διαμέρισμα, τα νουκλεοκαψίδια θα συναντηθούν με τις υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες και θα τα ισοσωμάτια, τα οποία θα εξαχθούν από το κύτταρο μέσω εξωκυττάρωσης.[7]



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του SARS-CoV-2

1.6. Ανοσολογική απόκριση του οργανισμού στον SARS-CoV-2

Η ανοσοαπόκριση του οργανισμού στον SARS-CoV2 είναι παρόμοια με αυτή στο SARS-CoV και διαμεσολαβείται από κυτοκίνες. Γενικά από σχετικές αναφορές στον COVID-19, φαίνεται πως υπάρχει αύξηση των ουδετερόφιλων, της ιντερλευκίνης 6 και συνολική μείωση των λεμφοκυττάρων.

Η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή προκαλεί διέγερση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή, η οποία θα αντιμετωπιστεί πρώτα από τα έμφυτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω κυττάρων παρουσίασης αντιγόνου (APC), όπως δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα ως πρώτη γραμμή του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι APC έχουν υποδοχείς αναγνώρισης προτύπων (PRR) που περιλαμβάνουν διάφορους υποδοχείς τύπου Toll (TLR), υποδοχείς τύπου NOD (NLR) και υποδοχείς τύπου RIG-I (RLR). Αναγνωρίζουν νουκλεϊκά οξέα, τμήματα υδατανθράκων, γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες και άλλα μικρά μόρια που βρίσκονται στα δομικά συστατικά ιών ή ενδιάμεσων προϊόντων, όπως dsRNA, και επάγουν ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών για να παράγουν τελεστές κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Καθένα από τα PRR θα μπορούσε να προκαλέσει μια διαφορετική βιολογική απόκριση ως απόκριση της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης.

Ως παρουσιαστής ξένων αντιγόνων, το APC θα παρουσιάσει το αντιγόνο του CoV στα CD4+ T-βοηθητικά κύτταρα από MHC τάξης I και αυτό οδηγεί στην απελευθέρωση της IL-12 ως συν-διεγερτικό μόριο για την περαιτέρω διέγερση της ενεργοποίησης των κυττάρων Th1. Εκτός από τη διέγερση Th1 και την απελευθέρωση ιντερλευκίνης-12 και IPN-α, απαιτείται, επίσης, αύξηση της έκφρασης MHC Τάξης I και ενεργοποίηση κυττάρων NK για την αντίσταση του ιικού αναδιπλασιασμού και την εξάλειψη των μολυσμένων από ιούς κυττάρων. Επιπλέον, ξεκινάει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών μέσω της οδού σηματοδότησης NF-κB. Η IL-17 που είναι μια προφλεγμονώδης κυτοκίνη η οποία επίσης αυξάνεται όταν εμφανίζεται μόλυνση από SARS-CoV2. Αυτές οι κυτοκίνες προσλαμβάνουν περαιτέρω ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα στη θέση της μόλυνσης, ενώ παράλληλα ενεργοποιούν πολλές άλλες προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες και χημειοκίνες συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF-β και MCP-1.

Στη συνέχεια, η ενεργοποίηση των κυττάρων Th1 διεγείρει τα CD8+ T κύτταρα, τα οποία είναι ένας από τους τελεστές των T κυττάρων που θα στοχεύουν και θα σκοτώνουν κύτταρα που έχουν μολυνθεί με SARS-CoV-2. Ταυτόχρονα, τα CD4 T κύτταρα θα μπορούσαν να διεγείρουν χυμικές ανοσοαποκρίσεις με παραγωγή αντιγόνων - ειδικών αντισωμάτων μέσω ενεργοποίησης T-εξαρτώμενων B κυττάρων.

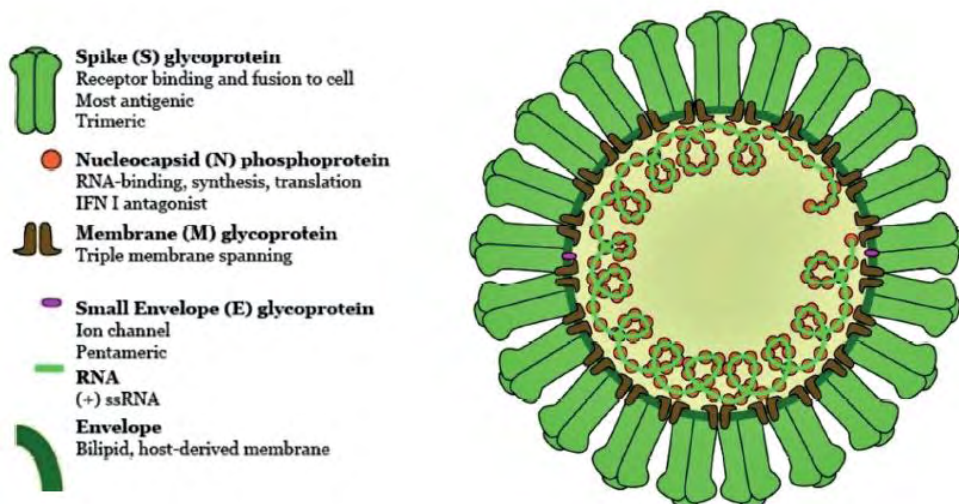
Τα αντισώματα που παράγονται είναι γενικά IgM και IgG, τα οποία έχουν ένα μοναδικό πρότυπο αντιγονοπαρουσίασης ως απόκριση στην παρουσία κορονοϊού. Γενικά, αυτή η μόλυνση θα παράγει ένα συγκεκριμένο IgM που μπορεί να διαρκέσει μόνο 12 εβδομάδες, αλλά και ένα IgG που έχει μεγαλύτερη διάρκεια. Εκτός από τον σχηματισμό αντισωμάτων, η έκθεση σε αυτόν τον ιό προκαλεί επίσης το σχηματισμό CD4 T κυττάρων και CD8 μνήμης που μπορεί να διαρκέσει για τέσσερα χρόνια. Στην

πραγματικότητα, με βάση τα ευρήματα σε ασθενείς που ανέκαμψαν έξι χρόνια μετά τη μόλυνση από κορονοϊό, τα Τ κύτταρα μνήμη ήταν ακόμη σε θέση να αναγνωρίσουν την αντίστοιχη πρωτεΐνη-ακίδα.^[7]

1.7. Μορφολογία του SARS-CoV2

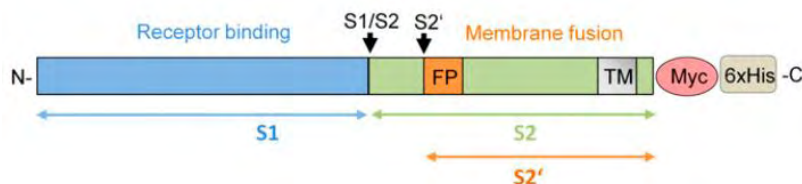
Όπως και οι υπόλοιποι κορονοϊοί, είναι ένας RNA μονόκλωνος ιός θετικής πολικότητας, με το γενετικό του υλικό να μην είναι τεμαχισμένο. Έχει διάμετρο 150-160nm με τα ιικά σωματίδια του να έχουν εικοσαεδρική συμμετρία και διαθέτει τόσο νουκλεοπρωτεϊνικό καψίδιο όσο και ιικό περίβλημα. Χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του ιού είναι η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου N, η πρωτεΐνη E, η μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη M και η γλυκοπρωτεΐνη S, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω.^{[15][25]}

