



---

**Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο**  
**Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας**  
**Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση**

**Διπλωματική Εργασία**  
**«Μοριακές και Ανοσολογικές Μέθοδοι Ανίχνευσης Ιών»**

**ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ**

**Επιβλέπων καθηγητής:**  
**ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Πάτρα, Ιανουάριος 2025

© ΕΑΠ, 2025

Η παρούσα εργασία ανήκει πνευματικά στον/στη φοιτητή/φοιτήτρια («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης, ο συγγραφέας/δημιουργός παραχωρεί στο ΕΑΠ μη αποκλειστική άδεια για τη χρήση των δικαιωμάτων αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσης σε διεθνές επίπεδο, σε ηλεκτρονική μορφή και μέσω οποιουδήποτε μέσου, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, χωρίς αντάλλαγμα και για όλη τη διάρκεια των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν συνεπάγεται σε καμία περίπτωση την παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού, ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση ή τροποποίηση της εργασίας με οποιονδήποτε τρόπο, είτε εν μέρει είτε συνοπτικά, χωρίς την ρητή προηγούμενη άδεια του συγγραφέα/δημιουργού.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο πρόγραμμα «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση» του τμήματος Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου. Καθώς ολοκληρώνω αυτή τη διαδικασία, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο, για την πολύτιμη υποστήριξή του και την ανάθεση αυτού του θέματος. Επίσης, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου για τη στήριξή τους, και ιδιαίτερα τον σύζυγό μου, για την αμέριστη συμπαράσταση, την κατανόηση και την συναισθηματική του στήριξη.

## Περίληψη

Τεράστια βήματα έχουν γίνει στην ιογενή διάγνωση την τελευταία δεκαετία. Πολλές λοιμώξεις είναι πλέον θεραπεύσιμες και, για βέλτιστο αποτέλεσμα, τα αντιικά φάρμακα πρέπει να ξεκινούν νωρίς. Για τους νοσηλευόμενους ασθενείς, η ταχεία και ακριβής ιογενής διάγνωση είναι απαραίτητη όχι μόνο για τη διαχείριση των ασθενών, αλλά και για τον έλεγχο των λοιμώξεων και την πρόληψη της νοσοκομειακής μετάδοσης. Ο αντίκτυπος της εποχικής και πανδημικής γρίπης στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα όλων των ηλικιών έχει λάβει αυξανόμενη προσοχή τόσο στην ιατρική βιβλιογραφία όσο και στον δημοφιλή τύπο. Οι αναδυόμενοι, εξαιρετικά λοιμογόνοι ιοί, όπως ο κοροναϊός σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (SARS) (CoV), το αναπνευστικό σύνδρομο CoV της Μέσης Ανατολής και η γρίπη των πτηνών H5N1 και H7N9 έχουν επίσης αυξήσει τις ανησυχίες. Τέλος, οι ανοσοκατασταλμένοι και άλλοι ευάλωτοι πληθυσμοί που διατρέχουν κίνδυνο για σοβαρές ή απειλητικές για τη ζωή ιογενείς λοιμώξεις συνεχίζουν να αυξάνονται. Ως απάντηση σε αυτές τις ανάγκες, υπήρξε μια έκρηξη στην ανάπτυξη ιογενών διαγνωστικών δοκιμών. Οι ιογενείς λοιμώξεις προκαλούν σοβαρά προβλήματα στον ανθρώπινο πληθυσμό παγκοσμίως. Το πρόσφατο ξέσπασμα της νόσου του κορονοϊού 2019 που προκλήθηκε από τον SARS-CoV-2 είναι ένα τέλειο παράδειγμα για το πώς η ιογενής λοίμωξη θα μπορούσε να αποτελέσει μεγάλη απειλή για την παγκόσμια δημόσια υγεία και τους οικονομικούς τομείς. Ως εκ τούτου, το πρώτο βήμα για την καταπολέμηση των ιογενών παθογόνων είναι η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση. Η έγκαιρη και ακριβής ανίχνευση της παρουσίας του ιού στο δείγμα του ασθενούς είναι ζωτικής σημασίας για την κατάλληλη θεραπεία, τον έλεγχο και την πρόληψη των επιδημιών. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται μερικές από τις μοριακές και ανοσολογικές διαγνωστικές προσεγγίσεις που είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων του ανθρώπου. Οι μοριακές διαγνωστικές τεχνικές παρέχουν ταχεία ανίχνευση ιών σε δείγμα ασθενούς. Είναι επίσης σχετικά φθηνές και εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές διαγνωστικές μέθοδοι. Οι ανοσολογικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανίχνευση και τις επιδημιολογικές μελέτες των ανθρώπινων ιογενών λοιμώξεων. Μπορούν να ανιχνεύσουν αντιικά αντισώματα ή ιικά αντιγόνα σε κλινικά δείγματα. Υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα μοριακά και ανοσολογικά διαγνωστικά κιτ που διευκολύνουν τη χρήση αυτών των μεθόδων στην πλειοψηφία των κλινικών εργαστηρίων παγκοσμίως. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Αιθιοπίας, όπου οι περισσότερες ιογενείς λοιμώξεις είναι

ενδημικές, η έκθεση σε βελτιωμένες ή νέες μεθόδους είναι εξαιρετικά περιορισμένη, καθώς αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ δαπανηρές στη χρήση και απαιτούν επίσης τεχνικές δεξιότητες. Δεδομένου ότι οι ερευνητές και οι κλινικοί γιατροί σε όλες τις γωνιές του πλανήτη εργάζονται σκληρά, ελπίζουμε ότι στο εγγύς μέλλον θα αναπτύξουν δοκιμές καλής ποιότητας που μπορούν να είναι προσβάσιμες σε χώρες χαμηλού εισοδήματος.

**Λέξεις – Κλειδιά:** Διάγνωση, ιός, ανίχνευση, μοριακές τεχνικές, ανοσολογικές τεχνικές

## "Molecular and Immunological Methods for the Detection of Viruses"

CHATZIKONSTANTINOU DESPOINA

### **Abstract**

The last decade has brought significant advances in virus diagnosis. Many infections are now treatable, and early administration of antiviral drugs is essential to achieve optimal results. For hospitalized patients, rapid and accurate diagnosis of viruses is critical, not only for proper patient management, but also for the prevention and control of hospital-acquired infections. The effect of seasonal and pandemic influenza on morbidity and mortality in all age groups has attracted increasing attention in the medical literature and media. Emerging, highly infectious viruses, such as severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, Middle East syndrome coronavirus (MERS), and avian influenza viruses H5N1 and H7N9, have also raised concerns. Finally, the number of immunocompromised and other vulnerable populations at risk of serious or life-threatening viral infections continues to rise. To meet these needs, diagnostic tests for viruses are being rapidly developed. Viral infections cause serious problems for human populations worldwide. The recent coronavirus outbreak in 2019, caused by the SARS-CoV-2 virus, exemplifies the serious threat that viral infections pose to public health and the global economy. Therefore, the first step in the fight against viral pathogens is timely and accurate diagnosis. Early and accurate detection of the virus in patient samples is critical for proper treatment, control and prevention of epidemics. The present study examines some of the available molecular and immunological diagnostic methods for detecting viral infections in humans. Molecular diagnostic methods allow rapid detection of viruses in patient samples and are relatively economical, sensitive and specialized. Immunological methods are widely used in the detection of viral infections in humans and in epidemiological studies, as they can detect antibodies against viruses. A wide range of molecular and immunodiagnostic kits are available on the market, which can be used in many clinical laboratory facilities worldwide. Although most viral infections are endemic in

developing countries such as Ethiopia, access to new and improved methods is limited due to high costs and the need for specialized technical knowledge. We hope that with the dedication of researchers and clinicians around the world, quality control methods will soon be developed that are applicable to low-income countries.

**Keywords:** Diagnosis, virus, detection, molecular techniques, immunological techniques

## Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή .....	10
2. Απομόνωση ιών.....	15
2.1 Διαδικασία.....	15
3. Διαγνωστικές μέθοδοι απομόνωσης ιού .....	18
4. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης με βάση το νουκλεϊκό οξύ .....	22
4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	23
4.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	24
4.2 Αντίστροφη μεταγραφή-PCR (RT-PCR).....	27
4.2.1 Τρέχοντα ζητήματα .....	28
4.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) .....	30
4.4 Βελτιστοποίηση PCR.....	37
4.5 Μέθοδοι ενίσχυσης με βάση τη μεταγραφή .....	40
4.6 Ισοθερμική ενίσχυση.....	44
4.7 Ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP) .....	48
4.7.1 Μέθοδος LAMP .....	48
4.7.2 Ανίχνευση προϊόντων LAMP .....	54
4.7.3 Εφαρμογή LAMP.....	58
4.8 Μικροσυστοιχίες DNA.....	59
4.9 Μέθοδος υποβοηθούμενη από CRISPR.....	60
4.10 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS).....	62
4.10.1 Βασικές αρχές NGS.....	64
4.10.2 Μέθοδοι NGS .....	65
4.10.3 Το NGS ως διαγνωστικό εργαλείο .....	66
4.10.4 NGS για τη μελέτη της ύπαρξης ενός ιού και την καταπολέμηση ψευδών αποτελεσμάτων.....	67

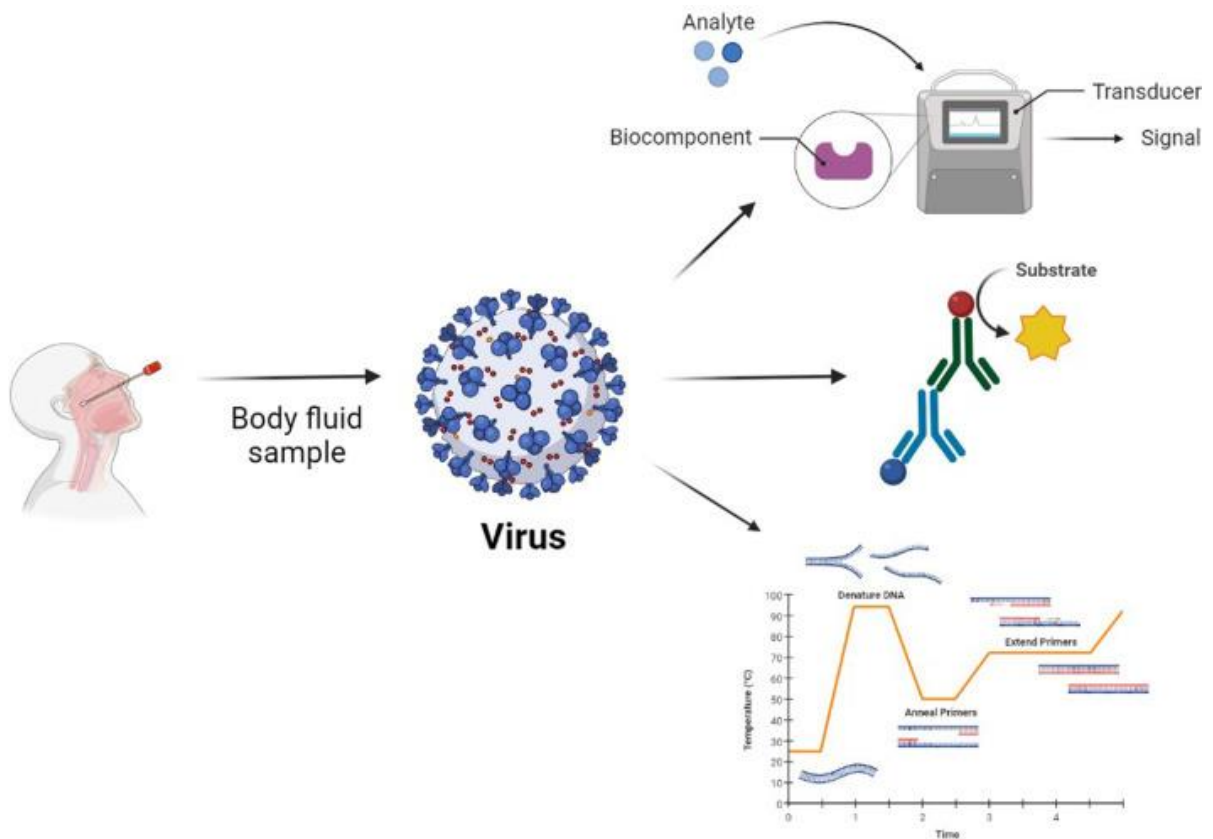


4.10.5 Μεθοδολογίες NGS για ανασυνδυασμένους, νέους ιούς, .....	69
4.10.6 Βιοπληροφορική Επεξεργασία Δεδομένων NGS .....	71
4.10.7 NGS με χρήση τυχαίων εκκινήτων (Metagenomics Sequencing).....	73
4.10.8 Καταγραφή αλληλουχίας, ανάκτηση θραυσμάτων και αλληλούχιση NGS (αλληλούχιση εμπλουτισμού στόχου) .....	74
4.10.9 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NNGS) ή αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης τρίτης γενιάς (TGS) .....	75
5. Ανοσολογικές Διαγνωστικές Τεχνικές Ανίχνευσης Ιών .....	77
5.1 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) .....	78
5.2 Ανάλυση Western Blotting .....	87
5.3 Δοκιμασία ανοσοφθορισμού .....	95
5.4 Κλινική χρησιμότητα της IF .....	97
5.5 Ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA) .....	98
5.6 Ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA) .....	100
5.7 Ταχεία ανίχνευση ιών σε καλλιέργεια με ανοσολογικές μεθόδους.....	105
5.8 Δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης (HI) .....	106
5.9 Ανίχνευση αντισωματικής απόκρισης σε λοιμώξεις από ιούς .....	108
5.10 Ανίχνευση IgM .....	109
6. Μελλοντικές προκλήσεις και ευκαιρίες .....	110
7. Συμπέρασμα .....	112
8. Βιβλιογραφία.....	116

## 1. Εισαγωγή

Οι ιοί είναι μικρά τμήματα νουκλεϊκών οξέων δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) ή ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) σε πρωτεϊνικό ή λιποπρωτεϊνικό κάλυμμα. Είναι ενδοκυτταρικά παράσιτα και, ως εκ τούτου, απαιτούν την ύπαρξη ξενιστή για τον πολλαπλασιασμό τους. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο-ξενιστή, οι ιοί καταλαμβάνουν τον βιοσυνθετικό μηχανισμό του κυττάρου και αναπαράγουν το γονιδιώμά τους και άλλα συστατικά. [7]. Εξαρτώνται από οργανισμούς ξενιστές για την αναπαραγωγή τους. Βρίσκονται σε όλα τα ενδιαίτηματα και μπορούν να μολύνουν ένα ευρύ φάσμα μορφών ζωής, από βακτήρια έως φυτά και ζώα. Δομικά τουλάχιστον, οι ιοί αποτελούνται από δύο κύρια συστατικά. Αυτά είναι το γονιδίωμα του νουκλεϊκού οξέος, το οποίο αποτελείται από δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA ή RNA, και το καψίδιο. Το καψίδιο είναι μια εξαιρετικά συμμετρική δομή και σχηματίζεται από πολλαπλά αντίγραφα ενός μικρού αριθμού πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ιικό γονιδίωμα ( Domingo, 2015 ). Τα καψίδια ενθυλακώνουν και προστατεύουν τα ιικά νουκλεϊκά οξέα. Ωστόσο, τα καψίδια είναι επίσης γνωστό ότι είναι πολυλειτουργικά και διαδραματίζουν ρόλο στην είσοδο των κυττάρων, στην έκθεση του γονιδιώματος και στην ενδοκυτταρική μεταφορά ( Mateu, 2013 ; Freire et al., 2015 ) [2].

Εκτός από την πρωτεΐνη του καψιδίου, ορισμένοι ιοί διαθέτουν ένα πρόσθετο προστατευτικό στρώμα που ονομάζεται φάκελος. Αυτό συνήθως αποτελείται από ένα περίβλημα λιπιδίων ή γλυκοπρωτεϊνών. Το λιπιδικό περίβλημα προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη του μολυσμένου ξενιστή, ενώ το γλυκοπρωτεϊνικό περίβλημα συνήθως κωδικοποιείται στο ιικό γονιδίωμα. Το ιικό γονιδίωμα κωδικοποιεί επίσης πρωτεΐνες που διευκολύνουν την αντιγραφή και τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων. Τα συναρμολογημένα μολυσματικά ιικά σωματίδια ονομάζονται ιόντα (Banerjee and Mukhopadhyay, 2016). Δομικά, οι περισσότεροι ιοί παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά, όπως οι συμμετρικές πρωτεΐνες του καψιδίου, αλλά γενετικά διαφέρουν σημαντικά [6].



**Εικόνα 1.1,** Γραφική Αναπαράσταση

Αυτή η γενετική ποικιλομορφία έχει οδηγήσει σε έλλειψη κατανόησης και άγνοια πολλών ιών στο περιβάλλον μας. Οι ιοί κυριαρχούν στους περισσότερους βιότοπους, αλλά το ιόσωμα δεν είναι καθόλου κατανοητό. Σε συνδυασμό με αυτό, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστών και ιών παραμένουν ασαφείς σε πολλές περιπτώσεις (Paez-Espino et al., 2016). Ενώ η μόλυνση από ορισμένους ιούς είναι γνωστό ότι έχει επιζήμιες επιπτώσεις στον ξενιστή, η σχέση μεταξύ των δύο μπορεί να είναι αμοιβαία επωφελής (Pradeu, 2016- Jagdale and Joshi, 2018). Είναι πιθανό πολλές από αυτές τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιού και ξενιστή να παραμένουν άγνωστες επειδή ο ξενιστής παραμένει ανέπαφος και η μόλυνση δεν εμφανίζει σαφώς αναγνωρίσιμα συμπτώματα. Σε σχέση με αυτές τις άγνωστες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και ιού, υπάρχει περιορισμένη γνώση των διαφόρων περιοχών ξενιστών του ιού. Μια περιοχή ξενιστή είναι ο αριθμός των ειδών που είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούνται από ένα παθογόνο, αλλά δεν είναι εύκολο να καθοριστούν οι ξενιστές που μπορεί ή δεν μπορεί να μολύνει ένας ιός [4].

Επιπλέον, η κλιματική αλλαγή, οι αυξημένες παγκόσμιες μεταφορές, η εντατική γεωργία και οι υψηλές πυκνότητες καλλιιεργειών, ζώων και ανθρώπων συμβάλλουν

επίσης στον πολλαπλασιασμό των ιών. Αυτοί οι παράγοντες δημιουργούν ένα περιβάλλον που διευκολύνει την εξάπλωση των ιών σε ξενιστές που κανονικά δεν εμπίπτουν στο εύρος των ξενιστών τους. Η ευελιξία και η ποικιλομορφία του ίδιου του ιικού γονιδιώματος είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στη διαφοροποίηση του εύρους των ιικών ξενιστών και της περιβαλλοντικής ανοχής. Ορισμένοι ιοί έχουν την ικανότητα να μεταλλάσσονται με εξαιρετικά γρήγορους ρυθμούς. Αυτή η ικανότητα των ιών να μεταλλάσσονται ταχέως και να μετακινούνται μεταξύ των ξενιστών καθιστά πολύ σημαντική την ανάπτυξη δυναμικών μεθόδων για την ανίχνευση των σημερινών και των αναδυόμενων ιικών στελεχών.

Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι η πιο κοινή αιτία ανθρώπινων ασθενειών. Εκατομμύρια άνθρωποι εξακολουθούν να πεθαίνουν παγκοσμίως από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και τους ιούς της ηπατίτιδας. Οι αναδυόμενοι ιοί προκαλούν επίσης σοβαρά προβλήματα στους ανθρώπινους πληθυσμούς. Για παράδειγμα, η γρίπη των πτηνών Α (H5N1) το 1997, το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο - κοροναϊός (SARS-CoV) το 2002-2003, η πανδημία της γρίπης των χοίρων Α (H1N1) το 2009, ο ιός Έμπολα το 2014 και ο ιός Ζίκα (ZIKV) το 2015, και η πρόσφατη πανδημία SARS-CoV-2 έχουν προκαλέσει αρκετά κρούσματα σε διάφορες χώρες. Το ποσοστό θνησιμότητας των ιογενών λοιμώξεων στον άνθρωπο είναι σημαντικά υψηλό [1]. Για παράδειγμα, η πανδημία γρίπης των χοίρων Α(H1N1) του 2009 εκδηλώθηκε σε 214 χώρες και σκότωσε περισσότερους από 18.036 ανθρώπους [5]- μόνο το 2010 εκτιμάται ότι υπήρξαν 61.000 άνθρωποι θάνατοι από λύσσα παγκοσμίως, με το 84% των θανάτων να συμβαίνουν σε αγροτικές περιοχές [1]- το 2013 περίπου 35.000.000 άνθρωποι μολύνθηκαν με τον ιό HIV παγκοσμίως. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) ανέφερε 1,34 εκατομμύρια θανάτους από ιογενή ηπατίτιδα το 2015. Στις 6 Ιανουαρίου 2015, ο ιός H5N1 είχε σκοτώσει 402 από τα 694 εργαστηριακά επιβεβαιωμένα ανθρώπινα κρούσματα σε 16 χώρες, με ποσοστό θνησιμότητας περίπου 58%. Πρόσφατα, ο κόσμος προκλήθηκε από τον νέο κορονοϊό 2019 (COVID-19) [1].

Η νόσος προκαλείται από έναν νέο κορονοϊό (SARS-CoV-2). Το παθογόνο εμφανίστηκε για πρώτη φορά στο Wuhan, στην επαρχία Hubei της Κίνας, και τώρα εξαπλώνεται γρήγορα σε όλο τον κόσμο- στις 11 Μαρτίου 2020, ο ΠΟΥ κήρυξε τον COVID-19 παγκόσμια πανδημία- σύμφωνα με τον ΠΟΥ, στις 31 Δεκεμβρίου 2019 και στις 24 Ιουνίου 2020, 473.797 9.129.146 επιβεβαιωμένα κρούσματα COVID-19, συμπεριλαμβανομένων των θανάτων, έχουν αναφερθεί παγκοσμίως. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη για καλύτερες διαγνωστικές τεχνικές για την έγκαιρη και ακριβή ανίχνευση αυτών των ιογενών λοιμώξεων. Η έγκαιρη και ακριβής ανίχνευση των ιογενών νοσημάτων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έγκαιρη επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, στην ελαχιστοποίηση του κόστους θεραπείας, στην ελαχιστοποίηση της άσκοπης απώλειας ζωής και στον έλεγχο της νόσου. Βοηθά επίσης στην ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας της νόσου, όπως η ανάπτυξη αντιικών εμβολίων και νέων θεραπευτικών παραγόντων.

Παραδοσιακά, η εργαστηριακή διάγνωση ιατρικών ιών πραγματοποιείται με απομόνωση του ιού σε αυγά κοτόπουλου, καλλιέργειες ιστών ή εργαστηριακά ζώα και, πάνω απ' όλα, με οπτική εξέταση των σωματιδίων του ιού στο δείγμα χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Πολλά παραδοσιακά διαγνωστικά εργαλεία τείνουν να είναι δύσχρηστα, χρονοβόρα, ακριβά και ελάχιστα επαναλήψιμα. Αντίθετα, η μοριακή τεχνολογία έχει φέρει επανάσταση στη διαγνωστική ιολογία ανιχνεύοντας την παρουσία ή την απουσία ιικών νουκλεϊκών οξέων στο δείγμα ενός ασθενούς. Παρά το γεγονός ότι πολλές από τις συμβατικές μεθόδους έχουν αντικατασταθεί από τεχνικές με βάση το νουκλεϊκό οξύ, οι ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την έρευνα ορού ανθρώπινων ιογενών λοιμώξεων ανιχνεύουν ιογενείς λοιμώξεις με την ταυτοποίηση αντικών αντισωμάτων ή ιικών αντιγόνων σε κλινικά δείγματα. Μερικές από τις μοριακές και ανοσολογικές διαγνωστικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση ιατρικών ιών περιγράφονται εδώ.[2]

Για παράδειγμα, όσον αφορά τον COVID-19, η ορολογική εξέταση βασίζεται στην ανίχνευση των αντιγονικών πρωτεϊνών του ιού ή των αντισωμάτων που παράγονται από τον μολυσμένο ξενιστή. Η ανίχνευση ιικών αντιγόνων είναι παρόμοια με τις μοριακές τεχνικές που ανιχνεύουν άμεσα την παρουσία ιικών σωματιδίων. Ωστόσο, η διαδικασία συλλογής και η παρουσία ιικών σωματιδίων στο συλλεγόμενο δείγμα περιπλέκουν τη δοκιμή. Η ανίχνευση αντισωμάτων, από την άλλη πλευρά, είναι απλούστερη, καθώς για την εξέταση χρησιμοποιείται ο ορός ή το πλάσμα που συλλέγεται από το φλεβικό αίμα του ασθενούς, και δεν εξαρτάται από τη διαδικασία συλλογής, καθώς ο ιστός προέλευσης είναι υγρός. Ένα ακόμη πλεονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχουν στάδια επεξεργασίας του δείγματος, όπως η απομόνωση RNA ή η σύνθεση cDNA. Η εξέταση μπορεί να εντοπίσει αξιόπιστα τα μολυσμένα άτομα με ή χωρίς συμπτώματα, αλλά μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με στενά συγγενείς κορονοϊούς. Επιπλέον, η παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων σε μολυσμένα άτομα και η παρουσία λίγο πολύ του ίδιου επιπέδου αντισωμάτων σε άτομα με ήπια ή σοβαρά κλινικά συμπτώματα μπορεί να υποδηλώνουν το επίπεδο ανοσίας του πληθυσμού στον πληθυσμό. Οι ορολογικές εξετάσεις βοηθούν επίσης στον αναδρομικό εντοπισμό σιωπηλών λοιμώξεων[10].

Ορισμένες από τις μοριακές και ανοσολογικές διαγνωστικές μεθόδους που είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων περιγράφονται παρακάτω. Οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι επιτρέπουν την ταχεία ανίχνευση ιών σε δείγματα ασθενών. Είναι επίσης σχετικά φθηνές, ευαίσθητες και ειδικές διαγνωστικές μέθοδοι. Οι ανοσολογικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων στον άνθρωπο και για επιδημιολογικές μελέτες. Μπορούν να ανιχνεύσουν αντιικά αντισώματα και ιικά αντιγόνα σε κλινικά δείγματα. Διατίθενται διάφορα εμπορικά διαθέσιμα μοριακά και ανοσοδιαγνωστικά κιτ και η χρήση αυτών των μεθόδων είναι δυνατή στην πλειονότητα των κλινικών εργαστηρίων παγκοσμίως. Αν και οι περισσότερες ιογενείς λοιμώξεις ενδημούν στις αναπτυσσόμενες χώρες,

συμπεριλαμβανομένης της Αιθιοπίας, η έκθεση σε βελτιωμένες και νέες μεθόδους είναι πολύ περιορισμένη, καθώς οι μέθοδοι αυτές είναι πολύ ακριβές και απαιτούν τεχνικές δεξιότητες [15].

Συμβατικές ανοσολογικές μέθοδοι, μέθοδοι με βάση το νουκλεϊκό οξύ και μολυσματικές μέθοδοι (κυτταρική καλλιέργεια) έχουν εφαρμοστεί ως μοριακές τεχνικές για ιική ανάλυση. Οι μέθοδοι με βάση το ανοσολογικό και το νουκλεϊκό οξύ καθορίζουν μόνο τον συνολικό αριθμό των ιικών σωματιδίων και η μόνη αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης της παρουσίας φυσικών ιικών σωματιδίων (ανεξάρτητα από την ικανότητά τους να μολύνουν και να αναπαράγουν κύτταρα) και ζωντανούς μολυσματικούς ιούς βασίζεται σε κυτταρικές καλλιέργειες θηλαστικών που ανιχνεύουν την παραγωγή ορατών κυτταροτοξικών επιδράσεων (CPE). Αυτή η μέθοδος είναι δύσκολο να εκτελεστεί και μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες για να φτάσει ο ιός σε μετρήσιμη ποσότητα για να επιτρέψει την ανίχνευση. Επιδημιολογικά σημαντικοί ιοί που δεν μπορούν ή είναι δύσκολο να πολλαπλασιαστούν σε κυτταρικές καλλιέργειες, όπως οι αδενοϊοί τύπου 40 και τύπου 41, οι αστροϊοί και οι καλυκοϊοί, προκαλούν την ανάγκη για γρήγορες, ευαίσθητες και συγκεκριμένες νέες προσεγγίσεις ανίχνευσης. Αυτές οι προσεγγίσεις πρέπει να είναι ποσοτικές και να αποκλείουν την ανίχνευση μη μολυσματικών ιών [60].

Οι επιστήμονες έχουν σημειώσει πρόοδο στις μεθόδους ανίχνευσης ιών τα τελευταία 60 χρόνια. Η εμφάνιση της μοριακής βιολογίας οδήγησε στην ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων για την αντιμετώπιση των σημερινών προκλήσεων, διευρύνοντας τη γνώση της δομής και της λειτουργίας του ιού σε μοριακό επίπεδο. Μια ποικιλία πειραματικών τεχνικών έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της παρουσίας ενός ιού ή ιογενούς λοίμωξης, π.χ. ανοσοποιητικό συγγόνιο, ανίχνευση με βάση νουκλεϊκό οξύ ή κυτταρική καλλιέργεια. Ανοσολογικές (ορολογικές) μέθοδοι όπως ραδιοανοσοδοκιμασία, ανοσοφθορισμός, μικροσκοπία ανοσοηλεκτρονίων ή ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA), με βάση την αλληλεπίδραση μεταξύ ιικών αντιγόνων και αντισωμάτων, τα αντισώματα σύλληψης κατευθύνονται έναντι ιικών αντιγόνων και τα δεσμευμένα σύμπλοκα ανιχνεύονται μέσω χρωμογόνων ή φθορίζοντων μορίων. Τα όρια ανίχνευσης ποικίλλουν ανάλογα με τη μεταβλητότητα του ιικού γονιδιώματος και τη συγγένεια των αλληλεπιδράσεων αντισωμάτων. Οι ανοσολογικές μέθοδοι απαιτούν εξελιγμένες συσκευές και επαγγελματική κατάρτιση και γενικά στερούνται του βαθμού ευαισθησίας που απαιτείται για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων ιών που αναμένονται σε περιβαλλοντικά δείγματα[14].



## 2. Απομόνωση ιών

Οι ενισχυμένες με φυγόκεντρο τεχνικές φιαλιδίων κελύφους ή πλάκες φρεατίων, που ονομάζονται πλάκες συμπλέγματος, διευκολύνουν την ταχεία προσρόφηση του ιού στην κυτταρική σειρά ξενιστή εφαρμόζοντας φυγοκέντρωση χαμηλού επιπέδου, μειώνοντας σημαντικά το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τον εμβολιασμό της κυτταρικής σειράς. Στις τεχνικές φιαλιδίων κελύφους και πλακών συμπλέγματος, ο ιός μολύνει κύτταρα που αναπτύσσονται σε μονοστιβάδα, συνήθως σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα, γεγονός που διευκολύνει επίσης την εύκολη ανάλυση των μολυσμένων κυττάρων κάτω από μικροσκόπιο (Gleaves et al., 1984; Hematian κ.ά., 2016). Μια άλλη πρόοδος στην καλλιέργεια ιικών κυττάρων ήταν η ανάπτυξη νέων κυτταρικών σειρών. Αυτές περιλαμβάνουν συνκαλλιεργημένες κυτταρικές σειρές, σειρές που αποτελούνται από περισσότερους από έναν τύπους κυττάρων και τη χρήση διαγονιδιακών κυττάρων. Τα κύτταρα συνκαλλιέργειας είναι χρήσιμα για σενάρια όπου η φύση του ιού μπορεί να είναι άγνωστη, επομένως ο βέλτιστος ξενιστής είναι επίσης άγνωστος. Οι γραμμές συνκαλλιέργειας μπορούν να εξοικονομήσουν χρόνο για τη διάγνωση, καθώς λιγότερες κυτταρικές γραμμές πρέπει να διατηρηθούν, να μολυνθούν και να αναλυθούν (George et al., 2002; LaSala κ.ά., 2007). Οι διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές βοηθούν επίσης στη βελτίωση της διάγνωσης του ιού. Οι γενετικά τροποποιημένες κυτταρικές σειρές τροποποιούνται ώστε να περιέχουν γονίδια που δρουν ως δημοσιογράφοι κατά τη μόλυνση με έναν συγκεκριμένο ιό. Στην ιδανική περίπτωση, αυτό το γονίδιο αναφοράς θα ενεργοποιηθεί μόνο παρουσία ειδικών πρωτεϊνών για τον ιό (Storch, 2000). Όταν χρησιμοποιούνται διαγονιδιακές γραμμές, το βίριον δεν χρειάζεται να συναρμολογηθεί πλήρως για να επιτευχθεί η διάγνωση, καθώς η παραγωγή μιας πρωτεΐνης ειδικής για τον ιό είναι αρκετή για να επιτευχθεί η έκφραση του αναφέροντος, μειώνοντας έτσι το χρόνο ανάκαμψης για τα αποτελέσματα (Olivo, 1996). Τόσο οι συνκαλλιεργημένες όσο και οι διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τεχνικές φιαλιδίων κελύφους για περαιτέρω μείωση του χρόνου μέχρι τη διάγνωση [6].

### 2.1 Διαδικασία

Η απομόνωση του ιού ενισχύεται από:

1. Συλλογή δειγμάτων κατά τη διάρκεια του οξέος σταδίου της ασθένειας, όταν η αποβολή του ιού είναι μεγαλύτερη. Αυτό εξασφαλίζει την απόκτηση της μεγαλύτερης ποσότητας ιού.
2. Προμήθεια ανέπαφων κυττάρων στο δείγμα. Μερικοί ιοί χάνουν τη μολυσματικότητα εκτός εάν διατηρούνται μέσα σε άθικτα κύτταρα.
3. Άμεση παράδοση του δείγματος στο εργαστήριο ιολογίας. Οι ιοί αδρανοποιούνται από τη θερμότητα, το δυσμενές pH και άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες μπορούν να υποβληθούν δείγματα κατά τη μεταφορά στο εργαστήριο. Τα δείγματα μπορεί να είναι κατάφυτα από συνήθη βακτήρια και μύκητες τύπου χλωρίδας κατά τη διάρκεια παρατεταμένων περιόδων μεταφοράς.

Τα δείγματα που συλλέγονται από μολυσμένα σημεία όπως το στόμα, ο κόλπος ή το δέρμα τοποθετούνται καλύτερα σε ένα υγρό μέσο μεταφοράς όπως το ισορροπημένο διάλυμα αλατιού Hanks που περιέχει αντιβιοτικά και 2% ορό μοσχारीού. Ο τόπος δειγματοληψίας υπαγορεύεται από τα συμπτώματα του ασθενούς. Βλάβες καλλιέργειας σε δερματική νόσο και βλεννώδη μεμβράνη και λαιμό και ορθό σε εντερικές ασθένειες. δείγμα του λαιμού ή της μύτης σε λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού; και συλλέγουν πτύελα σε λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού. Σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος, υποβάλετε εγκεφαλικό νωτιαίο υγρό μαζί με αντιπηκτικό περιφερικό αίμα, λαιμό και ορθικές καλλιέργειες. Κατευθυντήριες γραμμές για την επιλογή των κατάλληλων τύπων δειγμάτων και για τη σωστή συλλογή και μεταφορά δειγμάτων περιγράφονται σε άλλα σημεία αυτού του τόμου [60].

Στο εργαστήριο ιολογίας, τα δείγματα που συλλέγονται από τοποθεσίες μολυσμένες με βακτηριακή ή μυκητιακή χλωρίδα απολυμαίνονται με φυγοκέντρηση, διήθηση και προσθήκη αντιβιοτικών. Η συνήθης επεξεργασία δειγμάτων στυλεού που λαμβάνονται στο εργαστήριο σε κλάσματα 2,5 ml μέσου μεταφοράς περιλαμβάνει: 1) στροβιλισμό στυλεού στο μέσο μεταφοράς. 2) αφαίρεση του στυλεού από το μέσο μεταφοράς. 3) φυγοκέντρηση του μέσου μεταφοράς στα 1.500 x g επί 10 λεπτά· και 4) χρήση διαυγούς υπερκείμενου υγρού για τον εμβολιασμό ιοκαλλιέργειών. Τα δείγματα που συλλέγονται από περιοχές που στερούνται φυσιολογικής χλωρίδας, όπως το εγκεφαλικό νωτιαίο υγρό, εμβολιάζονται σε κυτταροκαλλιέργειες απευθείας χωρίς επεξεργασία απολύμανσης. Τα αντιπηκτικά δείγματα περιφερικού αίματος υποβάλλονται σε επεξεργασία με φυγοκέντρηση πυκνότητας σε ficoll-hydraque για να διαχωριστούν τα μονοπύρρηνα κύτταρα από το υπόλοιπο δείγμα. Τα μονοπύρρηνα κύτταρα χρησιμοποιούνται στον εμβολιασμό ιικής καλλιέργειας. Ο διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων μπορεί επίσης να επιτευχθεί με εμπορικά διαθέσιμους διαχωριστικούς σωλήνες που περιέχουν ένα στρώμα πολυσακχαρίτη και διαζωικού νατρίου και ένα στρώμα πολυεστερικής γέλης (Becton-Dickinson, 1986) [60].



Εάν τα δείγματα αποθηκεύονται λιγότερο από 24 ώρες πριν από την παράδοσή τους στο εργαστήριο του ιού, μπορούν να ψύχονται στους 4°C. Η αποθήκευση για περιόδους που υπερβαίνουν τις 24 ώρες πρέπει να γίνεται στους -70°C ή σε υγρό άζωτο. Εάν το δείγμα πρόκειται να μεταφερθεί μέσω ταχυδρομείου ή αγγελιοφόρου σε εργαστήριο αναφοράς, χρησιμοποιείται ξηρός πάγος κατά τη μεταφορά και το δείγμα πρέπει να σφραγίζεται σε περιέκτη αδιαπέραστο από CO<sub>2</sub>.

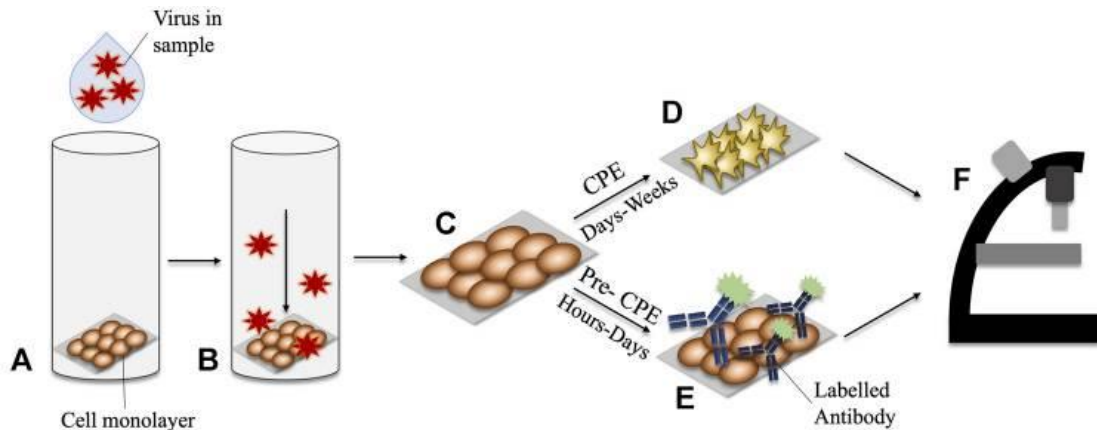
Κλινικά υλικά που έχουν υποστεί επεξεργασία για ιοκαλλιέργεια μπορούν να εισαχθούν στην κυτταροκαλλιέργεια με έναν από τους δύο τρόπους. Η προσθήκη 0,2 έως 0,3 ml επεξεργασμένου δείγματος σε σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας με εγκατεστημένο υπόστρωμα είναι μία αποδεκτή μέθοδος εμβολιασμού. Μια δεύτερη τεχνική, ο εμβολιασμός προσρόφησης, περιλαμβάνει την απομάκρυνση του υγρού μέσου από το σωλήνα κυτταροκαλλιέργειας. Το επεξεργασμένο δείγμα, 0,2 έως 0,3 ml ανά σωλήνα, τοποθετείται απευθείας στη μονοστιβάδα, όπου παραμένει για περίοδο επώασης I-h στους 37°C. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το υπόλοιπο δείγμα αναρροφάται και απορρίπτεται και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας στο σωλήνα καλλιέργειας. Η μέθοδος προσρόφησης συνιστάται για την ανάκτηση ιών όπως ο κυτταρομεγαλοϊός, οι οποίοι εξαπλώνονται μέσω μεταφοράς από κύτταρο σε κύτταρο. Ωστόσο, ορισμένα δείγματα όπως τα ούρα ή τα κόπρανα μπορεί να είναι τοξικά για τα κύτταρα, έτσι ώστε ο εμβολιασμός προσρόφησης να είναι καταστροφικός για τη μονοστιβάδα.

Εάν παραμείνει περίσσεια επεξεργασμένου δείγματος μετά τον εμβολιασμό των κυτταροκαλλιιεργειών, είναι συνετό να φυλάσσεται στους -70°C. Περιστασιακά, λόγω εργαστηριακών ατυχημάτων ή μολυσμένων κυτταροκαλλιιεργειών, απαιτείται επανέναρχη της διαδικασίας απομόνωσης του ιού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται το αποθηκευμένο, επεξεργασμένο δείγμα. Επίσης, πρόσθετες δοκιμασίες, που ζητούνται εκ των υστέρων από τον ιατρό, μπορούν να γίνουν σε αποθηκευμένο υλικό. Η περίσσεια δείγματος μπορεί να αποθηκευτεί σε κρυοβιάλ των 2,0 ml. Συνιστάται η προσθήκη 0,2 ml διαλύματος γλυκερίνης 5% σε φυσιολογικό ορό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων ή 70% σορβιτόλης. Μια περίοδος αποθήκευσης 3 μηνών ή περισσότερο είναι συνήθως ικανοποιητική. Περίπου 1.000 σωλήνες μπορούν να αποθηκευτούν ανά κυβικό πόδι χώρου κατάψυξης χρησιμοποιώντας ένα διαχωριστικό 81 κυψελών σε ένα κουτί από χαρτόνι διαστάσεων 51/8" (πλάτος) x 51/2" (βάθος) x 25 / s" (ύψος) (Εικ. 3). Τα τετραγωνίδια αριθμούνται διαδοχικά και η θέση κάθε δείγματος αναγνωρίζεται από τη σειρά και τη θέση. Για παράδειγμα, θέση 207, σειρά H, θέση 8 (207H8). Αυτό το σύστημα αποθήκευσης είναι συμβατό με ένα σύστημα υπολογιστή, αλλά είναι επίσης εύκολο στη χρήση χειροκίνητα.

### 3. Διαγνωστικές μέθοδοι απομόνωσης ιού

Μόλις αναπτυχθεί σε κυτταροκαλλιέργεια, υπάρχουν δύο κατηγορίες μεθόδων με τις οποίες διαγιγνώσκονται οι ιοί. Αποτελούνται από εκείνες που χρησιμοποιούν παρατήρηση των κυτταροπαθητικών επιδράσεων (CPE) και εκείνες που χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους, γνωστές ως προ-CPE. Η μόλυνση των κυττάρων με κυτταροπαθητικούς ιούς προκαλεί βλάβη και επακόλουθες μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα που μολύνουν και αυτές οι αλλαγές ονομάζονται CPE. Η επιθεώρηση των κυτταροκαλλιεργειών υπό μικροσκοπία φωτός χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παρουσίας ή της απουσίας CPE. Μπορεί να χρειαστούν από 48 ώρες έως αρκετές εβδομάδες για να γίνει εμφανής η ανάπτυξη του CPE. Επομένως, αυτή η μέθοδος δεν μπορεί απαραίτητα να παρέχει ένα γρήγορο χρόνο ανάκαμψης μέχρι τα αποτελέσματα (Fenner et al., 1974). Επιπλέον, ο τεκμαιρόμενος χαρακτήρας της διάγνωσης του ΚΠΦ σημαίνει ότι μπορεί να είναι δύσκολο να διακρίνει κανείς με βεβαιότητα ποιος ιός προκαλεί τη βλάβη. Μια άλλη πρόκληση είναι ότι αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται μόνο σε ιούς που προκαλούν CPE και επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί καθολική μέθοδος ανίχνευσης ιών. Για να ξεπεραστούν αυτές οι προκλήσεις, μοριακές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με την καλλιέργεια κυττάρων ιού για την παροχή ακριβέστερων και ταχύτερων διαγνώσεων. Αυτή η προσέγγιση ονομάζεται διάγνωση «προ-CPE».

Οι μέθοδοι προ-CPE έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν τον ιό μετά την είσοδο των κυττάρων, αλλά πριν τα κύτταρα παρουσιάσουν CPE, πράγμα που σημαίνει ότι γενικά παρέχουν ταχύτερα αποτελέσματα. Τα καλύμματα που λαμβάνονται από καλλιέργειες φιαλιδίων κελύφους μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για μεθόδους προ-CPE. Η ανίχνευση συνήθως διευκολύνεται από τη χρώση του καλύμματος με έναν παράγοντα που ανιχνεύει μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον ιό με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, για παράδειγμα ένα αντίσωμα (Leland and Ginocchio, 2007). Ένα ενζυματικό ή φθορίζον επισημασμένο αντίσωμα, εφαρμόζεται στη μονοστιβάδα των κυττάρων στο κάλυμμα. Η ολίσθηση επιθεωρείται για θετικό σήμα από το επισημασμένο αντίσωμα, το οποίο με τη σειρά του υποδεικνύει θετική επιβεβαίωση ενός συγκεκριμένου ιού. Γενικά, η χρήση μεθόδων προ-CPE παράγει συγκρίσιμα αποτελέσματα με τις παραδοσιακές μεθόδους κυτταροκαλλιεργειών, με βελτιωμένους χρόνους ανακύκλωσης (Peterson et al., 1988; Rabalais κ.ά., 1992· Lipson κ.ά., 2001). Παράλληλα με τους ταχύτερους χρόνους διεκπεραίωσης, η ανίχνευση πριν από το CPE έχει το πρόσθετο πλεονέκτημα της χρήσης ειδικών αντισωμάτων για τον ιό, πράγμα που σημαίνει ότι ένας συγκεκριμένος ιός ή στέλεχος του ιού μπορεί να επιβεβαιωθεί θετικά. Ένα σχήμα των διαγνωστικών μεθόδων που βασίζονται στο CPE και πριν από το CPE παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1 .