Αρχικά, στο εσωτερικό του ιού το γενετικό του υλικό πακετάρεται μέσω της πρωτεΐνης του νουκλεοκαψιδίου N. Στην επιφάνειά του, το ιοσωμάτιο περιέχει τρεις κύριες πρωτεΐνες: την πρωτεΐνη του φακέλου E (Envelope), την S γλυκοπρωτεΐνη (Spike protein) και μια επιπλέον γλυκοπρωτεΐνη M. Η S και η M πρωτεΐνες αποτελούν τις κύριες πρωτεΐνες του ιικού φακέλου, ενώ το ποσοστό της E είναι αρκετά μικρότερο από αυτό των άλλων δυο.^{[1][8]}



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της εικόνας του SARS-CoV-2

Η S γλυκοπρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση των χαρακτηριστικών ακίδων στον ιό δίνοντας τη μορφή κορόνας. Είναι, επίσης, η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την έναρξη της μόλυνσης μέσω σύνδεσης με τους υποδοχείς ACE-2 των ανθρώπινων κυττάρων και τη σύντηξη του λιπιδικού φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη. Όπως πολλές πρωτεΐνες σύντηξης ιών, έτσι και η S πρωτεΐνη ενεργοποιείται από κυτταρικές πρωτεάσες. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση περιλαμβάνει την πρωτεολυτική πέψη σε δύο διακριτά σημεία, S1/S2 και S2' αντίστοιχα, από τα οποία παράγονται οι S1 και οι S2 υπομονάδες. Η S1 υπομονάδα περιέχει την επικράτεια πρόσδεσης υποδοχέα (RBD), ενώ η S2 υπομονάδα αγκυροβολεί στη μεμβράνη των κυττάρων και συμμετέχει στο μηχανισμό της σύντηξης. Οι κύριες πρωτεάσες που έχουν βρεθεί για την πέψη της S πρωτεΐνης είναι η φουρίνη και η TMPRSS2 (Transmembrane serine protease 2).^{[9][19][28]}



Εικόνα 5: Απεικόνιση του γονιδίου της S πρωτεΐνης και των θέσεων πέψης από πρωτεάσες

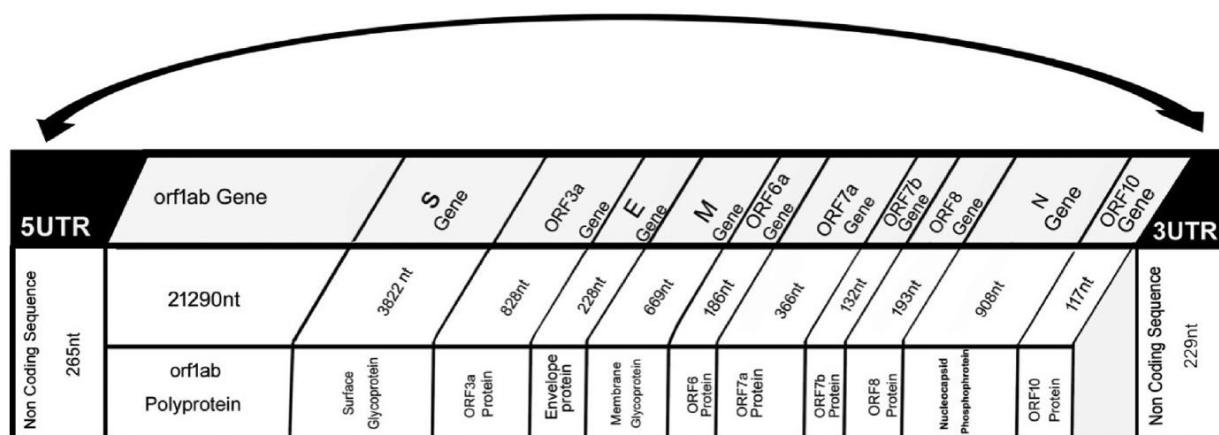
Η M πρωτεΐνη, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, βρίσκεται στην επιφάνεια της λιπιδικής μεμβράνης του ιού και αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ιικού φακέλου. Αρχικά, μέσω αλληλεπίδρασης με την S πρωτεΐνη και στη συνέχεια μέσω σύνδεσης με τον ACE-2 υποδοχέα, συνεισφέρει στη σύντηξη του ιικού σωματίου με την κυτταρική μεμβράνη. Επιπρόσθετα, μετά την είσοδο του ιού, φαίνεται να έχει κύριο ρόλο στη σύνθεση των ιικών σωματίων μέσω συνεισφοράς στην έναρξη του πακεταρίσματος του RNA του ιού με την N πρωτεΐνη. Ο ακριβής μηχανισμός είναι ακόμη μη προσδιορισμένος.

Τέλος, η E που βρίσκεται στη μικρότερη συγκέντρωση στον ιικό περίβλημα, έχει κύριο ρόλο στη μορφογένεση του ιού και στη συναρμολόγηση. Συντίθεται ως μια πενταμερής πρωτεΐνη που δρα ως ιοπορίνη (viroporin) και επιτρέπει τη μεταφορά ιόντων (H^+ και μάλλον K^+). Επίσης, έχει σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα του ιού, καθώς ενεργοποιεί τα σωματία φλεγμονής NLRP3 που οδηγούν σε υπερπαραγωγή IL-1 β .^[8]

1.8. Γονιδίωμα του SARS-CoV2

1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά και οργάνωση γονιδιώματος

SARS-CoV-2 Complete Genome (29903 Nucleotides)



Εικόνα 6: Απεικόνιση της σειράς των γονιδίων και του αντίστοιχου μήκους τους στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2

Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από ένα γραμμικό μη τεμαχισμένο μόριο RNA θετικής πολικότητας. Το ποσοστό σε GC είναι 38% και έχει μήκος 30 kb (29.891 kb). Έχει 89% ποσοστό ομοιότητας με αυτό των υπόλοιπων κορονοϊών και περιλαμβάνει συνολικά 12 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης. Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 παρουσιάζει χαρακτηριστική δομή που συναντάται στους κορονοϊούς και ιδιαίτερα το SARS-CoV και το MERS-CoV, με τα δύο τρίτα αυτού να καταλαμβάνει το γονίδιο orf1ab που κωδικοποιεί τις αντίστοιχες πολυπρωτεΐνες rrb1a και rrb1ab, οι οποίες εκφράζονται από το ORF1 και το ORF2 αντίστοιχα και παράγονται 16 μη-δομικές πρωτεΐνες NSP1-NSP16. Η παραγωγή της πολυπρωτεΐνης rrb1ab από το γονίδιο orf1ab και όχι της rrb1a γίνεται μέσω του φαινομένου αλλαγής ριβοσωμικού πλαισίου (ribosomal frameshift).^[25] Το υπόλοιπο ένα τρίτο περιλαμβάνει γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες S, M, την πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (N) και την πρωτεΐνη του φακέλου (E). Επίσης, ο SARS-CoV-2 περιέχει 6 ακόμα πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 και ORF10 γονίδια.^[10]



Εικόνα 7: Οργάνωση του γονιδιώματος του SARS-CoV-2

Ο MERS-CoV σχετίζεται στενά με το SARS-CoV-2 καθώς φέρει και αυτός ένα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα συγκριτικά με τους υπόλοιπους κορονοϊούς. Έχει επίσης παρόμοια γενετική οργάνωση με τον SARS-CoV-2, η οποία ξινάει από την 5' καλύπτρα, συνεχίζει με το γονίδιο *gen*, από το οποίο παράγονται 16 μη δομικές πρωτεΐνες και καταλήγει σε μια 3' πολυ-A-ουρά. Επίσης, όπως και στο SARS-CoV-2, 10 kb στο 3' άκρο του γονιδιώματος του MERS-CoV αποτελούν τέσσερα γονίδια των δομικών πρωτεϊνών S, E, M, N και πέντε γονίδια βοηθητικών πρωτεϊνών ORF3, ORF4a, ORF4b, ORF5, ORF8.