Εικόνα 3.1, Σύγκριση της ανίχνευσης CPE με την Pre-CPE σε καλλιέργεια φιαλιδίου κελύφους. (Α) Ένα δείγμα που περιέχει ιό τοποθετείται στο φιαλίδιο του κελύφους. (Β) Εφαρμόζεται φυγόκεντρος δύναμη, προάγοντας την προσκόλληση του ιού στη μονοστιβάδα των κυττάρων. (Γ) Τα μονοστρωματικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα μπορούν να απομακρυνθούν για περαιτέρω ανάλυση. (Δ) Η ανάπτυξη του CPE μπορεί να απαιτήσει από ημέρες έως εβδομάδες στα κύτταρα καλλιέργειας. (Ε) Η ανίχνευση πριν από το CPE χρησιμοποιεί επισημασμένα αντισώματα για τον εντοπισμό συγκεκριμένων δεικτών του ιού, οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν μέσα σε λίγες ώρες έως ημέρες. (ΣΤ) Η μικροσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση μορφολογικών αλλαγών που σχετίζονται με τη διάγνωση του CPE ή για την ανίχνευση σημάτων που προκύπτουν από την παρουσία επισημασμένου αντισώματος πριν από το CPE.

Αν και τα διαγνωστικά πριν από το CPE αποδεικνύονται χρήσιμα για τη μείωση των χρόνων ανάκαμψης σε σύγκριση με την παραδοσιακή κυτταροκαλλιέργεια, ο χρόνος μέχρι τη διάγνωση μπορεί να διαρκέσει ημέρες σε ορισμένες περιπτώσεις. Σε καταστάσεις όπου η ταχεία διάγνωση αποτελεί βασικό παράγοντα, για παράδειγμα σε περιπτώσεις εξαιρετικά επιβλαβών ή λοιμογόνων ιών, η ανάκαμψη των ημερών είναι ανεπαρκής. Ενώ οι μέθοδοι κυτταροκαλλιέργειας είναι σημαντικές για την απομόνωση των ιών, δεν μεταβαίνουν καλά στις τρέχουσες απαιτήσεις για ταχείες δοκιμές. Παράλληλα με τους μεγάλους χρόνους ανακύκλωσης των αποτελεσμάτων, η καλλιέργεια του ιού απαιτεί δειγματοληψία από την ική πηγή και απομάκρυνση σε αποστειρωμένα και ασφαλή εργαστήρια, όπου μπορεί να αναπτυχθεί ο ιός. Στο σημερινό κλίμα, όπου οι δοκιμές σημείου ανάγκης / σημείου φροντίδας είναι ιδιαίτερα επιθυμητές, τα βήματα που απαιτούνται για την καλλιέργεια ιών την περιορίζουν ως εργαλείο ταχείας διάγνωσης. Ως εκ τούτου, υπήρξε μια στροφή σε μοριακές τεχνικές που διευκολύνουν την άμεση δειγματοληψία από την πηγή, την ταχεία ανάκαμψη των αποτελεσμάτων και την επιδεκτικότητα για γρήγορη προσαρμογή στους αναδυόμενους ιούς. Οι τεχνικές που περιλαμβάνουν την

ανίχνευση του ιού από την πηγή, χωρίς να απαιτείται διάδοση του ιού, εμπίπτουν στην ευρεία κατηγορία της άμεσης ανίχνευσης. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κατηγοριοποιημένα μερικές μέθοδοι ανίχνευσης ιών με πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανά είδος.

Πίνακας 3.1, Μέθοδοι ανίχνευσης ιών.

Method	Advantages	Disadvantages	Examples	Refs.
qPCR	Quantitative; highly specific when using well-designed primers; highly sensitive; amenable to high-volume testing	Specialised equipment and trained staff required; relatively long runtime	Dengue; Zika; Chikungunya; Flaviviruses; Hantaviruses; Influenza A; Coronavirus	Colombo et al. (2019), Jääskeläinen et al. (2019), Nagy et al. (2019), Nunes et al. (2019), Corman et al. (2020)
LAMP	Rapid (30–60 min); sensitive; multiple primer requirements aid in specificity; can be quantitative or qualitative	Requires higher run temperature of 65°C; primer design can be challenging; DNA sample needs denaturation prior to amplification; appears particularly prone to carry-over contamination	Coronavirus; Zika; Dengue; Lassa; Hepatitis B	Jayanath et al. (2018), Lopez-Jimena et al. (2018), Da Silva et al. (2019), Pemba et al. (2019), Huang et al. (2020)
SPA	Rapid (20 mins); can operate at room or body temperature; simple primer design; no requirement for DNA denaturation prior to amplification	Low operating temperature can reduce specificity	Respiratory syncytial virus; Zika; Influenza	Wand et al. (2018), Sun et al. (2019), Xi et al. (2019)
HDA	Relatively simple primer design; no requirement for DNA denaturation prior to amplification	Cannot operate at ambient temperatures; may be prone to non-specific amplification due to lower operating temperature	Herpes simplex viruses; Varicella-zoster	Teo et al. (2015), Jevšnik et al. (2020)
RCA	Multiple formats available (e.g., linear, hyper-branched, multiply primed, padlock probe); at minimum requires only one primer	Product yield can be low depending on amplification method; additional sample manipulation may be required when using padlock-probes in RCA. Generally requires pre-amplification of target; may require manipulation of sample post-amplification; increasing carry-over contamination risk	Influenza A/B; Human immunodeficiency virus; Ebola; Zika; Dengue; Middle-East respiratory syndrome	Na et al. (2018), Neumann et al. (2018), Ciftci et al. (2020), Soares et al. (2020)
CRISPR- Cas Nucleic Acid Detection	Can be used standalone or in conjunction with already established amplification methods; may offer additional specificity as the target must be recognised by both the initial amplification method and guide RNA; relatively rapid (~60 mins)		Ebola; Epstein-Barr virus; Zika; Dengue; Lassa	Myhrvold et al. (2018), Qin et al. (2019), Barnes et al. (2020), Yuan et al. (2020)
ELISA	Multiple formats available (e.g., direct, indirect, competitive, sandwich); assay design made relatively simple by the wide range of commercially available antibodies; amenable to high-volume testing	Long runtime (hours-days); can be affected by sample matrix; different antibodies may exhibit different specificities for target; false negatives may occur in early infection window	Zika; Ebola; Influenza A; Human parechovirus; Hepatitis C; Human immunodeficiency virus	Bystryak and Acharya (2016), Zai et al. (2018), Zhang et al. (2018), Chen et al. (2019), Goto et al. (2020), Patel and Sharma (2020)
Blotting	Cheap; can be used with crude samples blotted onto membrane; blots are relatively stable which facilitates multiple sample collection/testing	Only qualitative/semi quantitative; results turnaround of hours-days; limited sensitivity	Respiratory syncytial virus; Dengue; Hepatitis B	Falconar and Romero-Vivas (2013), Gómez et al. (2014), Zhang et al. (2014)
LFA	Rapid (~10 mins); easy to interpret results; resistant to sample matrix effects; user-friendly	Results generally limited to quantitative/semi-quantitative; does not typically achieve sensitivity comparable to nucleic-acid detection	Zika; Influenza A; Hepatitis B; Dengue; Ebola	Hu et al. (2017), Liang et al. (2017), Wiriyachaiyorn et al. (2017), Kumar et al. (2018), Rong et al. (2019)

#### 4. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης με βάση το νουκλεϊκό οξύ

Οι μοριακές τεχνικές που περιλαμβάνουν την ενίσχυση του ιικού γονιδιωματικού υλικού είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές, παρέχουν ταχεία διάγνωση και επιτρέπουν την ανίχνευση πολλών ιών ταυτόχρονα. Οι τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ χρήσιμες για την ανίχνευση ιών που είναι μη καλλιιεργήσιμοι ή δύσκολοι και επιβλαβείς για την καλλιέργεια, ιών αργής ανάπτυξης σε καλλιέργεια και ιών που εμφανίζουν αντιγονικές παραλλαγές. Οι δοκιμές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων είναι πολύ δημοφιλείς στη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων που προκαλούνται από διάφορους ιούς, συμπεριλαμβανομένου του ιού της ηπατίτιδας C (HCV), του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), του ιού του δάγκειου πυρετού, του ιού Epstein-Barr (EBV), των ιών της γρίπης, του ιού Zika (ZIKV), του ιού Ebola και του κοροναϊού[2].

Ένα σημαντικό στοιχείο ανίχνευσης με βάση το νουκλεϊκό οξύ είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία χρησιμοποιεί πολλαπλούς προοδευτικούς κύκλους θερμοκρασίας και πολυμεράσες για την ενίσχυση του κλώνου DNA (Mullis et al., 1986). Δεδομένου ότι οι τυποποιημένες πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στην PCR μπορούν να συντεθούν μόνο από το πρότυπο DNA, η ενίσχυση του RNA απαιτεί τη χρήση ενζύμων με αντίστροφη μεταγραφική δραστηριότητα (bustin, 2000). Η PCR και η αντίστροφη μεταγραφή-PCR είναι ευρέως εφαρμοζόμενες μέθοδοι για την ανίχνευση ιών DNA και RNA, αντίστοιχα (Metcalf, 1995; Pring-Å Kerblom κλπ.). 1997; Burkhalter and Savage, 2017; Wadhwa et al. 2017; Liu et al., 2017; Liu et al. 2018, Lin et al., 2020). Στην τυπική PCR, το προϊόν DNA απεικονίζεται γενικά με ηλεκτροφόρηση γέλης για να ελεγχθεί η παρουσία της αναμενόμενης ζώνης DNA. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο, μπορείτε να επιτύχετε μόνο ημι-ποσοτικά αποτελέσματα, τα οποία διευκολύνονται από τον χειρισμό γνωστών μοτίβων DNA μαζί με άγνωστα δείγματα[36]. Αυτή η μέθοδος μπορεί επίσης να αποτύχει εάν το δείγμα περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις DNA. Αν και μπορεί να είναι δυνατή η ευαίσθητη ανίχνευση, η ευαισθησία μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τον τύπο χρώσης DNA που χρησιμοποιείται και τον τύπο του συστήματος που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της γέλης (Motohashi, 2019). Η ηλεκτροφόρηση με τζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πολλών εναλλακτικών μεθόδων ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος, όπως αυτές που βασίζονται στην ισοθερμική ενίσχυση, αλλά το πρόβλημα παραμένει ως επί το πλείστον το ίδιο. Δεδομένου ότι η ηλεκτροφόρηση πηκτής μπορεί να θεωρηθεί ως τυποποιημένη μέθοδος ανάλυσης ενισχυμένων προϊόντων DNA, οι ακόλουθες ενότητες θα επικεντρωθούν σε ορισμένες από τις εναλλακτικές στρατηγικές ανίχνευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων μετά την ενίσχυση.



Η ποσοτική ανάλυση αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων είχε σημαντικό ρόλο σε πολλούς τομείς της βιολογικής έρευνας. Η μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης (RNA) έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην παρακολούθηση βιολογικών αποκρίσεων σε διάφορα ερεθίσματα (Tan et al. 1994; Huang et al. 1995α, β; Prud'homme κ.ά. 1995). Η ποσοτική γονιδιακή ανάλυση (DNA) έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ποσότητας του γονιδιώματος ενός συγκεκριμένου γονιδίου, όπως στην περίπτωση του ανθρώπινου γονιδίου HER2, το οποίο ενισχύεται στο -30% των όγκων του μαστού (Slamon και συν. 1987). Η ποσοτικοποίηση γονιδίων και γονιδιώματος (DNA και RNA) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του φορτίου του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) καταδεικνύοντας αλλαγές στα επίπεδα του ιού σε όλες τις διάφορες φάσεις της νόσου (Connor και συν. 1993; Piatak κ.ά. 1993β· Furtado κ.ά. 1995).

#### 4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια εργαστηριακή τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος που χρησιμοποιείται για την αποδημία και την αποδημία μικρών τμημάτων του DNA χρησιμοποιώντας το ένζυμο Dna πολυμεράση I, ένα στέλεχος που απομονώνεται από το *Thermus aquaticus* γνωστό ως πολυμεράση Taq. Η PCR ΕΙΣΗΧΘΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ MULLIS ET AL. ΤΟ 1985, ΚΑΙ ΟΙ MULLIS ET AL. ΑΡΓΌΤΕΡΑ ΚΕΡΔΙΣΕ ΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ ΝΌΜΠΕΛ. Το PCR είναι ένα μνημειώδες εργαλείο που χρησιμοποιείται στη βιομοριακή επιστήμη για τη βαθιά ικανότητά του να εξετάζει και να ανιχνεύει ενισχυμένα συστατικά του DNA[40].

Η PCR είναι η διαδικασία της επιλεκτικής εστίασης σε ένα μικρό τμήμα του DNA σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Η θερμική σταθερότητα μπορεί να αντισταθεί σε μη αναστρέψιμες αλλαγές στις χημικές και φυσικές ιδιότητες σε ακραίες θερμοκρασίες. Μετά από αρκετούς κύκλους μετουσίωσης και μετουσίωσης στη διαδικασία PCR, η πολυμεράση Taq προτιμάται για τη θερμική της σταθερότητα και επιτρέπει τη συνεχή σύνθεση DNA ακόμη και με έκθεση σε αστάρι. Το PCR χρησιμοποιείται για τη διάγνωση βακτηριακών και ιογενών λοιμώξεων και για τη δοκιμή γενετικών διαταραχών λόγω της υψηλής ευαισθησίας του, καθιστώντας το τη διαδικασία δοκιμής χρυσού προτύπου για πολλά δείγματα[41].

#### 4.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η διαδικασία PCR ξεκινά με τη συλλογή ενός μικρού δείγματος DNA σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η PCR αποτελείται από 3 κύρια στάδια: αποδιάταξη, υβριδισμό ή ανόπτηση και επιμήκυνση ή ενίσχυση. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αποδιάταξης, το DNA θερμαίνεται στους 95°C, για να διαχωριστούν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών ζευγών βάσεων δίκλωνου DNA ή RNA. Αμέσως μετά την αποδιάταξη, εμφανίζεται η διαδικασία του υβριδισμού. Ο υβριδισμός περιλαμβάνει την ψύξη του μετουσιωμένου DNA σε θερμοκρασία 37-72°C, επιτρέποντας την τροποποίηση των δεσμών υδρογόνου. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται στους 55 και 72°C και είναι αποτελεσματικότερη στη θερμοκρασία μεταξύ των δύο.

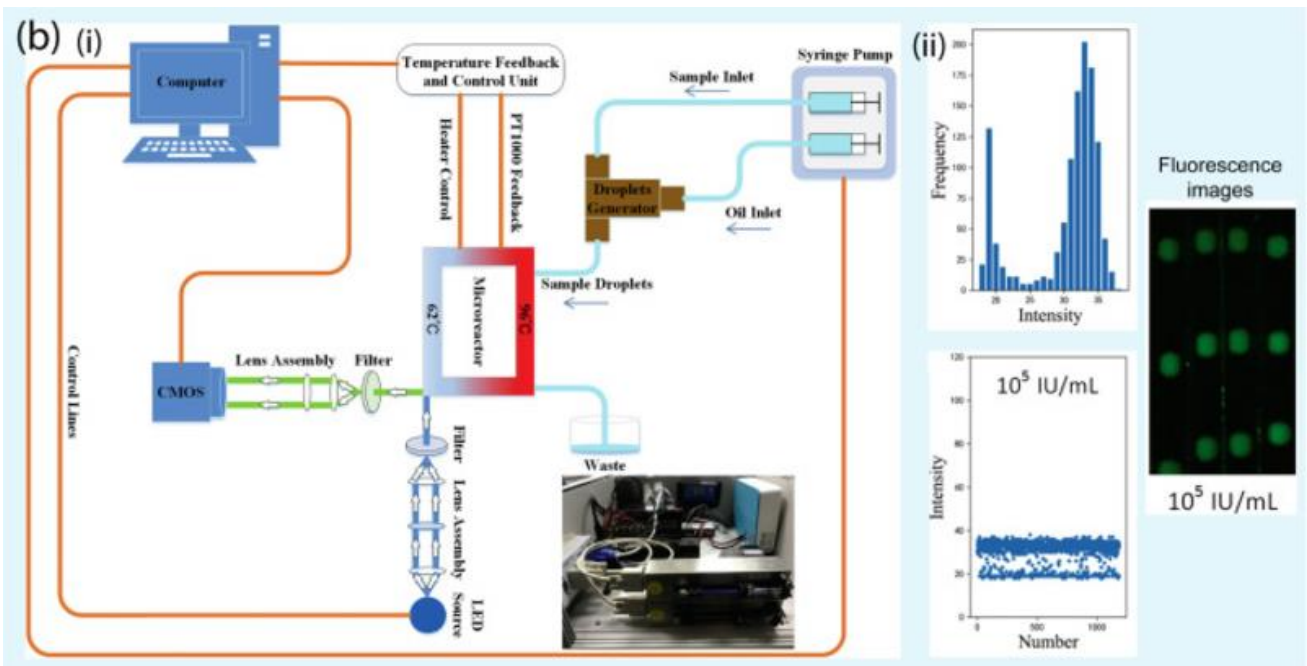
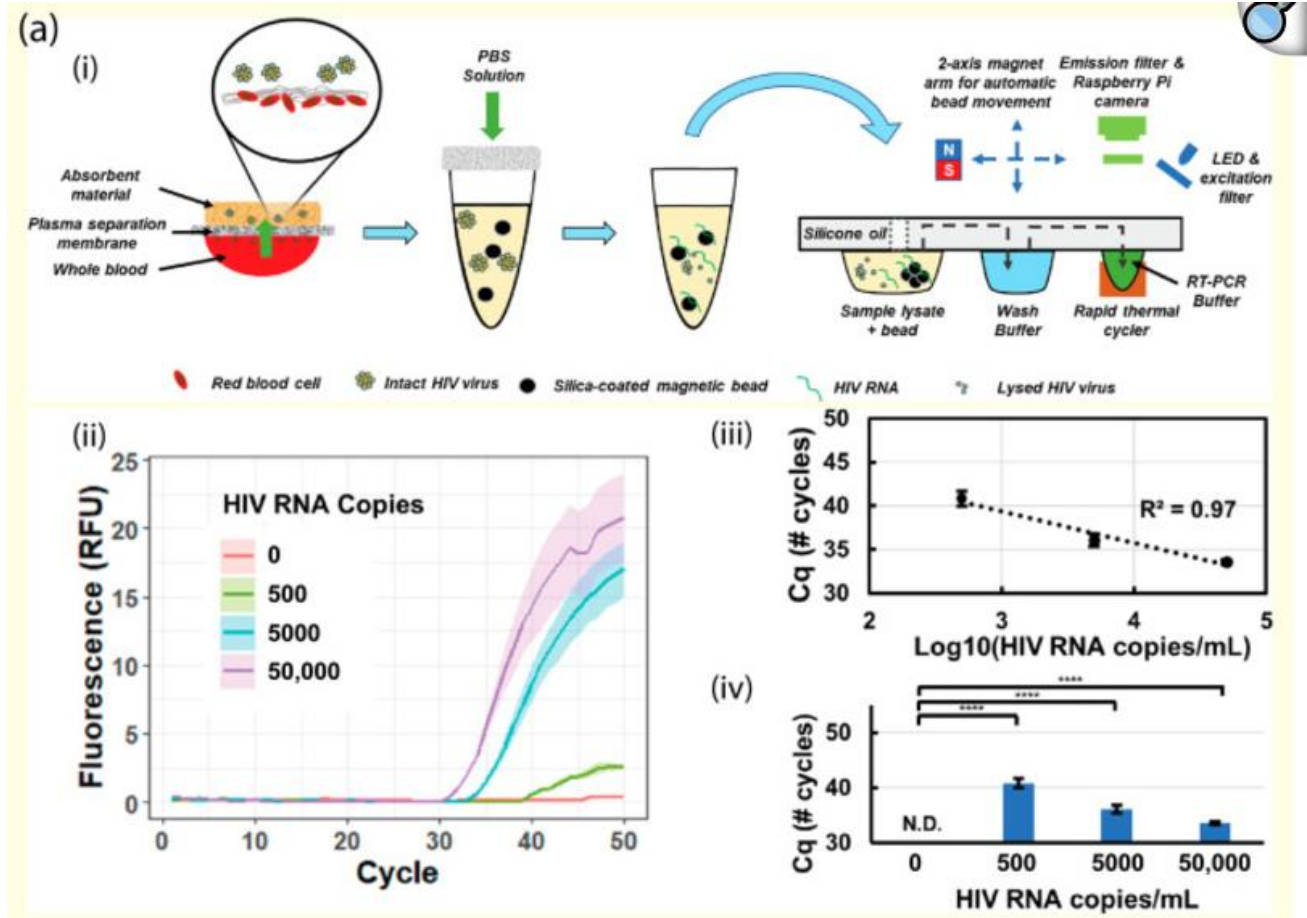
Η ειδική θερμοκρασία προσδιορίζεται με βάση τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ειδικών εκκινητών που χρησιμοποιούνται στο διάλυμα. Το μήκος του εκκινητή είναι 20-25 νουκλεοτίδια. Με την ανάφλεξη, ο εκκινητής μπορεί να δεσμευτεί σε μονόκλωνο DNA σε κάθε συμπληρωματική θέση, ξεκινώντας από το 3' άκρο του προτύπου DNA. Στη συνέχεια, ο εκκινητής δεσμεύεται σε μια συμπληρωματική θέση σε μονόκλωνο DNA για να παράγει 2 δίκλωνα μόρια. Τέλος, επιλέγεται η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης 75-80°C, η οποία είναι η πλέον κατάλληλη για αντιγραφή DNA που προκαλείται από ένζυμα, για να εξασφαλιστεί η δραστικότητα DNA πολυμεράσης.

Για να λειτουργήσει η DNA πολυμεράση, το δίκλωνο DNA είναι απαραίτητο για να ξεκινήσει η αντιγραφή. Στη συνέχεια, το ένζυμο συνθέτει νέους κλώνους DNA σε κατεύθυνση 5' έως 3', παράγοντας κλώνους πανομοιότυπους με τους κλώνους προτύπων. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές χρησιμοποιώντας έναν θερμικό κυκλωτή. Ένας θερμικός κυκλοποιητής είναι μια συσκευή που ελέγχει το χρόνο και τη θερμοκρασία κάθε κύκλου και τα αντίστοιχα βήματά του. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση πολλαπλών αντιγράφων του DNA-στόχου μέσα στο σωλήνα. Μετά από 30 έως 40 κύκλους, οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι τελικά μειώνονται λόγω της περιορισμένης ικανότητας του αντιδραστήριου και άλλων παραγόντων που συμβάλλουν, όπως η συσσώρευση πυροφωσφορικών μορίων, η υπερβολική αυτοανόπτηση και η παρουσία αναστολέων PCR στο δείγμα. Αρκετοί αναστολείς μπορούν να επηρεάσουν την καλή λειτουργία της PCR. Οι πιο συνηθισμένοι αναστολείς PCR είναι η πρωτεΐνωση K, η φαινόλη και η EDTA. Η πρωτεΐνωση K έχει την τάση να αποικοδομεί την Taq πολυμεράση. Άλλες ουσίες που επηρεάζουν αρνητικά τις δοκιμές PCR είναι τα ιοντικά απορρυπαντικά, η ηπαρίνη, η σπερμιδίνη και η αιμοσφαιρίνη. Επιπλέον, οι βαφές βρωμοφαινόλης και η ξυλοκυανόλη μπορούν να αποτελέσουν επιπλοκές στη δοκιμή PCR. Για να



ξεπεραστούν αυτά τα ζητήματα, τα πρότυπα DNA μπορούν να καθαριστούν με αιμοκάθαρση και καθίζηση με αιθανόλη. Αρκετές άλλες στρατηγικές για τον καθαρισμό του προτύπου DNA περιλαμβάνουν τη χρήση χλωροφορμίου για σκοπούς εκχύλισης και χρωματογραφίας. [40]

Μετά την ενίσχυση PCR, η ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου εκτελείται συνήθως για την απεικόνιση του DNA. Στη συνέχεια, η γέλη αξιολογείται σε υπεριώδες φως. [12] Ένα ουσιαστικό βήμα σε αυτή τη διαδικασία περιλαμβάνει την επαλήθευση της ιδιαιτερότητας των αποτελεσμάτων μεταφέροντας το DNA σε ένα φίλτρο και χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή, όπως στον υβριδισμό Southern blot. Αυτό το βήμα βοηθά επίσης στην εξάλειψη της μη ειδικής ενίσχυσης, όπως τα διμερή αστάρια. Η χρήση PCR στις βασικές και βιοϊατρικές επιστήμες προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Με τα χρόνια, έχει αποκτήσει μια φημισμένη φήμη, καθιστώντας την τη διαδικασία χρυσού προτύπου για διάφορες εφαρμογές. Η PCR είναι γνωστή για την ικανότητά της να παράγει γρήγορα αποτελέσματα με χρονικά αποδοτικό τρόπο. η διαδικασία PCR απαιτεί συνήθως μερικές ώρες έως 3 ημέρες για να παράγει αποτελέσματα. Ένα μικρό δείγμα DNA ή RNA (0,1-5 mcg) απαιτείται για να υποβληθεί σε αυτή την αντίδραση. Η PCR έχει επίσης την ευαισθησία να ενισχύσει 106 έως 109 αντίγραφα DNA σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η PCR μπορεί να δημιουργήσει αποτελεσματικά προϊόντα ενίσχυσης μετά την κλωνοποίηση και την έκφραση λόγω της παρουσίας σημείων περιορισμού στα τερματικά άκρα.



Εικόνα 4.1.1 Σχηματική απεικόνιση του ιού POC HIV. (i) Αρχή λειτουργίας της μικροσυσκευής ανίχνευσης του HIV. (ii) Καμπύλες ενίσχυσης. (iii) Τιμές Cq. (iv) Αξιολόγηση του LOD σε 500 αντίγραφα HIV RNA/mL. N.D. σημαίνει μη ανιχνευμένος και υποδεικνύει  $p < 0,0001$ . Το κείμενο αναδημοσιεύεται με άδεια από [88]. Πνευματικά δικαιώματα (2022) εκδόσεις ACS. θ) Πλήρως ενσωματωμένη ψηφιακή συσκευή PCR συνεχούς ροής για την ανίχνευση της ηπατίτιδας B. θ) Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος ψηφιακού οργάνου PCR συνεχούς ροής. (ii) Αποτελέσματα ψηφιακής ανίχνευσης PCR: κατανομή, συχνότητα και πραγματική εικόνα της έντασης φθορισμού των σταγονιδίων. Το κείμενο αναδημοσιεύεται με άδεια από [30]. Πνευματικά δικαιώματα (2020) Elsevier.

## 4.2 Αντίστροφη μεταγραφική-PCR (RT-PCR)

Η RT-PCR επινοήθηκε για την ενίσχυση των στόχων RNA. Στην τεχνική αυτή, η αντίστροφη μεταγραφάση (RT) χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των ιικών στόχων RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και το cDNA που προκύπτει ενισχύεται με συμβατική PCR. Από την ανάπτυξή της, η RT-PCR χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της λοίμωξης από ανθρώπινο RNA ιό. Η συμβατική RT-PCR έχει δείξει ευαισθησία 73% έως 100% και ειδικότητα 99% έως 100% στην ανίχνευση της ιογενούς λοίμωξης [29]. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η RT-PCR είναι μια εξαιρετική μέθοδος για τη διάγνωση της λοίμωξης από ανθρώπινο RNA ιό. Ωστόσο, επί του παρόντος, η μέθοδος αυτή είναι δαπανηρή και χρονοβόρα και, ως εκ τούτου, δεν χρησιμοποιείται ευρέως σε κλινικά δείγματα [30].

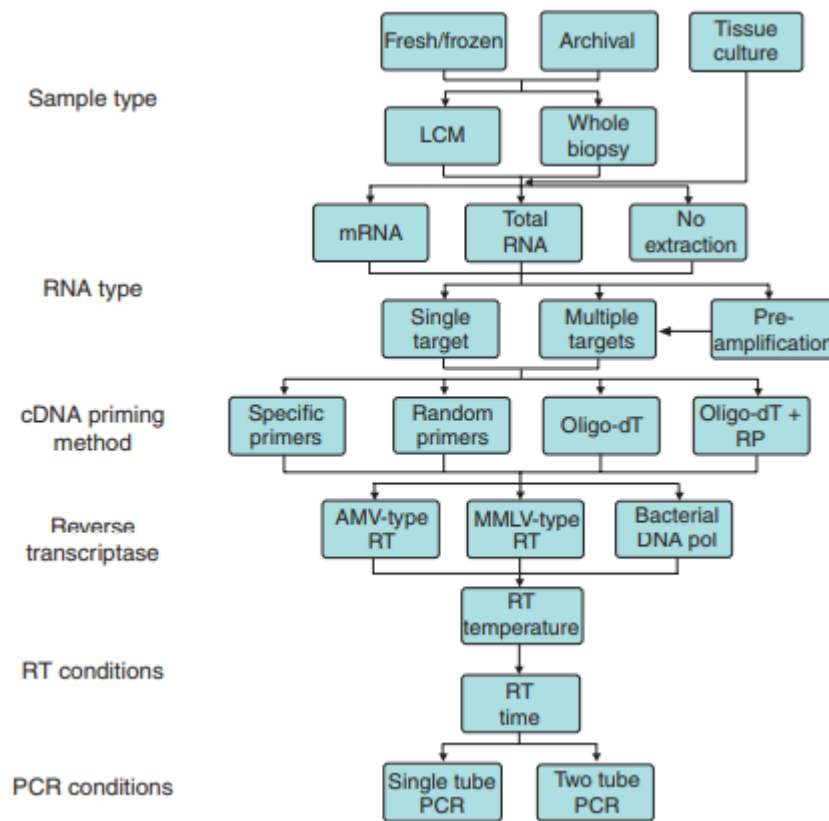
Η επιλογή των ζευγών εκκινητών για την αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής-πολυμεράσης (RT-PCR) είναι σημαντική για την ειδική ενίσχυση των αλληλουχιών-στόχων. Εάν η αλληλουχία του επιλεγμένου ζεύγους εκκινητών δεν συνδέεται αποτελεσματικά με το RNA του δείγματος ή με αλληλουχίες που αναστέλλονται σε οποιοδήποτε στάδιο της αντίδρασης PCR, η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης RT-PCR μειώνεται και λαμβάνεται μικρή ή καθόλου απόδοση προϊόντος. Εάν τα επιλεγμένα ζεύγη εκκινητών έχουν επίσης μη στοχευμένες αλληλουχίες ανόπτησης ή πλευρικές αλληλουχίες, η αντίδραση RT-PCR θα ενισχύσει επίσης ανεπιθύμητες περιοχές RNA, με αποτέλεσμα έναν ετερογενή πληθυσμό προϊόντων. Είναι δυνατόν να προβλεφθεί εκ των προτέρων υπολογιστικά πότε θα εμφανιστεί αυτή η κατάσταση και να αποφευχθεί [40].

Οι εκκινητές περιλαμβάνουν κανονικούς και εκφυλισμένους εκκινητές. Εάν συντίθενται κανονικοί εκκινητές, στην αντίδραση PCR υπάρχουν μόνο δύο πληθυσμοί εκκινητών: ένας πληθυσμός εμπρόσθιων εκκινητών και ένας πληθυσμός αντίστροφων εκκινητών. Εάν συντίθενται εκφυλισμένοι εκκινητές, μπορεί να υπάρχουν πολλαπλές παραλλαγές εμπρόσθιων και αντίστροφων εκκινητών που αντιστοιχούν στην απαρίθμηση των κωδικών ασάφειας που αντιπροσωπεύουν οι

εκφυλισμένοι εκκινητές. Για παράδειγμα, εάν ο εμπρόσθιος εκκινητής έχει σχεδιαστεί να περιέχει N σε μία μόνο θέση, θα συντίθενται και θα υπάρχουν στην αντίδραση PCR τέσσερις παραλλαγές εμπρόσθιων εκκινητών, εξαιρουμένου του αντίστροφου εκκινητή. Οι εκφυλισμένοι εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση αλληλουχιών-στόχων πολλαπλών γονότυπων, επιτρέποντας την εμφάνιση παραλλαγών στις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών. Η διαδικασία σχεδιασμού κανονικών εκκινητών διαφέρει από εκείνη του σχεδιασμού εκφυλισμένων εκκινητών [42].

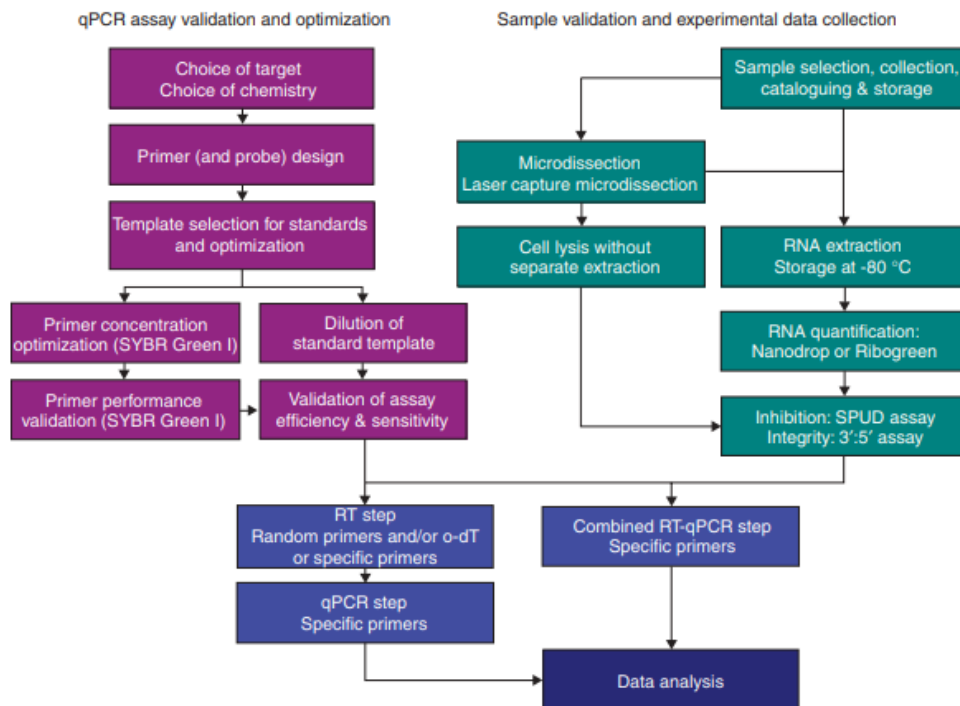
#### 4.2.1 Τρέχοντα ζητήματα

Η εκτεταμένη χρήση αυτής της τεχνολογίας έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολυάριθμων πρωτοκόλλων για την παραγωγή ποσοτικών δεδομένων χρησιμοποιώντας (i) φρέσκα, κατεψυγμένα ή διατηρημένα δείγματα FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded), (ii) ολόκληρες βιοψίες ιστών, δείγματα μικροδιατομής, μεμονωμένα κύτταρα, (iii) ολικό RNA ή mRNA, (iv) διάφορες στρατηγικές προετοιμασίας cDNA, (v) διάφορα ενζυμικά ή συνδυασμούς ενζύμων, (vi) έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα πρωτόκολλα για την παραγωγή ποσοτικών δεδομένων με τη χρήση διαφόρων δοκιμασιών απόδοσης, ευαισθησίας και ανοχής, (vii) ολικό RNA ή mRNA, (iv) διάφορες διαφορετικές στρατηγικές προετοιμασίας cDNA, (v) διάφορα ένζυμα ή συνδυασμούς ενζύμων, (vi) ) διάφορες δοκιμασίες απόδοσης, ευαισθησίας και ανοχής, (vii) διάφορες χημικές ουσίες ανίχνευσης, συνθήκες αντίδρασης και θερμικούς κυκλοποιητές και (viii) μεμονωμένες μεθόδους ανάλυσης και αναφοράς. Αυτή η προφανής έλλειψη τυποποίησης σε κάθε στάδιο της ανάλυσης (Εικόνα), η οποία επιδεινώνεται από σημαντικές διαφορές στην επεξεργασία των δειγμάτων, στη χρήση των ελέγχων, στις μεθόδους τυποποίησης και στη διαχείριση του ποιοτικού ελέγχου, έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αξιοπιστία, την εγκυρότητα και την αναπαραγωγικότητα της RT-qPCR.



Εικόνα 4.2.1 , Βήματα που απαιτούνται για το σχεδιασμό μιας δοκιμασίας RT-qPCR. Ορισμένες μεταφορές απεικονίζουν τις επιλογές και τις δυνατότητες διαφοροποίησης που σχετίζονται με αυτή την τεχνική.

Ιδανικά, όλα τα διαθέσιμα πρωτόκολλα θα μπορούσαν να συγκριθούν για να αντιμετωπιστούν οι αβεβαιότητες που προκύπτουν σε κάθε βήμα. Καθώς αυτό είναι σαφώς αδύνατο, παρουσιάζεται ένα σύνολο πρωτοκόλλων με βάση τις τρέχουσες σκέψεις για κάθε βήμα. Η λεπτομερής συζήτηση για την επιλογή των δειγμάτων, την αποθήκευση και την εκχύλιση RNA υπερβαίνει το πεδίο εφαρμογής του παρόντος εγγράφου και έχει περιγραφεί εκτενώς αλλού. Τα πρωτόκολλα ξεκινούν με την επικύρωση του εκχυλισμένου RNA. Είμαστε βέβαιοι ότι αυτά τα πρωτόκολλα είναι προσιτά στους περισσότερους ερευνητές και θα παρέχουν αξιόπιστα δεδομένα. Σε κάθε περίπτωση, η απόφαση να προταθεί μια συγκεκριμένη προσέγγιση είναι δικαιολογημένη, αλλά οι επιμέρους εφαρμογές ενδέχεται να απαιτούν διάφορες τροποποιήσεις ανάλογα με τον χρήστη- μια επισκόπηση των θεμάτων που σχετίζονται με τις διαδικασίες και τα εναλλακτικά βήματα για την εκτέλεση αντιδράσεων RT-qPCR παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα [43].



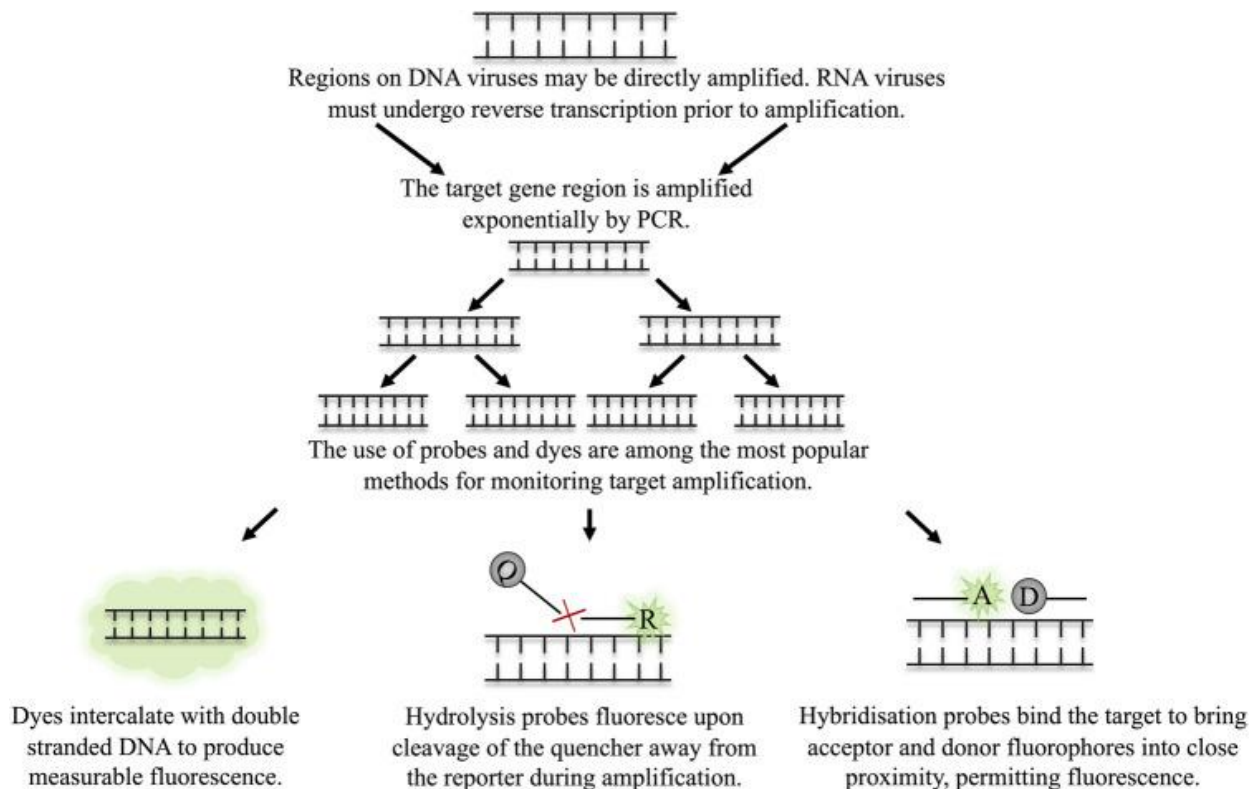
Εικόνα 4.2.2 , Πειραματική ροή εργασίας RT-qPCR, με τέσσερα κύρια θέματα (επικύρωση και βελτιστοποίηση δοκιμασίας, επικύρωση δείγματος και συλλογή δεδομένων, δοκιμασία RT-PCR και ανάλυση δεδομένων) που επισημαίνονται με διαφορετικά χρώματα [43].

### 4.3 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (QPCR σε πραγματικό χρόνο) μετρά την παραγωγή του DNA στόχου καθ ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Αυτό διευκολύνεται από τη χρήση χρωστικών DNA, όπως SYBR® green, ή ανιχνευτών με ετικέτα φθορισμού. Η χρωστική DNA συνδέεται με ολόκληρο το δίκλωνο DNA. Για τη χρήση αυτών των χρωστικών, τα αρχικά πρέπει να είναι εξαιρετικά βελτιστοποιημένα και να μην παράγουν μη ειδικά αμπλικόνια, και αυτά τα μη ειδικά προϊόντα παράγουν επίσης σήματα που στρεβλώνουν την ποσοτικοποίηση, έτσι ώστε να μην παράγουν μη ειδικά αμπλικόνια. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι μια στοχευμένη εναλλακτική λύση. Αν και πολλοί τύποι ανιχνευτών χρησιμοποιούνται στο cPCR, οι συνηθισμένοι ανιχνευτές περιλαμβάνουν ανιχνευτές που πρέπει να συνδέονται με συγκεκριμένες



τοποθεσίες του DNA στόχου για την επίτευξη φθορισμού, για παράδειγμα, ανιχνευτές υδρόλυσης ή υβριδισμού (Navarro et al., 2015). Ένα παράδειγμα χρήσης χρωστικών φθορισμού και ανιχνευτών φαίνεται στην εικόνα. Το επίπεδο φθορισμού στο δείγμα για ανάλυση PCR μετράται και είναι ευθέως ανάλογο με την αρχική συγκέντρωση του στόχου στο δείγμα, γεγονός που επιτρέπει μια γρήγορη ποσοτική αξιολόγηση.

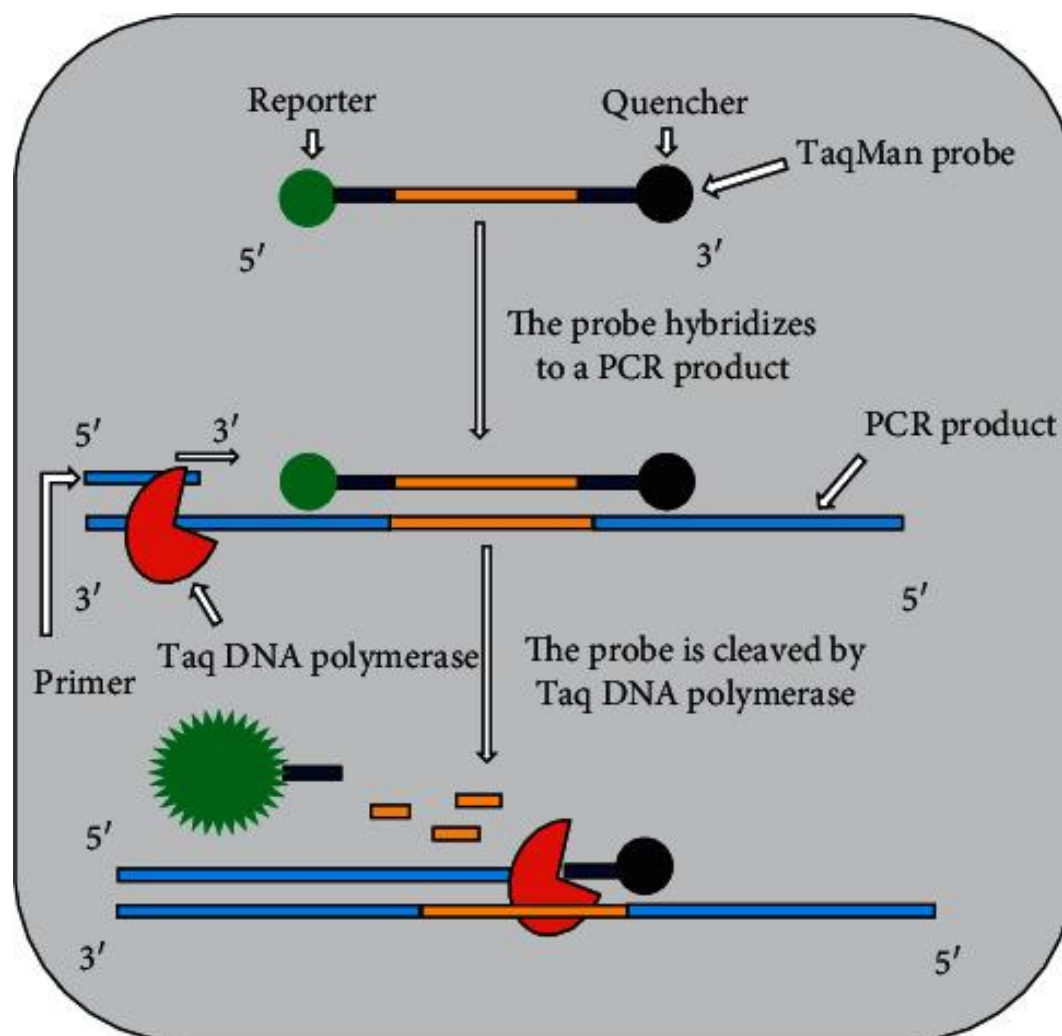


Εικόνα 4.3.1, Η ανίχνευση του DNA στόχου στην qPCR πραγματοποιείται μέσω χρωστικών και ανιχνευτών. Η περιοχή-στόχος του ιού υποβάλλεται σε πολλαπλούς γύρους εκθετικής ενίσχυσης κατά την PCR. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι για την παρακολούθηση της παραγωγής του DNA στόχου σε πραγματικό χρόνο. (Α) Οι χρωστικές αλληλεπιδρούν με το δίκλωνο DNA, προκαλώντας αύξηση του φθορισμού καθώς το επίπεδο του δίκλωνου DNA στο δείγμα αυξάνεται. Οι ανιχνευτές υδρόλυσης και υβριδισμού απαιτούν σύνδεση με συγκεκριμένη αλληλουχία στο αμπλικονικό στόχο για να ενεργοποιηθεί ο φθορισμός. Ο φθορισμός επιτυγχάνεται είτε μέσω της διάσπασης του καθετήρα κατά τη χρήση ανιχνευτών υδρόλυσης (Β), είτε μέσω της πρόσδεσης των ανιχνευτών στην περιοχή-στόχο, όπου βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση, όπως συμβαίνει με τους ανιχνευτές υβριδισμού (C).

Όσον αφορά την ανάπτυξη ταχέων διαγνωστικών δοκιμασιών ιών, η qPCR σε πραγματικό χρόνο έχει τόσο οφέλη όσο και μειονεκτήματα. Ένα πλεονέκτημα είναι η υπόσχεση υψηλής εξειδίκευσης κατά τη χρήση ανιχνευτών όπως ανιχνευτές υδρόλυσης ή υβριδισμού, καθώς τόσο οι εκκινητές όσο και ο καθετήρας πρέπει να δεσμεύουν την ακολουθία στόχου για να επιτύχουν σήμα. Όταν υπάρχει πίεση χρόνου, είναι πολύ επιθυμητή μια ανάλυση που παράγει πολύ συγκεκριμένα, ποσοτικά αποτελέσματα κατά τη διάρκεια λίγων ωρών. Ενώ η qPCR προσφέρει μια σχετικά γρήγορη ανάκαμψη των αποτελεσμάτων όσον αφορά την ίδια τη δοκιμασία, η προετοιμασία του δείγματος, η οποία γενικά απαιτείται για την qPCR, μπορεί να είναι ένας παράγοντας καθυστέρησης. Ενώ υπάρχουν αρκετά εμπορικά διαθέσιμα κιτ που διευκολύνουν την ταχεία απομόνωση του DNA ή του RNA, έρχονται με το μειονέκτημα του πρόσθετου κόστους (Clark et al., 2016). Αυτό, σε συνδυασμό με το αρχικό κόστος του ίδιου του εξοπλισμού qPCR, θα μπορούσε να καταστήσει τις μεθόδους ανίχνευσης όπως η qPCR απρόσιτες στις αναπτυσσόμενες περιοχές. Ένα άλλο επιθυμητό χαρακτηριστικό μιας ταχείας ανάλυσης είναι η ικανότητά της για δοκιμές υψηλής απόδοσης. Δεδομένου ότι η qPCR χρησιμοποιείται συνήθως σε μορφή ανάλυσης 96 φρεατίων, η μετάβαση σε υψηλή απόδοση είναι εφικτή (Arya et al., 2005; Eigner κ.ά., 2019). Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για καταστάσεις όπου οι δοκιμές μεγάλου όγκου είναι ζωτικής σημασίας, για παράδειγμα κατά τη διάρκεια πανδημιών ή επιδημιών, ή για βιομηχανικές ή γεωργικές εφαρμογές όπου ενδέχεται να χρειαστεί να εξεταστούν ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η ικανότητα εκτέλεσης qPCR σε πολυπλεγμένες αντιδράσεις συμπληρώνει αυτή τη δυνατότητα υψηλής απόδοσης. Η χρήση πολλαπλών ζευγών ειδικών εκκινητών και κατάλληλων ανιχνευτών, που στοχεύουν διαφορετικούς ιούς που μπορεί να βρεθούν στο ίδιο δείγμα, διευκολύνει τον έλεγχο για πάνελ ιών. Αυτό, σε συνδυασμό με τη διάταξη πολλαπλών κοιλοτήτων των δοκιμασιών qPCR και τα καθιερωμένα συστήματα υψηλής απόδοσης, παρέχει μια ισχυρή μέθοδο για τη δοκιμή πολλαπλών δειγμάτων για την παρουσία πολλών ιών ταυτόχρονα (Hwang et al., 2018; Sánchez-Ponce κ.ά., 2018· Eigner κ.ά., 2019· Ου κ.ά., 2020). Αν και, όπως προαναφέρθηκε, η απαραίτητη προετοιμασία του δείγματος μπορεί, και πάλι, να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα στην ικανότητα απόδοσης των δοκιμασιών qPCR. Αυτό θα μπορούσε να ξεπεραστεί με τη συνεχή ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων νουκλεϊκής εξαγωγής, όπως οι δοκιμασίες που βασίζονται σε μαγνητικές χάντρες που περιγράφονται από τους Xin και Chen (2012) και Clark et al. (2016). Αυτά διευκολύνουν την προετοιμασία δειγμάτων υψηλής απόδοσης σε σύντομο χρονικό διάστημα (λίγες ώρες) με σημαντικά μειωμένο κόστος σε σύγκριση με τα εμπορικά διαθέσιμα συστήματα εξαγωγής υψηλής απόδοσης (Xin and Chen, 2012; Clark κ.ά., 2016).

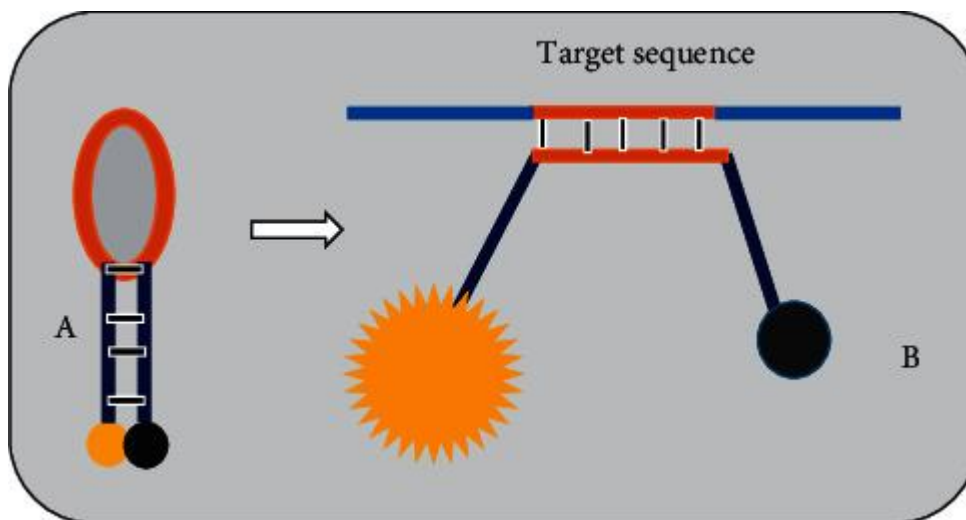


Εναλλακτικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στρατηγικές δειγματοληψίας, όπως η σύνθετη δειγματοληψία, σύμφωνα με τις οποίες ένας αριθμός δειγμάτων αναμειγνύεται και δοκιμάζεται ως ένα. Η εφαρμογή σύνθετης δειγματοληψίας μπορεί να επιτύχει υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με δοκιμές ενός δείγματος (Jones et al., 2020). Αυτό θα διευκόλυνε την αξιολόγηση πολλαπλών δειγμάτων στο πλαίσιο μιας ίδιας δοκιμασίας, μειώνοντας έτσι το επίπεδο επεξεργασίας του δείγματος που απαιτείται για κάθε δοκιμή. Επιπλέον, εάν ένα από τα συνδυασμένα δείγματα παρουσιάζει θετικό αποτέλεσμα, τότε μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση σε μεμονωμένα δείγματα για τον εντοπισμό μολυσμένων ατόμων. Άλλα μειονεκτήματα της qPCR περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος του εξοπλισμού και των αντιδραστηρίων, την ανάγκη για αυστηρά ελεγχόμενο κύκλο θερμοκρασίας και την ανάγκη για εκπαιδευμένο προσωπικό για τη διεξαγωγή δοκιμών. Παράλληλα με την qPCR, προτείνονται και άλλες μέθοδοι ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που επιτρέπουν την ισοθερμική ενίσχυση του DNA και του RNA.



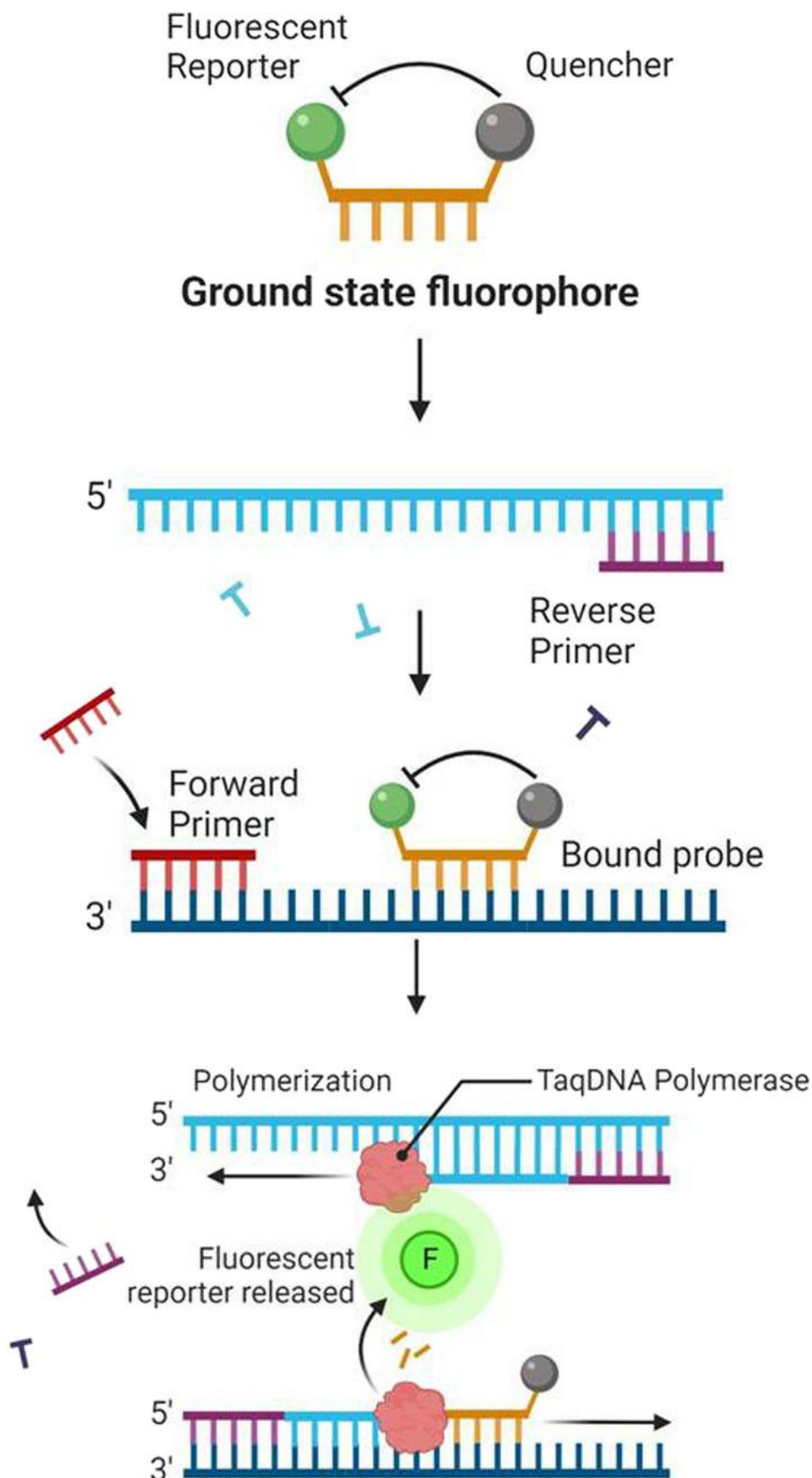
Εικόνα 4.3.2, Σχηματική απεικόνιση της χρήσης του ανιχνευτή TaqMan σε PCR σε πραγματικό χρόνο.

Σε σύστημα PCR σε πραγματικό χρόνο, πραγματοποιούνται ταυτόχρονα βήματα ενίσχυσης και ανίχνευσης ιικού νουκλεϊκού οξέος. Η ανίχνευση του προϊόντος ενίσχυσης βασίζεται στην ποσότητα εκπομπών φθορισμού από το δείγμα. Η εκπομπή φθορισμού από το δείγμα παρακολουθείται από ειδικό θερμικό κυκλωτή. Ο υπολογιστής, με κατάλληλο λογισμικό συνδεδεμένο με τον θερμικό κυκλωτή, καταγράφει τα δεδομένα και παράγει ένα διάγραμμα ενίσχυσης σε κάθε κύκλο αντίδρασης [42]. Η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων ενίσχυσης μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας το πράσινο SYBR, το TaqMan, και χημικές ουσίες μοριακού φάρου. Η πράσινη βαφή SYBR συνδέεται με την ελάσσονα αύλακα του δίκλωνου προϊόντος DNA (dsDNA) και κατά τη διέγερση με κατάλληλο φως, εμφανίζει βελτιωμένο φθορισμό, ο οποίος είναι ευθέως ανάλογος με το συσσωρευμένο προϊόν dsDNA. Ο ανιχνευτής TaqMan είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο DNA με φθορίζουσα χρωστική ουσία που ονομάζεται ανιχνευτής προσαρτημένος στο ένα άκρο (βάση 5') και στο άλλο (βάση 3'). Οι αισθητήρες TaqMan έχουν σχεδιαστεί για υβριδισμό σε μια εσωτερική περιοχή ενός προϊόντος PCR. Κατά τη διάρκεια του σταδίου έναρξης της PCR, τόσο ο εκκινητής όσο και ο αισθητήρας TaqMan συνδέονται με τον κλώνο προτύπου. Όταν η Taq DNA πολυμεράση επεκτείνει τον εκκινητή, η πολυμεράση διασπά τον καθετήρα από τη δραστηριότητα της εξωνουκλεάσης 5'-3'. Η διάσπαση του καθετήρα οδηγεί στην απελευθέρωση της φθορίζουσας βαφής, με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού. Η ποσότητα φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με το προϊόν PCR. Ο μοριακός φάρος είναι ένα μικρό μόριο DNA με φθορίζουσα χρωστική ουσία στο άκρο 5' και στο άκρο 3'. Οι ακολουθίες στα άκρα 3' και 5' είναι συμπληρωματικές μεταξύ τους. Το εσωτερικό μέρος του μορίου έχει σχεδιαστεί για να είναι συμπληρωματικό προς την αλληλουχία-στόχο ενός προϊόντος PCR. Όταν ο μοριακός φάρος είναι ελεύθερος σε διάλυμα, θα υιοθετήσει μια δομή φουρκέτας.



Εικόνα 4.3.3, Διάγραμμα μοριακού φάρου. (Α) Το μόριο σχηματίζει φουρκέτα όταν είναι ελεύθερο σε διάλυμα. Αυτό φέρνει το φθοροφόρο (κίτρινη σφαίρα) και τον σβεστήρα (μαύρη μπάλα) σε κοντινή απόσταση, έτσι ώστε να μην ανιχνεύεται φως φθορισμού. (Β) Το μόριο υβριδοποιείται στην αλληλουχία στόχο. Αυτό διαχωρίζει το φθοροφόρο και τον σβεστήρα και οδηγεί σε εκπομπή φθορίζοντος φωτός.

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης, του σύντομου χρόνου παράδοσης των αποτελεσμάτων και της ευκολίας απόδοσης, τα περισσότερα εργαστήρια σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν PCR σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ιατρικών ιών DNA και RNA σε κλινικά δείγματα. Για παράδειγμα, οι Borraña et al. χρησιμοποίησαν PCR σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σε υγρό σάλιο με συνολική ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99,9%, σε σύγκριση με την τυπική ταχεία καλλιέργεια. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη διάγνωση της πρωτοπαθούς λοίμωξης από EBV με συνολική ευαισθησία 95,7% και ειδικότητα 100%, σε σύγκριση με τις ορολογικές δοκιμασίες. Χρησιμοποιήθηκε επίσης PCR σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου σε ασθενείς με εγκεφαλίτιδα απλού έρπητα. Ο προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε δείγματα ασθενών είναι ζωτικής σημασίας καθώς παρέχει προγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες. Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς με υψηλότερα ιικά φορτία στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τους (CSF) βρέθηκαν να χρειάζονται θεραπεία με acyclovir για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και είχαν φτωχότερο κλινικό αποτέλεσμα από τους ασθενείς με χαμηλότερο ιικό φορτίο στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τους [40].



*Εικόνα 4.3.4, διαγραμματική αναπαράσταση TaqDNA πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο PCR (Real-Time PCR)*

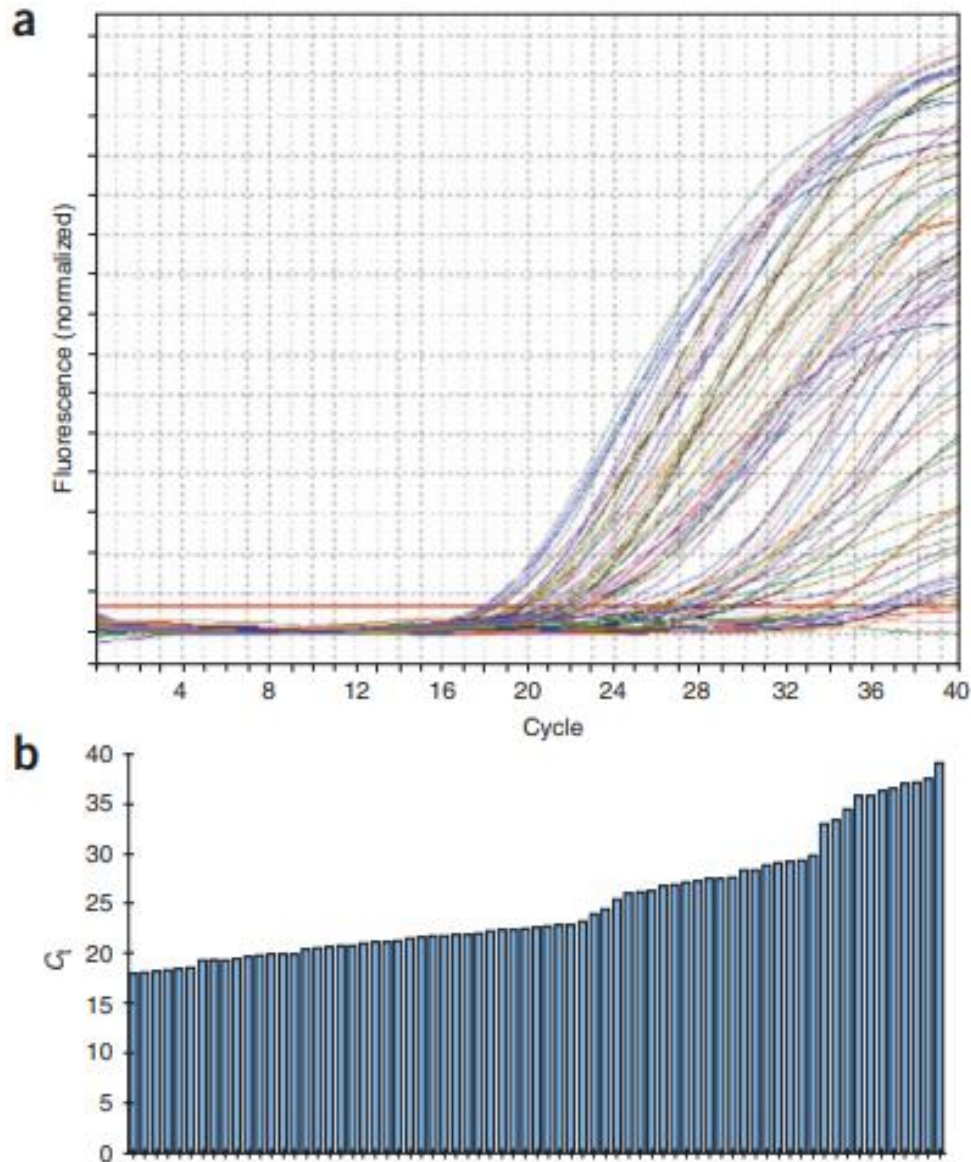
Η δοκιμασία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πολυπλεκτική ταυτοποίηση διαφορετικών ιών. Τόσο ο ανιχνευτής TaqMan όσο και ο μοριακός φάρος διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο για την πολυπλεκτική ταυτοποίηση διαφορετικών ιών σε μία μόνο αντίδραση PCR. Σε δοκιμασίες πολυπλεξίας, διαφορετικοί ανιχνευτές / φάροι επισημαίνονται με διαφορετικές φθορίζουσες βαφές. Στην ανάλυση πολυπλεξίας, αναφέρθηκε ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99,6%, σε σύγκριση με τη δοκιμασία ανοσοφθορισμού, για PCR σε πραγματικό χρόνο στην ανίχνευση ανθρώπινου αδενοϊού B, C και E στα δείγματα επιχρίσματος λαϊμού. Ο Ramamurthy και οι συνεργάτες του συνέκριναν την πολλαπλή PCR σε πραγματικό χρόνο με την πολυπλεκτική συμβατική PCR για την ανίχνευση νευροτρόπων ιών (CMV, EBV, τύπου 1 και 2 του ιού του απλού έρπητα (HSV-1 και HSV-2), του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας (JEV) και του ιού ανεμευλογιάς-ζωστήρα (VZV)) στο ENY. Από τα 147 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού που συλλέχθηκαν από ασθενείς με νευρολογικές διαταραχές, η PCR σε πραγματικό χρόνο ανίχνευσε ιογενή παθογόνα σε 88 δείγματα, ενώ η συμβατική PCR μπορούσε να ανιχνεύσει τους ιούς μόνο σε έξι δείγματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η PCR σε πραγματικό χρόνο έχει υψηλότερη ευαισθησία από τη συμβατική PCR. Οι Qiu et al. ανέπτυξαν μια τριπλή ποσοτική δοκιμασία PCR σε πραγματικό χρόνο για ταχεία και διαφορική ανίχνευση των οροτύπων 2, 3 και 7 του ανθρώπινου αδενοϊού (hAdV) για πιθανή κλινική χρήση. Η αναλυτική ευαισθησία (όριο ανίχνευσης· LoD) αυτής της δοκιμασίας ήταν 102 αντίγραφα DNA/αντίδραση για καθέναν από τους ορότυπους και καμία διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα αναπνευστικά παθογόνα. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η δοκιμασία είναι ευαίσθητη και ειδική και έχει τη δυνατότητα κλινικής χρήσης στην ταχεία και διαφορική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ορότυπων 2, 3 και 7 hAdV σε ανθρώπινα δείγματα.

#### 4.4 Βελτιστοποίηση PCR

Η βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου είναι το κλειδί για τη βελτίωση της ευαισθησίας, της ειδικότητας, της αναπαραγωγικότητας και του γραμμικού δυναμικού εύρους. Ευτυχώς, ενώ το στάδιο RT είναι εξαιρετικά μεταβλητό, το τμήμα qPCR της ανάλυσης είναι σημαντικά πιο αναπαραγώγιμο όταν εκτελείται υπό

βέλτιστες συνθήκες, αλλά έχει μεγαλύτερη μεταβλητότητα μεταξύ των επαναλήψεων όταν εκτελείται υπό μη βέλτιστες συνθήκες.<sup>43</sup> Η θερμοδυναμική σταθερότητα (DG) της αμφίδρομης κατασκευής εκκινητή/στόχου είναι εξαρτάται από τον εκκινητή και ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του εκκινητή. Η βελτιστοποίηση των αντιδράσεων PCR αποτελούσε αναπόσπαστο μέρος της ανάπτυξης της ανάλυσης, αλλά η πρόσφατη τάση προς την υψηλή απόδοση και την ταχεία αναφορά δεδομένων οδήγησε στην παράλειψη αυτού του βήματος σε πολλά εργαστήρια. Αυτό το βήμα παραλείπεται πλέον σε πολλά εργαστήρια. Πράγματι, ορισμένοι κατασκευαστές ισχυρίζονται ότι η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών δεν είναι απαραίτητη όταν χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο κύριο μείγμα. Ωστόσο, το σκεπτικό που διέπει την αρχική σύσταση παραμένει έγκυρο και είναι σαφές ότι η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των εκκινητών μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ευαισθησία ανίχνευσης μιας ανάλυσης (Εικόνα 4.4.1 ).





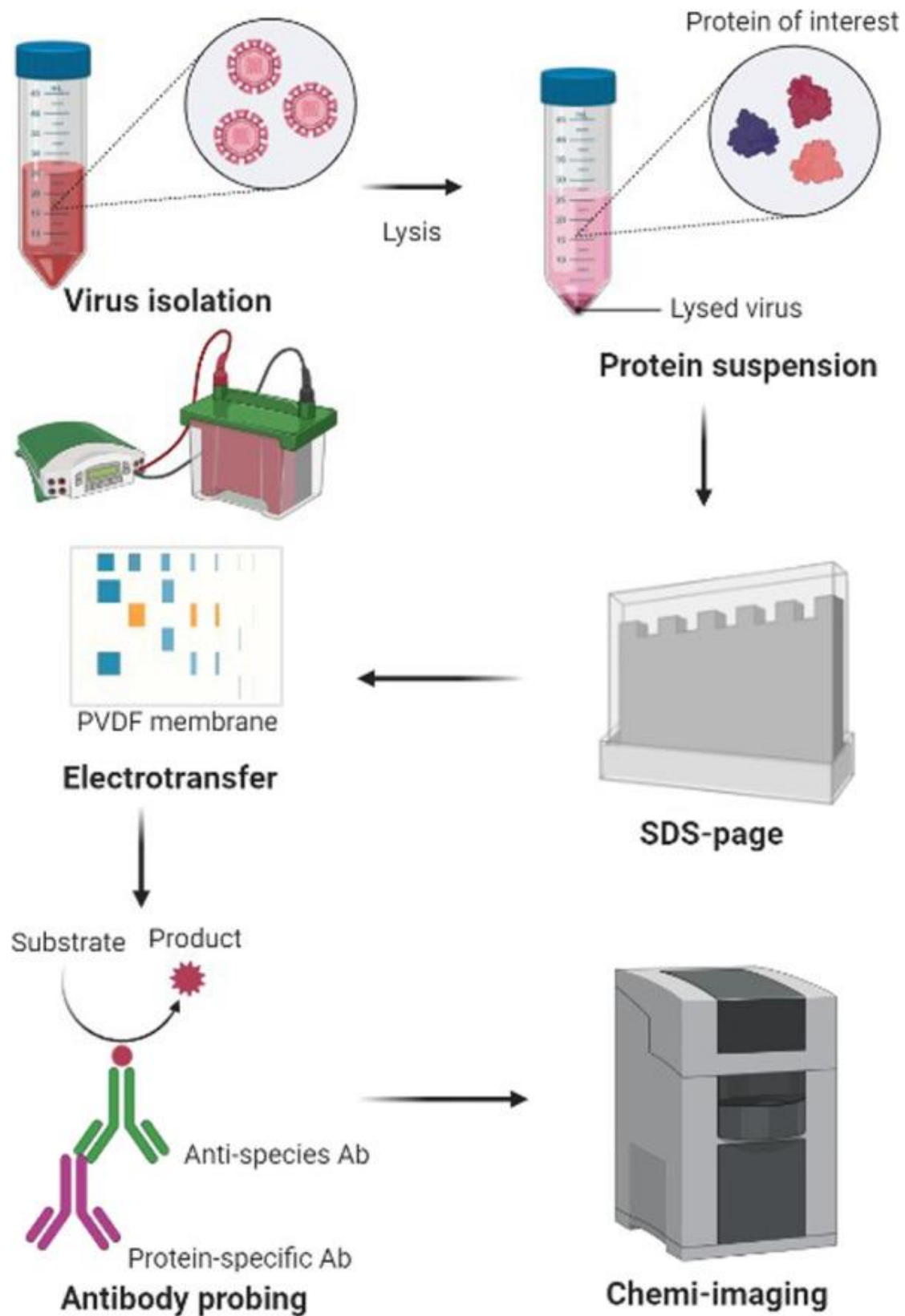
Εικόνα 4.4.1, Βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης εκκινήτων. Το cDNA που προήλθε από ολικό RNA (ποντικός) ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας εκκινήτες PCR ειδικά για το *Hercadin 1*. Δεδομένου ότι δεν καθορίστηκαν οι συνθήκες του εκκινήτη, χρησιμοποιήθηκαν όλοι οι συνδυασμοί των εμπρόσθιων και αντίστροφων συγκεντρώσεων εκκινήτων που κυμαίνονταν μεταξύ 50 nM και 600 nM, παρόμοιοι με τον συντομευμένο αναντιστοιχία πίνακα συγκέντρωσης εκκινήτη. (α) Τα γραφήματα ενίσχυσης αποκαλύπτουν τις τεράστιες διαφορές σε Ct, κλίση και οροπέδιο που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας πανομοιότυπα πρότυπα. Κάθε γραφική παράσταση ενίσχυσης αντιπροσωπεύει διαφορετικό συνδυασμό συγκέντρωσης εκκινήτη. Η οριζόντια κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει το κατώφλι, το οποίο ορίστηκε αυτόματα από το όργανο. β) Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εκκινήτων οδήγησαν σε εύρος Ct άνω των 20 κύκλων με χαμηλές συγκεντρώσεις του εμπρόσθιου εκκινήτη που αντιστοιχούν σε υψηλές τιμές Ct. Ο καταλληλότερος συνδυασμός εκκινήτων είναι αυτός που δίνει το χαμηλότερο Ct και τον υψηλότερο κανονικοποιημένο φθορισμό [43].

Για τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης συνιστάται η χρήση φθορίζουσών χρωστικών νουκλεϊκών οξέων, όπως η SYBR Green I ή η EvaGreen, καθώς και η ανάλυση των διαγραμμάτων ενίσχυσης και των καμπυλών τήξης. Η καμπύλη τήξης είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον ακριβή εντοπισμό των προϊόντων ενίσχυσης και τη διάκρισή τους από διμερή εκκινητών και άλλα μικρά τεχνουργήματα ενίσχυσης. Το DNA τήκεται σε μια χαρακτηριστική θερμοκρασία που ονομάζεται θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ), η οποία ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία χάνεται το ήμισυ της ελικοειδούς δομής του DNA. Η θερμοκρασία τήξης ενός μορίου DNA εξαρτάται από την εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Έτσι, τα πλούσια σε GC αμπλικόνια έχουν υψηλότερη  $T_m$  από τα πλούσια σε ζεύγη βάσεων AT αμπλικόνια. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης καμπύλης τήξης, το όργανο πραγματικού χρόνου παρακολουθεί συνεχώς τον φθορισμό κάθε δείγματος καθώς αυτό θερμαίνεται αργά από μια καθορισμένη από τον χρήστη θερμοκρασία κάτω από την  $T_m$  του προϊόντος σε μια θερμοκρασία πάνω από το σημείο τήξης του. Καθώς το δίκλωνο DNA λιώνει (μετουσιώνεται), η φθορίζουσα χρωστική απελευθερώνεται, παρέχοντας ακριβή δεδομένα  $T_m$  για κάθε ενισχυμένο προϊόν. Οι κορυφές τήξης υπολογίζονται με τη λήψη της παραγώγου [αρνητική παράγωγος πρώτης τάξης ( $-dF/dT$ )] της καμπύλης τήξης. Αυτές οι κορυφές είναι παρόμοιες με τις ζώνες στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και επιτρέπουν την ποιοτική παρακολούθηση του προϊόντος στο τέλος της εκτέλεσης. Τα μικρά διμερή εκκινητών λιώνουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ό,τι το μακρύτερο προϊόν αμπλικόνιο στόχου.

#### 4.5 Μέθοδοι ενίσχυσης με βάση τη μεταγραφή

Οι μέθοδοι ενίσχυσης με βάση τη μεταγραφή περιλαμβάνουν την ενίσχυση με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA) και την ενίσχυση με τη βοήθεια της μεταγραφής (TMA). Πρόκειται για ισοθερμικές μεθόδους ενίσχυσης. Ολόκληρη η διαδικασία ενίσχυσης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 41°C. Και στις δύο περιπτώσεις, οι ιικοί στόχοι RNA μετατρέπονται πρώτα σε cDNA κατά την RT και στη συνέχεια η RNA πολυμεράση συνθέτει ένα προϊόν ιικού RNA πολλαπλών αντιγράφων. Η μόνη διαφορά μεταξύ TMA και NASBA στη διαδικασία ενίσχυσης είναι ότι η TMA χρησιμοποιεί δύο ένζυμα (RT και RNA πολυμεράση), ενώ η NASBA χρησιμοποιεί τρία (αντίστροφη μεταγραφάση του ιού της μυελοβλάστης των πτηνών (AMV-RT), RNάση H και T7 RNA πολυμεράση) [2].



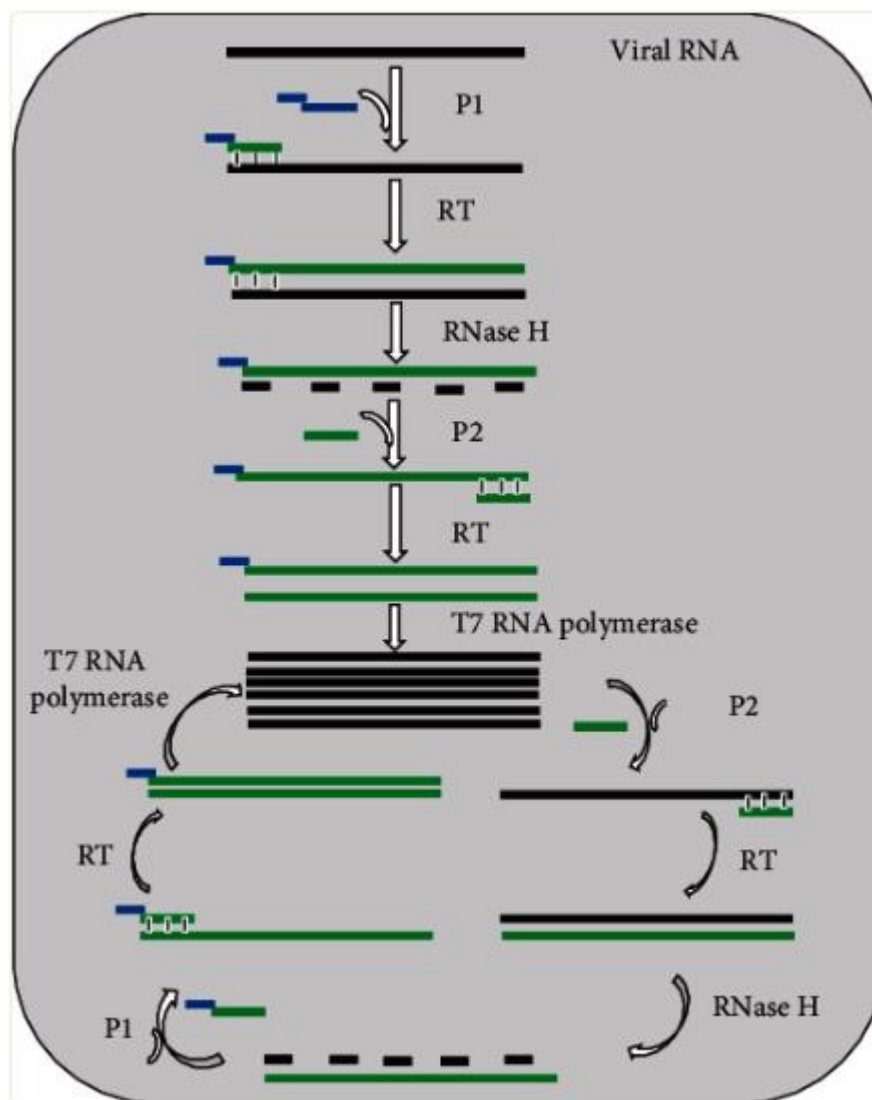


Εικόνα 4.5.1, Αναπαράσταση της τεχνικής. Ξεκινά με την απομόνωση του ιού, στη συνέχεια, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που ενδιαφέρει, έχει διαχωριστεί, στη συνέχεια τρέχει SDS-σελίδα, μετά από αυτό η διαχωρισμένη πρωτεΐνη μεταφέρεται στη μεμβράνη

*PVDF, τότε η ανίχνευση αντισωμάτων έχει γίνει και τα αποτελέσματα έχουν συλλεχθεί με χημειο-απεικόνιση*

Όπως φαίνεται στην Εικόνα, στη διαδικασία NASBA, τρία ένζυμα και δύο εκκινητές συνεργούν για την εκθετική ενίσχυση ενός ιικού RNA-στόχου. Ο εκκινητής 1 (P1) περιέχει στο 5' άκρο του την περιοχή προκινητικής πολυμεράσης RNA T7, ενώ στο 3' άκρο του φέρει μια αλληλουχία συμπληρωματική προς την αλληλουχία του ιικού RNA-στόχου. Ο εκκινητής 2 (P2) περιέχει μια αλληλουχία συμπληρωματική του κλώνου cDNA. Η διαδικασία ενίσχυσης ξεκινά με την παραγωγή cDNA από το ιικό RNA μέσω της RT, χρησιμοποιώντας τον P1. Η RNase H αποικοδομεί το ιικό RNA από τα υβριδικά μόρια RNA-DNA. Στη συνέχεια, η RT συνθέτει μόρια dsDNA χρησιμοποιώντας τον P2 και τον απελευθερωμένο κλώνο DNA. Τέλος, η T7 RNA πολυμεράση χρησιμοποιεί τα μόρια dsDNA ως πρότυπα για τη μεταγραφή πολλών αντιγράφων ιικού RNA. Ο παραπάνω κύκλος επαναλαμβάνεται πολλές φορές, οδηγώντας στη συσσώρευση πολλών αντιγράφων ιικού RNA και dsDNA. Το ενισχυμένο προϊόν μπορεί να ανιχνευθεί είτε μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής στο τέλος της δοκιμής είτε σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση μοριακού φάρου. Οι μέθοδοι ενίσχυσης που βασίζονται στη μεταγραφή προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η μη απαίτηση θερμικού κυκλωτή, γεγονός που καθιστά τις δοκιμές προσιτές για αναπτυσσόμενες χώρες και εργαστήρια με περιορισμένο προϋπολογισμό. Επιπλέον, διαθέτουν γρήγορη κινητική (χρειάζονται λιγότερους κύκλους) και παράγουν ένα μονόκλωνο RNA προϊόν, το οποίο είναι κατάλληλο για ανίχνευση με διάφορες τεχνικές. Αυτές οι μέθοδοι είναι ιδανικές για τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων σε ανθρώπους που προκαλούνται από RNA ιούς. Μπορούν να ενισχύσουν το ιικό γονιδιωματικό RNA, το αγγελιοφόρο RNA ή το ριβοσωμικό RNA. Οι Ayele et al. ανέπτυξαν τη δοκιμασία NASBA, η οποία χρησιμοποιεί μοριακούς φάρους βασισμένους στο γονίδιο gag για να διακρίνει μεταξύ των υποτύπων C (C και C') του HIV-1 που κυκλοφορούν στην Αιθιοπία. Η δοκιμή παρουσίασε υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας για και τους δύο φάρους, με 90.5% ευαισθησία και 100% ειδικότητα για τον φάρο C, καθώς και 100% ευαισθησία και 95.2% ειδικότητα για τον φάρο C', λαμβάνοντας υπόψη την αλληλούχηση ως το χρυσό πρότυπο για τον γονότυπο. Οι Moore et al. χρησιμοποίησαν επίσης NSABA για την ανίχνευση του ιού H5N1 της γρίπης Α σε κλινικά δείγματα, με όριο ανίχνευσης 10 αντιγράφων RNA/μl, επιτυγχάνοντας την ίδια ευαισθησία με την RT-PCR και μέσο χρόνο διεκπεραίωσης 4 ωρών. Η δοκιμασία NASBA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση του ιικού RNA του δάγκειου πυρετού, με όριο ανίχνευσης (LoD) 1 PFU/ml για όλους τους τέσσερις ορότυπους του ιού, χωρίς να παρατηρηθούν διασταυρούμενες αντιδράσεις με το JEV και με χρόνο ανακύκλωσης 3 ωρών [1]. Οι Ender και οι συνεργάτες τους [26]

χρησιμοποίησαν TMA για τον έλεγχο των αιμοδοσιών για RNA HIV-1 και HCV. Η δοκιμασία TMA παρουσίασε LoDs 16,2 IU/ml για τον HIV-1 και 3,5 IU/ml για τον HCV. Μια πολυπλεκτική δοκιμασία NASBA εφαρμόστηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση HIV-1 και HCV σε δείγματα πλάσματος, με LoD 1000 αντίγραφα/ml και χωρίς διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους επιλεγμένους ιούς. Ο Swenson και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν TMA σε πραγματικό χρόνο για την ανίχνευση HSV-1 και HSV-2 σε δείγματα επιχρίσματος βλάβης, με συνολικές ευαισθησίες 98,2% και 99,4% αντίστοιχα, και ειδικότητες 97,8% και 94,5% αντίστοιχα, σε σύγκριση με την καλλιέργεια [1].



Εικόνα 4.5.2, Σχηματική απεικόνιση της αρχής της NASBA. Συντομογραφίες: P1, αστάρι 1; P2, αστάρι 2; RT, αντίστροφη μεταγραφή.

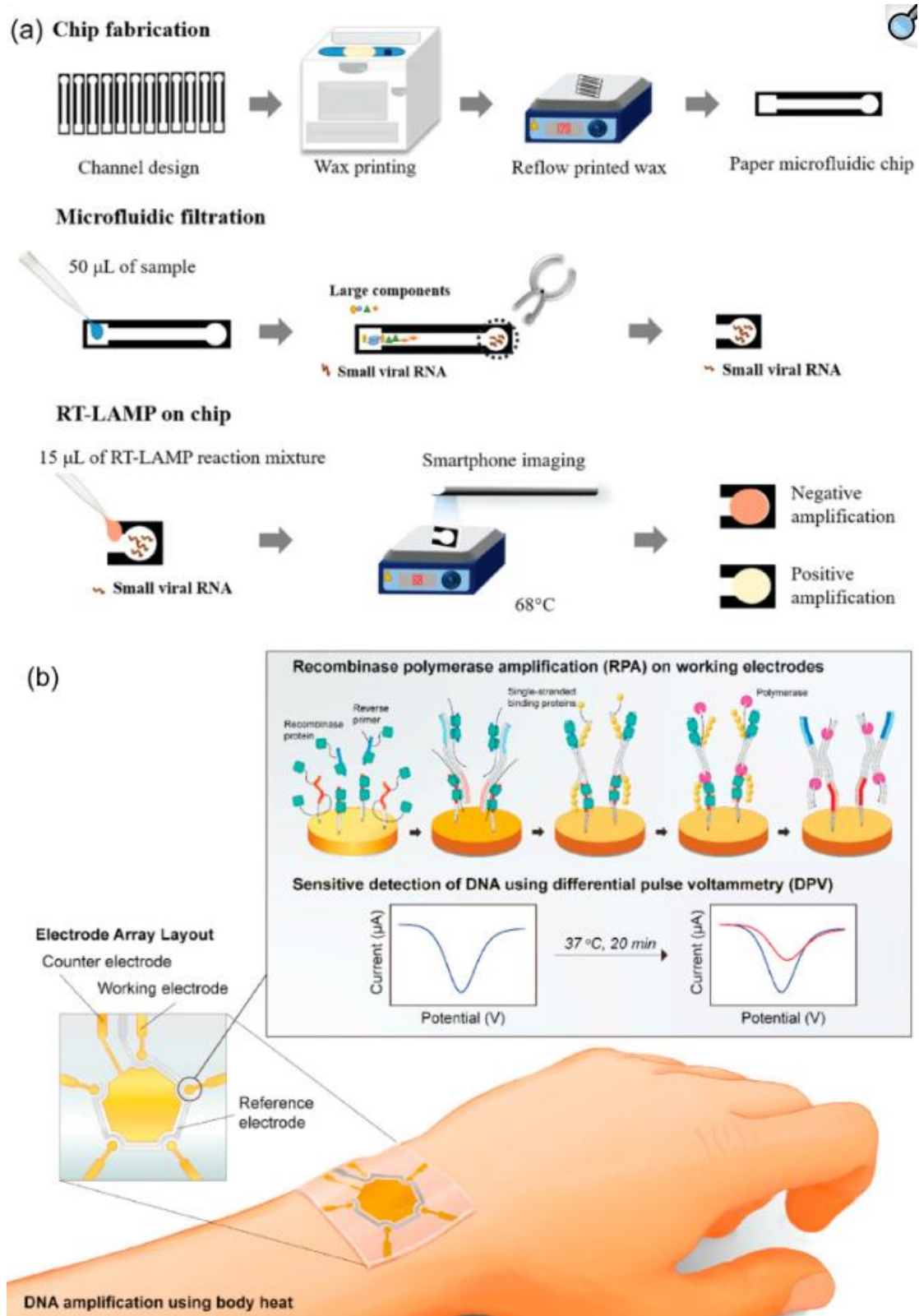
Οι δοκιμασίες με βάση το TMA για την ανίχνευση του HCV και του HIV-1 είναι εμπορικά διαθέσιμες, που αναπτύχθηκαν από την Hologic (San Diego, CA, USA). Η ποιοτική δοκιμασία Aptima HCV RNA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του HCV RNA στο ανθρώπινο πλάσμα ή ορό. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί TMA για να ενισχύσει διατηρημένες περιοχές εντός του 5'-UTR του γονιδιώματος HCV. Η δοκιμασία έχει LoD 7,5 IU/ml με ειδικότητα 99,6%. Τα κιτ με βάση τη NASBA για την ανίχνευση του HIV-1, του CMV, του εντεροϊού και του RSV είναι επίσης διαθέσιμα στο εμπόριο, που αναπτύχθηκαν από την bioMérieux Clinical Diagnostics. Η δοκιμασία NucliSens Easy Q RSV A και B αναπτύχθηκε από την bioMérieux (Marcy l'Etoile, Γαλλία) και χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανίχνευση του RSV σε αναπνευστικά δείγματα διαφόρων τύπων. Η ανάλυση βασίζεται σε πραγματικό χρόνο NASBA και στοχεύει το γονίδιο F του RSV. Οι Moore et al. αξιολόγησαν την απόδοση του εμπορικού κιτ δοκιμών χρησιμοποιώντας 508 αναπνευστικά δείγματα που ελέγχθηκαν με άμεσο ανοσοφθορισμό και καλλιέργεια. Η ανάλυση βρέθηκε να είναι πιο ευαίσθητη από την καλλιέργεια και τη δοκιμασία ανοσοφθορισμού. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της δοκιμασίας προσδιορίστηκαν σε 99% και 87%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη δοκιμασία ανοσοφθορισμού με χρόνο διεκπεραίωσης <4 ώρες.