Μετά από συγκριτική ανάλυση αλληλουχίας του SARS-CoV-2, φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη ομοιότητα με το BAT-CoV, γεγονός το οποίο προτείνει μια πιθανή προέλευση από νυχτερίδες στη Wuhan της Κίνας. Παρά την μεγάλη γενετική ομοιότητα των δυο ιών, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι οι νυχτερίδες αποτελούν φυσικές δεξαμενές του SARS-CoV-2 και όχι την αρχική προέλευση του, καθώς οι κορονοϊοί χρειάζονται κάποιο ενδιάμεσο ξενιστή για να μεταδοθούν στον άνθρωπο. Άλλη μια υπόθεση αφορά την πιθανή προέλευση από Πανγκολίνους, όμως προς το παρόν είναι άγνωστο πώς οι Bat-CoVs τροποποιήθηκαν γενετικά και μόλυναν τους ανθρώπους.^[8]

1.8.2. Γονίδια του SARS-CoV 2

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γονίδιο ORF1ab κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια πρωτεολύεται για να παραχθούν οι πρωτεΐνες NSP1-NSP16.

NSP-1: Αφού ο ιός εισέλθει στο κύτταρο, αναστέλλει τη διαδικασία μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή, αλληλεπιδρώντας με τη 40s υπομονάδα του ριβοσώματος. Επιπρόσθετα, καταλύει τη διάσπαση του mRNA του ξενιστή, κοντά στην 5' αμετάφραστη περιοχή προκειμένου να αποδομηθεί. Καταστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση του κυττάρου ξενιστή, η NSP-1 επιτυγχάνει την αποτελεσματική μετάφραση των ιικών γονιδίων και "αποφεύγει" την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα ιικά mRNA δε στοχεύονται από την NSP-1 καθώς διαθέτουν στο 5' άκρο του μια αλληλουχία-leader που τα προστατεύει από τη διάσπαση.^[11]

Πρωτεΐνη NSP-2: Δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη η λειτουργία της, ωστόσο φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες PHB και PHB2, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στην προστασία του κυττάρου από διάφορους παράγοντες stress.^[11]

Parain-like-proteinase: Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για την πέψη / τεμαχισμό στο αμινοτελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης ρεπλικάσης. Συμμέτχει μαζί με την NSP-4 στη συναρμολόγηση των κυστιδίων με διπλή μεμβράνη που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των ιικών σωματίων. Τέλος, ανταγωνίζεται με την έμφυτη ιντερφερόνη τύπου I μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση, τον διμερισμό και την επακόλουθη πυρηνική μετατόπιση του IRF3 του ξενιστή, ενώ παράλληλα αποτρέπει τη σηματοδότηση του NF-κB.^[11]

Πρωτεΐνη NSP-4: Συμμετέχει στη συναρμολόγηση κυτταροπλασματικών κυστιδίων που προκαλούνται από τον ιό και είναι απαραίτητα για την παραγωγή του ιού. ^[11]

Πρωτεΐνωση 3CL-PRO: Τεμαχίζει το καρβοξυτελικό άκρο τη πολυπρωτεΐνης ρεπλικάσης σε 11 σημεία. Αναγνωρίζει, επίσης, υποστρώματα που περιέχουν την αλληλουχία [ILMVF]-Q-|-[SGACN], ενώ μπορεί να συνδέεται με ADRP. ^[11]

Πρωτεΐνη NSP-6: Έχει κύριο ρόλο στην αρχική επαγωγή των αυτοφαγοσωμάτων από το ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή, ενώ στη συνέχεια περιορίζει την επέκταση αυτών των αυτοφαγοσωμάτων που δεν είναι πλέον ικανά να μεταφέρουν ιικά συστατικά στα λυσοσώματα. ^[11]

Πρωτεΐνη NSP-7: Σχηματίζει ένα εξαδεκαμερές με την NSP-8 (8 υπομονάδες από κάθε μια) που μπορεί να συμμετέχει σε ιική αντιγραφή ενεργώντας ως πριμάση. Εναλλακτικά, μπορεί να συνθέτει σημαντικά μακρύτερα προϊόντα από τους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες. ^[11]

Πρωτεΐνη NSP-8: Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σχηματίζει ένα εξαδεκαμερές με την NSP-7 (8 υπομονάδες από κάθε μια) που μπορεί να συμμετέχει σε ιική αντιγραφή ενεργώντας ως πριμάση. Εναλλακτικά, μπορεί να συνθέτει σημαντικά μακρύτερα προϊόντα από τους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινήτες. ^[11]

Πρωτεΐνη NSP-9: Μπορεί να συμμετάσχει στον ιικό πολλαπλασιασμό δρώντας ως πρωτεΐνη σύνδεσης ssRNA. ^[11]

Πρωτεΐνη NSP-10: Παίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταγραφή του ιού ενεργοποιώντας την NSP-14 3'-5' εξωριβονουκλεάση, τη NSP-16 2'-O-μεθυλοτρανσφεράση, έχοντας με αυτόν τον τρόπο κύριο ρόλο στη μεθυλίωση των ιικών mRNA. ^[11]

RNA-dependent-RNA-polymerase (RdRP): Είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή και τη μεταγραφή του ιικού RNA γονιδιώματος. ^[11]

Helicase: Διαθέτει μια επικράτεια δέσμωσης Zn και έχει την ικανότητα να εκτυλίσσει μόρια DNA και RNA με προσανατολισμό δράσης 5' προς 3'. Η ενεργότητα αυτού του ενζύμου εξαρτάται από μαγνήσιο. ^[11]

ExoN: Έχει δράση εξωριβονουκλεάσης με προσανατολισμό 3' προς 5' τόσο σε ssRNA, όσο και σε dsRNA, καθώς και δράση μεθυλοτρανσφεράσης της N7-γουανίνης. Κατά την αντιγραφή βοηθάει στο proofreading, ώστε να περιορίζεται η ευαισθησία του ιού σε μεταλλαξιγόνα. ^[11]

NendoU: Είναι ένα Mn_2^+ εξαρτώμενο ένζυμο εξειδικευμένο για το ουριδυλικό, το οποίο σχηματίζει 2'-3' κυκλικά φωσφορικά στο 5' του σημείου τομής. ^[11]

2'-O-MT: Είναι μια μέθυλοτρανσφεράση, η οποία καταλύει τη 2-O μεθυλίωση της ριβόζης στην 5' καλύπτρα του mRNA. Η καλύπτρα N7-μεθυλο γουανοσίνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη

δέσμευση του NSP16. Επομένως, διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη μεθυλίωση των ιικών mRNAs που είναι απαραίτητη για την αποφυγή του ανοσοποιητικού συστήματος.^[11]

Πρωτεΐνη S: Αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη για την αναγνώριση και την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο-ξενιστή. Πρωτεολύεται από την TMPRSS2 για να παραχθούν οι S1 και S2 υπομονάδες. Η S1 περιέχει την επικράτεια πρόσδεσης στον υποδοχέα, ενώ η S2 συμμετέχει στη διαδικασία της σύντηξης.^{[11][18]}

Orf3a: Σχηματίζει ομομοτετραμερή κανάλια ιόντων ευαίσθητα στο κάλιο (virogorgins) και σχετίζεται με την απελευθέρωση του ιού. Ρυθμίζει την έκφραση των υπομονάδων ινωδογόνου FGA, FGB και FGG σε επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα του ξενιστή. Προκαλεί απόπτωση στην καλλιέργεια κυττάρων. Τέλος, μειώνει την έκφραση του υποδοχέα ιντερφερόνης τύπου 1 μέσω φωσφορυλίωσης φωσφορυλίωση σερίνης εντός του μοτίβου αποικοδόμησης της υπομονάδας άλφα-υποδοχέα IFN 1 (IFNAR1) και αυξάνοντας την ουβικουτίνωση του IFNAR1.^[11]