#### 4.6 Ισοθερμική ενίσχυση

Η ισοθερμική ενίσχυση νουκλεϊκών οξέων είναι μια εναλλακτική μέθοδος στη συμβατική PCR. Λόγω της χρήσης θερμοκυκλωτή, η PCR έχει περιορισμούς στην εφαρμογή της για POCT. Εν τω μεταξύ, η ισοθερμική ενίσχυση απαιτεί μόνο μία σταθερή θερμοκρασία για την αντίδραση. Ως εκ τούτου, εξαλείφει την ανάγκη για περίπλοκο έλεγχο θερμοκρασίας. Πολλές μέθοδοι ισοθερμικής ενίσχυσης έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται εκτενώς στο POCT, συμπεριλαμβανομένης της ενίσχυσης με βάση την αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων (NASBA), της ενίσχυσης πολυμεράσης ανασυνδυασμένης (RPA), της ισοθερμικής ενίσχυσης με μεσολάβηση βρόχου (LAMP), της εξαρτώμενης από ελικάση ενίσχυσης (HDA) και της ενίσχυσης με ανασυνδυασμένη υποβοήθηση (RAA). Επί του παρόντος, η ισοθερμική ενίσχυση έχει προσελκύσει σημαντική προσοχή για την ευρεία εφαρμογή της στον διαγνωστικό τομέα, ειδικά για την ανίχνευση του SARS-CoV-2, χωρίς την ανάγκη εξελιγμένων οργάνων [96]. Η LAMP είναι ένας πολλά υποσχόμενος υποψήφιος για την ανάπτυξη γρήγορων και απλών βιοαισθητήρων με βάση μικρορευστά με βάση τα μοριακά για την ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων [7]. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί μεταξύ δύο και

τριών σετ εκκινήτων για να αναγνωρίσει πολλές περιοχές της ακολουθίας στόχου με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία. Η θερμοκρασία που απαιτείται για την αντίδραση ήταν περίπου 60–65 °C με χρόνο αντίδρασης μικρότερο από 1 ώρα. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων, η LAMP έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με βάση μικρορευστά. Αναπτύχθηκε μια πλατφόρμα POCT για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 με υψηλή ακρίβεια, ειδικότητα και ευαισθησία. Η δοκιμασία LAMP χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 [5].

Η πλατφόρμα, στην οποία τα βήματα μεταφοράς, εξαγωγής και ενίσχυσης δειγμάτων ενσωματώθηκαν σε ένα φυσίγγιο μιας χρήσης, ήταν εξαιρετικά φορητή. Η όλη διαδικασία ανάλυσης δείγματος ελεγχόταν από μια μονάδα με μέγεθος τσέπης και λειτουργούσε από μια μπαταρία. Τα χρωματομετρικά αποτελέσματα ελήφθησαν εντός 35 λεπτών. Μια συσκευή με βάση το χαρτί έχει εισαχθεί για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 στο ανθρώπινο σάλιο. Το RT-LAMP ενσωματώθηκε στη συσκευή για να στοχεύσει τον SARS-CoV-2. Το χρωματομετρικό σήμα που ελήφθη από την αντίδραση επέτρεψε μια φιλική προς το χρήστη απόκριση. Μέσα σε 60 λεπτά, η συσκευή θα μπορούσε να ανιχνεύσει τον ιό στο δείγμα χωρίς προετοιμασία δείγματος, με υψηλή ειδικότητα 100% και υψηλή ευαισθησία 97%. Το LOD για αυτή τη συσκευή ήταν 200 αντίγραφα/μL. Σε μια άλλη μελέτη, ο Wang εισήγαγε ένα διπλό μικροτσίπ (Dmchip) και φορητή συσκευή ανίχνευσης για ταυτόχρονη ανίχνευση του SARS-CoV-2, των ιών της γρίπης A, H1N1, H3N2 και των ιών της γρίπης B χρησιμοποιώντας δοκιμασίες RT-LAMP και Cas12a και το LOD ήταν 10 αντίγραφα/δείγμα.



Εικόνα 4.6.1, α) Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας RT-LAMP μικρορευστών χαρτιού για ταχεία ανίχνευση του ιού Ζίκα. Ανατυπώθηκε με άδεια από [106]. Πνευματικά δικαιώματα (2018) Springer Nature. (β) Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα σε συνδυασμό με ισοθερμική



*ενίσχυση για ανίχνευση COVID-19. Ανατυπώθηκε με άδεια από [102]. Πνευματικά δικαιώματα (2021) Elsevier.*

Το RPA χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένη και πολυμεράση για ενίσχυση. Ο υβριδισμός εκκινητών καταλύεται από ανασυνδυασμένη. Το σύμπλοκο ανασυνδυασμένης-εκκινητής σαρώνει μέσω δίκλωνου DNA και αναζητά ομόλογες αλληλουχίες. Μετά την αναγνώριση της συγγενούς θέσης, το συγκρότημα προωθεί την ανταλλαγή κλώνων. Οι μονόκλωνες πρωτεΐνες δέσμευσης DNA βοηθούν στη σταθεροποίηση της προκύπτουσας δομής DNA. Η DNA πολυμεράση καταλύει την παράταση του DNA. Η θερμοκρασία αντίδρασης ήταν αρκετά χαμηλή - περίπου 37-42 ° C - και τα αποτελέσματα ελήφθησαν σε λιγότερο από 30 λεπτά. Ένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας αναπτύχθηκε για την ταχεία και ακριβή ανίχνευση του SARS-CoV-2. Ο αισθητήρας συνδυάστηκε με RPA σε πλατφόρμα πολλαπλών μικροηλεκτροδίων και στόχευσε πολλαπλά γονίδια SARS-CoV-2. Τα σετ εκκινητών για κάθε γονίδιο ακινητοποιήθηκαν στα ηλεκτρόδια και η παραγωγή αμπλικόνων είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της πυκνότητας ρεύματος. Σήματα από διαφορετικά ηλεκτρόδια καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας βολταμμετρία διαφορικού παλμού. Το γονίδιο RdRP και το γονίδιο N του ιού θα μπορούσαν να ανιχνευθούν σε χαμηλό επίπεδο με όριο ανίχνευσης 0,972 fg/μL και 3,925 fg/μL, αντίστοιχα. Μια φορητή συσκευή χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του DNA του HIV-1. Η μικρορευστολογική συσκευή συνδυάστηκε με το RPA και η θερμότητα του σώματος χρησιμοποιήθηκε ως πηγή θερμότητας για ενίσχυση. Ένα σύστημα ανίχνευσης φθορισμού βασισμένο σε κινητό τηλέφωνο ενσωματώθηκε στη συσκευή για να πραγματοποιήσει μια φορητή, χωρίς ηλεκτρική ενέργεια συσκευή για το POCT μολυσματικών παθογόνων σε περιοχές χαμηλών πόρων. Το LOD της συσκευής ήταν περίπου 102 αντίγραφα/mL μέσα σε 24 λεπτά.

Η ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου (RCA) χρησιμοποίησε μοναδικές πολυμεράσες DNA ή RNA και κυκλικά πρότυπα DNA για την ενίσχυση βραχέος DNA ή RNA. Το προϊόν RCA είχε δομή concatemer. Η δομή περιείχε διαδοχικές επαναλήψεις με ακολουθίες συμπληρωματικές του κυκλικού προτύπου. Ένα μικρορευστολογικό σύστημα που χρησιμοποιεί RCA βασισμένο σε πλέγμα αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Το πιο συναρπαστικό χαρακτηριστικό αυτής της προσέγγισης είναι ότι το σύστημα συνδυάζει RCA, ζελατινοποίηση DNA, απόφραξη με ζελατινοποίηση στους μικροπόρους πλέγματος και υδροστατική μικρορευστομηχανική. Το σύστημα προσέφερε ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση του SARS-CoV-2 με συγκέντρωση DNA 3-30 aM σε 5 έως 15 λεπτά.



#### 4.7 Ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου (LAMP)

Ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας είναι η εφεύρεση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) από τον Kary B. Mullis το 1983, για την οποία του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1993. Ένα πλεονέκτημα της PCR είναι ότι καθιστά δυνατή τη διεξαγωγή γενετικής έρευνας ακόμη και με μικρές ποσότητες του στοχευόμενου βιολογικού υλικού. Η τεχνική μπορεί να πολλαπλασιάσει οποιοδήποτε θραύσμα DNA μέσα σε δύο ή ακόμα και τρεις ώρες. Ως συνέπεια των πολλών πλεονεκτημάτων και περαιτέρω τροποποιήσεων της, η PCR έχει γίνει το θεμελιώδες εργαλείο στην επιστημονική, διαγνωστική και εγκληματολογική εργαστηριακή έρευνα [1,2,3,4,5]. Ορισμένες από τις τροποποιήσεις PCR βελτιώνουν την ευαισθησία (nano-PCR) ή την ειδικότητά του (ένθετη PCR). Άλλα επιτρέπουν την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο της ενίσχυσης του προϊόντος (PCR σε πραγματικό χρόνο), μπορούν να ενισχύσουν πολύ μεγάλα θραύσματα DNA (μακρά PCR) ή πολλαπλά θραύσματα ταυτόχρονα (multiplex PCR). Όλες οι παραλλαγές της PCR εξελίσσονται κυκλικά κατά μήκος σταδίων με αυστηρά καθορισμένες διάρκειες και συνθήκες θερμοκρασίας, που περιλαμβάνουν τη μετουσίωση του DNA, τον υβριδισμό των εκκινητών σε συμπληρωματικές βάσεις DNA και την ειδική επιμήκυνση της αλυσίδας DNA. Αυτή η διαδικασία απαιτεί ειδικό εξοπλισμό (θερμοκυκλωτή) και σημαντικό χρονικό διάστημα, το οποίο απαιτείται όχι μόνο για την ίδια την PCR αλλά και για την εξαγωγή DNA/RNA και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι έχουν ήδη αναπτυχθεί πολυμεράσες που είναι ικανές να συνθέσουν ακόμη και παρουσία αναστολέων, γεγονός που εξαλείφει την ανάγκη εκχύλισης γενετικού υλικού. Για παράδειγμα, η rTth πολυμεράση έχει δείξει την ικανότητα αναγνώρισης γενετικού υλικού παρουσία αναστολέων, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους. Αυτή η ικανότητα είναι υψηλότερη για το RNA από ό, τι για το DNA όταν και τα δύο χρησιμοποιούνται ως βιολογικό υλικό.

##### 4.7.1 Μέθοδος LAMP

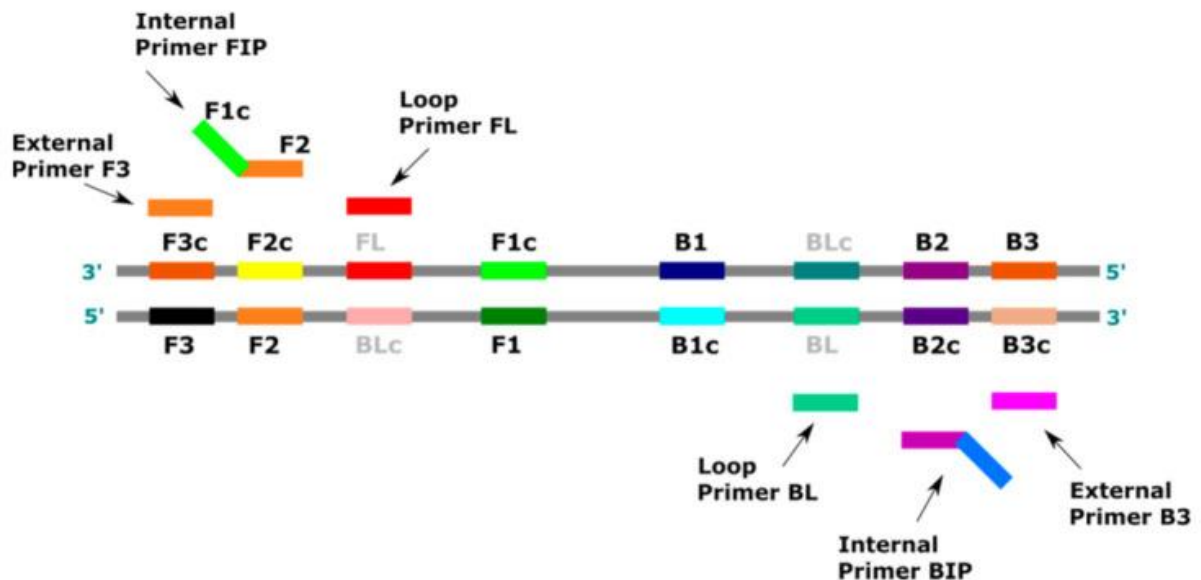
Η μέθοδος LAMP αποτελεί μια ισοθερμική τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την ευαίσθητη, ειδική, γρήγορη και οικονομικά αποδοτική ανίχνευση ιών DNA και RNA σε ανθρώπινα δείγματα. Το 1998, η ιαπωνική

εταιρεία Eiken Chemical Co., Ltd. ανέπτυξε τη μέθοδο αυτή, γνωστή ως ισοθερμική ενίσχυση DNA με τη βοήθεια βρόχου (LAMP), επιλύοντας ορισμένα προβλήματα που σχετίζονται με την PCR [45]. Αυτή η τεχνική είναι εξαιρετικά συγκεκριμένη και μπορεί να αυξήσει την ποσότητα του ενισχυμένου DNA έως και ένα δισεκατομμύριο αντίγραφα σε λιγότερο από μία ώρα, σε αντίθεση με το ένα εκατομμύριο αντίγραφα που παράγονται μέσω της PCR. Η ισοθερμική ενίσχυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την ανάγκη προηγμένου εργαστηριακού εξοπλισμού, όπως θερμοαντήρες ξηρού μπλοκ ή υδατόλουτρα. Μια άλλη καινοτόμος πτυχή της μεθόδου LAMP είναι η υψηλή ειδικότητά της, η οποία προκύπτει από τη χρήση πολλών εκκινητών (από τέσσερις έως έξι). Αυτοί οι εκκινητές έχουν τη δυνατότητα να αναγνωρίζουν έως και οκτώ συγκεκριμένες θέσεις στο πρότυπο DNA, σε αντίθεση με τις μόλις δύο που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή PCR.

Ένα κρίσιμο στοιχείο που επηρεάζει την επιτυχή εξέλιξη της αντίδρασης LAMP είναι το στάδιο σχεδιασμού των εκκινητών. Πολλά ζεύγη εκκινητών πρέπει να βελτιστοποιηθούν λαμβάνοντας υπόψη διάφορους παράγοντες, όπως η συγκέντρωση, η θέση των νουκλεοτιδίων και η απόσταση μεταξύ των περιοχών του DNA. Οι εκκινητές θα πρέπει να διατηρούν μονόκλωνη δομή σε θερμοκρασίες 60–65 °C και να μην σχηματίζουν σταθερές δομές διπλού κλώνου. Η χρήση περισσότερων εκκινητών για την ενίσχυση μπορεί να ενισχύσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους για την ίδια ακολουθία. Ο σχεδιασμός των εκκινητών LAMP μπορεί να γίνει μέσω διαδικτυακών εργαλείων, όπως το PrimerExplorer (<https://primerexplorer.jp/e/> - πρόσβαση στις 24 Ιουλίου 2021), το LAMP Designer Optigene ([www.optigene.co.uk/lamp-designer/](http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/) - πρόσβαση στις 24 Ιουλίου 2021) ή το Premier Biosoft (πρόσβαση στις 24 Ιουλίου 2021). Επιπλέον, η επιλογή των εκκινητών απαιτεί προηγούμενη ανάλυση της παραλλαγής πολλών γονιδιωματικών αλληλουχιών στα στοχευόμενα είδη, ανάλογα με τον στόχο της μεθόδου LAMP. Σε περίπτωση που αυτές οι πληροφορίες δεν είναι διαθέσιμες, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί αλληλούχιση για τον προσδιορισμό της παραλλαγής ενός συγκεκριμένου γονιδίου στο είδος, κάτι που αυξάνει σημαντικά τον χρόνο και την προσπάθεια που απαιτούνται για μια τυπική εφαρμογή LAMP.

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο LAMP περιλαμβάνουν τους εσωτερικούς εκκινητές, δηλαδή τον εσωτερικό αστάρι προς τα εμπρός (FIP) και τον εσωτερικό αστάρι προς τα πίσω (BIP), καθώς και τους εξωτερικούς εκκινητές, που είναι ο εμπρόσθιος αστάρι (F3) και ο αστάρι προς τα πίσω (B3). Επιπλέον, υπάρχουν προαιρετικά αστάρια βρόχου, όπως το αστάρι βρόχου προς τα εμπρός (FL) και το αστάρι βρόχου προς τα πίσω (BL) (βλ. Σχήμα 4.7.1). Οι εσωτερικοί εκκινητές είναι μεγαλύτεροι (45-49 bp) και συμπληρώνουν δύο απομακρυσμένες θέσεις στο πρότυπο (στο σκέλος αίσθησης και στο σκέλος αντινοήματος). Αντίθετα, οι εξωτερικοί εκκινητές είναι μικρότεροι (21-24 bp) και χρησιμοποιούνται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο μείγμα αντίδρασης, συνδεδεμένοι με το πρότυπο πιο αργά από τους εσωτερικούς εκκινητές. Οι εσωτερικοί και εξωτερικοί εκκινητές, τόσο προς τα

εμπρός όσο και προς τα πίσω, σε συνδυασμό με την πολυμεράση DNA Bst, η οποία έχει υψηλή δραστηριότητα μετατόπισης κλώνων στους 60-65 °C, σχηματίζουν μια δομή DNA που μοιάζει με αλτήρα.



Εικόνα 4.7.1, Εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση LAMP. FIP (πρόσθιος εσωτερικός εκκινητής) περιέχει μια περιοχή F2 συμπληρωματική της F2c της μήτρας και μια ελεύθερη περιοχή F1c συμπληρωματική της F1 στο νεοσχηματισμένο σκέλος. Ο ΣΣΕ (εσωτερικός εκκινητής προς τα πίσω) περιέχει μια περιοχή B2 συμπληρωματική της B2c του υποδείγματος και μια ελεύθερη περιοχή B1c συμπληρωματική της B1 στο νεοσυσταθέν σκέλος. F3 (εμπρός εξωτερικός εκκινητής) περιέχει μια περιοχή F3c συμπληρωματική της F3c του υποδείγματος. B3 (εξωτερικός εκκινητής προς τα πίσω) περιέχει την περιοχή B3 συμπληρωματική της B3c του υποδείγματος. Το FL (εκκινητής εμπρόσθιου βρόχου) είναι συμπληρωματικό του μονόκλωνου βρόχου μεταξύ των περιοχών F2 και F1. Το BL (αστάρι οπίσθιου βρόχου) είναι συμπληρωματικό του μονόκλωνου βρόχου μεταξύ των περιοχών B2 και B1. (Βάσει <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html> (πρόσβαση την 1η Ιουνίου 2021)).

Η μέθοδος αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Notomi et al. και γρήγορα κέρδισε δημοτικότητα στη διαγνωστική ιολογία. Η μέθοδος χρησιμοποιεί τέσσερις έως έξι μοναδικούς εκκινητές και DNA πολυμεράση με δραστηριότητα μετατόπισης κλώνων για την ενίσχυση του DNA-στόχου. Η προσθήκη RT στην αντίδραση LAMP (RT-LAMP) επιτρέπει την ενίσχυση του στόχου RNA. Τα σετ εκκινητών για το LAMP που αναφέρθηκαν αρχικά από τους Notomi et al. [8] περιλαμβάνουν το εμπρόσθιο εσωτερικό αστάρι (FIP), το οπίσθιο εσωτερικό αστάρι (BIP), το εμπρόσθιο εξωτερικό αστάρι (F3) και το οπίσθιο εξωτερικό αστάρι (B3). Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να αναγνωρίζουν έξι ακριβείς περιοχές από μια στοχευμένη αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων. Οι Nagamine et al. πρόσθεσαν αργότερα δύο εκκινητές βρόχου, συγκεκριμένα, το αστάρι εμπρόσθιου βρόχου (LF) και το αστάρι οπίσθιου βρόχου

(LB), για να επιταχύνουν τη δοκιμασία LAMP. Λόγω της χρήσης τεσσάρων έως έξι ειδικών εκκινητών, η δοκιμασία LAMP έχει εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση νουκλεϊνικών οξέων-στόχων [7, 8]. Μια λεπτομερής περιγραφή του μηχανισμού αντίδρασης LAMP είναι διαθέσιμη σε ανασκοπήσεις από τους Becherer et al. [8], Tomita et al., and Silva et al., οι οποίοι χρησιμοποιούν εικόνες για να εξηγήσουν τον μηχανισμό. Η αντίδραση LAMP πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία μεταξύ 60-65°C, ανακουφίζοντας την ανάγκη για ακριβό εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η μέθοδος απαιτεί μόνο φθινό μπλοκ θέρμανσης ή λουτρό νερού, καθιστώντας το πολύ χρήσιμο κάτω από κακές εργαστηριακές ρυθμίσεις. Η αντίδραση LAMP διαρκεί χρόνο ανακύκλωσης <1 ώρας και το ενισχυμένο προϊόν μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της μέτρησης σε πραγματικό χρόνο της θολρότητας που προκαλείται από κατακρημνισμένο πυροφωσφορικό μαγνήσιο χρησιμοποιώντας θολόμετρο, οπτική ανίχνευση της καθίζησης πυροφωσφορικού μαγνησίου μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ανίχνευση φθορισμού υπό υπεριώδες φως ή φυσικό φως με την προσθήκη παρεμβαλλόμενης φθορίζουσας βαφής στο τελικό μείγμα αντίδρασης, και οπτικοποίηση των ζωνών με διάφορα μεγέθη χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης.

Η δοκιμασία LAMP έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ταχεία ανίχνευση ενός αριθμού ιών DNA σε ανθρώπινα δείγματα, όπως HSV-1 με LoD 10 αντιγράφων HSV-1 DNA/μl και χωρίς διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους επιλεγμένους ιούς, hAdV40 και hAdV41 με LoD μεταξύ 50 και 100 αντιγράφων DNA/αντίδρασης, χωρίς διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους επιλεγμένους ιούς, και χρόνος διεκπεραίωσης 60 λεπτών, EBV με ευαισθησία 86,4%, ειδικότητα 100%, σε σύγκριση με ορολογική δοκιμασία και μόνο 45 λεπτά ενίσχυσης των αλληλουχιών-στόχων, και CMV με LoD 10 αντιγράφων DNA/μl, χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με άλλους ιούς και χρόνος ανακύκλωσης 1 ώρα μετά την εκχύλιση RNA[9].

Η χρησιμότητα του LAMP επεκτείνεται με τη συγχώνυσή του με αντίστροφη μεταγραφή (RT) σε RT-LAMP για να επιτρέψει την ταχεία ανίχνευση ιών RNA σε κλινικά δείγματα. Πρόσφατα, για παράδειγμα, οι Huang et al. ανέπτυξαν μια ταχεία δοκιμασία RT-LAMP για τη διάγνωση του SARS-CoV-2 με LoD 80 αντιγράφων ιικού RNA/ml σε δείγμα εντός αντίδρασης 30 λεπτών. Αυτή η ανάλυση επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας 16 κλινικά δείγματα (8 θετικά και 8 αρνητικά) που ελέγχθηκαν επίσης με RT-qPCR. Τα αποτελέσματα των δοκιμών της ανάλυσης ήταν σύμφωνα με τη μέθοδο RT-qPCR, υποδηλώνοντας ότι η δοκιμασία RT-LAMP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταχεία, απλή, οικονομικά αποδοτική και ευαίσθητη ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε αναπνευστικά δείγματα. Ομοίως, οι Lu et al. ανέπτυξαν τη μέθοδο RT-LAMP για ταχεία ανίχνευση του SARS-CoV-2 με LoD 30 αντιγράφων RNA/αντίδραση και χρόνο ανακύκλωσης 40 λεπτών. Περαιτέρω, οι Baek et al. ανέπτυξαν μια ταχεία δοκιμασία RT-LAMP για την έγκαιρη ανίχνευση του SARS-CoV-2. Η δοκιμασία έχει LoD 100 αντιγράφων/αντίδρασης RNA, το οποίο είναι κοντά σε

αυτό της RT-qPCR με εύρος ταχείας ανίχνευσης 30 λεπτών. Η δοκιμασία RT-LAMP έχει επίσης αναπτυχθεί για την ανίχνευση του κοροναϊού του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής (MERS-CoV) με LoD 3,4 αντιγράφων MERS-CoV RNA/αντίδρασης μαζί με την ίδια ευαισθησία με τον MERS-CoV RT-qPCR, χωρίς διασταυρούμενη αντίδραση σε άλλους αναπνευστικούς ιούς και αποτελέσματα διαθέσιμα σε <1 ώρα. Οι Kurosaki et al. ανίχνευσαν οξεία λοίμωξη από τον ιό Έμπολα με RT-LAMP σε συνδυασμό με μια φορητή συσκευή. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της δοκιμασίας ήταν 100% η καθεμία, σε σύγκριση με την RT-qPCR και τον χρόνο ανακύκλωσης 35 λεπτών. Σε μία μελέτη, το RT-LAMP ήταν πιο ευαίσθητο από τα συμβατικά RT-PCR και NASBA. Η δοκιμασία έχει επίσης αναπτυχθεί για την ταχεία ανίχνευση του ιού του δάγκειου πυρετού, του ιού της γρίπης A (H1N1) pdm09, του ιού H5N1 της γρίπης των πτηνών, του HCV, του HIV-1, του RSV και του ZIKV σε κλινικά δείγματα. Διατίθενται εμπορικά κιτ δοκιμών με βάση το RT-LAMP για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε αναπνευστικά δείγματα. Η ανάλυση αναπτύχθηκε από την Color Genomics (ΗΠΑ) και χρησιμοποιεί τρία ειδικά σύνολα εκκινητών SARS-CoV-2 που στοχεύουν το γονίδιο N, το γονίδιο E και την περιοχή ORF1a, αντίστοιχα, και ένα τέταρτο σετ εκκινητών ελέγχου που στοχεύει την ανθρώπινη ριβονουκλεάση P (RNaseP). Έχει LoD 0,75 αντιγράφων ιικού RNA/μl με αντίδραση 70 λεπτών. Η δοκιμασία έλαβε EUA από το FDA των ΗΠΑ σε αναπνευστικά δείγματα. Η Abbott Diagnostic Scarborough, Inc. (ΗΠΑ) έχει επίσης αναπτύξει δοκιμή βασισμένη σε RT-LAMP (ID NOW™ COVID-19 assay) για άμεση ανίχνευση του SARS-CoV-2 σε ρινικά, ρινοφαρυγγικά ή επιχρίσματα λαιμού. Το κιτ έχει λάβει EUA από το FDA των ΗΠΑ. Η ανάλυση στοχεύει το γονίδιο RdRp του SARS-CoV-2. Το LoD της δοκιμής είναι 125 ισοδύναμα γονιδιώματος (GE)/ml με θετικά αποτελέσματα σε <5 λεπτά και αρνητικά αποτελέσματα σε 13 λεπτά. Τα σετ εκκινητών LAMP, όπως το σετ εκκινητών Loopamp για τη γρίπη των πτηνών H5 και H7 και τη γρίπη της γρίπης, διατίθενται στο εμπόριο από την Eiken Chemical Co., Ltd. (Ιαπωνία).

Αυτή η δομή λειτουργεί ως πρότυπο για επιπλέον ενίσχυση. Η προσθήκη εκκινητών βρόχου, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στο DNA και έχουν δομή παρόμοια με αλτήρα, αυξάνει τον αριθμό των «σημείων εκκίνησης» κατά τη διάρκεια της αντίδρασης LAMP, φτάνοντας συνολικά έως και οκτώ ενισχυμένες αλληλουχίες DNA. Έτσι, οι εκκινητές βρόχου βελτιώνουν σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία της αντίδρασης, μειώνοντας παράλληλα τον απαιτούμενο χρόνο κατά 50%. Επιπλέον, οι εκκινητές βρόχου ενεργοποιούνται μόνο μία φορά, όταν έχει παραχθεί το τεχνητό πρότυπο, γεγονός που ενισχύει σημαντικά την επιλεκτικότητα της αντίδρασης.

Η τεχνική LAMP δεν περιλαμβάνει το στάδιο της μετουσίωσης του DNA, καθώς η δραστηριότητα μετατόπισης κλώνων της πολυμεράσης Bst DNA επιτρέπει την εκτέλεση της αντίδρασης υπό ισοθερμικές συνθήκες [8,11]. Όλα τα στάδια της LAMP πραγματοποιούνται σε σταθερή θερμοκρασία 60-65 °C, γεγονός που εξαλείφει την ανάγκη για θερμοκυκλωτή, η οποία είναι απαραίτητη για την ακριβή ρύθμιση του θερμικού και χρονικού προφίλ στην παραδοσιακή τεχνική PCR. Η διαδικασία LAMP



μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: την παραγωγή της πρώτης ύλης για την αντίδραση, την κυκλική ενίσχυση και την επιμήκυνση σε συνδυασμό με την ανακύκλωση (λεπτομερή σχήματα και κινούμενα σχέδια αρχών είναι διαθέσιμα στο <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/> (πρόσβαση στις 26 Ιουλίου 2021)). Το πιο κρίσιμο βήμα στο πρώτο στάδιο είναι η παραγωγή ενός τεχνητού προτύπου DNA με δομή που μοιάζει με αλτήρα (Εικόνα 4.7.2).



Εικόνα 4.7.2, Σχηματική απεικόνιση μιας μονόκλωνης δομής που μοιάζει με αλτήρα DNA, ένα τεχνητό πρότυπο για περαιτέρω ενίσχυση της αντίδρασης χρησιμοποιώντας την τεχνική LAMP. (Βάσει <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html> (πρόσβαση την 1η Ιουνίου 2021)).

Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν μια εκθετική ενίσχυση του προτύπου αυτόματης πλήρωσης και την αντικατάσταση των κλώνων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μείγματος διπλού κλώνου DNA. Η τελική παραγωγή του LAMP έχει μορφή που θυμίζει κουνουπίδι. Με την πάροδο του χρόνου, έχουν προστεθεί διάφορες παραλλαγές του LAMP, όπως η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP), η ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση πολλαπλού βρόχου (M-LAMP) και η παρακολούθηση του προϊόντος σε πραγματικό χρόνο μέσω τροποποιήσεων του αρχικού πρωτοκόλλου, που επιτρέπουν την ανάλυση RNA και την ανίχνευση πολυπλεξίας. Όπως συμβαίνει και με την παραλλαγή RT-PCR, η μέθοδος RT-LAMP αξιοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση σε συνδυασμό με DNA πολυμεράση για την ανίχνευση RNA αλληλουχιών ή πολυμερασών που διαθέτουν δραστηριότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, όπως οι Bst 3.0 ή OmniAmp [40]. Αυτή η διαδικασία έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική στη διάγνωση διαφόρων ιών RNA. Επιπλέον, η μέθοδος M-LAMP έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει πολλαπλά παθογόνα σε μία μόνο αντίδραση ή δοκιμαστικό σωλήνα, εφόσον χρησιμοποιηθούν περισσότερα εκκινητές ή εκκινητές με μοναδικά σήματα φθορισμού.

#### 4.7.2 Ανίχνευση προϊόντων LAMP

Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου LAMP είναι η ικανότητά της να ανιχνεύει γρήγορα προϊόντα μέσω διαφόρων τεχνικών. Κάθε ενίσχυση DNA που γίνεται με PCR (εκτός από την PCR σε πραγματικό χρόνο) ολοκληρώνεται με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων. Ωστόσο, η προετοιμασία της γέλης (είτε αгарόζης είτε πολυακρυλαμίδιο) και η διαδικασία ηλεκτροφόρησης απαιτούν αρκετό χρόνο, ενώ η απεικόνιση των προϊόντων συχνά προϋποθέτει τη χρήση βαφών, πολλές από τις οποίες είναι μεταλλαξιογόνες ή καρκινογόνες. Αντίθετα, τα προϊόντα της LAMP μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα, ακόμη και με γυμνό μάτι, αμέσως μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ή ακόμα και κατά τη διάρκεια αυτής, χωρίς να απαιτούνται επιπλέον διαδικασίες.

Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την ανίχνευση θετικών αντιδράσεων LAMP, όπως η χρωματομετρική ανίχνευση με τη χρήση φθορισουσών βαφών, η ακτινοβολία υπεριώδους φωτός, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, η μέτρηση θολότητας, ο φθορισμός σε πραγματικό χρόνο, η χρήση smartphone, η δοκιμή πλευρικής ροής (LFA) και η ευαισθησία AC. Οι πιο διαδεδομένες φθορίζουσες βαφές για την ανίχνευση αμπλικόνων LAMP είναι η καλσεΐνη, οι πράσινες βαφές SYBR και το EvaGreen. Άλλες βαφές που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό περιλαμβάνουν τη βαφή μαλαχίτη, τη μπλε χρωστική υδροξυναφθόλη, τη βαφή Goldview, τη βαφή GelRed, τη φθορίζουσα βαφή SYTO, τη βαφή λευκοκρυσταλλικού ιώδους (LCV) και τη βαφή berberine. Όλες οι φθορίζουσες βαφές εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος μετά τη σύνδεση με DNA διπλού κλώνου, εκτός από την καλσεΐνη, η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με μαγνήσιο που προκύπτει από την αντίδραση LAMP. Τα αποτελέσματα γίνονται ορατά υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι, καθώς αλλάζουν χρώμα, όπως για παράδειγμα από πορτοκαλί σε πράσινο στην περίπτωση του ασβεστίου. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να συνδυαστούν με ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ποσοτική αξιολόγηση του προϊόντος. Ωστόσο, η παρακολούθηση του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο απαιτεί ακριβό εξοπλισμό και κατάλληλη επίβλεψη, γεγονός που δεν συμβαδίζει με τις ανάγκες για γρήγορες και οικονομικές δοκιμές.

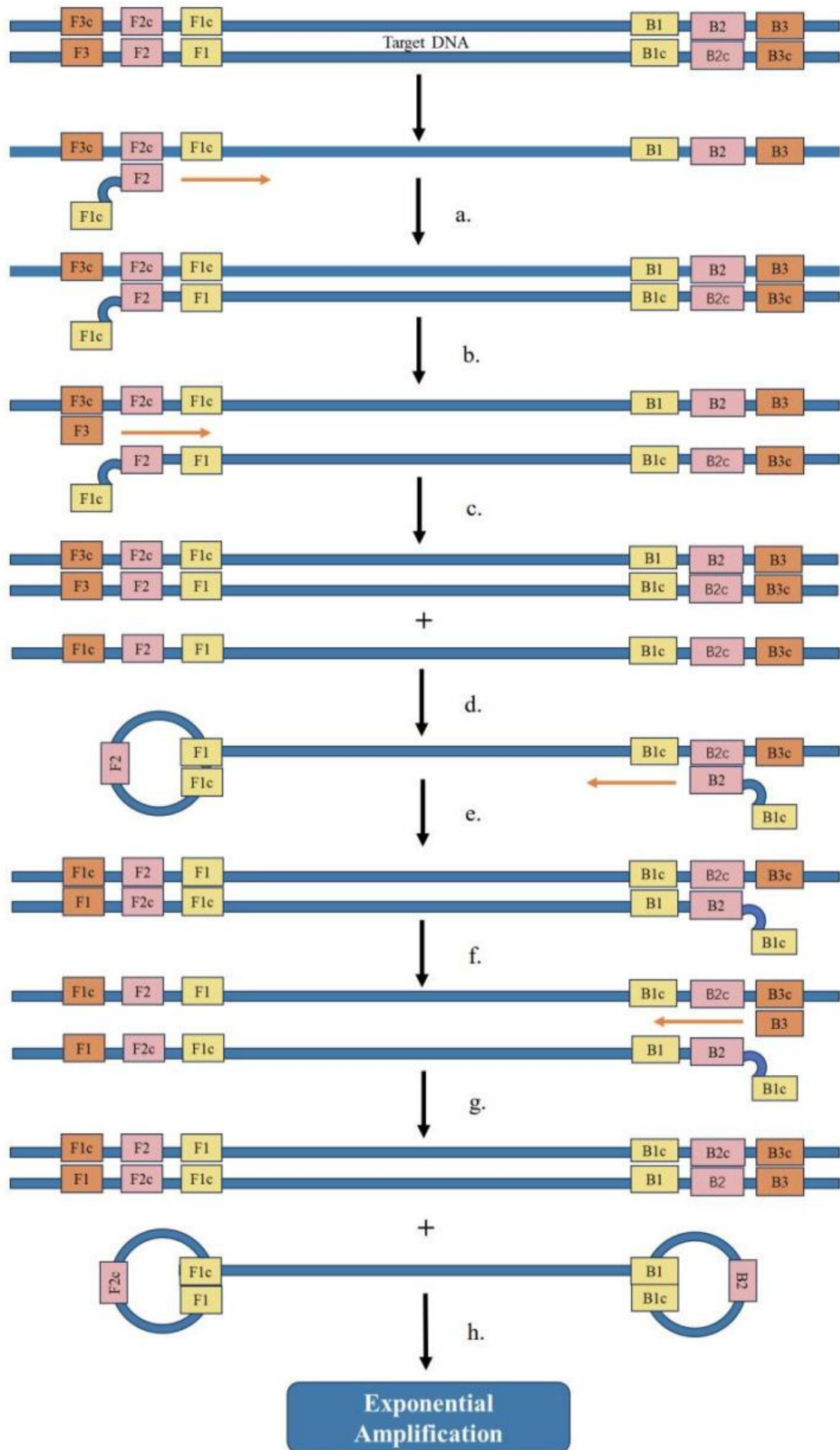
Μια πολύ γρήγορη μέθοδος που δεν απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό είναι η θολομετρική ανάλυση. Το παραπροϊόν της μεθόδου LAMP, το πυροφωσφορικό μαγνήσιο ( $Mg_2P_2O_7$ ), επιτρέπει την εκτίμηση των αποτελεσμάτων με βάση την αδιαφάνεια του διαλύματος αντίδρασης ή την παρουσία ιζήματος. Μια έντονη αδιαφάνεια υποδηλώνει την ύπαρξη του προϊόντος, ενώ αν το διάλυμα είναι διαυγές, το προϊόν δεν υπάρχει. Το ίζημα σχηματίζεται καθώς προστίθενται τα επόμενα νουκλεοτίδια στην επιμήκη αλυσίδα του DNA. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το πυροφωσφορικό μαγνήσιο αντιδρά με τα ιόντα μαγνησίου που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα, οδηγώντας στη δημιουργία του ιζήματος. Ο



δοκιμαστικός σωλήνας καθίσταται σαφώς αδιαφανής όταν η συγκέντρωση του πυροφωσφορικού μαγνησίου ξεπερνά τα 0,5 mM. Μια τέτοια ανάλυση δεν είναι εφικτή με τη μέθοδο PCR, καθώς η συγκέντρωση του πυροφωσφορικού μαγνησίου είναι μόλις περίπου 0,02 mM. Επιπλέον, η θερμοκρασία της PCR, και συγκεκριμένα η μετουσίωση που συμβαίνει γύρω στους 95 °C, οδηγεί στην υδρόλυση των πυροφωσφορικών ιόντων σε φωσφορικά ιόντα. Η αδιαφάνεια του διαλύματος επιτρέπει την ποιοτική αξιολόγηση του παραγόμενου προϊόντος. Για ποσοτική αξιολόγηση, η μέθοδος LAMP μπορεί να συνδυαστεί με ανάλυση σε πραγματικό χρόνο. Στη συνέχεια, η απόδοση του πυροφωσφορικού μαγνησίου συγκρίνεται με την απόδοση του DNA.

Μια εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης θετικής αντίδρασης LAMP είναι η ευαισθησία AC, η οποία αποτελεί ένα εξαιρετικά αναλυτικό σύστημα ικανό να ανιχνεύσει 1 αττομοριακό (aM:  $10^{-18}$  moles ανά λίτρο) συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια των εξεταζόμενων παθογόνων σε διάστημα 27 λεπτών. Τα αποτελέσματα της LAMP αξιολογούνται μέσω ενός φορητού αναστολέα AC, όπου οι μεταβολές του υδροδυναμικού όγκου εκτιμώνται με τη βοήθεια μαγνητικών νανοσωματιδίων στρεπταβιδίνης (streptavidin-MNPs) που έχουν αναμειχθεί με τα αντιδραστήρια LAMP. Επιπλέον, η μέθοδος LFA προτιμάται λόγω της φιλικότητάς της προς τον χρήστη, της πρακτικότητάς της για εφαρμογές στο πεδίο, καθώς και της ελαφριάς, φορητής και οικονομικής της φύσης. Οι δοκιμές πλευρικής ροής σε συνδυασμό με την αντίδραση LAMP/RT-LAMP απαιτούν συνολικά 35-40 λεπτά για τη μοριακή ανίχνευση παθογόνων.

Ένα θετικό αποτέλεσμα της αντίδρασης LAMP μπορεί να επιβεβαιωθεί και μέσω παραδοσιακής ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης. Σε αντίθεση με την εικόνα που προκύπτει από την PCR, το αποτέλεσμα της αντίδρασης LAMP εμφανίζεται ως ζώνες διαφόρων μηκών. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στα διαφορετικά μήκη και τις δομές των παραγόμενων προϊόντων DNA. Παρ' όλα αυτά, η οπτικοποίηση των αμπλικόν LAMP μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής είναι χρονοβόρα και ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων, λόγω των μεγάλων ποσοτήτων DNA που παράγονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας LAMP.



Εικόνα 4.7.3, Η αρχή του LAMP: α) η ακολουθία F2 του εκκινητή συνδυάζεται με την περιοχή F2c του προτύπου για τη σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων με το πρότυπο· β) η αλληλουχία F3 του εκκινητή συνδυάζεται με την περιοχή F3c του υποδείγματος για την επέκταση και την έναρξη της υποκατάστασης της αλυσίδας· γ) δημιουργία νέων διπλών αλυσίδων και αντικατάσταση μονών αλυσίδων· δ) η αντικατασταθείσα περιοχή F1 μονής αλυσίδας συμπληρώνει την περιοχή F1c για να σχηματίσει κυκλική δομή, η αντικατασταθείσα μονόκλωνη περιοχή F1c συμπληρώνει την περιοχή F1c για να σχηματίσει κυκλική δομή και η ακολουθία εκκινητή B2 συμπληρώνει και επεκτείνει τη μονόκλωνη περιοχή B2c· ε) σχηματισμός νέας διπλής αλυσίδας· στ) η ακολουθία εκκινητή B3 συμπληρώνει, επεκτείνει και δρομολογεί την υποκατάσταση της αλυσίδας με την περιοχή B3c της αλυσίδας προτύπων· ζ) σχηματισμός νέων διπλών αλυσίδων και αντικατασταθεισών μονών αλυσίδων, με συμπληρωματικές αλληλουχίες F1 και αλληλουχίες F1c και στα δύο άκρα της αντικατασταθείσας μονής αλυσίδας, και συμπληρωματικές αλληλουχίες B1 και ακολουθίες B1c, που σχηματίζουν κυκλική δομή· η) εκθετική ενίσχυση. Το πορτοκαλί και το μαύρο βέλος υποδεικνύουν την κατεύθυνση της ενίσχυσης και τη διαδικασία ενίσχυσης, αντίστοιχα.

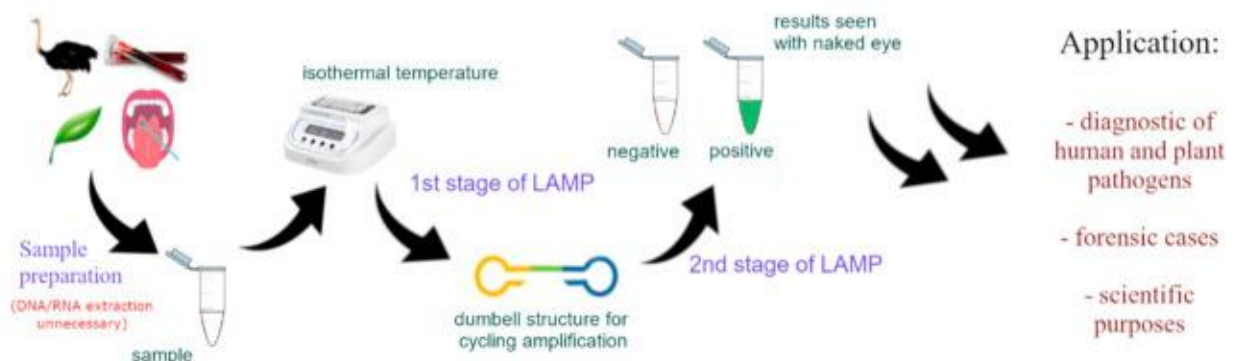
Η αρχή ενίσχυσης του LAMP όπως φαίνεται στο σχήμα, όπου το πορτοκαλί και το μαύρο βέλος δείχνουν την κατεύθυνση της ενίσχυσης και τη διαδικασία ενίσχυσης, αντίστοιχα. Οι Imai et al. χρησιμοποίησαν ισοθερμική ενίσχυση με μεσολάβηση βρόχου αντίστροφης μεταγραφής (RT-LAMP), μια χαρακτηριστική τεχνική δοκιμής νουκλεϊκών οξέων. Σχεδίασαν δύο εσωτερικά αστάρια και δύο εξωτερικά αστάρια και καθιέρωσαν ένα σύνολο γρήγορων και ευαίσθητων δοκιμών. Σε σύγκριση με τη συνηθισμένη RT-PCR, τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του H5N1 AIV, η ευαισθησία αυτού του συστήματος είναι 100 φορές υψηλότερη. Οι Jayawardena et al. καθιέρωσαν μια μέθοδο RT-LAMP για την ανίχνευση του H5 AIV από ικές καλλιέργειες χωρίς εκχύλιση RNA. Ωστόσο, το όριο ήταν περίπου 1000 φορές χαμηλότερο από αυτό για την ανίχνευση καθαρού RNA. Οι Dinh et al. ανέπτυξαν ένα βελτιωμένο RT-LAMP για την ανίχνευση του H5N1 AIV και σχεδίασαν ένα σύνολο εκκινητών με υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία από ό, τι αναφέρθηκε προηγουμένως. Οι Jung et al. καθιέρωσαν μια μέθοδο που συνδυάζει πολλαπλά RT-LAMP με ανοσοχρωματογραφικές ταινίες μέτρησης και σχεδίασαν δύο εξωτερικούς εκκινητές και δύο εσωτερικούς εκκινητές που στοχεύουν το γονίδιο HA [18].