E: Παίζει κεντρικό ρόλο στη μορφογένεση και τη συναρμολόγηση του ιού. Δρα ως ιορορίνη (virogorgin) και αυτοσυναρμολογείται σε μεμβράνες των κυττάρων ξενιστών σχηματίζοντας πενταμερείς πόρους πρωτεϊνών-λιπιδίων που επιτρέπουν τη μεταφορά ιόντων. Επίσης, παίζει ρόλο στην πρόκληση απόπτωσης. Τέλος, ενεργοποιεί το το σωματίο φλεγμονής NLRP3 του ξενιστή, οδηγώντας σε υπερπαραγωγή IL-1beta.^[11]

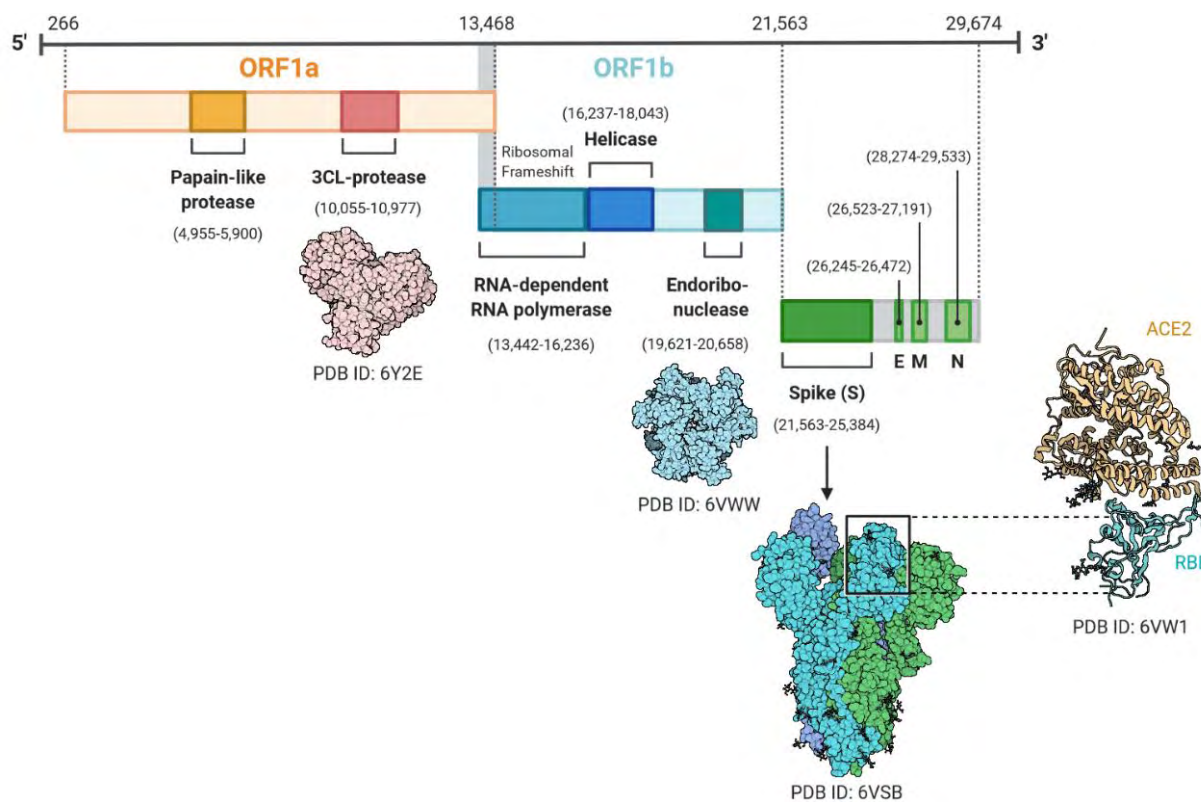
Πρωτεΐνη M: Αποτελεί συστατικό του ιικού περιβλήματος και μάλιστα αυτή που βρίσκεται στη μεγαλύτερη ποσότητα σε σύγκριση με τις E και S. Έχει κύριο ρόλο στη μορφογένεση και τη συναρμολόγηση του ιού μέσω των αλληλεπιδράσεων του με άλλες ιικές πρωτεΐνες.^{[11][26]}

ORF6: Διαταράσσει το σχηματισμό του συμπλόκου εισόδου στον πυρήνα με πρόσδεση της καρυοφερόνης άλφα 2 και της καρυορορίνης βήτα 1 στη μεμβράνη. Η διατήρηση των παραγόντων εισαγωγής στη μεμβράνη ER / Golgi οδηγεί σε απώλεια μεταφοράς στον πυρήνα. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η πυρηνική μετατόπιση STAT1 σε απόκριση στη σηματοδότηση ιντερφερόνης, εμποδίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων που διεγείρονται από ιντερφερόνη (ISGs) που εμφανίζουν πολλαπλές αντιικές δραστηριότητες.^[11]

ORF7a: Συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό του ιού, απορρυθμίζοντας τη G0/G1 φάση του κυττάρου ξενιστή. Συμμετέχει στο στάδιο αλληλεπίδρασης μεταξύ ιού και ξενιστή. Το αντίστοιχο γονίδιο παρουσιάζει ομοιότητα με ορισμένα γονίδια NS-8 BAT-CoVs, αλλά διαφέρει εντελώς από τα αντίστοιχα NS-8 και NS-8b του SARS-CoV.^[11]

Πρωτεΐνη N: Πακετάρει το θετικής πολικότητας γονιδίωμα του ιού σε ένα ελικοειδές ριβονουκλεοκαψίδιο (RNP) και διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο κατά τη συναρμολόγηση ιοσωμάτων μέσω των αλληλεπιδράσεών του με το ιικό γονιδίωμα και την πρωτεΐνη μεμβράνης M. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της απόδοσης της μεταγραφής και αντιγραφής του ιικού RNA. [11]

ORF10: Προς το παρόν δεν είναι σαφές εάν αυτή η περιοχή μεταφράζεται σε λειτουργική πρωτεΐνη. Η αντίστοιχη περιοχή σε σχετικούς Β-CoVs, όπως το SARS-CoV, δεν αντιστοιχεί σε μεταφρασμένο πεπτίδιο. [11]



Εικόνα 8: Οργάνωση του γονιδιώματος του SARS-CoV-2 και σχηματική απεικόνιση των χαρακτηριστικών για τον ιό πρωτεΐνες

1.9. Μοριακή διάγνωση του SARS-CoV-2

Προς το παρόν δυο είναι οι κύριες μέθοδοι διάγνωσης του SARS-CoV 2: α) Μοριακή διάγνωση μέσω τεχνικών που βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων (Nucleic acid assays) και β) Ανοσολογικές μέθοδοι διάγνωσης μέσω τεστ αντισωμάτων ή αντιγόνων για τον SARS-CoV 2 (Immunological assays).^{[12][20]}

1.9.1. Διάγνωση μέσω τεχνικών που βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων του ιού

Real-time-RT-PCR

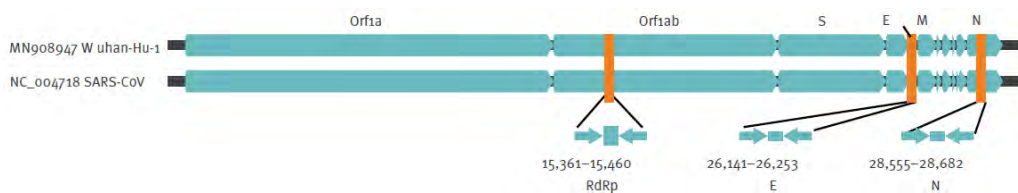
Σε περιπτώσεις οξείας αναπνευστικής μόλυνσης η μέθοδος της real-time-PCR (ανάστροφη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) αποτελεί μια συνηθισμένη μέθοδο για την ανίχνευση των αντίστοιχων ιών σε δείγματα από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος. Λόγω της υψηλής της εξειδίκευσης και ευαισθησίας, αποτελεί προς το παρόν την καλύτερη μέθοδο για την ανίχνευση και τη μελέτη του SARS-CoV-2.^[20]