Δύο εκκινητές βρόχου και πέντε εκκινητές σχεδιάστηκαν σύμφωνα με το γονίδιο M, το οποίο μπορεί να ανιχνεύσει όχι μόνο H5N1 AIV αλλά και H1, H3, H5 και άλλους υποτύπους ταυτόχρονα. Έτσι, είναι κατάλληλο για την έγκαιρη ανίχνευση του AIV επί τόπου. Οι Tang et al. [78] καθιέρωσαν μια δοκιμασία RT-LAMP (Immuno-RT-LAMP) βασισμένη σε ανοσοδοκιμασία για την ταχεία ανίχνευση του H5N1 AIV σε δείγματα ολικού αίματος. Ο H5N1 AIV συλλέχθηκε ειδικά από δείγματα αίματος και, μετά από θερμική λύση, ενισχύθηκαν εκθετικά σε όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο ή σε σύστημα υδατόλουτρου για ποσοτική ανάλυση. Οι Zhang et al. σχεδίασαν εκκινητές βασισμένους στο γονίδιο M, το γονίδιο H5 και το γονίδιο H9 του AIV και καθιέρωσαν την τεχνολογία RT-LAMP, η οποία μπορεί να αποκλείσει τον AIV και να διακρίνει τους

υποτύπους H5 και H9. το όριο ανίχνευσης είναι 10 φορές μεγαλύτερο από αυτό της RT-PCR και ο χρόνος ανίχνευσης είναι μικρότερος από 30 λεπτά. Η ανίχνευση RT-LAMP είναι ένα πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ασθενειών, δεν απαιτεί πολύπλοκο, ακριβό εξοπλισμό ή εκπαιδευμένο προσωπικό και είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για επιτόπια ανίχνευση. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος ανίχνευσης έχει μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη στόχευση. Είναι πιο δύσκολο να σχεδιαστούν συγκεκριμένοι εκκινητές για την ακολουθία στόχου.

#### 4.7.3 Εφαρμογή LAMP

Η τεχνική LAMP επιταχύνει σημαντικά τη διαδικασία ανάλυσης, γεγονός που την καθιστά ελκυστική για τα διαγνωστικά εργαστήρια. Η εφαρμογή της LAMP στη διάγνωση μεταδοτικών ασθενειών επεκτείνεται συνεχώς, τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα οικόσιτα ζώα. Χάρη στην υψηλή της ευαισθησία, η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μικροοργανισμούς ακόμη και από πολύ μικρά δείγματα (10-15 g) [43]. Η ευρεία χρήση της LAMP στα εργαστήρια διευκολύνεται από την ύπαρξη εκκινητών στην αγορά, οι οποίοι έχουν δοκιμαστεί για την ανίχνευση ιών, βακτηρίων, μυκήτων και παρασίτων που προκαλούν ασθένειες στους ανθρώπους (όπως COVID-19, SARS, ηπατίτιδα B, φυματίωση και αμοιβάδα), στα ζώα (όπως η γρίπη H5N1 και ο αφθώδης πυρετός) και στα χρήσιμα και διακοσμητικά φυτά (Εικόνα 4.7.4).



4.7.4, Διάγραμμα διεργασίας της μεθόδου LAMP από τη δειγματοληψία έως το στάδιο απεικόνισης των αποτελεσμάτων.

#### 4.8 Μικροσυστοιχίες DNA

Οι τεχνολογίες μικροσυστοιχιών DNA έχουν την ικανότητα να εντοπίζουν ιατρικούς ιούς [10]. Στη διάγνωση μικροσυστοιχιών DNA, φθορίζοντα επισημασμένα ιικά νουκλεϊκά οξέα σε ένα δείγμα δοκιμής χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο μιας σειράς ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων ακινητοποιημένων σε μια στερεή επιφάνεια (π.χ. γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα). Οι ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται εδώ είναι ειδικοί για το γονιδίωμα του ιού-στόχου. Τα αποτελέσματα του υβριδισμού μεταξύ ακινητοποιημένων ανιχνευτών και αλληλουχιών στόχων που επισημαίνονται με φθορίζουσες βαφές ανιχνεύονται και ποσοτικοποιούνται με ανίχνευση με βάση τον φθορισμό [16].

Υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία που αποδεικνύει τη χρησιμότητα της μικροσυστοιχίας DNA για την ανίχνευση ιατρικών ιών σε ανθρώπινα δείγματα. Οι Chiu et al. χρησιμοποίησαν μικροσυστοιχίες DNA για ανίχνευση πολλαπλών ιών υψηλής απόδοσης σε δείγματα ρινοφαρυγγικής αναρρόφησης που προέρχονταν από παιδιά μολυσμένα με αναπνευστικούς ιούς. Η δοκιμασία έδειξε συνολική ευαισθησία 87% έως 90% και ειδικότητα  $\geq 99\%$  στην ανίχνευση RSV, ιού γρίπης A και ρινοϊού/εντεροϊού σε σύγκριση με την RT-PCR. Σε μία μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μικροσυστοιχία DNA για ταυτόχρονη ανίχνευση HSV-1/2, VZV, EBV, CMV, ανθρώπινου ερπητοϊού-6 τύπου A και B (HHV-6 A/B) και αδενοϊού σε κλινικά δείγματα με LoD 10 GE/αντίδραση για κάθε ιό χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα [10]. Η μικροσυστοιχία DNA χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον εντοπισμό ιογενών αιτιών μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας με συνολική ευαισθησία 93% και ειδικότητα 100%, σε σύγκριση με την PCR ενός ιού [104]. Η μικροσυστοιχία DNA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση πολλαπλών ιών του γαστρεντερικού σωλήνα υψηλής απόδοσης [15], ιών που μεταδίδονται από μικρά θηλαστικά και αρθρόποδα, ερπητοϊών, εντεροϊών και φλαβοϊών, ιών HIV-1, HIV-2 και ηπατίτιδας και διπλής μόλυνσης με δύο ορότυπους του ιού του δάγκειου πυρετού σε ανθρώπινα δείγματα. Η μικροσυστοιχία DNA χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό και τον γονότυπο ανθεκτικών στα φάρμακα μεταλλάξεων του HIV για την ανίχνευση και γονότυπου ανθεκτικών στα φάρμακα μεταλλάξεων του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), για την ανίχνευση και τον γονότυπο του κορωνοϊού SARS [13] και για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της γενεαλογίας των ιών της γρίπης B. Κατά τη διάρκεια ενός ξεσπάσματος του SARS στην Κίνα το 2002,



η μικροσυστοιχία DNA χρησίμευσε επίσης για την ανακάλυψη ενός νέου μέλους της οικογένειας των κοροναϊών.

Η τεχνολογία μικροσυστοιχιών DNA είναι ένα εργαλείο υψηλής απόδοσης, καθώς επιτρέπει την πολλαπλή ανίχνευση μεγάλου αριθμού πιθανών ιογενών παθογόνων σε κλινικά δείγματα. Ωστόσο, η τεχνική έχει ορισμένους περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ότι είναι πολύ δαπανηρή για να χρησιμοποιηθεί για κλινική διάγνωση ρουτίνας, εντατική εργασία και χρονοβόρα (η διαδικασία υβριδισμού μπορεί να διαρκέσει ώρες έως ημέρες για να ολοκληρωθεί). Ο μη ειδικός υβριδισμός μεταξύ των υλικών δοκιμής και των ακινητοποιημένων ανιχνευτών μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Επιπλέον, ο σχεδιασμός συγκεκριμένων ανιχνευτών απαιτεί σχεδόν πλήρεις πληροφορίες για τη γενετική σύνθεση του ιού που μας ενδιαφέρει. Η δοκιμασία ανιχνεύει μόνο εκείνα τα μικρά παθογόνα που έχουν ανιχνευτές στόχου στη συστοιχία.

#### 4.9 Μέθοδος υποβοηθούμενη από CRISPR

Τα συσσωματωμένα τακτικά διαχωριζόμενα σύντομα παλινδρομικά συστήματα επαναλήψεων (CRISPR) και τα πρωτεϊνικά συστήματα που σχετίζονται με το CRISPR (Cas) ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά το 1987. Το σύστημα CRISPR, που προέρχεται από αρχαία και βακτήρια, είναι ο ανοσοποιητικός μηχανισμός αυτών των μικροοργανισμών. Το σύστημα περιέχει το γονίδιο CRISPR και τις πρωτεΐνες CRISPR-Cas, οι οποίες μπορούν να διασπάσουν συγκεκριμένα νουκλεϊκά οξέα υπό την καθοδήγηση του RNA. Πρόσφατα, τα συστήματα CRISPR-Cas έχουν εφαρμοστεί ευρέως στον διαγνωστικό τομέα λόγω της ιδιαιτερότητάς τους, της ευκολίας χρήσης και της δυνατότητας προγραμματισμού τους. Σε αυτή την ενότητα, συζητάμε τα διάφορα ένζυμα Cas και τις εφαρμογές τους σε διαγνωστικές δοκιμασίες. Με βάση τις μονάδες τελεστών κωδικοποίησης γονιδίων, το σύστημα CRISPR-Cas μπορεί να χωριστεί σε δύο κύριες κατηγορίες: "κατηγορία 1" και "κατηγορία 2". Επιπλέον, με βάση την οργάνωση των τόπων και των πρωτεϊνών τους, αυτές οι κατηγορίες μπορούν επίσης να υποδιαιρεθούν σε ξεχωριστούς τύπους. Το σύστημα κατηγορίας 1, το οποίο χρησιμοποιεί ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών πολλαπλών τελεστών, περιλαμβάνει τους τύπους I, III και IV. Το σύστημα κατηγορίας 2 περιλαμβάνει μεμονωμένες πρωτεΐνες δέσμησης crRNA, όπως Cas9, Cas12 και Cas13. Λόγω των δραστηριοτήτων

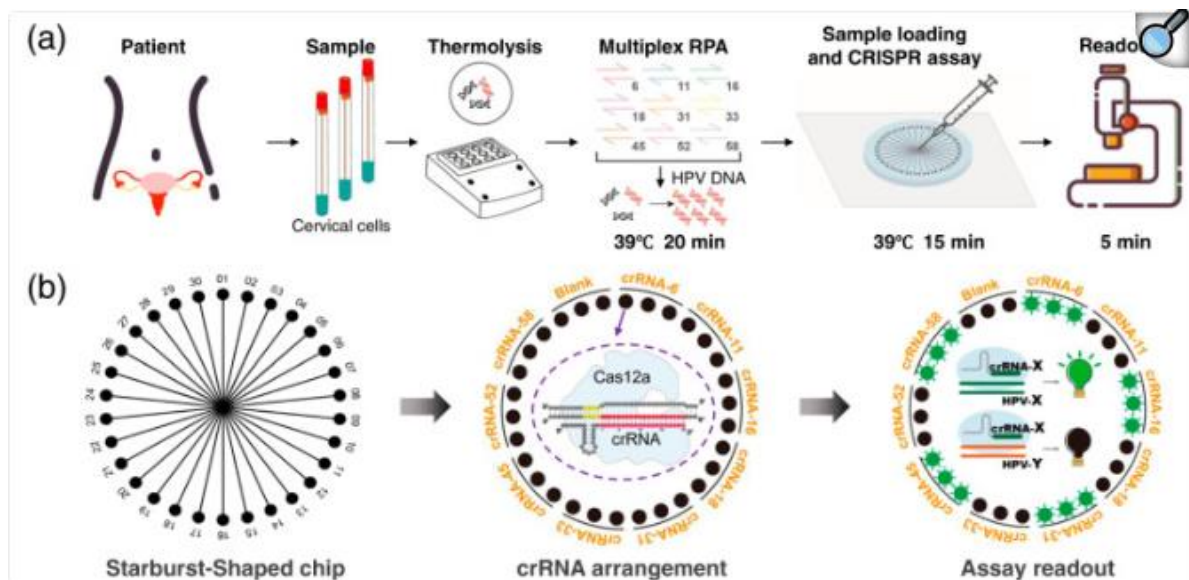
διαφορετικών συστημάτων CAS, τα συστήματα κλάσης 2 χρησιμοποιούνται ευρέως για διαγνωστικούς σκοπούς.

Για παράδειγμα, το CRISPR/Cas13 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση μονόκλωνου RNA και το CRISPR/Cas14 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη στόχευση μονόκλωνου DNA. Επιπλέον, η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων μπορεί να επιτύχει πολυπλεξία και υψηλή ευαισθησία μέχρι το ατομοριακό επίπεδο. Επομένως, η ενσωμάτωση του CRISPR/Cas σε βιοαισθητήρες που βασίζονται σε μικρορευστά μπορεί να παρέχει ακριβή, εξαιρετικά ευαίσθητα, γρήγορα και ισχυρά εργαλεία για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων. Μια μάσκα προσώπου με αισθητήρα SARS-CoV-2 αναπτύχθηκε για φορητή, απλή και μη επεμβατική ανίχνευση. Η διαδικασία ανίχνευσης απαιτούσε ελάχιστη παρέμβαση του χρήστη με ένα μόνο πάτημα κουμπιού. Ο αισθητήρας συνδύαζε RT, RPA και CRISPR/Cas12a για ανίχνευση SARS-CoV-2. Το όριο ανίχνευσης του αισθητήρα ήταν 500 ιικά αντίγραφα. Ένα αυτοματοποιημένο σύστημα αναπτύχθηκε για την ανίχνευση του RNA του Έμπολα με τη βοήθεια της καθοδηγούμενης από RNA RNA ενδονουκλεάσης Cas13a. Το σύστημα μικρορευστών παρείχε μια αυτόματη στρατηγική ανάμιξης και υβριδισμού για ανάλυση δειγμάτων. Τα παραγόμενα σήματα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα ειδικά ενσωματωμένο φθορόμετρο.

Μια άλλη μελέτη εισήγαγε μια ταχεία ανάλυση για την ευαίσθητη ανίχνευση του SARS-CoV-2 ενσωματώνοντας ισοθερμική ενίσχυση με CRISPR-Cas12. Το RNA-στόχος ενισχύθηκε με πολυμεράση ανασυνδυασμένης ανασυνδυασμένης ανάστροφης μεταγραφάσης και αναγνωρίστηκε από τη δοκιμασία CRISPR. Το σήμα συλλέχθηκε με μετρήσεις φθορισμού ή με πλευρική λωρίδα ροής. Πρόσφατα, οι Zhou et al. ανέφεραν μια πολυπλεξία μικρορευστών με τη βοήθεια μεμβράνης θέρμανσης για τη γρήγορη και χαμηλού κόστους ανίχνευση υποτύπων HPV χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό δοκιμασιών RPA και CRISPR. Αυτή η συσκευή μπορούσε ταυτόχρονα να ανιχνεύσει HPV16 και HPV18 μέσα σε 30 λεπτά και το LOD ήταν περίπου  $1 \times 10^{-18}$  M χρησιμοποιώντας πλασμίδια. Επιπλέον, οι Zhao et al. ανέπτυξαν μια συσκευή διπλού σταγονιδίου για ταυτόχρονη ανίχνευση HPV16 και HPV18 συνδυάζοντας το σύστημα CRISPR-Cas12a με μια πολυπλεκτική ανάλυση RPA, και το LOD ήταν περίπου 1 αντίγραφο/αντίδραση. Δύο τύποι του ιού της γρίπης, ο A και ο B, ανιχνεύθηκαν επιτυχώς χρησιμοποιώντας μια ταχεία επιτόπια δοκιμασία. Αυτή η δοκιμασία αναπτύχθηκε με βάση τη δραστηριότητα του συστήματος CRISPR/Cas σε συνδυασμό με RT-LAMP. Οι πλευρικές ταινίες μέτρησης παρείχαν ένδειξη με γυμνό μάτι. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν σε λιγότερο από 85 λεπτά με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Μια αυτόνομη πλατφόρμα εργαστηρίου σε χαρτί έχει αναπτυχθεί για την ταχεία ανίχνευση του SARS-CoV-2. Η ανάλυση συνδύασε RT-RPA και CRISPR-Cas12a για να εντοπίσει ταυτόχρονα πολλαπλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου νουκλεοπρωτεΐνης, του γονιδίου ακίδας του ιού και του γονιδίου RNase P της ανθρωπίνης καθαριότητας.



Η ανάλυση μπορεί να ανιχνεύσει έως και 102 αντίγραφα ιικού RNA σε λιγότερο από μία ώρα. Μια διαγνωστική πλατφόρμα που ονομάζεται microfluidic Combinatorial Arrayed Reaction for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids (mCARMEN) προτάθηκε για την αποτελεσματική ανίχνευση ιών και των παραλλαγών τους. Η πλατφόρμα συνδύασε την τεχνολογία μικρορευστών με το σύστημα CRISPR/Cas για να δοκιμάσει έως και 21 ιούς. Πολλά δείγματα που συλλέχθηκαν από κλινικές ρυθμίσεις δοκιμάστηκαν για να αποδείξουν την αποτελεσματικότητα του συστήματος. Ένα μικρορευστολογικό σύστημα (MAPnavi) εισήχθη για την ακριβή και ευαίσθητη ανίχνευση πολλαπλών αναπνευστικών ιών σε λιγότερο από 40 λεπτά. Το σύστημα ενσωμάτωσε ένθετο RPA με CRISPR/Cas12a για να επιτύχει χαμηλό όριο ανίχνευσης 50–200 αντίγραφα/mL. Δείγματα στυλεού που συλλέχθηκαν από ασθενείς με COVID-19 χρησιμοποιήθηκαν για να αποδείξουν την επιτυχία αυτής της προσέγγισης.



Εικόνα 4.9.1, Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής μικρορευστών σε συνδυασμό με CRISPR-Cas12a και ενίσχυση πολυμεράσης ανασυνδυασμένης πολυπλεξίας για ανίχνευση ιού ανθρώπινου θηλώματος (HPC). α) Σύντομη επισκόπηση των σταδίων της διαδικασίας. β) Αρχές δοκιμών σε μικροκύκλωμα (on-chip). Ανατυπώθηκε με άδεια από [116]. Πνευματικά δικαιώματα (2022) Springer Nature.

#### 4.10 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS)

Η έξαρση του COVID-19 εντοπίστηκε αρχικά στην πόλη Wuhan της Κίνας, στην επαρχία Hubei, τον Δεκέμβριο του 2019. Ένα σύνολο ανεξήγητων περιπτώσεων πνευμονίας οδήγησε στην αναγνώριση της COVID-19 ως νέας μορφής πνευμονίας, και αμέσως ξεκίνησαν οι έρευνες για τον εντοπισμό του υπεύθυνου παθογόνου και την αποτύπωση της γονιδιωματικής του αλληλουχίας. Το παθογόνο αναγνωρίστηκε ως κοροναϊός σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου-2 (SARS-CoV-2), με την αλληλουχία να αναφέρεται για πρώτη φορά στις τοπικές αρχές στις 5 Ιανουαρίου 2020 και να δημοσιεύεται στον ιστότοπο ανοικτής πρόσβασης [virological.org](https://virological.org) στις 11 Ιανουαρίου.

Ο ιός έχει πλέον διαδοθεί σε όλες τις γωνιές του πλανήτη, και οι καινοτόμοι στον ακαδημαϊκό τομέα, την κυβέρνηση και τη ιδιωτική βιομηχανία εργάζονται με πρωτοφανή ταχύτητα και κλίμακα για να προτείνουν λύσεις που θα συμβάλλουν στην αντιμετώπιση και επίλυση της κρίσης. Ένα από τα κύρια μέτρα που έχουν ληφθεί για τον περιορισμό της εξάπλωσης της νόσου είναι η διενέργεια ελέγχων για τον SARS-CoV-2 στον πληθυσμό, το οποίο έχει εφαρμοστεί παγκοσμίως. Οι δοκιμές αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς παρέχουν στους ανθρώπους πληροφορίες σχετικά με πιθανές μολύνσεις, επιτρέποντάς τους και στους επαφές τους να λάβουν τις απαραίτητες προφυλάξεις, όπως η καραντίνα, προκειμένου να μειωθεί η έκθεση στην κοινότητα. Επιπλέον, οι τυποποιημένες και εκτενείς δοκιμές προσφέρουν δεδομένα στους ερευνητές και τους υπαλλήλους δημόσιας υγείας, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μοντελοποίηση της μετάδοσης και τη λήψη αποφάσεων σχετικά με δημόσιες πολιτικές, όπως η κοινωνική απόσταση και η χρήση μάσκας, μεταξύ άλλων.

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) είναι μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται σε αμέτρητα εργαστήρια σε όλο τον κόσμο για τη μελέτη της γενετικής σύνθεσης οποιουδήποτε οργανισμού, αλλά η χρήση της στη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών είναι μέχρι στιγμής σχετικά σπάνια. Οι πληροφορίες που συλλέγονται από την NGS, η οποία αλληλουχεί τα γονιδιώματα των παθογόνων μικροοργανισμών, παρέχουν πολύ περισσότερες γνώσεις από τα δεδομένα που παράγονται με τις συνήθεις εργαστηριακές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης θεραπευτικών φαρμάκων και εμβολίων, της παρακολούθησης των αλλαγών στους ιούς που κυκλοφορούν σε έναν πληθυσμό και της καλύτερης κατανόησης των προτύπων μετάδοσης με την πάροδο του χρόνου και της γεωγραφίας.

Η NGS είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία με τη δυνατότητα να αλληλουχίζει ταυτόχρονα δισεκατομμύρια τμήματα νουκλεϊνικών οξέων και οι πρόσφατες εξελίξεις έχουν μειώσει δραματικά το χρόνο και το κόστος της αλληλούχισης. Η ισχύς της τεχνολογίας NGS υψηλής απόδοσης έχει παρουσιάσει στην επιστημονική κοινότητα πολλές υποσχόμενες εφαρμογές, και η τρέχουσα πανδημία έχει δώσει ένα τεράστιο αίσθημα επείγουσας ανάγκης για τη διάδοση ορισμένων από αυτές τις εφαρμογές

Μια ευκαιρία εφαρμογής της NGS είναι στον τομέα της κλινικής διάγνωσης των μολυσματικών ασθενειών. Η χρήση της τεχνολογίας NGS για τη διάγνωση μολυσματικών ασθενειών επιτρέπει μια αμερόληπτη προσέγγιση για την ανίχνευση παθογόνων που δεν απαιτεί καλλιέργεια ή κλινικές περιπτώσεις. Ενώ οι συνήθεις διαδικασίες εξέτασης απαιτούν από τους κλινικούς γιατρούς να προσδιορίσουν τι μπορεί να εξηγή τα συμπτώματα ενός ασθενούς και να χρησιμοποιήσουν δοκιμές που στοχεύουν στο συγκεκριμένο παθογόνο, οι δοκιμές NGS μπορούν να αποκαλύψουν την παρουσία οποιουδήποτε τύπου μικροοργανισμού που υπάρχει σε ένα δείγμα, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών, μυκήτων και παρασίτων [47].

#### 4.10.1 Βασικές αρχές NGS

Η τεχνολογία NGS (Next Generation Sequencing) αναπτύχθηκε γύρω στο τέλος του 20ού αιώνα ως μια πιο εξελιγμένη και ισχυρή μέθοδος αλληλούχισης γονιδίων. Η αλληλούχιση Sanger, η οποία εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του 1970, ήταν η αρχική μέθοδος αλληλούχισης και συνέβαλε στην ολοκλήρωση του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος στις αρχές της δεκαετίας του 2000. Αυτή η πρώιμη τεχνική βασίζεται σε μια διαδικασία τερματισμού της αλυσίδας, η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη φθορίζοντος επισημασμένων dideoxynucleotides (ddNTPs) στην αντίδραση PCR του γενετικού υλικού που πρόκειται να αλληλουχηθεί. Τα ddNTPs δεν διαθέτουν την ομάδα 3'-OH, η οποία είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών, με αποτέλεσμα η επιμήκυνση της αλυσίδας να τερματίζεται σε τυχαία σημεία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Ως αποτέλεσμα αυτού του τυχαίου τερματισμού, δημιουργούνται θραύσματα νουκλεϊκών οξέων διαφόρων μηκών, τα οποία μπορούν να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ανάλογα με το μέγεθός τους. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA ή RNA προσδιορίζεται μέσω ανάλυσης σε πηκτή. Μετρώντας τα διακριτά μοτίβα φθορισμού κάθε διαφορετικού ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), είναι δυνατός ο προσδιορισμός των βάσεων που υπάρχουν σε κάθε θέση της ζώνης. Η μικρότερη ζώνη νουκλεϊκού οξέος στο πήκτωμα διανύει μεγαλύτερη απόσταση και αντιπροσωπεύει το 5' άκρο της κλωνικής αλληλουχίας. Από αυτό το σημείο, η αλυσίδα διαβάζεται στην πηκτή προς το 3' άκρο. Η μέθοδος αλληλούχισης Sanger παραμένει ευρέως χρησιμοποιούμενη σε κοινές εργαστηριακές εφαρμογές και στην επικύρωση δεδομένων NGS.

#### 4.10.2 Μέθοδοι NGS

Υποτύποι της τεχνολογίας NGS περιλαμβάνουν την πυροαλληλουχία, την αλληλουχία σύνθεσης, την αλληλουχία σύνδεσης και την ιοντική αλληλουχία ημιαγωγών, καθένας από τους οποίους έχει τις δικές του τεχνικές παραλλαγές, πλεονεκτήματα και αδυναμίες. Η αλληλούχιση με βάση τη σύνθεση (SBS) είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους και χρησιμοποιείται ευρέως από πολλές ιδιωτικές εταιρείες.

Στη μέθοδο SBS, τα παραγόμενα θραύσματα βιβλιοθήκης τροποποιούνται με ένα μοτίβο προσαρμογέα που περιέχει μια θέση πρόσδεσης αλληλουχίας, έναν δείκτη και μια περιοχή συμπληρωματική προς το ligand του ολιγομερούς στην επιφάνεια του τσιπ. Στη συνέχεια, τα θραύσματα προσδένονται στο τσιπ με πρόσδεση σε μια αλληλουχία πρόσδεσης ολιγομερούς και κάθε θραύσμα ενισχύεται σε ξεχωριστή θέση στο τσιπ για να σχηματιστεί μια συστάδα. Η ενίσχυση επιτυγχάνεται με μια διαδικασία που περιλαμβάνει ενίσχυση γέφυρας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ξεχωριστών συστάδων θραυσμάτων της ίδιας αλληλουχίας που υπάρχουν τόσο στην εμπρόσθια όσο και στην ανάστροφη κατεύθυνση. Οι συστάδες διορθώνονται με μια διαδικασία πλύσης ώστε να παραμείνει μόνο η εμπρόσθια αλληλουχία και να αρχίσει η αλληλούχιση. Αφού διαβαστεί η εμπρόσθια αλληλουχία, η διαδικασία αντιστρέφεται και διαβάζεται η αντίστροφη αλληλουχία. Η ίδια η διαδικασία αλληλούχισης επιτυγχάνεται με τη συνεχή προσθήκη φθορίζοντων νουκλεοτιδίων, των οποίων οι βάσεις μπορούν να αναγνωριστούν σε πραγματικό χρόνο από το προφίλ εκπομπής. Το όργανο είναι σε θέση να αναλύει τα δεδομένα κάθε συστάδας ταυτόχρονα και μπορεί να διαβάσει αποτελεσματικά εκατομμύρια αλληλουχίες θραυσμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Για παράδειγμα, μια πλατφόρμα που αναπτύχθηκε από την Ion Torrent Systems χρησιμοποιεί τεχνολογία ημιαγωγών ιόντων. Η συσκευή αυτή ανιχνεύει ιόντα υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά τον πολυμερισμό της πρότυπης αλυσίδας. Επομένως, αυτό αντιστοιχεί επίσης σε μια κεφαλή ακολουθίας με σύνθεση [44]. Η λεπτομερής περιγραφή όλων των συστηματικών διαδικασιών NGS ξεφεύγει από τα όρια της παρούσας ανασκόπησης.

#### 4.10.3 Το NGS ως διαγνωστικό εργαλείο

Τα τελευταία χρόνια, η NGS έχει εισαχθεί όλο και περισσότερο για τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων χρησιμοποιώντας μια μεταγενωμική προσέγγιση που βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση PCR για τον εντοπισμό ιικών γονιδιωμάτων που υπάρχουν στο πλάσμα, σε ρινοφαρυγγικές αναρροφήσεις, σε δείγματα κοπράνων και σε άλλα σωματικά υγρά. Το πλεονέκτημα της χρήσης αυτής της προσέγγισης είναι ότι η αλληλουχία κάθε νουκλεϊκού οξέος προσδιορίζεται σχεδόν χωρίς προκατάληψη. Ως εκ τούτου, δεν υπάρχει ανάγκη σχεδιασμού και σύνθεσης ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών, μειώνοντας έτσι την κατανάλωση χρόνου και επιτρέποντας την ταυτοποίηση νέων ιών σε άγνωστες ιογενείς λοιμώξεις. Μετά την ανίχνευση, ο ταυτοποιημένος νέος ιός ή η παραλλαγή μπορεί να μελετηθεί φαινοτυπικά, π.χ. σε κυτταροκαλλιέργεια (όπου είναι δυνατόν) ή με τη χρήση ψευδοτυπικών σωματιδίων ιού [26]. Στην περίπτωση του SARS-CoV-2, αυτού του είδους η μελέτη μπορεί να εξετάσει κατά πόσον τα αντισώματα που παράγονται από το εμβόλιο μπορούν να εξουδετερώσουν τη νέα παραλλαγή, και να προσδιοριστεί κατά πόσον είναι απαραίτητο να παραχθούν εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι αυτού του νέου VOC που ανιχνεύεται ως δευτερεύουσα παραλλαγή για την τροποποίηση του εμβολίου ή την αντιική δοκιμή [48]. Ωστόσο, η προσέγγιση τυχαίων εκκινητών έχει σημαντικούς περιορισμούς. Απαιτείται υψηλή ταυτότητα με τις αλληλουχίες αναφοράς για τη σωστή χαρτογράφηση και οι αλληλουχίες μειοψηφίας ενδέχεται να υποτιμηθούν και να μην εντοπιστούν. Αυτός ο περιορισμός εμποδίζει την επιτήρηση παραλλαγών που είναι παρούσες σε πολύ χαμηλό ποσοστό ψευδοειδών σε ορισμένα μολυσμένα άτομα. Αυτές οι μειονοτικές παραλλαγές μπορεί στη συνέχεια να γίνουν κυρίαρχες και να αποτελέσουν δημόσιο κίνδυνο- πιο λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη στρατηγική τυχαίας εκκίνησης WGS και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά της συζητούνται παρακάτω.

Αντίθετα, μια βαθιά προσέγγιση NGS χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές μπορεί να ανιχνεύσει αυτές τις δευτερεύουσες παραλλαγές στο είδος ή να ανιχνεύσει μικτές λοιμώξεις. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καταδειχθεί η μετάδοση του ιού από άτομο σε άτομο σε περιπτώσεις όπου η μετάδοση έχει συμβεί μετά από συμφόρηση, στις οποίες ένας υποπληθυσμός της πηγής του ιού έχει ξεκινήσει τη νέα λοίμωξη στον δότη. Το NGS χρησιμοποιώντας μια συγκεκριμένη προσέγγιση εκκινητών έχει μεταφερθεί στη διαγνωστική πρακτική υγειονομικής περίθαλψης για υποτυποποίηση HCV υψηλής ανάλυσης ως μέθοδος χωρίς σφάλματα ικανή να ταξινομήσει όλα τα απομονώματα ιών, να εντοπίσει νέους υποτύπους και να αναφέρει εάν ο ασθενής έχει μολυνθεί από περισσότερους από έναν υποτύπους ταυτόχρονα (μικτή λοίμωξη). Αυτή η δοκιμή βασίζεται σε μια ισχυρή μεθοδολογία ενίσχυσης RT-PCR-Nested που μπορεί να ενισχύσει όλους τους υποτύπους HCV. Το RNA είναι RT-PCR-Heminested ενισχυμένο χρησιμοποιώντας ειδικά και πατενταρισμένα αστάρια της περιοχής NS5B και βαθιά αλληλουχία χρησιμοποιώντας

μια πλατφόρμα NGS. Οι πρώτες αλληλουχίες NS5B υποβάλλονται πρόσφατα σε διαδικασία φιλτραρίσματος και φυλογενετικής ταξινόμησης χρησιμοποιώντας αλληλουχίες αναφοράς γονιδιωμάτων HCV. Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε μια δοκιμή για υποκαταστάσεις που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (RAS). Η αξιολόγηση των μειονοτικών παραλλαγών που φέρουν RAS καθιστά δυνατή την πρόβλεψη της επιλογής τους με ειδικά αντιϊικά άμεσης δράσης έναντι του HCV. Αυτό επιτρέπει τη δημιουργία μιας τελικής έκθεσης για το RAS που περιλαμβάνει συστάσεις για την επανεπεξεργασία ασθενών ανθεκτικών στις αντιϊκές θεραπείες. Λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με τη συγκεκριμένη στρατηγική εκκινήτων για τη μελέτη των ιικών οιονεί ειδών και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους παρέχονται παρακάτω [48].

#### 4.10.4 NGS για τη μελέτη της ύπαρξης ενός ιού και την καταπολέμηση ψευδών αποτελεσμάτων.

Η προέλευση του SARS-CoV-2 εξακολουθεί να βρίσκεται στο προσκήνιο, αλλά δεν υπάρχει αμφιβολία για τη ζωονοσογόνο προέλευσή του. Το NGS ήταν χρήσιμο στην απόκτηση ολόκληρου του γονιδιώματος του αρχικού γονιδιώματος του Wuhan-hu-1 SARS-CoV-2 και αργότερα χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφόρτωση εκατομμυρίων αλληλουχιών από απομονωμένα στελέχη σε όλο τον κόσμο [41]. Η σύγκριση του Wuhan-hu-1 και του πλησιέστερου απομονωμένου CoV από οποιοδήποτε ζώο (νυχτερίδα CoV RaTG13) δείχνει ότι το 3,25% του γονιδιώματός τους είναι διαφορετικό (περισσότερα από 900 nts από τα 29.813), ενώ μόνο το 0,36% (107 nt αλλαγές από τα 29729) του γονιδιώματος είναι διαφορετικό κατά τη σύγκριση του Wuhan-hu-1 και ενός απομονωμένου Omicron από την πόλη της Βαρκελώνης (υπολογισμοί που βασίζονται σε δεδομένα των ίδιων των συγγραφέων). Δύο κοντινά παραδείγματα ιογενούς ζωονοσογόνου προέλευσης είναι οι δύο προηγούμενες επιδημίες CoVs, SARS-CoV και MERS-CoV. Τα γονιδιώματα SARS-CoV ιών που απομονώθηκαν από μασκοφόρους φοίνικες, ρακούν, σκύλους και ασβούς κουνάβιων είναι σχεδόν πανομοιότυπα με εκείνα που απομονώθηκαν από τον άνθρωπο, δείχνοντας ότι αυτά τα ζώα ήταν οι ενδιάμεσοι ξενιστές μεταξύ των αρχικών CoVs που μολύνουν νυχτερίδες (*Rhinolophus affinis*, *Rhinolophus sinicus*) και των ανθρώπων. Οι απομονωμένοι από τον άνθρωπο MERS-CoV έχουν περισσότερο από 99% ταυτότητα με εκείνους που απομονώθηκαν από καμήλες, οι οποίες ήταν ο ενδιάμεσος ξενιστής μεταξύ των αρχικών CoV που μόλυναν την αιγυπτιακή νυχτερίδα και των ανθρώπων. Από την άλλη, η απόκλιση του SARS-CoV-2 σε σχέση με άλλους



CoVs είναι πολύ μεγαλύτερη. Αυτός ο CoV δείχνει την εισαγωγή τεσσάρων πολυβασικών αμινοξέων (PRRA) στη θέση διάσπασης της φουρίνης και πέντε αμινοξέων (F484, Q493, S494, N501 και Y505) που άλλαξαν στην περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα σε σχέση με τον πλησιέστερο RaTG13 και άλλες υποκαταστάσεις που δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως σε νυχτερίδες και άλλους CoV [48].

Τέτοιες παρεμβολές και αλλαγές αμινοξέων που συνέβησαν κατά μήκος του γονιδίου spike, οι οποίες διευκόλυναν τη μετάδοση του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό, δεν ήταν προφανείς για τους ειδικούς. Άλλωστε, οι CoV που καλλιεργήθηκαν στο παρελθόν δεν παρουσίαζαν κάτι παρόμοιο με αυτές τις γονιδιωματικές αλλαγές, γεγονός που συνηγορεί και πάλι έντονα στο ότι ο ιός αυτός δεν δημιουργήθηκε από ερευνητές εργαστηρίου. χαρακτηριστικές εισαγωγές αμινοξέων και αλλαγές που βρέθηκαν στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2. Η πιο πιθανή εξήγηση για τη συσσώρευση είναι ότι είναι το αποτέλεσμα πολλαπλών γεγονότων άλματος από το ζώο στον άνθρωπο (ζωνοόσος) και από τον άνθρωπο στο ζώο (ζωνοόσος) [43], οπότε ο ιός εξελίχθηκε και στα δύο είδη ελλείψει προϋπάρχουσας ανθρώπινης ανοσίας στον SARS-CoV-2 και και μπορεί στη συνέχεια να έχει εξαπλωθεί μεταξύ των ανθρώπινων πληθυσμών. Πράγματι, είναι εξαιρετικά απίθανο το άλμα μεταξύ των ειδών που οδηγεί σε μια ανθρώπινη πανδημία να συμβεί ως μεμονωμένο γεγονός.

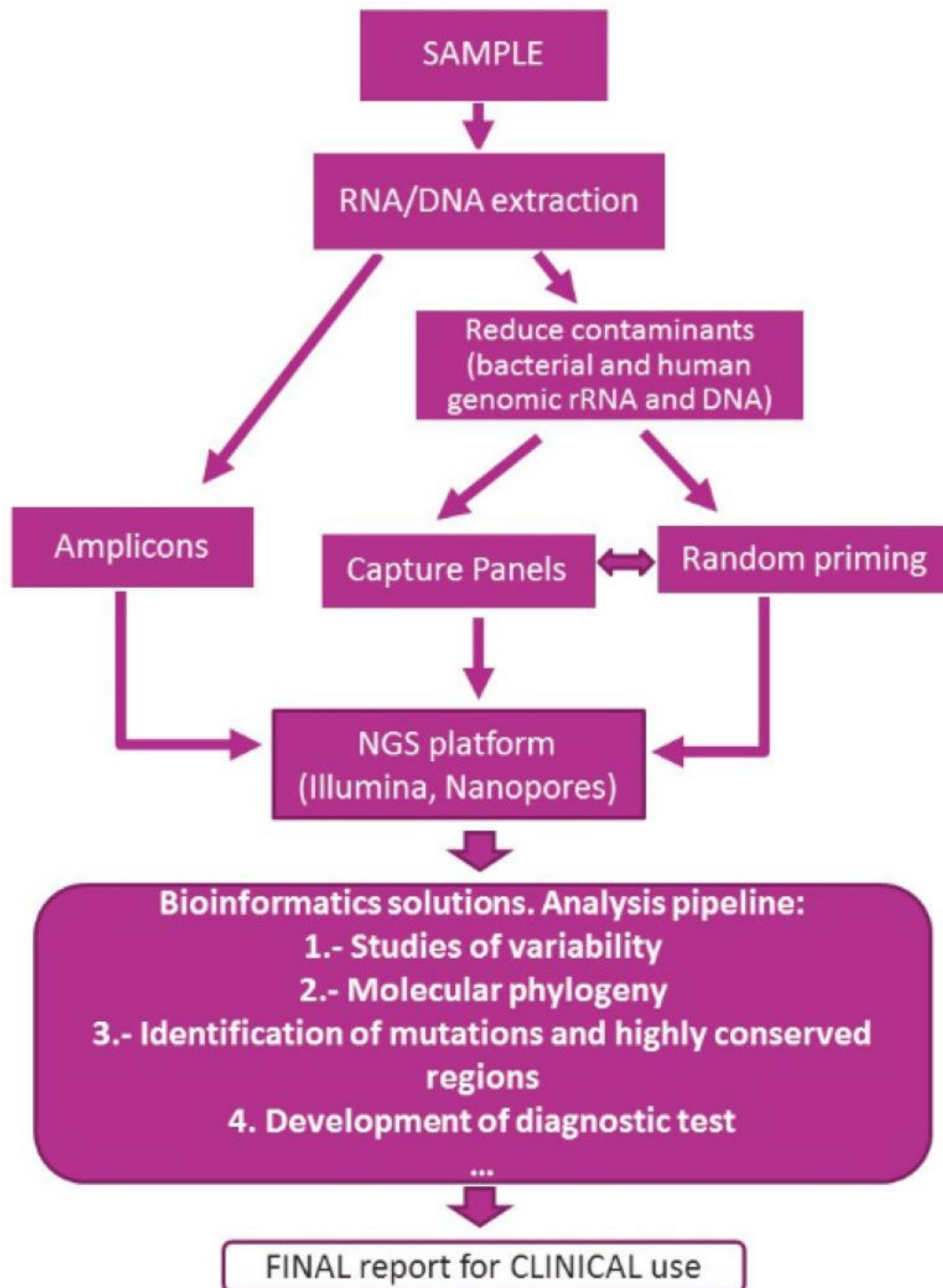
Το NGS ήταν απαραίτητο για να αποδειχθεί ότι οι εστίες του SARS-CoV-2 σε φάρμες βιζόν στη Δανία και τις Κάτω Χώρες προέρχονταν από ανθρώπους. Σε αυτές τις εστίες, ο ιός εισήχθη αρχικά από τον άνθρωπο, εξελίχθηκε σε μινκ και εξαπλώθηκε στον άνθρωπο. Παρόλο που ο ιός μπόρεσε να μεταπηδήσει από τα λιοντάρια των ανθρώπων στους ζωολογικούς κήπους και τα κατοικίδια ζώα, όπως οι σκύλοι και οι γάτες, και ενώ υπάρχουν στοιχεία για αποτελεσματική μετάδοση, η πιθανότητα κατοικίδιων ζώων ή αιλουροειδών ως προέλευση της πανδημίας έχει αποκλειστεί και δεν έχει θεωρηθεί ως σημαντική ανησυχία. Επιπλέον, αυτό δεν περιορίζεται στον SARS-CoV-2 επειδή έχει αναφερθεί στη Μαλαισία μια περίπτωση νέας μετάδοσης CoV σκύλου από κατοικίδια σκυλιά σε ανθρώπους. Επομένως, πρέπει να γνωρίζουμε και να αποφεύγουμε τη μαζική μόλυνση σε αυτά τα ζώα, ώστε να μην διευκολύνουμε την προσαρμογή του ιού με απρόβλεπτα αποτελέσματα. Για να μελετήσουμε την προέλευση του SARS-CoV-2, θα ήταν ενδιαφέρον να χρησιμοποιήσουμε το NGS για να συγκρίνουμε αλληλουχίες που απομονώθηκαν από φάρμες άγριων ζώων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γούνας και τροφίμων, όπως αυτές που είναι αφιερωμένες στην εκτροφή βιζόν, αλεπούδων και ρακούν, οι οποίες αυξάνονται στην Κίνα από τη δεκαετία του 1990 (σχεδόν 60 εκατομμύρια ζώα σφαγιάστηκαν το 2018). Πράγματι, η πανδημία SARS-CoV-2 έχει αναζωογονήσει την προσέγγιση One Health [41], όπως ορίζεται από τα Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων (CDC): «Το One Health αναγνωρίζει ότι η υγεία των ανθρώπων συνδέεται με την υγεία των ζώων και του περιβάλλοντος». Στην περίπτωση των μολυσματικών ασθενειών, αυτό σημαίνει την ανάπτυξη διεπιστημονικών και διεπιστημονικών στρατηγικών για την ενσωμάτωση των μελετών αλληλούχισης NGS μολυσματικών παραγόντων που απομονώνονται



από ανθρώπους, ζώα, φυτά και το περιβάλλον με τους επαγγελματίες της βιοϊατρικής, της βιοπληροφορικής, της κτηνιατρικής, των τροφίμων και της περιβαλλοντικής υγείας.

#### 4.10.5 Μεθοδολογίες NGS για ανασυνδυασμένους, νέους ιούς,

Οι γενικές μεθοδολογικές στρατηγικές για την αλληλούχιση του ιού NGS συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4.10.1, Γενικές σχηματικές μεθοδολογίες για την αλληλούχιση του γονιδιώματος του ιού

#### 4.10.6 Βιοπληροφορική Επεξεργασία Δεδομένων NGS

Οι τεχνολογίες NGS παράγουν τεράστιες ποσότητες πρωτογενών δεδομένων, αλλά απαιτούν τεράστιο όγκο υπολογιστικής επεξεργασίας για την παραγωγή ουσιαστικών και χρήσιμων αποτελεσμάτων. Η βιοπληροφορική αναφέρεται στην ακολουθία αλγορίθμων μέσω των οποίων τα δεδομένα επεξεργάζονται για την παραγωγή χρήσιμων και ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων στην NGS [47]. Λόγω των διαφορών στις ιδιότητες τεχνολογίες NGS και των διαφορών στις εμπορικές εργαστηριακές διαδικασίες και στόχους, υπάρχουν αναπόφευκτα διαφορές στο λογισμικό και τα υπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται από τις ομάδες αυτές. Όλοι οι αγωγοί βιοπληροφορικής NGS μοιράζονται πολλές σημαντικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της αλληλούχισης, της συναρμολόγησης και της ευθυγράμμισης, της αναγνώρισης παραλλαγών, του σχολιασμού παραλλαγών, της ιεράρχησης παραλλαγών και της οπτικοποίησης. Οι σωληνώσεις βιοπληροφορικής απαιτούν επίσης αυστηρές μεθόδους ποιοτικού ελέγχου για να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

Η αλληλούχιση είναι η διαδικασία με την οποία μια πλατφόρμα NGS μετατρέπει τις πληροφορίες του αισθητήρα σε κλήσεις βάσεων και παράγει ακατέργαστες αλληλουχίες θραυσμάτων σε κάθε ομάδα. Οι τεχνικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ των κατασκευαστών. Οι πλατφόρμες αλληλούχισης Illumina με σύνθεση επιτυγχάνουν αυτό το έργο μετρώντας την έξοδο φθορισμού σε κάθε συστάδα ολιγονουκλεοτιδίων για να προσδιορίσουν τα νουκλεοτίδια που ενσωματώνονται στους κλώνους κατά τη διάρκεια κάθε γύρου [45]. Το επόμενο συστατικό του αγωγού βιοπληροφορικής είναι η συναρμολόγηση και η ευθυγράμμιση των τμημάτων αλληλουχίας. Η συναρμολόγηση αναφέρεται στη δημιουργία contigs, οι οποίες είναι μεγαλύτερες αλληλουχίες συναίνεσης σε συνδυασμό με την υπολογιστική ανάλυση αλληλουχιών που επικαλύπτονται και παράγονται από διαφορετικές συστάδες. Η ευθυγράμμιση εκφράζεται επίσης ως χαρτογράφηση και αναφέρεται στην τοποθέτηση αναγνώσεων θραυσμάτων ή contigs κατά μήκος ενός γονιδιώματος αναφοράς. Η σχετική σειρά ευθυγράμμισης και συναρμολόγησης στη ροή εργασίας του αγωγού είναι μεταβλητή και εξαρτάται από τους στόχους των επιμέρους έργων. Οι δύο διαδικασίες μπορεί να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα ή η de novo αλληλουχία μπορεί να κατασκευάζεται και στη συνέχεια να συγκρίνεται με ένα γονιδίωμα αναφοράς. Η de novo κατασκευή ενός γονιδιώματος είναι ένας τρόπος με τον οποίο οι επιστήμονες μπορούν να δημιουργήσουν ένα γονιδίωμα αναφοράς για έναν πρόσφατα μελετώμενο οργανισμό.

Ένα σημαντικό ζήτημα στο βήμα της ευθυγράμμισης είναι η έννοια της αυστηρότητας. Αυτή αναφέρεται στο πόσο αυστηρά η αναγνωσμένη αλληλουχία ή το contig πρέπει να ταιριάζει με την αλληλουχία αναφοράς. Η χαμηλή αυστηρότητα μπορεί να οδηγήσει σε πιθανή κλωνική λανθασμένη ευθυγράμμιση, ενώ η υψηλή αυστηρότητα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια παραλλαγών επειδή δεν ταιριάζουν ακριβώς με την αλληλουχία αναφοράς. Οι μικρές ακολουθίες ανάγνωσης (<250 bp) μπορεί επίσης να αντιμετωπίσουν δυσκολίες ευθυγράμμισης λόγω της παρουσίας μεγάλων ομόλογων περιοχών στο γονιδίωμα αναφοράς, γεγονός που περιορίζει την ικανότητα των μικρών τμημάτων να χαρτογραφηθούν σωστά [28]. Η ταυτοποίηση παραλλαγών, γνωστή και ως κλήση παραλλαγών, είναι η ταυτοποίηση των περιοχών όπου οι αλληλουχίες δείγματος και αναφοράς αποκλίνουν [26]. Το πιο βασικό παράδειγμα είναι οι παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNVs), όπου οι βάσεις δεν ταιριάζουν μεταξύ πανομοιότυπων αλληλουχιών. Άλλες παραλλαγές περιλαμβάνουν μικρές μεταλλάξεις εισαγωγής και διαγραφής (INDELs), παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων ή σημαντικές δομικές αλλαγές, όπως αναστροφές και μετατοπίσεις. Υπάρχουν διάφορα υπολογιστικά εργαλεία διαθέσιμα για το στάδιο κλήσης παραλλαγών της βιοπληροφορικής αγωγού NGS.

Ο σχολιασμός είναι η διαδικασία περαιτέρω χαρακτηρισμού των εντοπισμένων παραλλαγών στο πλαίσιο των σχετικών μεταδεδομένων. Ουσιαστικά, το πρόγραμμα υποβάλλει ερωτήματα σε διάφορες βάσεις δεδομένων για να βοηθήσει στη συσχέτιση των παραλλαγών με χρήσιμες πληροφορίες και στην τοποθέτησή τους στο πλαίσιο. Διερευνώνται πτυχές όπως η θέση της παραλλαγής στο γονιδίωμα, οι προβλεπόμενες αλλαγές στις αλληλουχίες cDNA και αμινοξέων και η συχνότητα εμφάνισης σε κοινές βάσεις δεδομένων παραλλαγών [46]. Οι σχολιασμοί αυτοί χρησιμοποιούνται για την ιεράρχηση των παραλλαγών. Τα ασήμαντα ευρήματα μπορούν να φιλτραριστούν, ώστε οι επιστήμονες να επικεντρωθούν στα σημαντικά ευρήματα. Αυτό είναι σημαντικό για να διασφαλιστεί ότι οι ερευνητές και οι κλινικοί γιατροί δεν κατακλύζονται από μια ανεξέλεγκτη πλημμύρα πληροφοριών. Ένα παράδειγμα μη σημαντικού ευρήματος είναι οι SNVs, οι οποίες είναι ευρέως αποδεδειγμένο ότι είναι καλοήθειες. Τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιούν σκληρά φίλτρα που αφαιρούν όλες τις παραλλαγές εκτός από εκείνες που σχετίζονται με το ερευνητικό ή κλινικό τους ενδιαφέρον.

#### 4.10.7 NGS με χρήση τυχαίων εκκινητών (Metagenomics Sequencing)

Οι τυχαίοι εκκινητές είναι βραχέα μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια DNA μήκους μόνο έξι έως εννέα νουκλεοτιδίων (συνήθως εξαμερή) και αποτελούνται από κάθε πιθανό συνδυασμό βάσεων, πράγμα που σημαίνει ότι ένα μείγμα περιέχει 4096 διαφορετικά εξαμερή. Καθώς όλα τα πιθανά εξαμερή είναι παρόντα, αυτοί οι εκκινητές μπορούν να συνδεθούν με οποιονδήποτε στόχο αλληλουχίας RNA ή DNA σε ένα μείγμα γονιδιωμάτων. Στη συνέχεια, οποιαδήποτε αναδρομική μεταγραφική θα αντιγράψει οποιοδήποτε γονιδίωμα RNA στο DNA και σε PCR, οποιοδήποτε θραύσμα DNA θα ενισχυθεί. Το προϊόν PCR μπορεί να ακολουθηθεί με επιτυχία μετά τη σύνθεση μιας βιβλιοθήκης που θα φορτωθεί και θα εκτελεστεί σε μια πλατφόρμα NGS.

Αυτή η τεχνική λύση έχει σημαντικά πλεονεκτήματα:

1. Δεν απαιτεί προηγούμενη γνώση του γονιδιώματος για το σχεδιασμό εκκινητών ή ανιχνευτών, γεγονός που απλοποιεί τη διαδικασία συνολικά.
2. Επιτρέπει την ταυτοποίηση όλων των παθογόνων σε κάθε είδους δείγμα (πλάσμα, ορός, κόπρανα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, λύματα κ.λπ.) καθώς και των κύριων γονιδιωμάτων του ιικού πληθυσμού σε επιδημιολογικές μελέτες ή έρευνες επιδημιών.

Ωστόσο, το NGS με τυχαία προετοιμασία έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα: ενισχύει τυχαία οποιοδήποτε γονιδίωμα DNA ή RNA και, ως αποτέλεσμα, τα μειονοτικά γονιδιώματα υποεκπροσωπούνται ή ακόμη και χάνονται (χαμηλότερη ευαισθησία), καθώς τα νουκλεϊκά οξέα από τον ξενιστή και οι κοινοί μικροοργανισμοί σε κλινικά δείγματα θα ενισχυθούν επίσης. Ο τεράστιος αριθμός ανεπιθύμητων ενισχύσεων καθιστά το κόστος απόκτησης επαρκών δεδομένων υψηλό, γεγονός που αυξάνει την υπολογιστική πρόκληση. Το ποσοστό των αναγνώσεων που ταιριάζουν με τα γονιδιώματα-στόχους του ιού είναι συνήθως πολύ χαμηλό: 0,008% για τον ιό Epstein-Barr (EBV) στο αίμα ενός υγιούς ενήλικα, 0,0003% για τον ιό Lassa σε κλινικά δείγματα και 0,3% για τον ιό Zika σε δείγμα εμπλουτισμένο για ιικά σωματίδια μέσω διήθησης και φυγοκέντρησης [27]. Επομένως, η τυχαία προετοιμασία απαιτεί μεγάλη ποσότητα αρχικού γονιδιωματικού υλικού (π.χ. υψηλό ιικό φορτίο). Μια πιθανή λύση σε αυτόν τον περιορισμό είναι η συμπύκνωση των προσμίξεων πριν από τη μέθοδο αλληλούχισης. Αυτό μπορεί να γίνει με αντισώματα, διήθηση, υπερφυγοκέντρηση και απομάκρυνση των ελεύθερων νουκλεϊκών οξέων, κυρίως από τον ξενιστή. Το ιικό RNA

μπορεί να εμπλουτιστεί περαιτέρω με απομάκρυνση υλικού του ξενιστή, όπως ριβοσωμικό RNA (πρωτόκολλο διάσπασης ριβοσώματος), βακτηριακό DNA, DNA του ξενιστή (επεξεργασία DNA και διήθηση DNA) και στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυχαίοι εκκινητές για να αυξηθεί η απόδοση του γονιδιώματος.

#### 4.10.8 Καταγραφή αλληλουχίας, ανάκτηση θραυσμάτων και αλληλούχιση NGS (αλληλούχιση εμπλουτισμού στόχου)

Μια μέθοδος εμπλουτισμού παθογόνων συνίσταται στο σχεδιασμό μικρών ανιχνευτών RNA ή DNA συμπληρωματικών προς τις αλληλουχίες αναφοράς παθογόνων. Συνήθως συνδέονται με μια στερεά φάση (για παράδειγμα μαγνητικές χάντρες επισημασμένες με στρεπταβιδίνη) και χρησιμοποιούνται για να συλλάβουν ή να «τραβήξουν προς τα κάτω» συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA από ολικά νουκλεϊνικά οξέα σε ένα δείγμα. Η βλάβη του DNA επιδιορθώνεται (εγκοπές, διμερή θυμιδίνης, οξειδωμένες γουανίνες και πυριμιδίνες κ.λπ.) και τελικά επισκευάζεται. Στη συνέχεια, οι προσαρμογείς συνδέονται και οι αλληλουχίες εμπλουτίζονται χρησιμοποιώντας λίγους κύκλους PCR [48].

#### Πλεονεκτήματα:

- Η στρατηγική δέσμευσης αλληλουχίας επιτρέπει τον εμπλουτισμό αλληλουχιών από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς σε ένα σύνθετο μείγμα.
- Ολόκληρα γονιδιώματα μπορούν να αλληλουχηθούν με χαμηλό κόστος, καθώς τα μη παθογόνα γονιδιώματα μειώνονται σημαντικά, μειώνοντας έτσι τα μολυσματικά νουκλεϊνικά οξέα από διαφορετικές προελεύσεις. Χάρη σε αυτό, λίγοι κύκλοι PCR είναι απαραίτητοι για την ενίσχυση, περιορίζοντας την εισαγωγή μεταλλάξεων τεχνουργημάτων και διατηρούνται δευτερεύουσες παραλλαγές (δηλ. υψηλότερη ευαισθησία), αντανακλώντας *in vivo* παραλλαγή.

#### Μειονεκτήματα:



- Ο σχεδιασμός των ανιχνευτών σύλληψης ολιγονουκλεοτιδίων απαιτεί γνώση του γονιδιώματος των μικροοργανισμών. Έτσι, δεν επιτρέπει την αλληλούχιση νέων παθογόνων.
- Απαιτεί υψηλή τεχνική εμπειρογνωμοσύνη για την προεπεξεργασία του δείγματος.
- Αν και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο, η ανακτημένη κάλυψη αλληλουχίας είναι χαμηλή.

#### 4.10.9 Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NNGS) ή αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης τρίτης γενιάς (TGS)

Οι τεχνολογίες αλληλούχισης επόμενης γενιάς έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με το μήκος ανάγνωσης, όταν είναι σύντομες ως τεχνολογίες «δεύτερης γενιάς» ή «NGS» και όταν είναι μακρές ως τεχνολογίες «τρίτης γενιάς» ή «NNGS», στον παρακάτω πίνακα.

Σύγκριση μεταξύ μεθοδολογιών αλληλούχησης δεύτερης και τρίτης γενιάς. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Λαμβάνοντας ως παραδείγματα τις πλατφόρμες Ion Torrent Personal Genome Machine και Illumina MiSeq. \*\*

Λαμβάνοντας ως παραδείγματα τις πλατφόρμες Pacific Biosciences RSII και Oxford Nanopore MinION. \*\*\* Ιικοί απλότυποι = μοναδικές αλληλουχίες στο οιοειδί είδος, που αντιστοιχούν σε μια παραλλαγή οιοειδούς.

	Δεύτερη Γενιά *	Τρίτη Γενιά **
<b>Μήκος ανάγνωσης</b>	400–~500 (2 × 300) bp	60 K–2 M bp
<b>Ποσοστά σφάλματος</b>	~1%–2.4%	~10%–15%
<b>Φόντα</b>	<p>Οι υψηλές αποδόσεις με σχετικά χαμηλά ποσοστά σφάλματος τα καθιστούν κατάλληλα για:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ποσοτική ανίχνευση παραλλαγών (ακόμη και δευτερευόντων).</li> <li>Μελέτη της ποικιλογένεσης οιοειδών ειδών (πολυπλοκότητα του μείγματος παραλλαγών).</li> </ul>	<p>Οι πολύ μεγαλύτερες αναγνώσεις επιτρέπουν την ακριβέστερη ανακατασκευή απλότυπου ***, η οποία επιτρέπει:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Σύνδεση μακράς εμβέλειας μεταξύ διαφορετικών γονιδιωματικών περιοχών.</li> <li>Βελτιωμένη ταξινόμηση γονότυπου, ειδικά για τη διάκριση μεταξύ μικτού/αναμειγμένου γονότυπου στη μόλυνση από HBV.</li> </ul>
<b>Μειονεκτήματα</b>	<p>Οι σύντομες αναγνώσεις δεν είναι κατάλληλες για:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Συναρμολόγηση και χαρακτηρισμός πολύπλοκων/υψηλά επαναλαμβανόμενων γονιδιωματικών περιοχών.</li> <li>Ανακατασκευή πλήρων «πραγματικών» ιικών απλότυπων ***.</li> </ul>	<p>Υψηλότερα ποσοστά σφάλματος δύσκολος χαρακτηρισμός «πραγματικών» αντικαταστάσεων, εισαγωγών και διαγραφών νουκλεοτιδίων.</p>

Η αλληλούχηση σύντομης ανάγνωσης NGS αντιπροσωπεύεται σήμερα από την Illumina (Illumina, ΗΠΑ) και την Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ΗΠΑ), ενώ η τεχνολογία αλληλούχησης 454 (Roche, ΗΠΑ) διακόπηκε τον Δεκέμβριο του 2016. Τα κύρια μειονεκτήματα της τεχνολογίας NGS είναι η μικρή διάρκεια ανάγνωσης (75–600 nts/read), η καθίζηση δομικών παραλλαγών, οι μεγάλες διαγραφές ή εισαγωγές, τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία ή/και οι αλληλουχίες με ακραία περιεκτικότητα σε γουανίνη-κυτοσίνη (GC). και η περιορισμένη ικανότητα εντοπισμού διαφορετικών μεταλλάξεων στο ίδιο γονιδίωμα και προσδιορισμού του κατά πόσον διαφορετικές μεταλλάξεις συνδέονται εντός του ίδιου γονιδιώματος. Οι συνδυασμοί μεταλλάξεων στο ίδιο γονιδίωμα (αστερισμός μεταλλάξεων) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ιολογία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένες από τις αντικαταστάσεις που επηρεάζουν τα λειτουργικά στοιχεία μπορεί να αντισταθμιστούν από μεταλλάξεις σε άλλα μέρη του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα το ιικό RNA ή η πρωτεΐνη να διατηρείται λειτουργικά, αν και μπορεί, για παράδειγμα, να μειωθεί η ευαισθησία στο αντιγόνο ή να τροποποιηθούν οι αντιγονικές ιδιότητες που αναγνωρίζονται από την επίκτητη ανοσολογική απόκριση.

Η αλληλούχηση τρίτης γενιάς (TGS), γνωστή και ως αλληλούχηση μακράς ανάγνωσης, έχει το μεγάλο πλεονέκτημα να αναφέρει μεγάλες και εξαιρετικά μεγάλες αναγνώσεις, με εκατοντάδες kilobases σε μία μόνο ανάγνωση σε εξαιρετικά μεγάλες αναγνώσεις, ακόμη και κοντά στο 1 εκατομμύριο αναγνώσεις ζευγών βάσεων. Το TGS επιτυγχάνεται μέσω της τεχνολογίας ενός μορίου σε πραγματικό χρόνο (SMRT) (Pacific Biosciences, ΗΠΑ) και της τεχνολογίας νανοπόρων που παρέχεται από την Oxford Nanopore Technology (Οξφόρδη, Ηνωμένο Βασίλειο), την Quantapore Inc. (San Francisco, CA, ΗΠΑ) και τη Stratos (Roche, ΗΠΑ), οι οποίες βασικά συνίστανται στη διέλευση ενός μορίου DNA ή ενός υποκατάστατου DNA μέσω ενός νανοπόρου

και στη συνέχεια στη μέτρηση των αλλαγών του ηλεκτρικού πεδίου. Ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα του TGS, μετά από 20 χρόνια αλληλούχησης, ήταν η τελική αλληλουχία ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος από άκρο σε άκρο, ένα άλλο είναι η άμεση αλληλούχηση του γονιδιώματος RNA του ιού της γρίπης Α, επιτρέποντας έτσι σε κάποιον να αναφέρει πληροφορίες σχετικά με τις τροποποιήσεις του RNA, καθώς και την άμεση ανίχνευση μεθυλίωσης του DNA λόγω του διακριτικού σήματος από τις άλλες τέσσερις νουκλεοτιδικές βάσεις [47].

Μειονεκτήματα του TGS (NNGS) είναι τα σφάλματα συστηματικής αλληλουχίας λόγω προβλημάτων στη συνοχή των ηλεκτρικών σημάτων, οι δυσκολίες στην απόκτηση πολλαπλών επικαλυπτόμενων αναγνώσεων, η μεγάλη ποσότητα γενετικού υλικού που απαιτείται για την άμεση αλληλούχηση και η χαμηλή απόδοση. Ωστόσο, οι συνεχείς βελτιώσεις προμηνύουν ένα λαμπρό μέλλον για αυτήν την τεχνολογία για την έρευνα και τη διάγνωση στον τομέα των γενετικών μελετών και των μελετών μολυσματικών ασθενειών.

## 5. Ανοσολογικές Διαγνωστικές Τεχνικές Ανίχνευσης Ιών

Ο χημικός κλάδος του ανοσοποιητικού συστήματος παράγει αντισώματα ως απόκριση σε ιογενείς λοιμώξεις. Αυτή η φυσική αντίδραση του ανθρώπινου σώματος κατά της ιογενούς λοίμωξης χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη ανοσολογικών διαγνωστικών μεθόδων. Διάφορες ανοσολογικές διαγνωστικές τεχνικές είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων του ανθρώπου σε κλινικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένης της ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής δοκιμασίας (ELISA), της Western blotting, της δοκιμασίας ανοσοφθορισμού (IFA) και της δοκιμασίας αναστολής της αιμοσυγκόλλησης. Οι αρχές αυτών των δοκιμασιών βασίζονται στο σχηματισμό συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος και αποτελούνται από κλινικά δείγματα, ολόκληρο ιό ή ιικό αντιγόνο και έναν δείκτη [54].

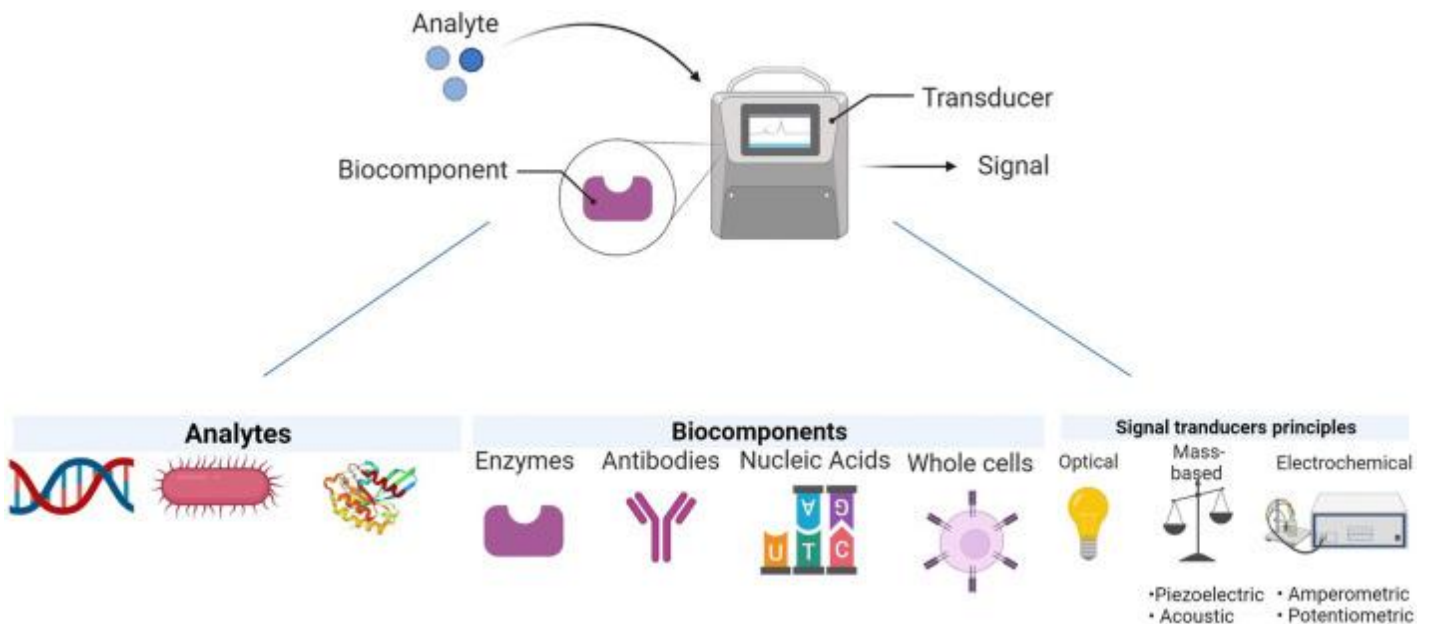
### 5.1 Ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA)

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) είναι η βιοχημική δοκιμασία που χρησιμοποιείται συνήθως για την εύρεση ιογενούς λοίμωξης μέσα σε δείγματα. Όπου τα ενζυμικά συνδεδεμένα αντισώματα χρησιμοποιούνται για να βρουν το συγκεκριμένο αντιικό αντίσωμα ή ιικό αντιγόνο σε ανθρώπινα δείγματα. Η αρχή είναι ότι το συγκεκριμένο αντίσωμα δεσμεύεται με το αντιγόνο-στόχο και η ποσότητα δέσμευσης ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός άχρωμου χρωμογόνου υποστρώματος που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολύχρωμου προϊόντος. Δεν δημιουργείται χρώμα στο κλινικό δείγμα όταν δεν υπάρχει αντιγόνο ή αντίσωμα και η ένταση του χρώματος είναι ίση με την ποσότητα αντιγόνου-αντισώματος που σχηματίζεται [54]. Ένα φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της μετατόπισης χρώματος. Οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει διάφορους τύπους ELISA, μεταξύ των οποίων υπάρχουν δύο σημαντικοί τύποι ELISA.

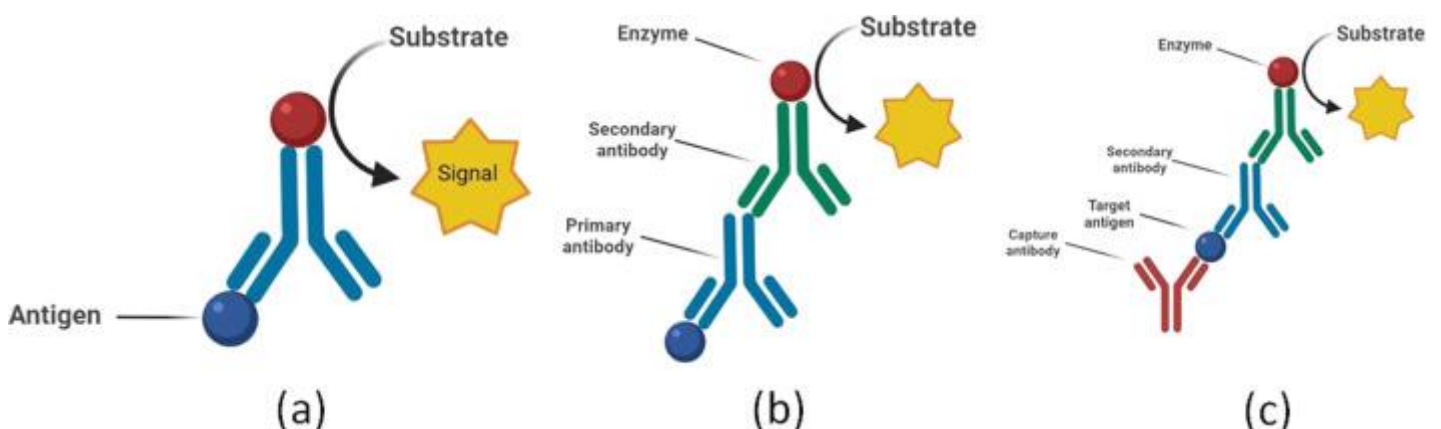
1. Η τύπου “Sandwich” ELISA ή αλλιώς μη συναγωνιστικού τύπου.
2. Η έμμεση ή συναγωνιστικού τύπου ELISA.

Στην σάντουιτς ELISA υπάρχουν δύο αντισώματα. Το ένα είναι ένα αντίσωμα σύλληψης και το άλλο είναι ένα αντίσωμα ανίχνευσης. Το αντιγόνο που θέλουμε να μάθουμε είναι δεσμευμένο μεταξύ του αντισώματος σύλληψης και του αντισώματος ανίχνευσης, επομένως αυτή η μέθοδος είναι γνωστή ως αντίσωμα σάντουιτς. Το αντίσωμα σύλληψης προσκολλάται στην επιφάνεια και το αντίσωμα ανίχνευσης που είναι συζευγμένο με οποιαδήποτε ετικέτα ενζύμου ή φθοροφόρου χρησιμοποιείται στο τελευταίο μόνο και μόνο λόγω της ποσοτικοποίησης.

Η έμμεση ELISA είναι μια διαδικασία δύο σταδίων δέσμευσης πρωτογενούς αντισώματος και επισημασμένου δευτερογενούς αντισώματος. Πρώτα η επώαση του πρωτογενούς αντισώματος με αντιγόνο και στη συνέχεια η επώαση με δευτερογενές αντίσωμα. Αυτό, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικά σήματα λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων που προκαλούνται από το δευτερεύον αντίσωμα.



Εικόνα 5.1.1, Διαγραμματική παρουσίαση του Βιοαισθητήρα. Η αναλυτέα ουσία που θα μπορούσε να είναι οτιδήποτε σωστό από ένζυμο, αντισώματα, νουκλεϊνικά οξέα ή ακόμα και ολόκληρα κύτταρα, όταν συνδέεται με το βιοσυστατικό, ανιχνεύεται από τον μορφοτροπέα με βάση έναν οπτικό, με βάση τη μάζα, ηλεκτροχημικό μηχανισμό και στέλνει ένα σήμα που θα μπορούσε να αναλυθεί περαιτέρω για τη διάγνωση της παρουσίας ενός ιικού σωματιδίου στο σώμα.



Εικόνα 5.1.2, α Άμεση ELISA, β Έμμεση ELISA, γ Σάντουιτς ELISA

Η ELISA είναι απλή στη χρήση, ευαίσθητη και συγκεκριμένη και παράγει δεδομένα γρήγορα. Το τεστ δημιουργήθηκε ως αποτέλεσμα και χρησιμοποιείται πλέον ευρέως

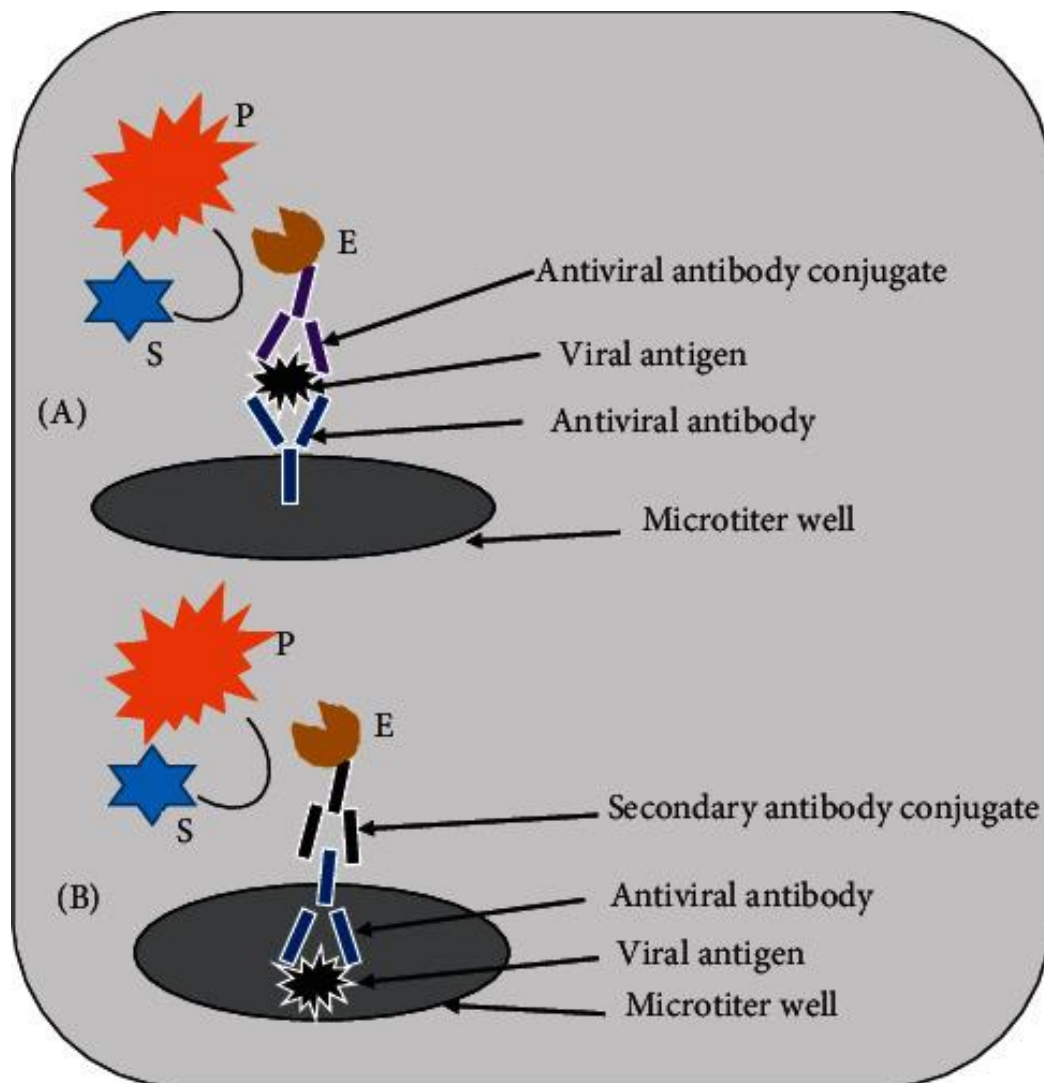
για τον εντοπισμό και την οροεπιτήρηση των ανθρώπινων ιογενών λοιμώξεων. Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως πρόσφατα για την ανίχνευση αντισωμάτων SARS-CoV-2 IgM ή IgG μέσα σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Η ELISA χρησιμοποιείται επίσης για την ανίχνευση του ιού Έμπολα, του ιού HSV-2, του SARS-CoV, του ιού της ηπατίτιδας, του ιού της ευλογιάς των πιθήκων.

Στην ELISA, το συζευγμένο με ένζυμο αντίσωμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ειδικού αντιϊκού αντισώματος ή ιικού αντιγόνου σε ανθρώπινα δείγματα. Σε θετικό δείγμα, η αντίδραση μεταξύ ενός ενζύμου συζευγμένου με ένα αντίσωμα και ενός άχρωμου χρωμογόνου υποστρώματος οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολύχρωμου προϊόντος. Ελλείπει αντιγόνου/αντισώματος στο κλινικό δείγμα, δεν παράγεται χρώμα. Η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος που σχηματίζεται. Η αλλαγή χρώματος μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι ή να διαβαστεί από ένα φασματοφωτόμετρο, το οποίο μπορεί να μετρήσει την απορρόφηση. Αρκετά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της αλκαλικής φωσφατάσης, της υπεροξειδάσης χρένου (HRP) και της β-γαλακτοσιδάσης, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ELISA. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της ELISA, αλλά οι δύο κύριοι τύποι είναι η ELISA σύλληψης αντιγόνου (ονομάζεται επίσης ELISA σάντουιτς) και η ELISA σύλληψης αντισωμάτων (ονομάζεται επίσης έμμεση ELISA) [19, 132]. Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 4, η πρώτη μέθοδος ανιχνεύει ιικό αντιγόνο ακινητοποιώντας αντίσωμα ειδικό για την ιική πρωτεΐνη που ενδιαφέρει σε ένα φρεάτιο μικροτιτλοδότησης [22]; Η δεύτερη τεχνική ανιχνεύει αντιικό αντίσωμα σε δείγμα ασθενούς επικαλύπτοντας ολόκληρο τον ιό ή την ιική πρωτεΐνη σε φρεάτιο μικροτιτλοδότησης [55].

Η ELISA είναι ευαίσθητη τεχνική, εύκολη στην εκτέλεση και έχει σύντομο χρόνο παράδοσης αποτελεσμάτων. Κατά συνέπεια, η δοκιμασία έχει αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την ανίχνευση και οροεπιτήρηση ανθρώπινων ιογενών παθογόνων. Πρόσφατα, οι Adams et al. ανέπτυξαν ELISA σύλληψης αντισωμάτων για την ανίχνευση SARS-CoV-2 IgM ή IgG σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος. Η δοκιμασία δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας 40 δείγματα πλάσματος από ασθενείς με λοίμωξη από RT-PCR SARS-CoV-2 και 50 δείγματα πλάσματος από υγιή μάρτυρα. Επέδειξε συνολική ευαισθησία 85%, σε σύγκριση με την RT-PCR και ειδικότητα 100% στην ανίχνευση αντι-SARS-CoV-2 IgG ή IgM σε δείγματα πλάσματος. Αυτή η δοκιμασία ανίχνευσε επίπεδα IgG σε όλα τα θετικά άτομα RT-PCR από  $\geq 10$  ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων με ευαισθησία 100%. Ομοίως, οι Colavita et al. ανέπτυξαν ELISA σύλληψης αντισωμάτων για την ανίχνευση αντι-SARS-CoV-2 IgG, IgM και IgA σε δείγματα ορού. Η δοκιμασία επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας 553 δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από ύποπτες και επιβεβαιωμένες περιπτώσεις μόλυνσης από SARS-CoV-2, υγιείς δότες και ασθενείς θετικούς για άλλες λοιμώξεις ή αυτοάνοσες καταστάσεις. Η δοκιμασία έδειξε συνολική ευαισθησία 91,7% και 97,9% για την ανίχνευση IgG και IgA σε δείγμα ορού, αντίστοιχα, και ειδικότητα  $>96\%$  για όλους τους τύπους αντισωμάτων, σε σύγκριση με τη δοκιμή αναφοράς IFA. Οι Chen et al.



ανέπτυξαν επίσης ELISA σύλληψης αντιγόνου για την ανίχνευση του MERS-CoV σε κλινικά δείγματα. Η δοκιμασία έδειξε LoD <1 ng ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου MERS-CoV/ml και ειδικότητα 100%. Η ELISA σύλληψης αντιγόνου αναπτύχθηκε για την ταχεία ανίχνευση του ιού του δάγκειου πυρετού NS1 και τη διαφοροποίηση των οροτύπων DENV σε ανθρώπινα δείγματα. Η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμής ήταν 84,85% και 100%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την RT-qPCR, και τα ποσοστά ευαισθησίας για τον ορότυπο ήταν 88,2%, 94,7%, 75% και 66,6% για τον ορότυπο DENV 1 (DENV1), DENV2, DENV3 και DENV4, αντίστοιχα, χωρίς διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των οροτύπων. Η ELISA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση πολλών άλλων ιατρικών ιών, συμπεριλαμβανομένων των ιών Ebola, HSV-2, SARS-CoV, ιών ηπατίτιδας, ιού γρίπης H5N1 και ZIKV [2].



Εικόνα 5.1.3 , Διάγραμμα των δύο αρχών της ELISA. Α) Σάντουιτς ELISA. Β) έμμεση ELISA. Συντομογραφίες: E, ένζυμο· S, υπόστρωμα; P, προϊόν.

Διατίθεται εμπορικό κιτ δοκιμής με βάση την ELISA σύλληψης αντισωμάτων (Anti-ZIKV IgA, IgG ή IgM ELISA), που αναπτύχθηκε από την Euroimmun AG (Γερμανία), για οροδιάγνωση οξέων και προηγούμενων λοιμώξεων ZIKV. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένο αντιγόνο NS1 ειδικό για ZIKV. Η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας είναι 100% και 94%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την RT-PCR. Η Creative Diagnostics (ΗΠΑ) ανέπτυξε επίσης εμπορικό κιτ με βάση το σάντουιτς ELISA (κιτ HIV 1 και 2 Ag / Ab ELISA) για τον ποιοτικό προσδιορισμό αντιγόνων ή αντισωμάτων έναντι του HIV-1 και του HIV-2 σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένα αντιγόνα HIV (HIV-1 γλυκοπρωτεΐνη (gp) 41, gp120 και HIV-2 gp36) και αντισώματα αντι-HIV ιικής πρωτεΐνης p24. Το LoD της δοκιμασίας για την ανίχνευση του αντιγόνου HIV p24 είναι περίπου 1pg/ml. Επιπλέον, η Bio-Rad (Γαλλία) ανέπτυξε το εμπορικό κιτ NS1 Ag capture ELISA (Platelia Dengue NS1 Ag) για την ποιοτική ή ημιποσοτική ανίχνευση του αντιγόνου NS1 του ιού του δάγκειου πυρετού σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί αντι-NS1 μονοκλωνικό αντίσωμα (Mab) ως αντίσωμα σύλληψης και συζευγμένο αντι-NS1 Mab-HRP ως αντίσωμα ανίχνευσης. Τα ποσοστά ευαισθησίας της δοκιμασίας που σχετίζονται με τον ορότυπο του ιού είναι 88,9%, 87,1%, 100% και 93,3% για τους DENV1, DENV2, DENV3 και DENV4, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την RT-PCR, και η ειδικότητα της δοκιμασίας είναι 100% για όλους τους ορότυπους. Πρόσφατα, η Euroimmun AG (Γερμανία) ανέπτυξε κιτ με βάση τη σύλληψη αντισωμάτων ELISA (Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG) για ποιοτική ανίχνευση IgG σε SARS-CoV-2 σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος.

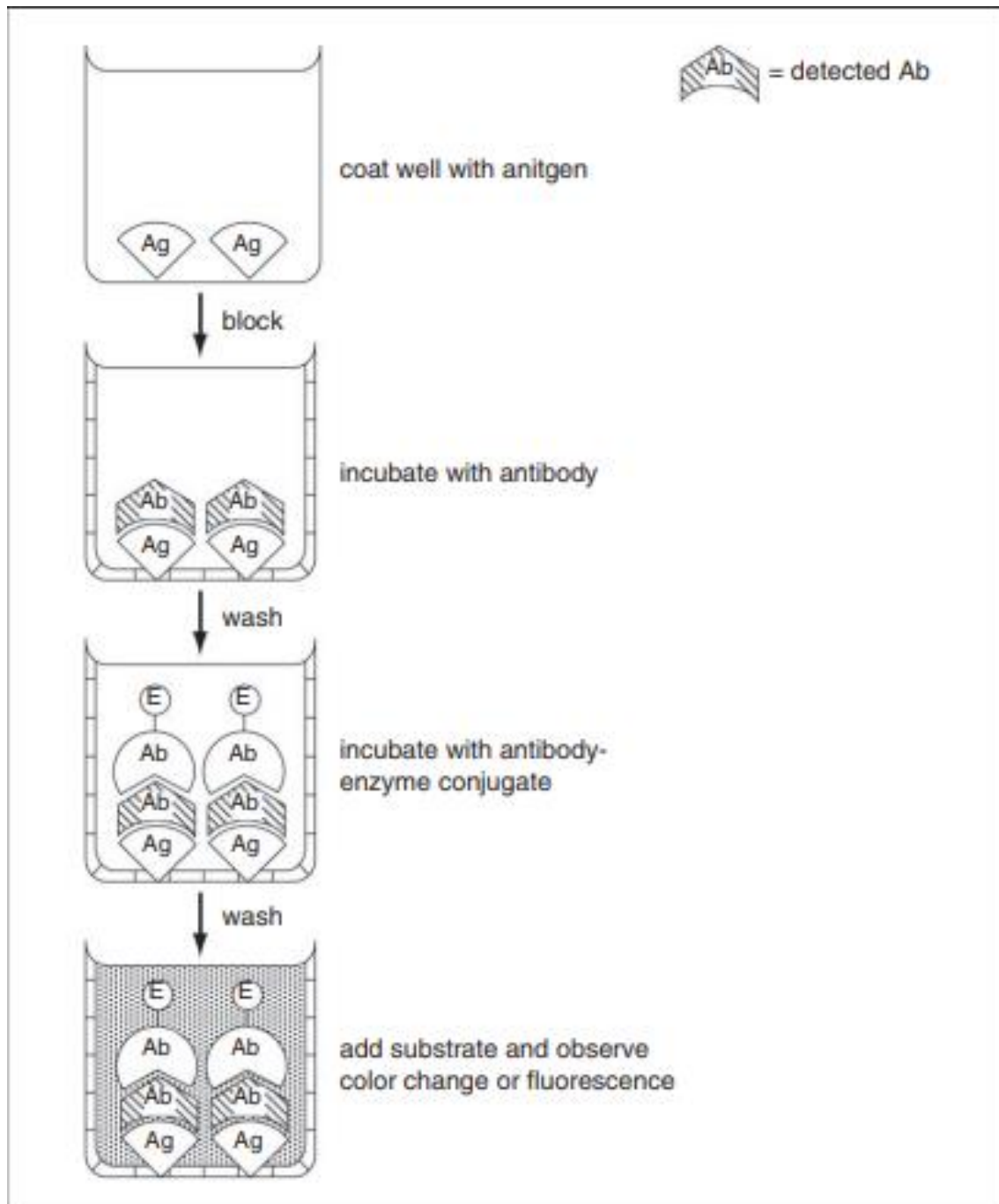
Η δοκιμασία χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη S1 του SARS-CoV-2 ως αντιγόνο σύλληψης. Η δοκιμασία έχει λάβει EUA από το FDA των ΗΠΑ για χρήση σε εξουσιοδοτημένα εργαστήρια. Η εκτιμώμενη ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας είναι 90% και 100%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη δοκιμή ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων. Η Eritope Diagnostics, Inc. (ΗΠΑ) έχει επίσης αναπτύξει δύο τύπους κιτ ELISA (COVID-19 IgG ELISA και COVID-19 IgM ELISA Kits) για την ανίχνευση αντι-SARS-CoV-2 IgG και IgM σε δείγματα ανθρώπινου ορού, αντίστοιχα. Το κιτ COVID-19 IgG ELISA χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένο αντιγόνο SARS-CoV-2 και αντι-ανθρώπινο αντίσωμα IgG επισημασμένο με HRP. Το COVID-19 IgM ELISA χρησιμοποιεί αντι-ανθρώπινο αντίσωμα IgM και HRP επισημασμένο ανασυνδυασμένο αντιγόνο SARS-CoV-2. Οι δοκιμασίες έχουν LoD 5IU/ml. Τα κιτ έχουν εγκριθεί από το FDA για κλινική και ερευνητική χρήση [2].