Προκειμένου η μέθοδος αυτή να εφαρμοστεί στη μοριακή διάγνωση του SARS-CoV 2, ένα πλήθος των γονιδίων αυτού έχει ταυτοποιηθεί, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί στόχοι. Τέτοια είναι τα γονίδια της πρωτεΐνης του νουκλεοκασιδίου (N), των πρωτεϊνών E, S, καθώς και το γονίδιο της RNA-εξαρτώμενης-RNA-πολυμεράσης (RdRP) και περιοχές των πλαισίων ORF1a και ORF1b.^[12]

Η ανίχνευση / μέτρηση του ιικού RNA στην real-time-RT-PCR υπολογίζεται μέσω του αριθμού Ct (Cycle Threshold), ο οποίος ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων που απαιτείται στη PCR ώστε το σήμα φθορισμού να ξεπεράσει μια τιμή-ουδό και να είναι ανιχνεύσιμο.

Όσον αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τιμές Ct μικρότερες από 40 χαρακτηρίζονται ως θετικά (εύρος 15-35). Πρέπει να αναφερθεί ότι παρά τη μεγάλη εξειδίκευση της μεθόδου, υπάρχουν περιπτώσεις ψευδώς-αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω κακής δειγματοληψίας ή λανθασμένου χρόνου δειγματοληψίας.

Σχετικά με τα πρωτόκολλα real-time-RT-PCR που εφαρμόζονται, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνιστά την χρήση του γονιδίου E προκειμένου να ανιχνευθούν ιοί του γένους των βήτα-κορονοϊών, μαζί με κάποιο γονίδιο από τα N, ORF1ab και RdRP ώστε να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη του SARS-CoV 2.



Εικόνα 9: Τα κυριότερα γονίδια- στόχοι για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 μέσω real-time-RT-PCR

1.9.2. Διάγνωση μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV 2

Σε αυτή τη μέθοδο διάγνωσης γίνεται μέτρηση / ανίχνευση των αντισωμάτων που παράγονται από τον οργανισμό ως απόκριση στην παρουσία μιας ιικής μόλυνσης. Συγκεκριμένα, γίνεται μέτρηση IgM και IgG αντισωμάτων εξειδικευμένων για το SARS-CoV-2.^[31]

Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση του ιού τόσο σε συμπτωματικά όσο και ασυμπτωματικά άτομα. Ωστόσο, επειδή στα αρχικά στάδια της μόλυνσης η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί, αυτή η μέθοδος μοριακής διάγνωσης δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού στη φάση της ενεργού μόλυνσης και ιδιαίτερα στα αρχικά της στάδια, σε αντίθεση με την real-time-RT-PCR.^{[12][21]}

Ο έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο σε ορό ή πλάσμα και η ανίχνευση των αντισωμάτων μπορεί να βασιστεί είτε στη μεθοδο ELISA όπου η ανίχνευση βασίζεται στη φωτομέτρηση, είτε στη ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία ροής, στην οποία βασίζονται τα γρήγορα τεστ και η παρουσία των αντισωμάτων παρατηρείται με χρωματική αλλαγή της αντίστοιχης λωρίδας.

Η διάγνωση μέσω ανίχνευσης αντισωμάτων παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού, καθιστώντας την ιδιαίτερα χρήσιμη σε επιδημιολογικές μελέτες.^[13]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν διαθέσιμα γρήγορα τεστ (rapid test) αντισωμάτων IG και IgM, εξειδικευμένα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του SARS-CoV-2. Τα τεστ αυτά είναι ιδιαίτερα πρακτικά λόγω του μικρού κόστους και της ταχύτητας του αποτελέσματος σε σύγκριση με τη μέθοδο της real-time-PCR. Ωστόσο, λόγω του μεγάλου ποσοστού ψευδώς-θετικών αποτελεσμάτων, προς το παρόν η χρήση τους για τη μοριακή διάγνωση του ιού δεν ενδείκνυται.

1.9.3. Άμεση ανίχνευση στο κλινικό δείγμα των αντιγόνων του ιού

Σε αυτού του είδους τα τεστ, γίνεται η ανίχνευση των αντίγονων και στην πλειονότητα τους, της N πρωτεΐνης του ιού. Όπως και τα γρήγορα τεστ αντισωμάτων, βασίζονται στην ανοσοχρωματογραφική δοκιμασία ροής. Τα τεστ αυτά χαρακτηρίζονται από μεγάλη εξειδίκευση, αλλά δεν έχουν μεγάλη ευαισθησία. Για το λόγο αυτό αρνητικά αποτελέσματα σε περιπτώσεις όπου οι ασθενείς παρουσιάζουν συμπτωματολογία ενεργού μόλυνσης χρειάζονται να επιβεβαιωθούν από εξέταση με real-time-PCR.^[13]

1.10. Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να αξιολογηθεί ο χρόνος που απαιτείται ώστε θετικά δείγματα για SARS-CoV-2 να αρνητικοποιηθούν. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 87 ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα που ελήφθησαν από 35 ασθενείς θετικούς για COVID-19 σε διάφορες χρονικές περιόδους.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. RT-PCR ή PCR-πραγματικού χρόνου

Η μέθοδος της PCR περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1993 από τον Higuchi και τους συνεργάτες του και αναφέρεται στην ενίσχυση του DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η οποία ελέγχεται ενώ εξελίσσεται. Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα που προσφέρει στον ερευνητή να παρατηρεί την ενίσχυση του αρχικού γενετικού υλικού σε πραγματικό χρόνο. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της γίνεται ολοένα και πιο ευρεία, εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού θερμοκυκλοποιητών Real Time PCR στην αγορά και της επακόλουθης πτώσης του κόστους τους όπως επίσης και των τιμών των αντιδραστηρίων.

Η Real Time PCR εφαρμόζεται τόσο σε παραδοσιακές όσο και σε νέες εφαρμογές με σημαντική αποτελεσματικότητα σε σχέση με την απλή PCR. Το γεγονός ότι η μέθοδος συλλέγει στοιχεία κατά την εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του DNA δημιούργησε νέες προοπτικές για ποικίλες εφαρμογές, όπως ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών, μέτρηση της έκφρασης γονιδίων, επαλήθευση του πολλαπλασιασμού γονιδίων, εκτίμηση της αποτελεσματικότητας θεραπευτικής αγωγής, ποσοτικό προσδιορισμό βλάβης στο DNA, ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και προσδιορισμό γονοτύπου.

Στη Real-Time PCR η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, καθώς το προϊόν που παράγεται συνδέεται με μία φθορίζουσα χρωστική ουσία, η οποία ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή της Real-Time PCR. Μέσω του συγκεκριμένου οργάνου, καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού, που αντανακλά το ποσό του συντιθέμενου νέου DNA. Έτσι, καθίσταται δυνατή η επακριβής μέτρησή του. Η Real-Time PCR μετρά τα προϊόντα PCR καθώς συσσωρεύονται ή μετρά σε πραγματικό χρόνο το ποσό των προϊόντων PCR σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των φθορίζουσων χρωστικών ουσιών. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης PCR, ένα σήμα φθορίζουσας χρωστικής καθορίζει το σημείο στο οποίο μπορούν να συγκριθούν όλα τα δείγματα συνολικά. Το κατώφλι υπολογίζεται ως συνάρτηση του ποσού του υποβάθρου της φθορίζουσας χρωστικής. Τελικά, ο κλασματικός αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται, ώστε να παράγουν αρκετό σήμα φθορίζουσας χρωστικής ικανό να φθάσει σε αυτό το κατώφλι, χαρακτηρίζεται ως κατώφλι κύκλου (cycle threshold, Ct). Οι τιμές του Ct εξαρτώνται απόλυτα

από το αρχικό ποσό του δείγματος και αποτελούν τη βάση για τον υπολογισμό των αντιγράφων DNA ή των επιπέδων έκφρασης του mRNA.

Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού αποτελεί στην ουσία τη συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων. Ως γραμμή βάσης ορίζονται οι κύκλοι PCR κατά τους οποίους το σήμα συσσωρεύεται, αλλά βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος (κατώφλι). Το κατώφλι υπολογίζεται πολλαπλασιαζόμενο 10 φορές σε σχέση με την κανονική παρέκκλιση από το μέσο σήμα της χρωστικής της βασικής γραμμής. Σήμα χρωστικής το οποίο ανιχνεύεται πάνω από το κατώφλι θεωρείται πραγματικό και χρησιμοποιείται για τον καθορισμό του κατωφλιού κύκλου για ένα δείγμα. Οι τιμές του Ct καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των κύκλων PCR κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης.

Η ικανότητα ελέγχου της προόδου του πολλαπλασιασμού του DNA σε πραγματικό χρόνο, η οποία επιτυγχάνεται κατά τη μεθοδολογία της Real Time PCR, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ειδικών χημικών αντιδράσεων. Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται σημασμένοι ανιχνευτές διαφόρων τύπων. Καθένας διαθέτει μοναδικά χαρακτηριστικά, με τη βασική στρατηγική να παραμένει κοινή για όλους και να αφορά στην ουσία την πρόκληση μιας ανιχνεύσιμης αλλαγής κατά τον πολλαπλασιασμό του DNA. Οι πιο κοινές χημικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη Real Time PCR αφορούν: α) τη SYBR green I χρωστική, β) τους ανιχνευτές υδρόλυσης και γ) τους ανιχνευτές υβριδοποίησης. Η χρήση ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών στη Real Time PCR οδηγεί στην επίτευξη μεγαλύτερης ειδικότητας. Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι με φθοριοχρώματα, ένα μόριο δότη και ένα μόριο αποσβέστη, ενώ υβριδίζονται στο πρότυπο DNA. Οι μέθοδοι ολιγονουκλεοτιδικών ανιχνευτών είναι οι Taqman probes, molecular beacons και scorpion primers. Σνηθέστερη τεχνική χρήσης αποτελούν οι ανιχνευτές Taqman. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος της PCR.

Τα προτερήματα της Real Time PCR, έναντι της απλής PCR, αλλά και άλλων μοριακών μεθόδων, είναι αρκετά. Το κυριότερο από αυτά είναι δυνατότητα υπολογισμού νουκλεϊκών οξέων με απίστευτα δυναμικό εύρος (το λιγότερο 5 λογαριθμικές μονάδες). Η ικανότητα αυτή σχετίζεται με την ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, στην οποία οφείλεται η ανίχνευση λιγότερων από πέντε αντιγράφων νουκλεϊκών αλληλουχιών (ίσως και μόνο ενός σε μερικές περιπτώσεις). Πλεονεκτήματα αποτελούν επίσης ο μικρός απαιτούμενος χρόνος αντίδρασης με παράλληλη ανάλυση του αποτελέσματος, η υψηλή ακρίβεια, η επαναληψιμότητα λόγω αυτοματισμού της αντίδρασης και της ανάλυσης και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης. Τέλος, ένα ακόμη πλεονέκτημα που παρουσιάζει αυτή η μέθοδος είναι η αποφυγή ή ελαχιστοποίηση επιμολύνσεων, καθώς η εκτέλεση της αντίδρασης πραγματοποιείται σε ένα κλειστό σύστημα, χωρίς την απαίτηση εξωτερικών χειρισμών ανάλυσης του προϊόντος.

2.2. Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού του ιού πραγματοποιείται μέσω επώασης του δείγματος σε ένα ειδικό διάλυμα λύσης / Binding μαζί με την παρουσία πρωτεΐνης K. Συγκεκριμένα, το δείγμα αναμιγνύεται με ένα χατροπικό άλας, την υδροχλωρική γουανιδίνη και στη συνέχεια εφαρμόζεται σε σωλήνα που περιέχει φίλτρο που αποτελείται από ίνες γυαλιού. Κάτω από τις συνθήκες που δημιουργούνται από το διάλυμα τα νουκλεϊικά οξέα του ιού συνδέονται στο φίλτρο, ενώ συστατικά όπως πρωτεΐνες, άλατα και λοιπά συστατικά του ιού δεν κατακρατώνται και μέσω διαδοχικών κύκλων έκπλυσης και φυγοκέντρησης απομακρύνονται. Στο τέλος της διαδικασίας τα νουκλεϊικά οξέα του ιού μπορούν να εκλουστούν με εφαρμογή διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης άλατος ή νερού ελεύθερο από RNAάσες.

Στην παρούσα εργασία για τη διαδικασία της εκχύλισης του RNA του ιού, χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο kit της Roche (High Pure Viral Nucleic Acid Kit) , τα αναλυτικά βήματα της οποίας περιγράφονται παρακάτω:

- 1) Σε ένα tube των 1.5 ml γίνεται προσθήκη 200μl δείγματος, 200μl από το Working Solution και 50μl από το διάλυμα της πρωτεΐνης K και ακολουθεί επώαση στους 72°C για 10 λεπτά.
- 2) Προσθήκη 100μl Binding Buffer, η οποία συνοδεύεται από ανάδευση.
- 3) Μεταφορά του δείγματος σε ένα σωλήνα με το αντίστοιχο φίλτρο.
- 4) Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 11.000 rpm.
- 5) Αφαίρεση του φίλτρου και απομάκρυνση του υγρού που έχει απομείνει στο σωλήνα. Εφαρμογή του φίλτρου σε νέο σωλήνα.
- 6) Προσθήκη 500 μl από το διάλυμα Inhibitor Removal Buffer και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11000 rpm.
- 7) Αφαίρεση του φίλτρου και απομάκρυνση του υγρού που έχει απομείνει στο σωλήνα. Εφαρμογή του φίλτρου σε νέο σωλήνα.

- 8) Προσθήκη 450 µl διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 11.000 rpm.
- 9) A) Αφαίρεση του φίλτρου και απομάκρυνση του υγρού που έχει απομένει στο σωλήνα.
Εφαρμογή του φίλτρου σε νέο σωλήνα.
B) Προσθήκη 450 µl διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρηση για 10 δευτερόπτα στη μέγιστη ταχύτητα.
- 10) Αφαίρεση του φίλτρου από το σωλήνα συλλογής και τοποθέτηση του φίλτρου σε ένα tube των 1.5 ml.
- 11) Για την έκλυση των νουκλεϊκών οξέων: Προσθήκη 50 µl από το διάλυμα έκλυσης (διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης άλατος ή νερό ελεύθερο από RNAάσες) και φυγοκέντρηση.

2.3. Ανίχνευση του SARS-CoV-2

Η μοριακή ανίχνευση του ιού στα ρινοφαρυγγικά δείγματα που εξετάστηκαν πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της RT-real-time-PCR.

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το kit GENESIG της Primer Design για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου RdRP (περιέχει εκκινητές ειδικούς για την αντίστοιχη περιοχή στο γονίδιο orf1ab), ενώ για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου E χρησιμοποιήθηκε το kit της ROCHE.