**Πίνακας 5.1.1, Περίληψη των πρωτοκόλλων ELISA**

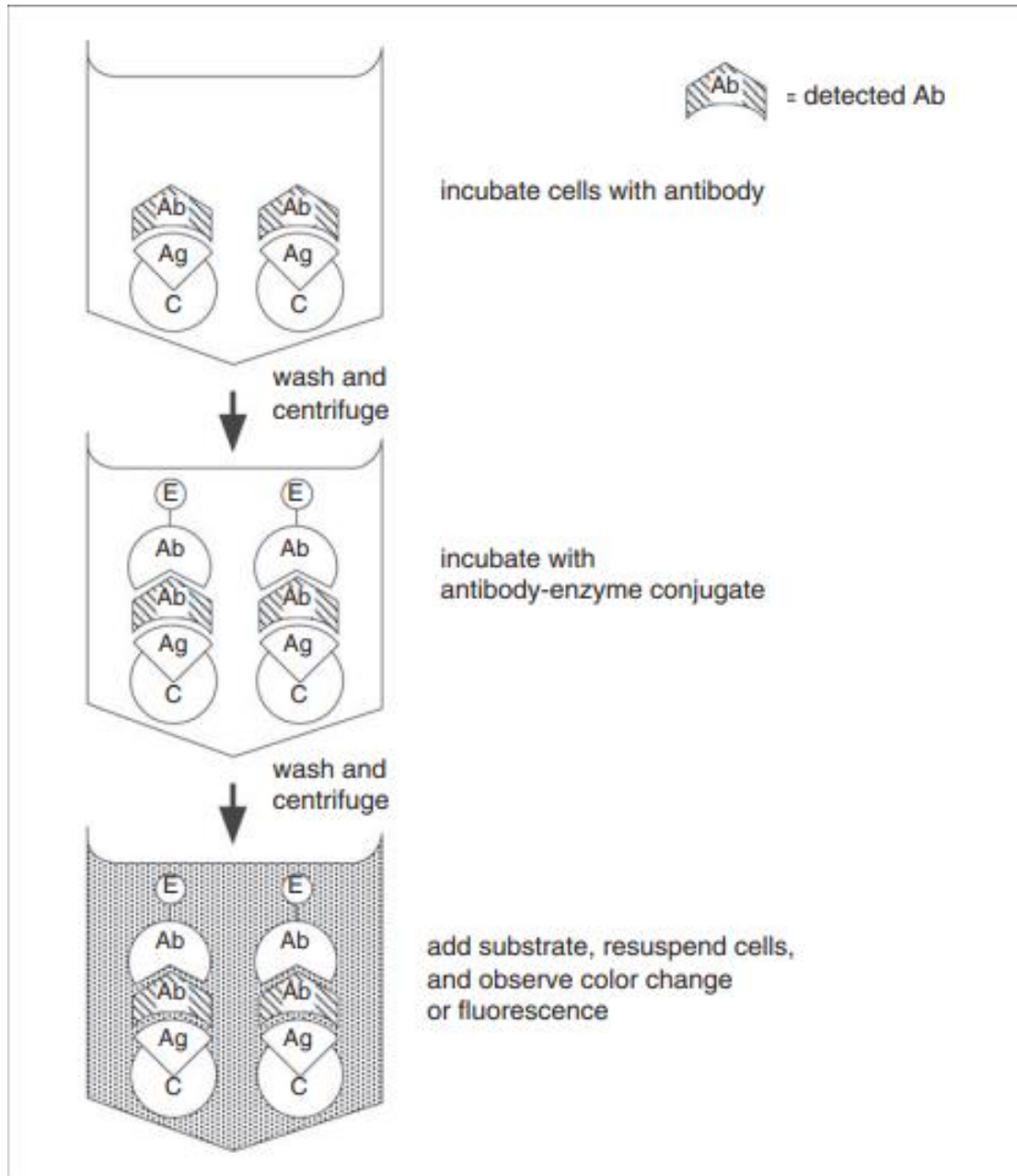
Πρωτόκολλο ELISA	Χρήσεις	Απαιτούμενα αντιδραστήρια	Σχόλια
<b>Έμμεση</b>	Έλεγχος αντισωμάτων; χαρτογράφηση επιτόπων	Αντιγόνο, καθαρό ή ημικαθαρό: διάλυμα δοκιμής που περιέχει αντίσωμα-συζευγμένο ένζυμο που δεσμεύει Ig ανοσοποιημένων ειδών	Δεν απαιτεί τη χρήση προϋπαρχόντων ειδικών αντισωμάτων. απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες αντιγόνου
<b>Άμεση ανταγωνιστική</b>	Έλεγχος αντιγόνου. ανίχνευση διαλυτού αντιγόνου	Αντιγόνο, καθαρό ή ημικαθαρό διάλυμα δοκιμής που περιέχει αντιγόνο. συζευγμένο ένζυμο-αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο	Ταχεία δοκιμασία με δύο μόνο βήματα. Εξαιρετικό για τη μέτρηση της αντιγονικής διασταυρούμενης αντιδραστικότητας
<b>Αντίσωμα-σάντουιτς</b>	Έλεγχος αντιγόνου. ανίχνευση διαλυτού αντιγόνου	Αντίσωμα σύλληψης (κεκαθαρισμένο ή ημικαθαρισμένο ειδικό αντίσωμα, διάλυμα δοκιμής που περιέχει αντιγόνο, συζευγμένο ένζυμο-αντίσωμα ειδικό για αντιγόνο	Πιο ευαίσθητη δοκιμασία αντιγόνου. απαιτεί σχετικά μεγάλες ποσότητες καθαρού ή ημι-καθαρού ειδικού αντισώματος (αντίσωμα σύλληψης)
<b>Διπλό αντίσωμα-σάντουιτς</b>	Έλεγχος αντισωμάτων; χαρτογράφηση επιτόπων	Αντίσωμα σύλληψης: (ειδικό για Ig ανοσοποιημένων ειδών). Διάλυμα δοκιμής που περιέχει συζευγμένο ένζυμο-αντίσωμα αντιγόνου ειδικό για αντιγόνο	Δεν απαιτεί καθαρισμένο αντιγόνο. σχετικά μεγάλη δοκιμασία με πέντε βήματα
<b>Άμεση κυψελοειδής</b>	Κύτταρα οθόνης για έκφραση αντιγόνου. Μέτρηση κυτταρικής έκφρασης αντιγόνου	Κύτταρα που εκφράζουν αντιγόνο ενδιαφέροντος. σύζευξη ενζύμου - αντισώματος ειδικό για κυτταρικό αντιγόνο	Ευαίσθητη δοκιμασία για μαζικό έλεγχο. μη ευαίσθητο στην ετερογένεια της έκφρασης σε μικτό πληθυσμό κυττάρων
<b>Έμμεση κυτταρική</b>	Έλεγχος αντισώματα κυτταρικών αντιγόνων	Κύτταρα που χρησιμοποιούνται για την ανοσοποίηση; διάλυμα δοκιμής που περιέχει αντισώματα· συζευγμένο ένζυμο που δεσμεύει Ig ανοσοποιημένων ειδών	Μπορεί να μην ανιχνεύσει αντισώματα ειδικά για κυτταρικά αντιγόνα εκφρασμένα σε χαμηλή πυκνότητα

Αυτή η ενότητα αναλύει έξι διαφορετικά συστήματα ELISA που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων, διαλυτών αντιγόνων ή αντιγόνων που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Σε όλα τα συστήματα, τα διαλυτά

αντιδρώντα απομακρύνονται από το διάλυμα μετά από την ειδική τους σύνδεση με αντιδρώντα στερεάς φάσης. Ο πίνακας παρακάτω συνοψίζει τα διάφορα πρωτόκολλα ELISA, τα οποία απεικονίζονται στις αντίστοιχες εικόνες. Στα πρώτα τέσσερα πρωτόκολλα, τα αντιδρώντα στερεάς φάσης παρασκευάζονται με προσρόφηση αντιγόνου ή αντισώματος σε πλαστικές πλάκες μικροτιτλοδότησης. Στα επόμενα δύο πρωτόκολλα, τα στερεά αντιδραστήρια είναι μόρια που σχετίζονται με τα κύτταρα. Σε όλα τα πρωτόκολλα, τα στερεά αντιδραστήρια επωάζονται με δευτερεύοντα ή τριτοταγή αντιδραστήρια που είναι ομοιοπολικά συζευγμένα με ένα ένζυμο. Τα μη δεσμευμένα συζεύγματα ξεπλένονται και προστίθεται ένα χρωμογενές ή φθορογόνο υπόστρωμα. Καθώς το υπόστρωμα υδρολύεται από το συζευγμένο ένζυμο, παράγεται ένα έγχρωμο ή φθορίζον προϊόν. Στη συνέχεια, το προϊόν ανιχνεύεται είτε οπτικά είτε με τη βοήθεια συσκευής ανάγνωσης πλάκας μικροτιτλοδότη. Η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα της ανάλυσης στο δοκιμαστικό μείγμα. Το πρώτο πρωτόκολλο υποστήριξης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση διαφόρων τύπων ELISA. Το δεύτερο πρωτόκολλο υποστήριξης περιγράφει μια μέθοδο για την παρασκευή συζευγμάτων αλκαλικής φωσφατάσης.



Εικόνα 5.1.4, Έμμεση ELISA για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων. Ag = αντιγόνο, Ab = αντίσωμα. E = ένζυμο.



Εικόνα 5.1.5 , Έμμεση κυτταρική ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων ειδικών για επιφανειακά αντιγόνα. Ab = αντίσωμα, E = ένζυμο, C = κύτταρο.

Οι ευαίσθητες ELISA απαιτούν αντισώματα υψηλής συγγένειας και υψηλής ειδικότητας. Δεδομένου ότι η ευαισθησία μιας ELISA εξαρτάται από τη συγγένεια των εμπλεκόμενων αντισωμάτων, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αντισώματα με τις υψηλότερες συγγένειες κατά τη ρύθμιση των ELISA. Τα αντισώματα θα πρέπει να ελέγχονται για ανεπιθύμητες διασταυρούμενες αντιδράσεις. Για παράδειγμα, τα αντισώματα σύλληψης δεν πρέπει να δεσμεύουν συζευγμένα αντισώματα και αντίστροφα. Υπάρχουν πολλές εμπορικές πηγές



αξιόπιστων αντιδραστηρίων. Ο Κατάλογος Ανοσολογικών και Βιολογικών Αντιδραστηρίων του Linscott, είναι ένα εξαιρετικό βιβλίο πηγής για τον εντοπισμό αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται σε ELISA. Εάν τα αντιδραστήρια από μια πηγή είναι ανεπαρκή, δοκιμάστε μια άλλη.

Κατά την επικάλυψη των πλακών με αντιγόνο, το παρασκεύασμα αντιγόνου δεν χρειάζεται να είναι καθαρό, αλλά πρέπει γενικά να περιλαμβάνει το >3% της πρωτεΐνης στο διάλυμα επικάλυψης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αραίωση του διαλύματος αντιγόνου με BSA έχει βελτιώσει σημαντικά την ευαισθησία της ELISA (Jitsukawa et al., 1989). Όλα τα στάδια μετά την επικάλυψη των πλακών μικροτιτλοδότησης πρέπει να διεξάγονται σε διαλύματα που περιέχουν 0,05% Tween 20 και πρωτεΐνη-φορέα (0,25% BSA ή ζελατίνη).

Κατά τη χρήση ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεντρώσεων αντιγόνου ή αντισωμάτων, θα πρέπει να ακολουθούνται τέσσερις κατευθυντήριες γραμμές. Πρώτον, είναι σημαντικό όλες οι πειραματικές συνθήκες μέχρι την τελική πλύση μετά την επώαση με συζευγμένο - συμπεριλαμβανομένων των χρόνων επώασης, των χρόνων πλύσης, των συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων και της θερμοκρασίας - να διατηρούνται σταθερές μεταξύ των πειραμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε δοκιμασίες που χρησιμοποιούν πολυσθενή αντισώματα και πολύπλοκα μείγματα αντιγόνων. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις όλων των αντιδραστηρίων για κάθε σύστημα θα πρέπει να προσδιορίζονται σε ένα αρχικό πείραμα διασταυρούμενης σειριακής αραίωσης (βλέπε πρώτο πρωτόκολλο υποστήριξης). Δεύτερον, επειδή η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης και άλλων μικροπεριβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να διαφέρει από πλάκα σε πλάκα, θα πρέπει να περιλαμβάνεται μια τυποποιημένη καμπύλη σε κάθε πλάκα. Τρίτον, όλα τα δείγματα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον εις διπλούν. Τέταρτον, η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου που προσδιορίζεται ποσοτικά πρέπει να βρίσκεται εντός του δυναμικού εύρους της πρότυπης καμπύλης.

## 5.2 Ανάλυση Western Blotting

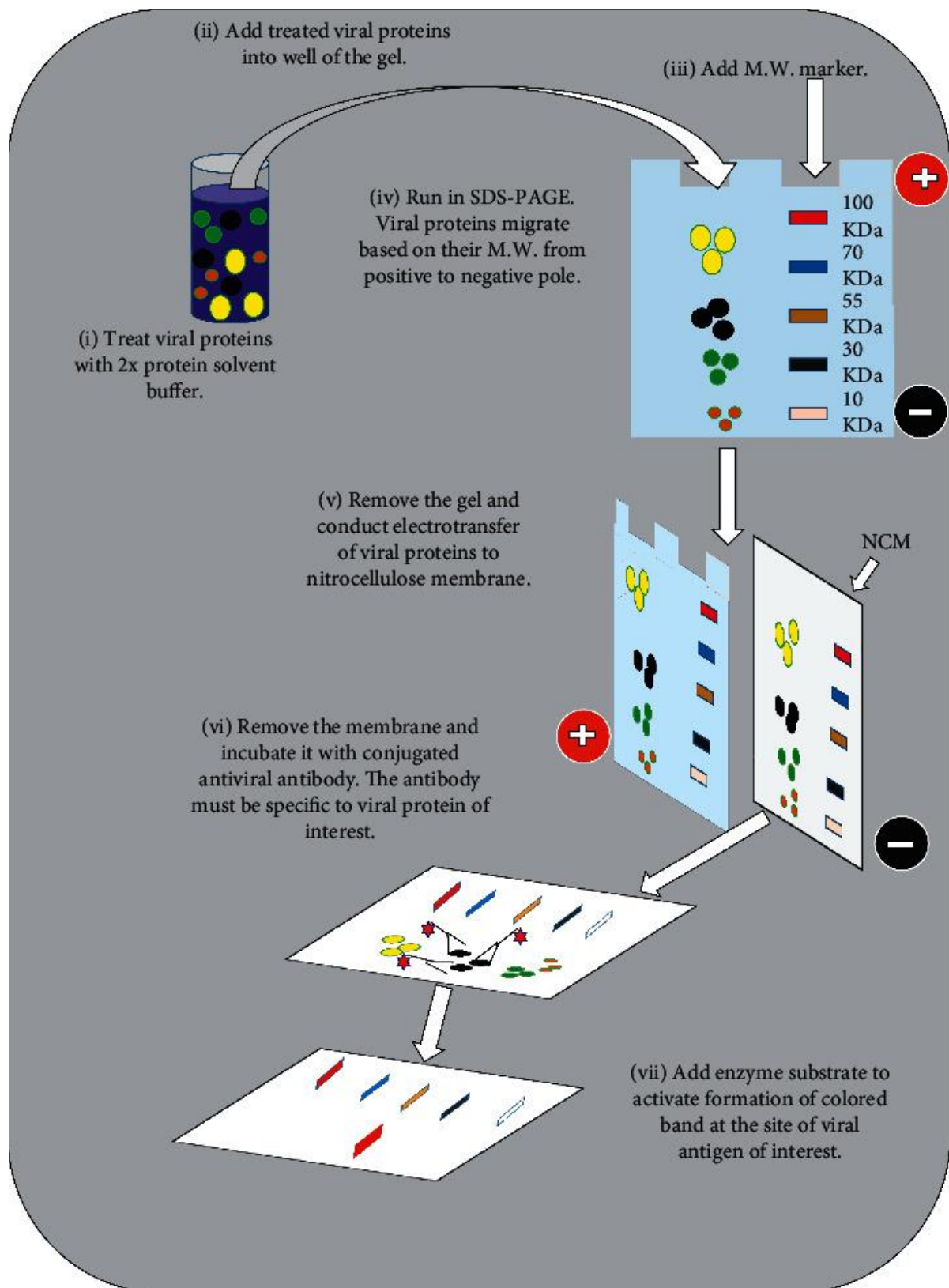
Η δοκιμασία Western blotting (επίσης γνωστή ως immunoblotting) ανιχνεύει ικές πρωτεΐνες ή αντιικά αντισώματα. Είναι μια πολύ ευαίσθητη και αποτελεσματική δοκιμασία για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό *in vivo* πρωτεϊνών που υπάρχουν σε μικρές ποσότητες, όπως οι πρωτεΐνες ρολογιού. Αποτελείται από τέσσερα μέρη: εκχύλιση δειγμάτων πρωτεΐνης, ηλεκτροφόρηση πήκτη, ηλεκτροκλήδα και ανίχνευση συγκεκριμένου αντιγόνου. Οι εκχυλισμένες πρωτεΐνες από τους ιστούς διαλύονται με μια μορφή ηλεκτροφόρησης πηκτής γνωστή ως ηλεκτροφόρηση

πηκτηής δωδεκυλοθειικού-πολυακρυλαμιδίου νατρίου, στην οποία οι πρωτεΐνες αναμιγνύονται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει SDS πριν από τη φόρτωση σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Το SDS δεσμεύει τις πρωτεΐνες και προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Επειδή το SDS δεσμεύει ομοιόμορφα τις πρωτεΐνες, οι περισσότερες πρωτεΐνες θα φορτιστούν αρνητικά ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα. Όταν ένα ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται σε μια μήτρα πηκτηής πολυακρυλαμιδίου, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μεταναστεύουν μέσω της μήτρας πηκτηής πολυακρυλαμιδίου προς την άνοδο. Επειδή το αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι περίπου ομοιόμορφο, ο ρυθμός μετανάστευσης των πρωτεϊνών θα εξαρτηθεί κυρίως από το μέγεθος των πρωτεϊνών. Έτσι, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με τη μοριακή τους μάζα. Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται από τη γέλη σε μια μεμβράνη με ηλεκτροκαθήλωση. Οι μεμβράνες πολυβινυλιδενοφθοριδίου και νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιούνται συχνότερα. Αν και κάθε μεμβράνη έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης είναι ευκολότερες στη χρήση και χρησιμοποιούνται συχνότερα σε εργαστήρια που μελετούν κίρκαδικά ρολόγια. Η ηλεκτροκλήδωση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας είτε σύστημα υγρής μεταφοράς είτε ημίξηρο σύστημα μεταφοράς. Το ημίξηρο σύστημα απαιτεί λιγότερο χρόνο και αντιδραστήρια και παράγει αποτελέσματα συγκρίσιμα με το σύστημα υγρής μεταφοράς [56].

Το τελικό βήμα της δοκιμασίας Western blotting είναι η ανίχνευση ενός συγκεκριμένου αντιγόνου ακινητοποιημένου στη μεμβράνη χρησιμοποιώντας πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα και ένα αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας. Το αντιγόνο αναγνωρίζεται ειδικά και δεσμεύεται από ένα πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο επίσης συνδέεται ειδικά με ένα δευτερεύον αντίσωμα. Το δευτερεύον αντίσωμα συζεύγνυται με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου, το οποίο καταλύει μια αντίδραση με ένα αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας για την παραγωγή φωτός. Η έξοδος φωτός μπορεί να απεικονιστεί σε φιλμ ή από σύστημα απεικόνισης συσκευής συζευγμένου φορτίου [55].

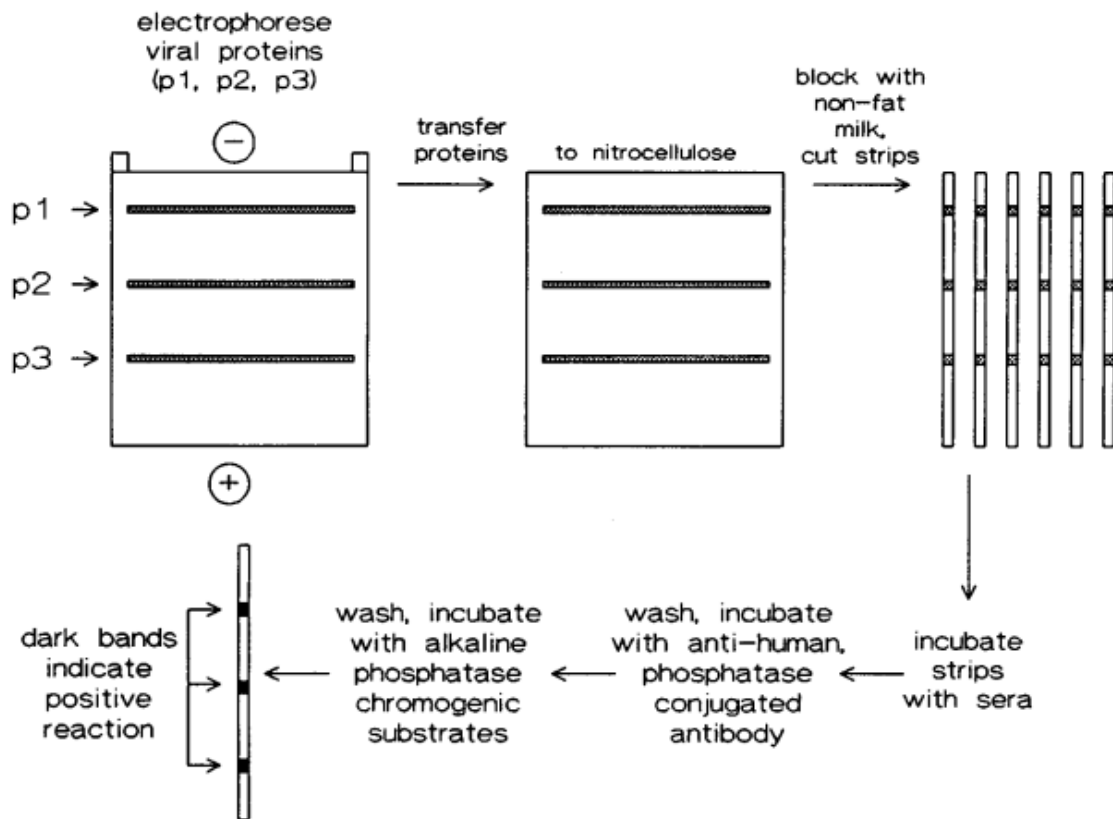
Σε συνδυασμό με άλλες βιοχημικές τεχνικές, η Western blotting μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μοριακών ποσοτήτων, μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, χρόνου ημίσειας ζωής και άλλων ιδιοτήτων των πρωτεϊνών ρολογιού (1-3). Για την ανίχνευση ικών πρωτεϊνών, οι μετουσιωμένες ολόκληρες ικές πρωτεΐνες διαχωρίζονται πρώτα με ηλεκτροφόρηση πηκτηής δωδεκυλοθειικού-πολυακρυλαμιδίου νατρίου (SDS-PAGE). Οι ικές πρωτεΐνες στη συνέχεια ηλεκτρομεταφέρονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη στη συνέχεια επωάζεται με ενζυμικά συζευγμένα αντισώματα ειδικά για τις ικές πρωτεΐνες. Εάν οι ικές πρωτεΐνες δεσμεύονται από ενζυμικά επισημασμένα αντισώματα, η προσθήκη ενός χρωμογόνου υποστρώματος οδηγεί στο σχηματισμό χρωματιστών ζωνών στις θέσεις των ικών αντιγόνων (Σχήμα ). Για την ανίχνευση αντιικών αντισωμάτων, οι ικές ειδικές μετουσιωμένες πρωτεΐνες στυπώνονται ηλεκτροφορητικά στη μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης αφού υποβληθούν σε SDS-PAGE. Η μεμβράνη στη συνέχεια επωάζεται με ορό ασθενούς. Εάν ο ορός του ασθενούς περιέχει αντισώματα έναντι των ικών πρωτεϊνών, θα συνδεθούν με τις συγκεκριμένες ικές πρωτεΐνες τους. Η προσθήκη ενζυμικού συζευγμένου δευτερογενούς αντιανθρώπινου αντισώματος και χρωμογόνου υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χρωματιστών ζωνών στις θέσεις των ικών πρωτεϊνών [5].



Εικόνα 5.2.1, Σχηματική ανάλυση ανοσοκλιμάκας ιικής πρωτεΐνης. Συνοτομογραφίες: M.W., μοριακό βάρος. SDS-PAGE, ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμίδιου. NCM, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Το Immunoblotting έχει χρησιμοποιηθεί στην κλινική διάγνωση για ορολογική επιτήρηση και ως επιβεβαιωτική εξέταση για ανθρώπινη ιογενή λοίμωξη. Οι He et al [143] ανέπτυξαν μια μέθοδο Western blotting για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του SARS-CoV σε δείγματα ανθρώπινου ορού. Η δοκιμασία έδειξε ευαισθησία 98,3% και ειδικότητα 90,9%, σε σύγκριση με την IFA. Η δοκιμασία Western blotting χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού Chikungunya στον ανθρώπινο ορό. Ευαισθησία 83,3% και ειδικότητα 96,7% καταδείχθηκαν από τη δοκιμασία χρησιμοποιώντας 30 ορούς από επιβεβαιωμένο ασθενή με λοίμωξη από τον ιό Chikungunya και 30 φυσιολογικούς ορούς. Σε μια μελέτη, η Western blotting ήταν μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την επιτήρηση της λοίμωξης HIV-1 σε περιοχές με περιορισμένους πόρους [5]. Η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση και επιβεβαίωση λοιμώξεων από HCV και HIV. Η δυτική δοκιμασία στίγματος είναι επίσης διαθέσιμη στο εμπόριο. Για παράδειγμα, η J. Mitra and Co. Pvt. Ltd (Βομβάη, Ινδία) ανέπτυξε εμπορικό κιτ (HIV 1 και HIV 2 western blot) για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του HIV-1 και του HIV-2 σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί προκληλιδωμένες ταινίες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διαχωρισμένο ιικό προϊόν λύσης HIV-1 και αντιγόνο HIV-2 (gp36). Η δοκιμασία έχει 100% ευαισθησία και ειδικότητα 100% σε σύγκριση με την αδειοδοτημένη δοκιμή western blot. Το κιτ GS HIV-1 Western Blot για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του HIV-1 σε ανθρώπινο ορό, πλάσμα ή αίμα, είναι επίσης διαθέσιμο που αναπτύχθηκε από τα εργαστήρια Bio-Rad (Redmond, ΗΠΑ). Η δοκιμασία χρησιμοποιεί ταινίες μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διαχωρισμένες ιικές πρωτεΐνες HIV-1. Η δοκιμασία έχει 100% ευαισθησία και ειδικότητα 87,2%, σε σύγκριση με την εγκεκριμένη δοκιμή HIV-1 western blot.



Εικόνα 5.2.2, Σχηματική αναπαράσταση του Western blotting.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές στυπώματος. Η αρχικά περιγραφείσα τεχνική αναφέρεται ως Southern blotting, από τον δημιουργό της, E. M. Southern (1975). Είναι ένα θεμελιώδες εργαλείο για την ανάλυση θραυσμάτων DNA. Μια ανάλογη μέθοδος για την ανάλυση των RNAs ονομάστηκε Northern blotting (Alwine et al., 1977) ως αστείο μοριακού βιολόγου. Το χιούμορ συνεχίστηκε όταν αναπτύχθηκε μια τροποποίηση των μεθόδων σφράγισης νουκλεϊνικών οξέων για τη μελέτη των πρωτεϊνών και αναφέρεται ως Western blotting, πιο σωστά αποκαλούμενη ανοσοκαθήλωση (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)[57].

Αυτές οι διαφορετικές τεχνικές στυπώματος μοιράζονται μια κοινή αρχή. Σύνθετα μείγματα μακρομορίων (DNA, RNA ή πρωτεΐνη) διαχωρίζονται πρώτα ανάλογα με το μέγεθος σε ορθογώνιες πλάκες με τη χρήση ηλεκτροφόρησης. Μετά το διαχωρισμό, τα μόρια μεταφέρονται (σκουπίζονται) στην επιφάνεια μιας μεμβράνης και τα διαχωρισμένα και ακινητοποιημένα θραύσματα ή πρωτεΐνες νουκλεϊκού οξέος ανιχνεύονται ή/και ταυτοποιούνται στη μεμβράνη χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους μοριακούς ανιχνευτές. Για παράδειγμα, οι ιοί RNA μπορούν να ανιχνευθούν με ραδιενεργούς ανιχνευτές cDNA. Το δεσμευμένο RNA υβριδοποιείται in situ με τον επισημασμένο καθετήρα και η αντίδραση στη συνέχεια απεικονίζεται με



αυτοακτινογραφία (Alwine et al., 1977). Η βασική προσέγγιση στη χρήση της Western blotting για τη διάγνωση ιογενών λοιμώξεων αρχίζει με καθαρισμένα βιρίονια που διαταράσσονται από ιοντική απορρυπαντική θεραπεία, απελευθερώνοντας ιικές πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 5.2.1 και 5.2.2, αυτές οι πρωτεΐνες βιρίον στη συνέχεια διαχωρίζονται σε πηκτές με ηλεκτροφόρηση πηκτής δωδεκυλοθειικού-πολυακρυλαμιδίου νατρίου (SDS-PAGE). Αυτά τα πηκτώματα, πάχους περίπου 1 mm, σχηματίζονται μεταξύ δύο τετράγωνων γυάλινων πλακών. 14 με 14 cm είναι ένα τυπικό μέγεθος. Οι ιικές πρωτεΐνες μετουσιώνονται με βρασμό σε ρυθμιστικό διάλυμα SDS – 2-μερκαπτοαιθανόλης και ένα δείγμα που περιέχει μερικές εκατοντάδες μικρογραμμάρια πρωτεΐνης φορτώνεται στην κορυφή της γέλης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η γέλη τοποθετείται σε μεμβράνη (νιτροκυτταρίνη ή νάιλον κ.λπ.) του ίδιου μεγέθους και αυτή η μονάδα πηκτής-νιτροκυτταρίνης τοποθετείται πάνω από διάφορα στρώματα υγρού χαρτιού. Στη συνέχεια τοποθετούνται διηθητικά χαρτιά στη γέλη και οι πρωτεΐνες μεταφέρονται (στυπώνονται) στη μεμβράνη με ηλεκτροφόρηση [58].

Η μεταφορά μπορεί να γίνει με ημίξηρα electroblotters όταν το σάντουιτς με πηκτή-νιτροκυτταρίνη-χαρτί τοποθετείται μεταξύ δύο ορθογώνιων ηλεκτροδίων μετάλλου ή άνθρακα (συσκευή διαθέσιμη από την Hoefer Scientific Instruments Inc., San Francisco, CA; Fisher Inc., Springfield, Νιού Τζέρσεϊ; ή άλλους διανομείς και κατασκευαστές). Σε μια παλαιότερη εκδοχή της electroblotting, η οποία εξακολουθεί να προτιμάται από ορισμένους ερευνητές, το σάντουιτς συγκρατείται από μια πλαστική συσκευή και βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα σε μια μεγάλη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Και στις δύο περιπτώσεις, η μεταφορά πρωτεϊνών από τη γέλη στη μεμβράνη διαμεσολαβείται από ηλεκτρικό ρεύμα, έτσι ώστε το πρότυπο των πρωτεϊνών που λαμβάνονται από το SDS-PAGE να διατηρείται κατά τη μεταφορά. Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη επώαζεται με ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει μη συγκεκριμένες πρωτεΐνες c όπως καζεΐνη γάλακτος ή λευκωματίνη ορού για να μπλοκάρει όλες τις ελεύθερες περιοχές που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως θέσεις σύνδεσης. Αυτό το στάδιο αποκλεισμού εμποδίζει τη μη ειδική προσρόφηση πρωτεϊνών ανοσοσφαιρίνης (Ig) στον φιλιπτήρα νιτροκυτταρίνης κατά τη διάρκεια των επόμενων σταδίων. Το φύλλο νιτροκυτταρίνης στη συνέχεια κόβεται σε διάφορες λωρίδες και κάθε λωρίδα είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντιικών αντισωμάτων.

Εάν ένας ορός ασθενούς που περιέχει αντισώματα κατά του HIV επώαζεται με μια ταινία Western blot, τα αντισώματα ειδικά για τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τα μεταφερόμενα είδη πρωτεϊνών και τα αντισώματα παραμένουν δεσμευμένα σε αυτά τα αντιγόνα ακόμη και μετά από εκτεταμένη πλύση. Τυπικά, οι ασθενείς που έχουν ορομετατραπεί έχουν αντισώματα σε διάφορες πρωτεΐνες του ιικού παράγοντα (Κέντρα Ελέγχου Νοσημάτων, 1988a, 1988b, 1989; Κοινοπραξία για την Τυποποίηση της Ορολογίας των Ρετροϊών, 1988).

Μετά το πλύσιμο για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων, το τελευταίο βήμα στη διαδικασία είναι να απεικονίσετε το δεσμευμένο Ig του ασθενούς. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης A *Staphylococcus aureus* ή ενός δεύτερου αντισώματος που επισημαίνεται με ραδιοϊσότοπο ή ένζυμο. Τα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν συνήθως ασφαλέστερες, μη ραδιενεργές μεθόδους όπως αλκαλική φωσφατάση ή αντισώματα συζευγμένα με ένζυμο υπεροξειδάσης χρένου. Το αντι-ανθρώπινο Ig και το ένζυμο συνδέονται ομοιοπολικά με τρόπο που επιτρέπει στη δραστηριότητα και των δύο μορίων να παραμείνει άθικτη.

Η ανίχνευση του αντισώματος του ασθενούς επιτυγχάνεται με την παρακολούθηση της ενζυμικής δραστηριότητας που συνδέεται με το αντι-ανθρώπινο αντίσωμα (βλ. κεφάλαιο 9, αυτόν τον τόμο). Η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να αποδειχθεί *in situ* με επώαση της μεμβράνης με κατάλληλα χρωμογόνα ή φωτεινογόνα υποστρώματα. Τα προϊόντα των χρωμογόνων αντιδράσεων είναι αδιάλυτα στο νερό και αναπτύσσουν σκούρο χρώμα στο σημείο της ενζυμικής δραστηριότητας. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου βήματος της διαδικασίας Western blot, σκούρες ζώνες (μπλε για αλκαλική φωσφατάση, καφέ για υπεροξειδάση) που αντιστοιχούν στη φυσική θέση των αντιδραστικών ικών πρωτεϊνών εμφανίζονται στο δοχείο νιτροκυτταρίνης. Τα φωτογόνα υποστρώματα παράγουν φως στο σημείο της ενζυμικής δραστηριότητας. Η λουμινόλη απελευθερώνει μπλε πράσινο φως όταν οξειδώνεται από μια αντίδραση που περιλαμβάνει υπεροξειδίο του υδρογόνου και υπεροξειδάση χρένου. Η αντίδραση ενισχύεται παρουσία φαινολών, οι οποίες αυξάνουν την παραγωγή φωτός και τη διάρκεια. Μια μόνιμη καταγραφή των αποτελεσμάτων επιτυγχάνεται με την έκθεση μεμβρανών σε ακτίνες X ευαίσθητες στο μπλε φως λίγες λεπτά μετά την προσθήκη υποστρωμάτων. Το φιλμ εκτίθεται για έως και 1 ώρα, αν και οι εκθέσεις από 10 δευτερόλεπτα έως 10 λεπτά είναι συνήθως το μόνο που είναι απαραίτητο.

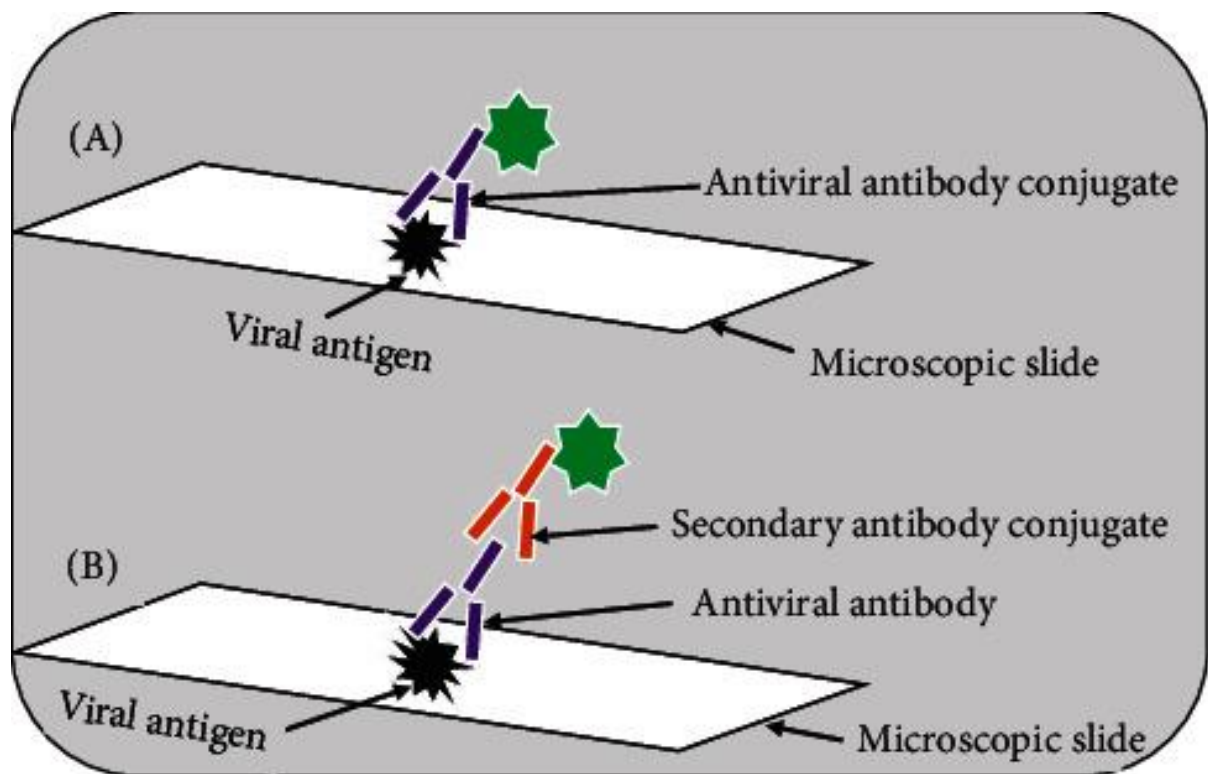
Συνοπτικά, ο καταρράκτης των βημάτων στην εκτέλεση της διαδικασίας περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό ικών πρωτεϊνών, ακινητοποίηση νιτροκυτταρίνης ικών πρωτεϊνών, σύλληψη ικής πρωτεΐνης αντισωμάτων ασθενούς, δέσμευση αντισωμάτων ασθενούς σε ενζυμικό αντι-ανθρώπινο αντίσωμα και ανίχνευση της παρουσίας ανθρώπινου αντισώματος από μια ενζυμική αντίδραση που παράγει ορατές σκοτεινές ζώνες ή χημειοφωταύγεια στη θέση αυτών των μοριακών συμπλεγμάτων.

### 5.3 Δοκιμασία ανοσοφθορισμού

Ο ανοσοφθορισμός (IF) είναι μακράν η πιο απαιτητική τεχνική ανίχνευσης αντιγόνου και απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στη λεπτομέρεια καθ' όλη τη διάρκεια. Αρχικά, τα κύτταρα εφαρμόζονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με προετοιμασία αφής, με πιπέτα ή με κυτταροφυγοκέντρωση. Μετά τη σταθεροποίηση σε ακετόνη, μεθανόλη ή φορμαλίνη, τα κύτταρα επικαλύπτονται με αντισώματα επισημασμένα με φθοροφόρα. Μετά την επώαση και το πλύσιμο για την απομάκρυνση των αντισωμάτων που δεν έχουν αντιδράσει, οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάζονται κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού. Ο ελεύθερος ιός δεν μπορεί να ανιχνευθεί με μικροσκοπία IF. Αντίθετα, οι ιικές πρωτεΐνες που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιού απεικονίζονται σε μολυσμένα κύτταρα-στόχους. Η IF εκτελείται συνήθως σε κυτταρικά επιχρίσματα από δερματικές βλάβες και ρινοφαρυγγικές (NP) αναρροφήσεις ή επιχρίσματα και έχει επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία σε λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBL). Τα πλεονεκτήματα της IF περιλαμβάνουν την ευκαιρία να εκτιμηθεί η ποιότητα του δείγματος (δηλαδή, παρουσία επαρκούς αριθμού κυττάρων-στόχων για ένα έγκυρο αποτέλεσμα), να διακριθούν συγκεκριμένα από μη ειδικά μοτίβα χρώσης, να ανιχνευθεί ένα μόνο μολυσμένο κύτταρο και, σε αντίθεση με άλλες ανοσολογικές δοκιμασίες, να ελεγχθεί ένα δείγμα για πολλαπλά ιικά παθογόνα σε ένα μόνο κυτταρικό σημείο. Μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ή πολλαπλά δείγματα και το κόστος αντιδραστήριου ανά δοκιμή είναι γενικά μικρότερο από ό, τι για άλλες μεθόδους. Ο χρόνος μέχρι το αποτέλεσμα είναι συνήθως 1 έως 2 ώρες.

Η δοκιμασία ανοσοφθορισμού διεξάγεται συνήθως για την ανίχνευση ικών αντιγόνων ή αντιικών αντισωμάτων σε κλινικά δείγματα. Η δοκιμασία διεξάγεται σε δύο μορφές: άμεση δοκιμασία ανοσοφθορισμού (DFA) που ανιχνεύει ιικά αντιγόνα σε δείγμα ασθενούς και έμμεση δοκιμασία ανοσοφθορισμού (IFA) που ανιχνεύει αντιικό αντίσωμα ή ικό αντιγόνο σε κλινικό δείγμα. Στην DFA, το αντίσωμα που αναγνωρίζει το ικό αντιγόνο είναι άμεσα συζευγμένο με φθορίζουσα βαφή. Στην IFA, το ειδικό αντίσωμα ιικού αντιγόνου δεν είναι επισημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο φθορίζον επισημασμένο αντι-ανθρώπινο αντίσωμα (Σχήμα ). Η IFA είναι πιο ευαίσθητη από την DFA επειδή αρκετά φθορίζουσα επισημασμένα αντισώματα αντι-ανοσοσφαιρίνης δεσμεύονται σε κάθε αντιικό αντίσωμα, αυξάνοντας την ένταση του

φθορισμού στη θέση κάθε αντιϊκού αντισώματος. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα βαφή στη διαγνωστική ιολογία είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η οποία εκπέμπει έντονο κίτρινο-πράσινο φθορισμό, αλλά η ροδαμίνη, η οποία εκπέμπει βαθύ κόκκινο φθορισμό, είναι επίσης διαθέσιμη. Μετά τη χρώση, το δείγμα εξετάζεται υπό μικροσκόπιο φθορισμού με πηγή προσπίπτοντος υπεριώδους φωτός.



Εικόνα 5.3.1, Σχηματική απεικόνιση των αρχών των δοκιμασιών ανοσοφθορισμού: Α) δοκιμασία άμεσου ανοσοφθορισμού· Β) δοκιμασία έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Το IFA χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση του SARS. Η δοκιμασία έδειξε 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα στην ανίχνευση αντι-SARS-CoV IgG σε δείγματα ανθρώπινου ορού σε σύγκριση με την RT-PCR. Οι Madhusudana et al. ανέπτυξαν IFA για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού της λύσσας στον ανθρώπινο ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Σε σύγκριση με τη δοκιμή εξουδετέρωσης ποντικού, η δοκιμασία έδειξε ευαισθησία 97,2% και ειδικότητα 97,9%. Η IFA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την άμεση ανίχνευση του αντιγόνου HSV σε κλινικά δείγματα με ευαισθησία 84,6% και ειδικότητα 95,7%, σε σύγκριση με τη μέθοδο ιστοκαλλιέργειας. Επιπλέον, η IFA εφαρμόστηκε για την υποτυποποίηση του ιού της γρίπης Α με 100%

συμφωνία με την RT-PCR. Το IFA χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ανίχνευση του EBV και ως επιβεβαιωτικό τεστ για τον HIV-1. Όσον αφορά την DFA, σε μία μελέτη, έδειξε 60% ευαισθησία και 96% ειδικότητα στην ανίχνευση της πανδημικής γρίπης A (H1N1) pdm09 σε παιδιά σε σύγκριση με την RT-qPCR]. Σε μια άλλη μελέτη, η DFA έδειξε υψηλή ειδικότητα (99-100%) σε σύγκριση με την RT-qPCR για την ανίχνευση του RSV στα παιδιά. Διατίθεται εμπορικό κιτ δοκιμών με βάση το IFA (Anti- ZIKV IIFT), που αναπτύχθηκε από την Euroimmun AG (Γερμανία), για την ανίχνευση λοίμωξης ZIKV. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί τα πλήρη σωματίδια ZIKV ως αντιγόνο. Κατά συνέπεια, μπορεί να εμφανιστούν διασταυρούμενες αντιδράσεις με αντισώματα έναντι ιών της οικογένειας των φλαβοϊών. Οι De Ory et al. αξιολόγησαν την απόδοση της δοκιμασίας χρησιμοποιώντας 126 θετικά και 102 αρνητικά δείγματα. Η ανάλυση έδειξε 96,8% ευαισθησία και 72,5% ειδικότητα. Η OXOID Limited (Ηνωμένο Βασίλειο) ανέπτυξε κιτ βασισμένο σε DFA (δοκιμή IMAGEN ιού γρίπης A και B) για την ανίχνευση και διαφοροποίηση του ιού της γρίπης A και του ιού της γρίπης B σε ανθρώπινα δείγματα. Η δοκιμασία χρησιμοποιεί σημασμένα αντικλωνικά αντισώματα κατά του ιού της γρίπης A ή μονοκλωνικά αντισώματα του ιού της γρίπης B. Η δοκιμασία έχει 100% ευαισθησία και 100% ειδικότητα, σε σύγκριση με τη μέθοδο κυτταροκαλλιέργειας [58].

#### 5.4 Κλινική χρησιμότητα της IF

Η κλινική χρησιμότητα της IF έχει ενισχυθεί με τη μείωση του συνολικού χρόνου σε μόλις 25 λεπτά (D3 FastPoint, Diagnostic Hybrids), με τη χρήση κυτταροφυγοκέντρωσης για τη βελτίωση της ποιότητας της αντικειμενοφόρου πλάκας (3) και με το συνδυασμό αντισωμάτων με διαφορετικές ετικέτες φθοροχρώματος σε ένα αντιδραστήριο για την ταυτόχρονη ανίχνευση και διαφοροποίηση πολλαπλών ιών στο ίδιο κυτταρικό σημείο (4). Η προσέγγιση διπλού φθοροφόρου έχει χρησιμοποιηθεί για τον ταυτόχρονο έλεγχο του ιού του απλού έρπητα (HSV) και του ιού ανεμευλογιάς-ζωστήρα (VZV) σε δείγματα δερματικών βλαβών και της γρίπης A και RSV σε αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα (SimulFluor Millipore). Για μια πιο ολοκληρωμένη εξέταση του αναπνευστικού ιού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια δεξαμενή MAbs σε επτά ή οκτώ κοινούς ιούς (RSV, γρίπη A και B, παραγρίπη τύπου 1, 2 και 3, αδενοϊός και ανθρώπινος μεταπνευμονοϊός [HMPV]) χωρίς να διακυβεύεται η ευαισθησία της δοκιμής. Με το D3 Ultra DFA (Diagnostic Hybrids), είτε το RSV είτε το MAb της γρίπης A επισημαίνονται με φθοροφόρο κίτρινου-χρυσού και τα

υπόλοιπα MAbs επισημαίνονται με πράσινη φλουορεσκεΐνη. Εάν η οθόνη είναι θετική με ένα πράσινο MAb επισημασμένο με φλουορεσκεΐνη, πρέπει να χρωματιστούν πρόσθετες αντικειμενοφόρες πλάκες με διπλά ή μονά αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό του μολυσματικού παθογόνου.

Οι βασικές προϋποθέσεις για ακριβείς δοκιμές IF είναι ένας έμπειρος και καλά εκπαιδευμένος μικροσκοπιστής, ευαίσθητα και ειδικά αντιδραστήρια, ένα μικροσκόπιο φθορισμού με στόχους υψηλής ποιότητας και μια επαρκής και σταθερή ροή δειγμάτων για την ανάπτυξη και διατήρηση εμπειρογνωμοσύνης. Η συνάρτηση IF λειτουργεί καλύτερα σε ρυθμίσεις που επιτρέπουν την εκ νέου συλλογή ανεπαρκών δειγμάτων. Τα καθορισμένα κριτήρια ερμηνείας πρέπει να τηρούνται αυστηρά και τα αποτελέσματα πρέπει να επικυρώνονται αρχικά και κατά διαστήματα στη συνέχεια με καλλιέργεια ή άλλες μεθόδους. Η χρώση IF μπορεί να είναι πιο ευαίσθητη από την καλλιέργεια για την ανίχνευση RSV σε αναρροφήσεις NP, VZV σε δερματικές αλλοιώσεις και κυτταρομεγαλοϊό (CMV) σε λευκοκύτταρα αίματος, αλλά ποικίλλει για άλλους ιούς ή τύπους δειγμάτων, που κυμαίνονται από 60% έως 95% σε σύγκριση με την καλλιέργεια (5, 6). Το IF είναι μια χειρωνακτική μέθοδος έντασης εργασίας, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον χειριστή και δεν υπόκειται σε αυτοματοποίηση ή δοκιμές μεγάλου όγκου. Τα περισσότερα αντιδραστήρια χρησιμοποιούν τώρα την ταχύτερη μέθοδο άμεσης χρώσης φθορισμού (δηλαδή, το κύριο αντικό αντίσωμα είναι επισημασμένο) και αναφέρονται ως άμεσες δοκιμασίες ανοσοφθορισμού (DFA).