Πρέπει να αναφερθεί ότι και στα δυο kit εκτός από το E και RdRP, ενισχύθηκε και ένα γονίδιο αναφοράς. Ένα αντίστοιχο γονίδιο είναι αυτό της RNAάσης P, το οποίο υπάρχει φυσιολογικά στα ανθρώπινα κύτταρα σε μεγάλες ποσότητες. Μέσω της ενίσχυσης ενός αντίστοιχου γονιδίου τεκμηριώνεται ότι έχει ληφθεί κατάλληλο κλινικό δείγμα.

Επίσης, σε κάθε κλινικό δείγμα προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα RNA ενός γονιδίου (Internal control), το οποίο στη συνέχεια ανιχνεύτηκε παράλληλα με τα άλλα γονίδια προκειμένου να τεκμηριωθεί ο αποκλεισμός της παρουσίας RNAάσης και ότι η εξαγωγή του RNA έγινε επιτυχώς.

Πρωτόκολλο για real-time-RT-PCR με το κιτ GENESIG:

- 1) Σε όλα τα σωληνάρια της αντίδρασης, γίνεται διανομή 12 μl του μείγματος που περιέχει qpcr OneStep Master Mix (MMX) (10μl) και Coronavirus (COVID-19) CE IVD Prmer/Probe (2μl).
- 2) Προσθήκη στα αντίστοιχα tubes 8 μl RNA από το αντίστοιχο δείγμα.
- 3) Προσθήκη 8 μl RNAase-free Water για τον αρνητικό μάρτυρα στο tube που έχω σημανθεί ως (-).
- 4) Προσθήκη 8 μl από το θετικό μάρτυρα στο tube που έχει σημανθεί ως (+).
- 5) Τοποθέτηση των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε στον αναλύτη και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε είναι το παρακάτω:

	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αντίστροφη μεταγραφή	10 λεπτά	55°C	1
Αρχική αποδιάταξη (Ενεργοποίηση της Taq)	2 λεπτά	95°C	1
Αποδιάταξη	10 δευτ.	95°C	45
Υβριδοποίηση και επιμήκυνση	60 δευτ.	60°C	

Ο θετικός μάρτυρας του κιτ αναμένεται να δώσει θετικό σήμα μεταξύ 14-22 Cq στο FAM. Ο αρνητικός μάρτυρας δε θα δώσει καθόλου σήμα στο FAM και θα δώσει <30 στο VIC/HEX/Yellow555.

Πρωτόκολλο για real-time-RT-PCR με το κιτ ROCHE:

- 1) Σε όλα τα σωληνάρια της αντίδρασης, γίνεται διανομή 15 μl του μείγματος που περιέχει RNAase-free Water (9,9μl), Master mix (4μl), EAV probes (0,5μl), E-gene probes (0,5μl) και ένζυμο αντίστροφης μεταγραφής (0,1 μl).
- 2) Προσθήκη στα αντίστοιχα tubes 5 μl RNA από το αντίστοιχο δείγμα.
- 3) Προσθήκη 5 μl RNAase-free Water για τον αρνητικό μάρτυρα στο tube που έχει σημανθεί ως (-).

- 4) Προσθήκη 5 μl από το θετικό μάρτυρα στο tube που έχει σημειωθεί ως (+).
- 5) Τοποθέτηση των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει σχεδιαστεί στον αναλύτη και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε είναι το παρακάτω:

	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αντίστροφη μεταγραφή	5 λεπτά	55°C	1
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C	1
Υβριδοποίηση και επιμήκυνση	5 δευτ.	95°C	45
	15 δευτ	60°C	
	15 δευτ	72°C	

Πρωτόκολλο για real-time-RT-PCR για το γονίδιο της Rνάσης P

- 1) Σε όλα τα σωληνάρια της αντίδρασης, γίνεται διανομή 20 μl του μείγματος που περιέχει RNAase-free Water (5,5μl), Reaction mix (12.5μl), Probes (0,5μl), Primers (0.5μl) Taq polymerase (0,5 μl).
- 2) Προσθήκη στα αντίστοιχα tubes 5 μl RNA από το αντίστοιχο δείγμα.
- 3) Προσθήκη 5 μl RNAase-free Water για τον αρνητικό μάρτυρα στο tube που έχει σημειωθεί ως (-).
- 4) Προσθήκη 5 μl από το θετικό μάρτυρα στο tube που έχει σημειωθεί ως (+).
- 5) Τοποθέτηση των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο που έχει σχεδιαστεί στον αναλύτη και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Το πρωτόκολλο κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε είναι το παρακάτω:

	Χρόνος	Θερμοκρασία	Κύκλοι
Αποδιάταξη	2 λεπτά	95°C	1
Υβριδοποίηση και επιμήκυνση	15 δευτ.	95°C	45
	30 δευτ	55°C	

3. Αποτελέσματα

Τα 35 άτομα από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα, προσήλθαν στα ΤΕΠ του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Όλα τα δείγματα ήταν ρινοφαρυγγικά, τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με τη μέθοδο real-time-RT-PCR, καθώς ως τώρα αποτελεί την πιο ευαίσθητη και ειδική μέθοδο.

ΔΕΙΓΜΑ	RdRP	E-gene	ΜΕΡΕΣ
1	15.93		1
	36.85	34.93	14
	32.93	31.63	19
	0	0	25
2	27.82		1
	38.72	33.33	7
	34.42	33.28	9
	0	0	13
3	25.76		0
	37	33.47	16
	38.72	35.24	18
	0	37.39	24
4	30.27		1
	32.16	30.34	4
	33.75		14
	0		19
	38.99	33.94	20
	0		21
	39.13		22
	39	33.29	24
	0	0	26
5	25.51		1
	35.21	34.02	9
	0	0	18
6	34.64		1
	36.96	0	6
	0	0	9
7	22.98		1
	0	35.43	6

ΔΕΙΓΜΑ	RdRP	E-gene	ΜΕΡΕΣ
8	27.11		1
	23.58		14
	0		23
	32		26
	0	0	33
9	21.13		1
	0	0	9
10	29.85		1
	0	0	13
11	31.29		1
	0		1
12	18.51		1
	23.76		9
	33.6		14
	0	0	18
13	14.27		1
	0	35.85	19
14	22.92		1
	0	0	12
	37.46	0	16
	0		26
15	29.29		1
	38.99	34.70	9
	39.89	33.46	13
	0	35.77	20
16	16.26		1
	0	34.45	9

ΔΕΙΓΜΑ	RdRP	E-gene	ΜΕΡΕΣ
17	21.38		1
	28.93		4
	37.85	33.97	13
	0	35.33	19
18	36.37		1
	34.93	27.80	2
	36.67	33.43	8
	32.06	29.64	10
	0	35.58	13
19	20.9		1
	24.94		12
	0	35.61	15
20	21.96		1
	0	0	14
21	43.04	28.77	1
	30.54		0
	33.46	30.33	3
	32.98	35.47	10
	0		20
22	23.96		1
	0	35.64	28
23	24.35		1
	29.73	28.23	14
	37.36	33.88	15
	37.99		17
24	37.77		1
	39.5	35.03	5
	37.92	31.77	8
	0	37.12	12

ΔΕΙΓΜΑ	RdRP	E-gene	ΜΕΡΕΣ
25	22.56		1
	25.98		9
	22.83		13
	0	30.08	17
26			1
	32.49		2
	31		8
	0	35.44	16
	37.16		19
27	30.12		1
	35.78	33.57	12
	0	36.66	16
28	17.91		1
	32.55	31.43	12
	0	0	13
29	31.52		0
	0		9
	33.28		11
	0	0	15
30	36.78	31.57	0
	25.83		10
	0		12
31	33.89	31.17	1
	27.37		1
	0	35.80	7

ΔΕΙΓΜΑ	RdRP	E-gene	ΜΕΡΕΣ
32	30.32		1
	30.65		1
	32.38		10
	0	25.49	14
	34.32		15
	0	0	18
33	29.02		0
	0	0	11
34	33.77		0
	0	0	9
35	22.92		0
	0	35.02	17

Η real-time PCR αποτελεί μια πολύ ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, σε αρκετούς ασθενείς ακόμη και μετά απο 14 μέρες ανιχνεύεται έστω και ελάχιστο ιικό φορτίο.

4. Συζήτηση

Είναι πλέον γνώστο ότι ο SARS-CoV-2 αποτελεί έναν από τους σοβαρότερους κινδύνους της δημόσιας υγείας, έχοντας ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, από ήπια ως σοβαρή πνευμονία, ενώ το ποσοστό των ασυμπτωματικών ατόμων είναι ιδιαίτερα μεγάλο. Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων μοριακής διάγνωσης είναι αναγκαία.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν να προσδιοριστεί ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι τα άτομα που έχουν διαγνωστεί με COVID-19 να αρνητικοποιηθούν δεδομένου ότι σύμφωνα με τις οδηγίες απαιτούνται δυο διαδοχικά αρνητικά δείγματα με PCR πριν αυτοί επιστρέψουν στην κανονικότητα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εργασίας, ο μέσος όρος για να διαγνωστεί ένας ασθενής ως αρνητικός είναι 14,9 μέρες. Ωστόσο αυτό αποτελεί μια γενική ένδειξη, καθώς ο χρόνος για να επιτευχθεί η αρνητικοποίηση είναι ιδιαίτερα μεταβλητός και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ορισμένοι τέτοιοι παράγοντες είναι η ηλικία του ασθενούς, το ιικό φορτίο που φέρει καθώς εξίσου σημαντική είναι και η ποιότητα της δειγματοληψίας.

Όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα, ενώ η πλειονότητα των δειγμάτων ακολουθεί την αναμενόμενη σταδιακή και διαδοχική ελάττωση του ιικού φορτίου, ένα σημαντικό ποσοστό δεν ακολουθεί αυτό το πρότυπο. Συγκεκριμένα, σε κάποια δείγματα ασθενών (6 από τους 35 ασθενείς), οι τιμές του ιικού φορτίου δεν ελαττώνονται συνεχώς αλλά αυξομειώνονται. Πιθανή εξήγηση της αυξομείωσης θα μπορούσε να αποδοθεί στη μεγάλη ευαισθησία της Real-time PCR που ανιχνεύει μόνο θραύσματα του ιού, επηρεάζοντας έτσι μια μεταβλητότητα.

Βιβλιογραφία

- 1) S. KANNAN, P. SHAIK SYED ALI et al. "COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) recent trends" *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **2020**.
- 2) WHO "Coronavirus disease (COVID-19)" Weekly Epidemiological Update 1" (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200817-weekly-epi-update-1.pdf?sfvrsn=b6d49a76_4) *World Health Organization* **2020**, τελευταία πρόσβαση 11/10/2020
- 3) Fehr A. Perlman S. "Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis." **2015**
- 4) Amanjit Bal Ranjan Agrawal et al. "COVID-19: An up-to-date review - from morphology to pathogenesis" *Indian journal of pathology and microbiology* Jul-Sep 2020;63(3):358-366. **2020**
- 5) WHO "Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions" (<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>) *World Health Organization* **2020**, τελευταία πρόσβαση 10/10/2020
- 6) Hussin A. Rothan, Siddappa N. Byrareddy "The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak" *Journal of Autoimmunity* **2020**
- 7) Indwiani Astuti, Ysrafil "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response" *Diabetes Metab Syndr. 2020 July-August; 14(4): 407–412. 2020*
- 8) Ahmad Abu Turab Naqvim, Kisa Fatima et al. "Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach" *BBA - Molecular Basis of Disease 1866 (2020) 165878 2020*
- 9) Dorothea Bestle, Miriam Ruth Heindl et al. "TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells" *Life Sci Alliance. 2020 Sep; 3(9): e202000786. 2020*
- 10) Rozhgar A. Khailany, Muhamad Safdar, Mehmet Ozaslan "Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2" *Gene Reports 19 (2020) 100682 2020*
- 11) Genome-wide structure and function modeling of SARS-CoV-2 (<https://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/COVID-19/>) University of Michigan **2020**, τελευταία πρόσβαση 10/10/2020
- 12) Jitendra Prasad Mathuria, Ramakant Yadav, Rajkumar "Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods" *Journal of Infection and Public Health 13 (2020) 901–905. 2020*
- 13) Victor M Corman, Olfert Landt et al "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR" Volume 25, *Eurosurveillance Issue 3, 23/Jan/2020. 2020*

- 14) Jasper Fuk-Woo Chan, Cyril Chik-Yan Yip “Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens” *J Clin Microbiol. May; 58(5): e00310-20 .2020*
- 15) Coronaviridae (https://viralzone.expasy.org/30?outline=all_by_species) Bioinformatics Resource Program, **2020**, τελευταία πρόσβαση 10/10/2020
- 16) Viral factories (<https://viralzone.expasy.org/1951>) Bioinformatics Resource Program, **2020**, τελευταία πρόσβαση 10/10/2020
- 17) Jian Shang, Gang Ye, Ke Shi et al, “Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2” *Nature volume 581, pages221–224(2020), 2020*
- 18) Coronavirus disease 2019 (COVID-19) (<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/coronavirus/symptoms-causes/syc-20479963>) Mayo Clinic, **2020**, τελευταία πρόσβαση 11/10/2020
- 19) Dorothea Bestle, Miriam Ruth Heindl et al, “TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells” *Life Sci Alliance. 2020 Sep; 3(9): e202000786. 2020*
- 20) Ali A. Rabaan, Shamsah H. Al-Ahmed, “Genomic Epidemiology and Recent Update on Nucleic Acid–Based Diagnostics for COVID-19” *Current Tropical Medicine Reports 2020*
- 21) COVID-19 Testing Project (<https://covidtestingproject.org/index.html>) **2020**, τελευταία πρόσβαση 9/10/2020
- 22) Sharun Khan, Kuldeep Dhama et al, “Coronavirus Disease 2019-COVID-19”, *Clin Microbiol Rev. Jun 24;33(4):e00028-20, 2020*
- 23) Symptoms of Coronavirus (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>) CDC, **2020**, τελευταία πρόσβαση 8/10/2020
- 24) J.M.Abduljalil, B.M.Abduljalil “Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view” *New Microbes and New Infections Volume 35,100672, 2020*

25) Structure and Genome of SARS-CoV-2 (COVID-19) with diagram (<https://microbenotes.com/structure-and-genome-of-sars-cov-2/>) **2020**, τελευταία πρόσβαση 11/10/2020

26) Yongwu Hu, Jie Wen et al "The M Protein of SARS-CoV: Basic Structural and Immunological Properties" ,*Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2003 May; 1(2): 118–130, **2020**

27) Lauren M. Kucirka ,Stephen A. Lauer, "Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure", *Annals of Internal Medicine* 18 August, **2020**,

28) Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber "SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor" *Cell*. Apr 16; 181(2): 271–280.e8., **2020**

29) Ming Gao,Lihui Yang "A study on infectivity of asymptomatic SARS-CoV-2 carriers", *Respir Med*. Aug;169:106026, **2020**

30) Yeshun Wu 1, Xiaolin Xu "Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses" ,*Brain Behav Immun* . Jul;87:18-22,**2020**

31) Robert Kubina, Arkadiusz Dziedzic "Molecular and Serological Tests for COVID-19. A Comparative Review of SARS-CoV-2 Coronavirus Laboratory and Point-of-Care Diagnostics", *Diagnostics (Basel)*. Jun; 10(6): 434, **2020**