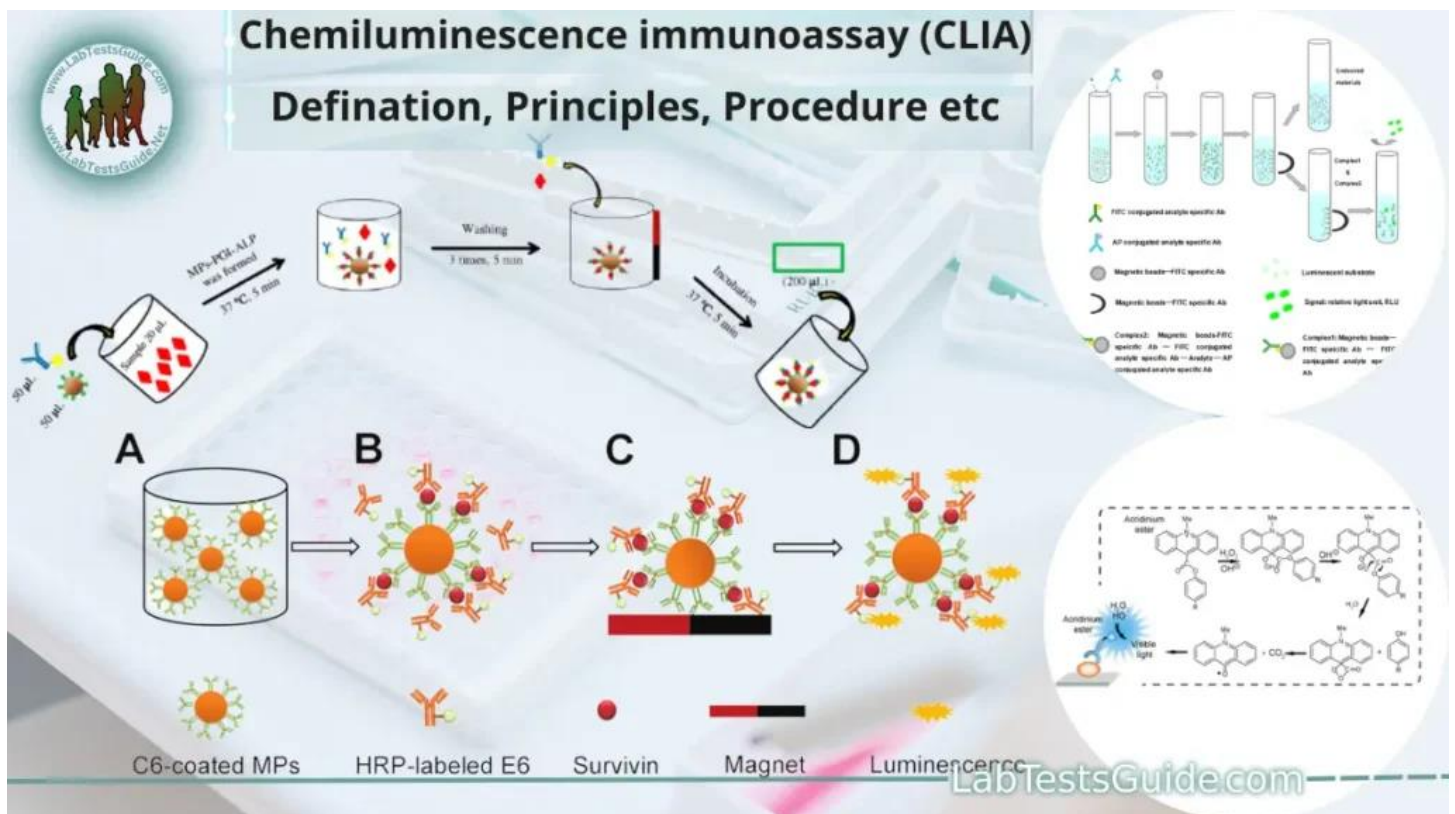
Η λογική ευαισθησία, η ταχύτητα και η ικανότητα πολυπλεξίας καθιστούν την DFA μια ελκυστική εναλλακτική λύση στην καλλιέργεια, ιδιαίτερα για τους αναπνευστικούς ιούς σε παιδιατρικούς ασθενείς. Η DFA έχει επίσης αποδειχθεί ότι μειώνει τη χρήση αντιβιοτικών και οδηγεί σε μειωμένο κόστος νοσηλείας (7, 8). Ωστόσο, οι δοκιμές NAAT, όπως το BioFire FilmArray με χρόνο 1 ώρας για να αποδώσουν, ανιχνεύουν περισσότερα παθογόνα, παρέχουν πιο ευαίσθητα αποτελέσματα και απαιτούν λιγότερη τεχνογνωσία από το DFA. Αν και η DFA είναι λιγότερο δαπανηρή από τη NAAT, η χρήση της έχει μειωθεί (9).

### 5.5 Ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA)

Η ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA) είναι μια τεχνική χημειοφωταύγειας σε συνδυασμό με ένα αντιδραστήριο που παράγει φως. Τα όργανα τυχαίας



προσπέλασης που χρησιμοποιούν CLIA αρχίζουν να αντικαθιστούν τον έλεγχο παρτίδας δειγμάτων αίματος. Οι δοκιμές μπορούν να πραγματοποιηθούν "κατόπιν αιτήματος" καθ' όλη τη διάρκεια των ωρών λειτουργίας, καθώς τα δείγματα φτάνουν στο εργαστήριο. Ο χρόνος μέχρι το αποτέλεσμα είναι γενικά 1 ώρα. Σε σύγκριση με την ΕΠΕ, η CLIA είναι πιο ευαίσθητη, έχει χαμηλότερο υπόβαθρο και μεγαλύτερο δυναμικό εύρος. Μια σημαντική πρόοδος στη διάγνωση των οξέων λοιμώξεων HIV είναι το τεστ προσυμπτωματικού ελέγχου HIV τέταρτης γενιάς που συνδυάζει την ανίχνευση IgM και IgG με την ανίχνευση του αντιγόνου HIV-1 p24. Μόλις αναπτυχθεί το αντίσωμα, το p24 δεσμεύεται σε ανοσοσυμπλέγματα, αλλά πριν από την εμφάνιση του αντισώματος, το αντιγόνο p24 είναι ένας ευαίσθητος δείκτης για οξεία λοίμωξη HIV. Επί του παρόντος, μία τέταρτη γενιά HIV EIA (Bio-Rad Genetic Systems), μία CLIA (Abbott Architect) και μία ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (Alere) έχουν εγκριθεί από τον FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες, αν και πολλές εξετάσεις HIV τέταρτης γενιάς έχουν χρησιμοποιηθεί εδώ και καιρό στην Ευρώπη [59].

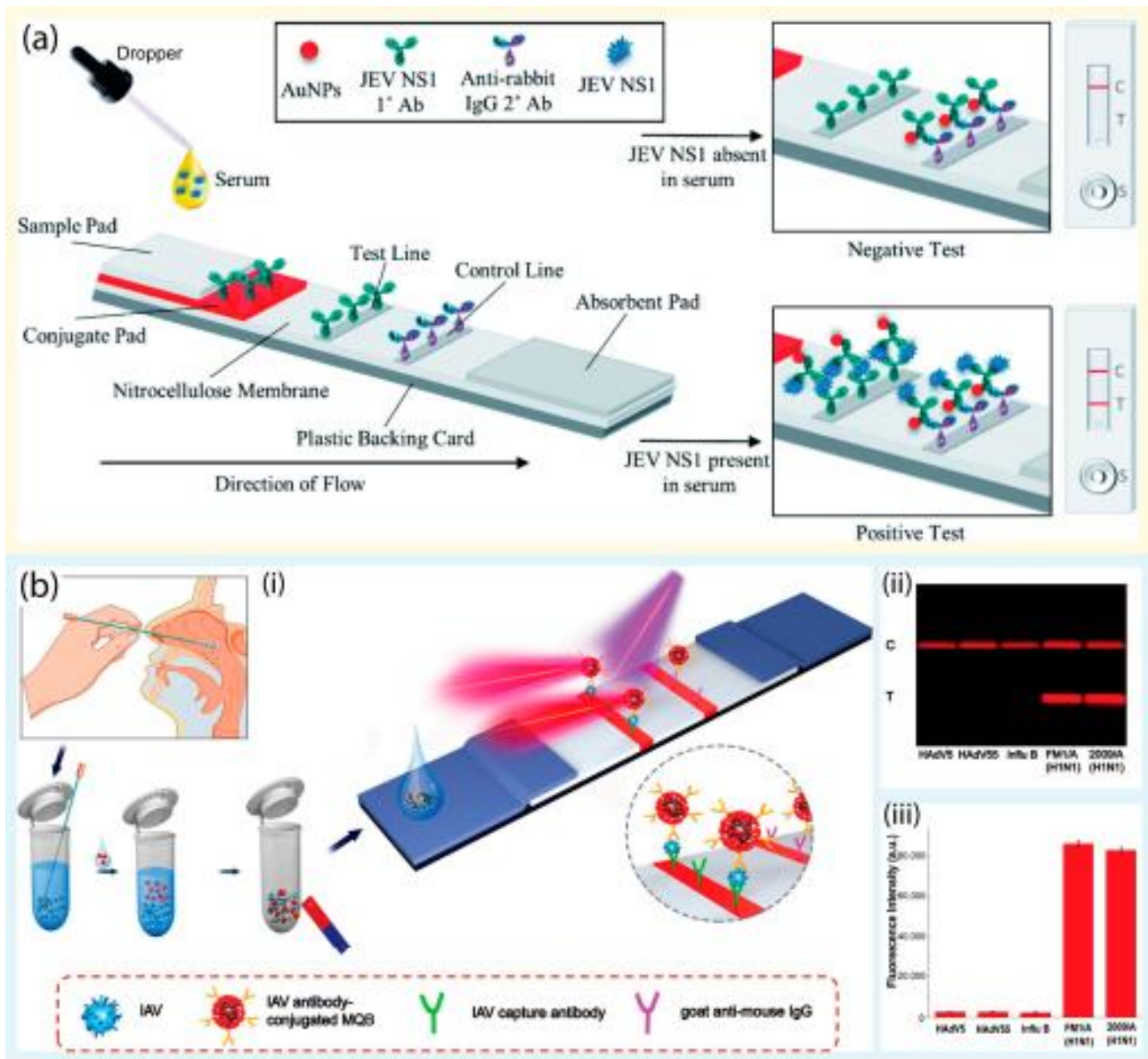


Εικόνα 5.5.1, Ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA)

## 5.6 Ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA)

Σε μια ανοσοδοκιμασία πλευρικής ροής (LFIA) για ανίχνευση αντιγόνου, ένα δείγμα εφαρμόζεται σε μια συσκευή ή μια ταινία και το αντιγόνο, εάν υπάρχει, συνδέεται με επισημασμένα αντιικά αντισώματα. Τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος κινούνται κατά μήκος της ταινίας μέτρησης με τριχοειδή δράση έως ότου δεσμευτούν από αντισώματα σύλληψης στο απώτερο άκρο της ταινίας, δημιουργώντας μια ορατή ζώνη. Ενώ η μέθοδος περιλαμβάνει μια σειρά προσθηκών αντιδραστηρίων, επώασης, βημάτων πλύσης για την απομάκρυνση υλικών που δεν έχουν αντιδράσει, προσθήκης υποστρώματος και αντιδραστηρίου διακοπής, η LFIA απαιτεί την προσθήκη μόνο δείγματος και παρέχει αποτελέσματα σε 10 έως 20 λεπτά. Σχεδόν όλα τα γρήγορα τεστ γρίπης και RSV είναι επί του παρόντος LFIA. Αυτές οι εξετάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο σημείο φροντίδας και έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζουν τη διαχείριση. Τόσο η ΕΠΕ μεμβράνης όσο και οι δοκιμασίες πλευρικής ροής πρέπει να διαβάζονται εντός 5 έως 10 λεπτών από την ολοκλήρωση της δοκιμασίας για έγκυρα αποτελέσματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση του κιτ μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από τα χρησιμοποιούμενα μέσα μεταφοράς. Τα μέσα με ζελατίνη όπως το M4 RT (Remel), ειδικά όταν είναι κρύο, μπορούν να επηρεάσουν τη ροή και να οδηγήσουν σε ψευδή αποτελέσματα (ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά). Όπως και η ΕΠΕ, η LFIA απαιτεί υψηλό ιικό φορτίο στο δείγμα για θετικό αποτέλεσμα και έτσι αποδίδει καλύτερα σε βρέφη και μικρά παιδιά. Οι ταχείες διαγνωστικές εξετάσεις γρίπης (RIDT), κυρίως LFIA, υποβλήθηκαν σε αυξημένο έλεγχο κατά τη διάρκεια της πανδημίας γρίπης του 2009 και η ανεπαρκής ευαισθησία τους αναγνωρίστηκε ευρέως. Επιπλέον, η ανίχνευση των κυκλοφορούντων στελεχών της γρίπης ποικίλλει από έτος σε έτος, επηρεάζοντας την απόδοση του κιτ. Για να βελτιωθεί η ευαισθησία, αρκετές ταχείες δοκιμές γρίπης και RSV LFIA χρησιμοποιούν μια ετικέτα φθορισμού, αντί του τυπικού κολλοειδούς χρυσού, και έναν μικρό

αναγνώστη. Δύο αναγνώστες (3M από την Focus Diagnostics και Sofia από την Quidel) είναι walkaway, παρέχουν μια εκτύπωση και μπορούν να διασυνδεθούν με το εργαστηριακό πληροφοριακό σύστημα (LIS). Ένας αναγνώστης (Veritor, Becton Dickinson) είναι λιγότερο ακριβός, αλλά δεν είναι περίπατος. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα του RIDT αποτελούν σημαντικό πρόβλημα όταν ο επιπολασμός της γρίπης είναι χαμηλός. Λόγω των επιπτώσεων της γρίπης στη δημόσια υγεία και των πλεονεκτημάτων ενός απλού τεστ POC, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) έχουν αρχίσει να παρακολουθούν την απόδοση με τα στελέχη που κυκλοφορούν σήμερα και ενθάρρυναν τους κατασκευαστές να δώσουν προτεραιότητα στη βελτίωση της απόδοσης. Η έρευνα για τη βελτίωση των σημάτων και την ενίσχυση της ευαισθησίας αποτελεί προτεραιότητα (18). Για ενημέρωση σχετικά με τη χρήση του RIDT, συμβουλευτείτε τον ιστότοπο του CDC στο <http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/>. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν δοκιμές POC που συνδυάζουν ιικό αντιγόνο με ανίχνευση αντισωμάτων IgM και IgG για τον ιό HIV (Determine, Alere) και για ιούς δάγκειου πυρετού (59).



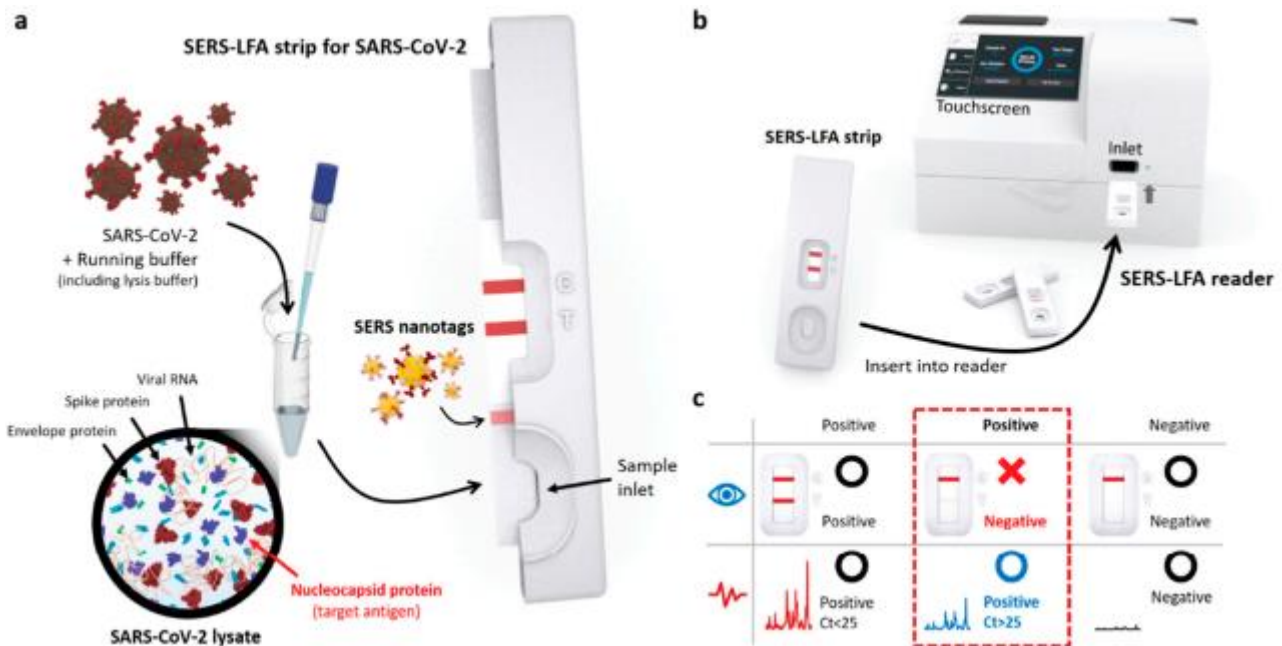
Εικόνα 5.6.1, α) Σχηματική αναπαράσταση του χρωματομετρικού LFA με βάση το σάντουιτς για ταχεία ανίχνευση του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας με τη χρήση νανοσωματιδίων χρυσού. Ανατυπώθηκε με άδεια από. Πνευματικά δικαιώματα (2022) εκδόσεις RSC. β) Σχηματική αναπαράσταση του φορτίζοντος ΜΠ με βάση τα ΜQB για ταχεία ανίχνευση και ανίχνευση υπερουαισθησίας του ιού της γρίπης Α σε ανθρώπινο δείγμα. γ) Σχηματικό διάγραμμα ανίχνευσης του ιού της γρίπης τύπου Α με χρήση LFA βάσει ΜQB. ii) εικόνες και iii) αντίστοιχες εντάσεις φθορισμού του LFA για τα θιριόνια H1N1 και δεν είναι ευαίσθητο σε άλλους αναπνευστικούς ιούς. Ανατυπώθηκε με άδεια από [27]. Πνευματικά δικαιώματα (2020) Elsevier [11].

Κατά συνέπεια, οι συσκευές που βασίζονται σε LFA υπόσχονται πολλά για εφαρμογές δοκιμών σημείου φροντίδας (POCT) στην ανίχνευση ιών λόγω της χαμηλής τιμής και της απλής λειτουργίας τους. Με τη χρήση των LFA, διάφοροι ιοί (π.χ. γρίπη A, B και C; HIV; και Έμπολα) εντοπίστηκαν επιτυχώς για επιτόπια διάγνωση χωρίς ειδικό. Επιπλέον, η LFA υπήρξε η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παρακολούθηση του SARS-CoV-2, ειδικά κατά τη διάρκεια της πανδημίας COVID [23]. Γενικά, οι LFA χρησιμοποιούν αντισώματα ως στοιχεία αναγνώρισης και AuNPs ως ανιχνευτές αναφοράς και το αποτέλεσμα ανίχνευσης απεικονίζεται άμεσα στη δοκιμαστική ταινία χωρίς να απαιτούνται εξωτερικές πηγές ενέργειας. Για παράδειγμα, οι Roberts et al. ανέφεραν ένα φορητό LFA για επιτόπια ανίχνευση του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας στον ορό (Εικόνα 5.6.1). Χρησιμοποιώντας AuNPs ως ανοσοανιχνευτές, η γραμμή δοκιμής έγινε κόκκινη παρουσία του αντιγόνου, με όριο ανίχνευσης (LOD) 10 pg/mL εντός 10 λεπτών. Στη μελέτη των Le et al., οι συγγραφείς προσπάθησαν να αναπαραστήσουν μια δοκιμασία πλευρικής ροής διπλού στοιχείου αναγνώρισης για την ανίχνευση ιών γρίπης. Σε αυτή τη μελέτη, υιοθετήθηκε ο συνδυασμός ενός απταμερούς με ένα αντίσωμα για τη διάκριση των τύπων και υποτύπων του ιού της γρίπης και επιτεύχθηκε ευαισθησία 90% σε σύγκριση με την ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) [11].

Σε μια άλλη έρευνα, οι Wiriyaichairorn et al. χρησιμοποίησαν LFA με βάση το νανοετικέτα άνθρακα για την ταχεία ανίχνευση του ιού της γρίπης A σε αλλαντοϊκά υγρά. Παρουσία του ιού, ο σχηματισμός ενός συμπλόκου νανοετικέτας αντισώματος-αντιγόνου-άνθρακα παρείχε άμεση απεικόνιση του ιού μέσω συσώρευσης νανοετικετών άνθρακα στη γραμμή δοκιμής. Έτσι, το όριο ανίχνευσης του ιού έφτασε περίπου τα 350 TCID<sub>50</sub>/mL. Χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια άνθρακα ως δημοσιογράφους, αυτή η προτεινόμενη μέθοδος LFA θα μπορούσε να επιτύχει καλύτερη ευαισθησία και χαμηλότερο κόστος από άλλους δημοσιογράφους νανοετικετών (π.χ. νανοσωματίδια χρυσού και χάντρες λατέξ).

Από την άλλη, για ποσοτική ανίχνευση, εφαρμόστηκε επίσης LFA με βάση τον φθορισμό και επέδειξε υψηλή ευαισθησία. Μια προσέγγιση βασισμένη στον φθορισμό σχεδιάστηκε από τους Wang et al. το 2020 για την ανίχνευση του RNA του SARS-CoV-2 σε μια λωρίδα LFA. Τα λειτουργικά νανοσωματίδια φθορισμού του ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκαν για τη σύλληψη του RNA του SARS-CoV-2 καθώς και για την ενίσχυση του σήματος. Συνολικά, αξιολογήθηκαν 734 κλινικά δείγματα και η προτεινόμενη LFA πέτυχε ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99% σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ποσοτική RT-PCR. Επιπλέον, οι Bai et al. κατασκεύασαν μια μαγνητική κβαντική κουκκίδα με βάση το νανοσφαιρίδιο LFA (MQB-based LFA) για τον ιό της γρίπης A σε κλινικά δείγματα, με aLOD 22 PFU/mL ιικών H1N1 virahions εντός 35 λεπτών (Εικόνα 5.6.2). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η υψηλή ειδικότητα της LFA με βάση το MQB για στελέχη του ιού H1N1 έναντι αρκετών άλλων αναπνευστικών ιών.





Εικόνα 5.6.2, Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος SERS-LFA για την επιτόπια ανίχνευση του SARS-CoV-2. α) Η λωρίδα SERS-LFA. β) Η φορητή συσκευή ανάγνωσης SERS-LFA. γ) Το πλεονέκτημα του φορητού συστήματος SERS-LFA που βασίζεται σε αναγνώση Raman για επιτόπια διάγνωση σε σύγκριση με την εμπορική ταινία LFA. Το κόκκινο πλαίσιο υποδεικνύει ότι οι περισσότερες δοκιμασίες LFA έδειξαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με χαμηλή συγκέντρωση ιού ( $Ct > 25$  στην RT-PCR). Ωστόσο, οι SERS-LFA έδειξαν θετικά, λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους. Ανατυπώθηκε με άδεια από [11]. Πνευματικά δικαιώματα (2022) εκδόσεις ACS.

Από την άλλη, η τεχνική επιφανειακής σκέδασης Raman (SERS) έχει υιοθετηθεί εκτενώς για την ανίχνευση ιών, λόγω της εξαιρετικά υψηλής ευαισθησίας και της ανίχνευσης χωρίς ετικέτα. Ως ισχυρή αναλυτική τεχνική για διαγνωστικές έρευνες, πολλοί ερευνητές έχουν υιοθετήσει το SERS για την ανίχνευση διαφόρων ιών όπως ο SARS-CoV-2, οι ιοί της γρίπης Α και Β, ο ροταϊός και ο ιός της ηπατίτιδας C. Ως εκ τούτου, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός SERS με LFA μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία της ανάλυσης. Για παράδειγμα, οι Park et al. εισήγαγαν μια LFA βασισμένη σε SERS για την έγκαιρη διάγνωση του ιού της γρίπης Α [34].



Συγκεκριμένα, αντί να χρησιμοποιηθούν νανοσωματίδια χρυσού, μια ενεργή νανοετικέτα SERS ενσωματώθηκε στη λωρίδα LFA, η οποία οδήγησε σε LOD τόσο χαμηλό όσο  $1,9 \times 10^4$  PFU / mL. Οι Xiao et al. χρησιμοποίησαν ένα αντισωμάτων SERS LFA για την ανίχνευση του ιού H7N9 της γρίπης των πτηνών [35]. Το κέλυφος πυρήνα AuAg4-ATP@AgNPs χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως ανιχνευτής Raman και το LOD ήταν τόσο χαμηλό όσο 0,0018 HAU με συνολικό χρόνο ανάλυσης 20 λεπτά. Οι Lu et al. ανέπτυξαν ένα LFA διπλής λειτουργίας που βασίζεται σε SERS που μπορεί να ανιχνεύσει τόσο τον ιό SARS-CoV-2 όσο και τον ιό της γρίπης Α από κλινικά δείγματα. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να μειώσει σημαντικά τα ψευδώς αρνητικά σε σύγκριση με τις εμπορικές χρωματομετρικές δοκιμασίες LFA. Επιπλέον, οι Young et al. ανέπτυξαν ένα φορητό σύστημα SERS-LFA (ταινία SERS-LFA και αναγνώστη) για την επίλυση των ζητημάτων ευαισθησίας που προέκυψαν σε εμπορικές LFA που στοχεύουν τον SARS-CoV-2 από κλινικά δείγματα (Σχήμα ). Αυτό το σύστημα θα μπορούσε να ανιχνεύσει το αντιγόνο SARS-CoV-2 επί τόπου με υψηλή ευαισθησία εντός 15 λεπτών, με LOD περίπου 3,53 PFU/mL [12].

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί LFA με βάση το CRISPR για να ενισχύσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της ανίχνευσης νουκλεϊκών οξέων σε βιολογικά δείγματα που περιέχουν χαμηλό αριθμό στόχων. Επιπλέον, μια λωρίδα LFA σε συνδυασμό με CRISPR/Cas9 επιτρέπει την ανίχνευση πολλαπλών στόχων και εξαλείφει την ανάγκη για όργανα ανίχνευσης με βάση νουκλεϊκά οξέα. Συνοπτικά, το LFA είναι μια συναρπαστική προσέγγιση για την ανίχνευση ιών, ειδικά την ανίχνευση πολυπλεξίας. Με την ενσωμάτωση άλλων στρατηγικών ανίχνευσης, η ευαισθησία και η ειδικότητα των LFA μπορούν να ενισχυθούν, καθιστώντας την εμπορευματοποίηση πιο εφικτή.

## 5.7 Ταχεία ανίχνευση ιών σε καλλιέργεια με ανοσολογικές μεθόδους

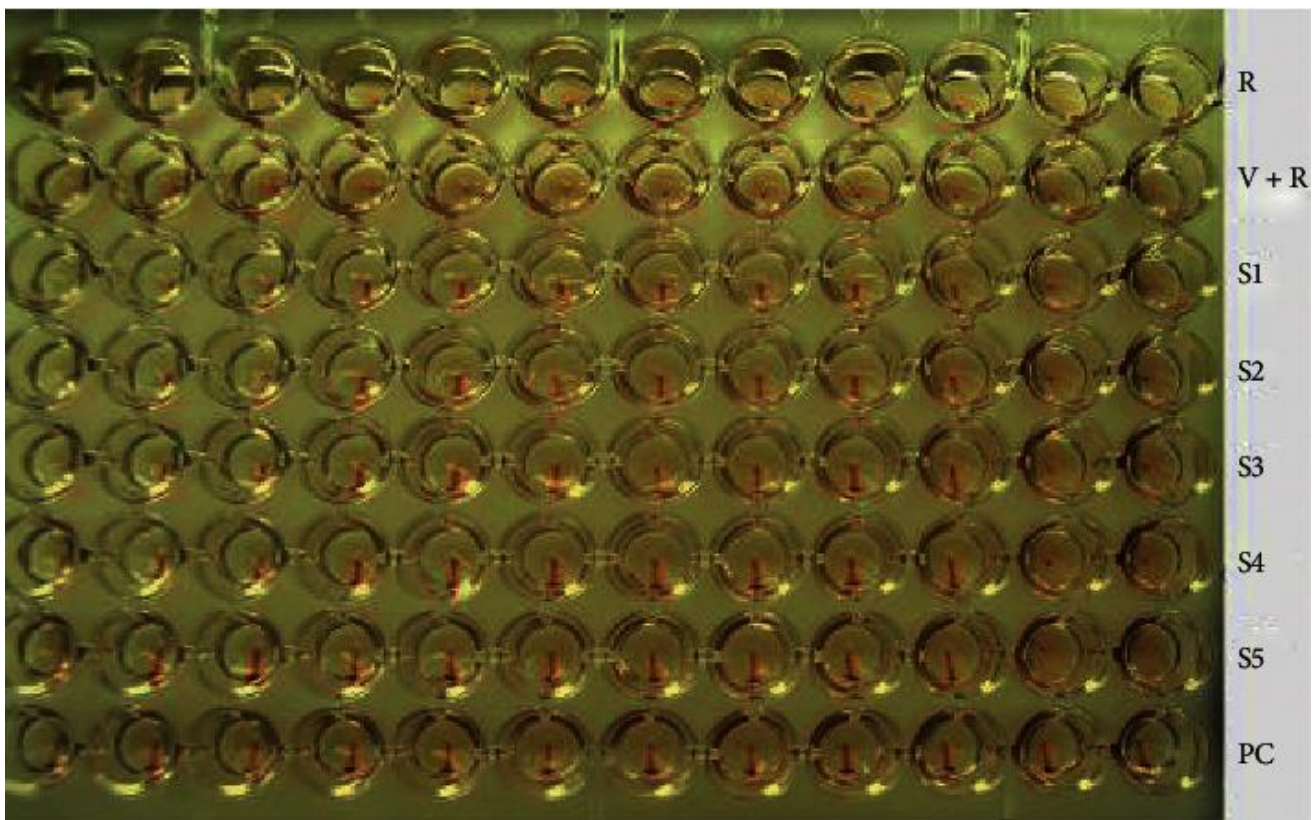
Η συμβατική απομόνωση του ιού απαιτεί συνήθως εμβολιασμό πολλαπλών κυτταρικών σειρών σε σωλήνες κυλίνδρων, ακολουθούμενη από καθημερινή μικροσκοπική εξέταση των κυτταρικών μονοστιβάδων για κυτταροπαθητικές επιδράσεις που προκαλούνται από τον ιό (CPE), οι οποίες μπορεί να χρειαστούν ημέρες έως εβδομάδες για να εμφανιστούν. Η απαιτούμενη τεχνογνωσία και η καθυστέρηση στην ανίχνευση του ιού περιορίζουν τον αντίκτυπο της συμβατικής

κουλτούρας στη θεραπεία και τη διαχείριση των ασθενών. Αντίθετα, οι ταχείες καλλιέργειες περιλαμβάνουν φυγοκέντρηση δειγμάτων σε μονοστιβάδες κυττάρων σε φιαλίδια κελύφους ή πλάκες πολλαπλών τοιχωμάτων, στη συνέχεια σταθεροποίηση των κυττάρων μετά από 16 έως 48 ώρες επώασης, ακολουθούμενη από χρώση με MAbs ειδικά για τον ιό για την ανίχνευση ιικών πρωτεϊνών σε μολυσμένα κύτταρα. Η ταχεία καλλιέργεια για CMV χρησιμοποιεί μία κυτταρική σειρά, συνήθως έναν ανθρώπινο ινοβλάστη, και χρώση με MAb σε CMV άμεσο-πρώιμο αντιγόνο (20). Για την ανίχνευση ενός φάσματος ιών σε συμβατική καλλιέργεια απαιτείται εμβολιασμός πολλαπλών κυτταρικών σειρών. Για να απλοποιηθεί η διαδικασία για ταχείες καλλιέργειες, δύο έως τρεις κυτταρικές σειρές έχουν συνδυαστεί σε ένα φιαλίδιο και μετά από εμβολιασμό δείγματος και επώαση για 1 έως 2 ημέρες και έως 5 ημέρες, η μονοστιβάδα κυττάρων χρωματίζεται με μια δεξαμενή αντισωμάτων έναντι πιθανών ιικών παθογόνων (51). Υπάρχει μια ποικιλία μικτών κυτταροκαλλιιεργειών για να διαλέξετε (Διαγνωστικά Υβρίδια), ανάλογα με το αν αναζητούνται ερπητοϊοί, αναπνευστικοί ιοί ή εντεροϊοί. Ο χρόνος εκπαίδευσης του προσωπικού ώστε να καταστεί ικανό στην ερμηνεία της χρώσης IF σε καλλιέργειες φιαλιδίων κελύφους είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που απαιτείται για συμβατικό CPE ή DFA κλινικών δειγμάτων.

### 5.8 Δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης (HI)

Ορισμένοι ιοί όπως ο ιός του δάγκειου πυρετού, ο αδενοϊός, ο ιός της ερυθράς, ο ιός της ιλαράς και ο ιός της γρίπης έχουν αντιγόνο αιμοσυγκολλητίνης στις επιφάνειές τους που δεσμεύει και συγκollά τα ερυθρά αιμοσφαίρια που ονομάζονται αιμοσυγκόλληση (HA). Η αναστολή της ικανότητας των ιών να συγκollούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη της ανάλυσης HI. Στη δοκιμασία HI, παρασκευάζονται σειριακές αραιώσεις δείγματος ορού σε τρυβλίο μικροτιτλοδότησης. Στη συνέχεια, προστίθεται μια καθορισμένη ποσότητα ιικής αιμοσυγκολλητίνης. Τέλος, προστίθενται κατάλληλα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η απουσία υαλουρονικού οξέος υποδηλώνει θετική αντίδραση. Αυτό κρίνεται με την κλίση της πλάκας μικροτιτλοδότησης, η οποία επιτρέπει τη ροή ελεύθερων ερυθρών αιμοσφαιρίων (Εικόνα 5.8.1). Καταγράφεται ο ρυθμός αραιώσης όπου σημειώθηκε πλήρης αναστολή της συγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ο τίτλος HI, επομένως, είναι το αντίστροφο της τελευταίας αραιώσης ορού που αναστέλλει πλήρως την HA. Το HI χρησιμοποιήθηκε για διάφορες εφαρμογές στη διαγνωστική

ιολογία. Η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για την οροεπιτήρηση του ιού της γρίπης Α (H1N1) pdm09 και του ιού της ιλαράς. Σε μία μελέτη, εφαρμόστηκε δοκιμασία HI για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του πανδημικού εμβολίου γρίπης. Σε μια μελέτη επικύρωσης που χρησιμοποίησε ορούς από 79 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις RT-qPCR και 176 ορούς από μη εκτεθειμένο πληθυσμό, η δοκιμασία HI έδειξε υψηλή ευαισθησία (92%) και ειδικότητα (91%) για την ανίχνευση ανθρώπινης λοίμωξης με τον πανδημικό ιό H1N1 του 2009.



Εικόνα 5.8.1, Δοκιμασία αναστολής αιμοσυγκόλλησης του ιού της γρίπης των πτηνών. Όταν τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι μόνα τους, θα εγκατασταθούν στον πυθμένα του πηγαδιού. Όταν το ειδικό αντίσωμα απουσιάζει από το κλινικό δείγμα, η ιική αιμοσυγκολλητίνη είναι ελεύθερη να συγκολλήσει τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Ο τίτλος HI των S1-S5 είναι 210. Συντομογραφίες: R, μόνο ερυθρά αιμοσφαίρια· V + R, ιός και ερυθρά αιμοσφαίρια. PC, θετικός έλεγχος. S, δείγμα (αδημοσίευτα δεδομένα).

Οι ανοσολογικές διαγνωστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική διάγνωση ρουτίνας των ανθρώπινων ιογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Οι μέθοδοι έχουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, σχετικά απλή συμπεριφορά, ταχύτητα και δυνατότητα δοκιμής πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα. Ωστόσο, οι ανοσολογικές δοκιμασίες έχουν αρκετούς περιορισμούς. Οι δοκιμασίες υπόκεινται σε παρεμβολές. Παρεμβολές σε ανοσολογικές δοκιμασίες μπορεί να προκύψουν από την παρουσία (α) διασταυρούμενων αντιδραστικών παραγόντων στο δείγμα που φέρουν παρόμοιους ή τους ίδιους επιτόπους με το ιικό αντιγόνο ενδιαφέροντος, οδηγώντας σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα, (β) ενδογενών αντισωμάτων, όπως αυτοαντισώματα, ετερόφιλα αντισώματα ή ανθρώπινα αντισώματα κατά των ζώων στο δείγμα. Παρά το γεγονός ότι το ιικό αντιγόνο δεν υπάρχει στο δείγμα, τα ενδογενή αντισώματα μπορεί να αλληλεπιδράσουν με αντιικά αντισώματα ή αντισώματα ανίχνευσης, οδηγώντας σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Η ειδικότητα της ανοσολογικής δοκιμασίας μπορεί να επηρεαστεί όταν χρησιμοποιούνται σε ενδημικές περιοχές της ελονοσίας. Όπως είναι γνωστό, το πλασμώδιο επάγει μη ειδική ενεργοποίηση πολυκλωνικών Β-κυττάρων που οδηγεί στη δημιουργία μη ειδικών αντισωμάτων. Αυτά τα ευρεία ειδικά αντισώματα μπορεί να αντιδράσουν με μια ποικιλία αντιγόνων, οδηγώντας σε ψευδώς θετικό τεστ. Σε μία μελέτη, από τα 34 δείγματα από ασθενείς με PCR επιβεβαιωμένη ελονοσία, 14 δείγματα ήταν θετικά ή οριακά για αντισώματα αντι-ZIKV σε εμπορικά διαθέσιμο κιτ δοκιμής ZIKV ELISA. Όταν αυτά τα 14 δείγματα ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας δοκιμασία εξουδετέρωσης ιού, η μόλυνση από ZIKV δεν αποδείχθηκε στα 11 δείγματα. Η δοκιμασία HI είναι επίπονη και χρονοβόρα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας μεταξύ εργαστηρίων μπορεί να είναι διαφορετική, καθώς δεν υπάρχουν πρότυπα αντιδραστήρια για τη δοκιμασία. Στην περίπτωση δοκιμασίας IF, η παρατεταμένη έκθεση του δείγματος σε υπεριώδες φως οδηγεί σε εξασθένηση του φθορισμού που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητική δοκιμή. Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούνται σε ορισμένες από τις ανοσολογικές δοκιμασίες είναι ακριβά [5].

## 5.9 Ανίχνευση αντισωματικής απόκρισης σε λοιμώξεις από ιούς

Γενικά, η ταχεία διάγνωση οξέων ιογενών λοιμώξεων σε χρονικό πλαίσιο που επηρεάζει τη διαχείριση των ασθενών βασίζεται στην ανίχνευση του ίδιου του ιού. Το αντίσωμα αναπτύσσεται ως απόκριση στην αντιγραφή του ιού και επομένως εμφανίζεται αργότερα. Ωστόσο, σε ορισμένες λοιμώξεις από ιούς, η ανίχνευση αντισωμάτων παραμένει το αρχικό τεστ εκλογής για διάφορους λόγους.

#### 5.10 Ανίχνευση IgM

Η ανίχνευση IgM είναι κυρίως χρήσιμη όταν οι μέθοδοι ανίχνευσης ιών δεν είναι άμεσα διαθέσιμες ή είναι πολύ αργές για να δώσουν κλινικά χρήσιμα αποτελέσματα ή όταν οι ασθενείς παρουσιάζουν σύμπτωση με την εμφάνιση IgM. Παραδείγματα περιλαμβάνουν αρμποϊούς και ιούς ερυθράς, ιλαράς και παρωτίτιδας. Στις περισσότερες λοιμώξεις, τα αντισώματα IgM μπορούν συνήθως να ανιχνευθούν εντός 5 έως 7 ημερών από τα κλινικά συμπτώματα, αλλά μπορεί να χρειαστούν έως και 2 εβδομάδες. Οι δοκιμασίες HIV τρίτης και τέταρτης γενιάς που ανιχνεύουν τόσο IgM όσο και IgG παρέχουν έγκαιρη διάγνωση από ό,τι παρέχεται από τις εξετάσεις πρώτης και δεύτερης γενιάς, οι οποίες ανίχνευαν μόνο IgG (59). Ομοίως, ορισμένες δοκιμές αντισωμάτων του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) ανιχνεύουν τόσο IgM όσο και IgG και μειώνουν το οροαρνητικό παράθυρο μετά την αρχική μόλυνση.

Για ορισμένες λοιμώξεις από ιούς, τα κλινικά συμπτώματα που προκαλούν ιατρική φροντίδα μεσολαβούνται από το ανοσοποιητικό. Επομένως, η IgM είναι συνήθως ανιχνεύσιμη όταν ο ασθενής παρουσιάζει για πρώτη φορά. Παραδείγματα περιλαμβάνουν τον ιό της ηπατίτιδας A (HAV), τον HBV, τον παρβοϊό B19 και τον ιό Epstein-Barr (EBV). Τα αντισώματα σε διάφορα διακριτά ιικά αντιγόνα παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με το στάδιο των λοιμώξεων από HBV και EBV.

Οι περιορισμοί του ελέγχου IgM περιλαμβάνουν μεταβλητότητα στις μεθόδους δοκιμών, ασθενείς ή μη ανιχνεύσιμες αποκρίσεις αντισωμάτων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή νεογνά, ετερόλογες αποκρίσεις IgM, παρεμβολή από ρευματοειδή παράγοντα κατηγορίας IgM (RF), ανταγωνισμό μεταξύ αντισωμάτων IgG και IgM που οδηγούν σε ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά,



αποτυχία ανίχνευσης IgM λόγω του χρόνου συλλογής δείγματος, εμμονή της IgM σε ορισμένες χρόνιες ιογενείς λοιμώξεις, και συχνή απουσία IgM σε επαναλοιμώξεις ή επανενεργοποιήσεις. Για τον CMV, το αντίσωμα IgM αυξάνεται με την ηλικία σε οροθετικά άτομα, πιθανώς λόγω υποκλινικής επανενεργοποίησης. Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ αντι-παρβοϊού, ερυθράς και ιλαράς IgM είναι ένα ιδιαίτερο πρόβλημα εάν κάποιος διερευνά ένα εξάνθημα κατά την εγκυμοσύνη.

Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την απομάκρυνση του RF ή την παρεμβολή της IgG πριν από τη δοκιμή. Ενώ η καλύτερη προσέγγιση ήταν η χρήση της μορφής σύλληψης-ανάλυσης κατηγορίας IgM για τη βελτίωση της εξειδίκευσης, η αφαίρεση φόντου μπορεί να εξακολουθεί να είναι απαραίτητη. Παρ' όλα αυτά, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα IgM είναι κοινά και μπορούν να οδηγήσουν σε ακατάλληλη φροντίδα. Αν και ένα θετικό αποτέλεσμα IgM μπορεί να είναι η πρώτη ένδειξη του ιικού παθογόνου, οι δοκιμές IgM δεν είναι οριστικές, αλλά απαιτούν επιβεβαίωση με ανίχνευση ιού ή ορομετατροπή IgG ή, για τους αρμποϊούς, την πιο ειδική δοκιμή εξουδετέρωσης μείωσης πλάκας. Η σχετική ένταση της αντιδραστικότητας της IgM και της IgG (δηλ. υψηλή IgM και χαμηλή ή αρνητική IgG), ακολουθούμενη από αύξηση της IgG με την πάροδο του χρόνου, αυξάνει την πιθανότητα ενός πραγματικού αποτελέσματος. Τα ψευδώς θετικά IgMs είναι ένα ιδιαίτερο πρόβλημα όταν ο επιπολασμός της νόσου είναι χαμηλός, όπως παρατηρείται συνήθως με το HAV IgM στον πληθυσμό των ΗΠΑ. Η χρήση συνθετικών πεπτιδίων για την αντικατάσταση ανοσολογικών δοκιμασιών με βάση το αντιγόνο βιρίον μπορεί να μειώσει, αλλά όχι να εξαλείψει, τις παρεμβολές από ραδιοσυχνότητες, τις μη ειδικές αντιδράσεις και τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα [59].

## 6. Μελλοντικές προκλήσεις και ευκαιρίες

Αυτό το άρθρο επικεντρώνεται στις διάφορες πτυχές των θεμάτων διάγνωσης στις ιογενείς ασθένειες και ως εκ τούτου επισημαίνει επίσης τις διαφορετικές τεχνικές οργάνων και συσκευών που χρησιμοποιούνται ή πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του ιού και τη μελέτη της αιτιολογίας των ασθενειών που προκαλούνται από τους ιατρικούς ιούς. Για τη γρήγορη ταυτοποίηση του SARS-CoV-2, ο FDA έχει εγκρίνει 235 μοριακά τεστ, ενώ ο EMA (Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων) έχει εγκρίνει 192 μεθόδους που βασίζονται σε PCR. Τα πιο ακριβή μοριακά διαγνωστικά για διάγνωση COVID-19 είναι αυτά που βασίζονται σε RT-PCR. Στη Νότια Κορέα, εάν ένα δείγμα μεταφέρεται σε UTM (καθολικό μέσο μεταφοράς) ή μοριακό νερό, ο SARS-CoV-2 μπορεί να ανιχνευθεί απευθείας με rRT-PCR χωρίς την απαίτηση εκχύλισης RNA [76]. Επιπλέον, ορισμένες επιχειρήσεις έχουν δημιουργήσει προσαρμοσμένες



δοκιμασίες RT-PCR που έχουν λάβει άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης από τον FDA των Ηνωμένων Πολιτειών, όπως οι Cobas® Liat® (Roche Molecular 145 Systems, ΗΠΑ), Xpert® Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid, ΗΠΑ) και ID NOW™ (Abbott, ΗΠΑ). Για τους σκοπούς της ανίχνευσης του SARS-CoV-2 στην Ινδία, το Ινστιτούτο Ιατρικών Επιστημών και Τεχνολογίας Sree Chitra Tirunal Thiruvananthapuram δημιούργησε το διαγνωστικό κιτ δοκιμής Chitra GeneLAMP-N. Ένα από τα πρώτα επιβεβαιωτικά διαγνωστικά τεστ για το γονίδιο N του SARS-CoV-2 στον κόσμο, αυτό το κιτ αποδίδει αποτελέσματα σε δύο ώρες. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να βελτιωθεί η μεθοδολογία RT-PCR για την αντιμετώπιση του προβλήματος της λιγότερο από τέλει ευαισθησίας.

Ενώ οι μοριακές τεχνικές και οι τεχνικές που βασίζονται σε αντισώματα πιθανότατα θα συνεχίσουν να κυριαρχούν στον τομέα της ιολογίας, η χρήση τους θα πρέπει να συμπληρωθεί με τη συμμετοχή σε νεότερες τεχνολογίες, όπως οι πλατφόρμες αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS). Η χρήση του NGS ωφελεί την ιολογία με πολλούς τρόπους. Πρώτον, μπορεί να λειτουργήσει ως αυτόνομη μέθοδος για τη διάγνωση ιών, εάν απαιτείται. Το NGS χρησιμοποιείται για την αλληλουχία γονιδιωμάτων, DNA και RNA και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των γενετικών πληροφοριών του ξενιστή από τις ιικές αλληλουχίες. Αυτό, επομένως, παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για τη διάγνωση ιών και θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο σε σενάρια όπου οι ασθενείς παρουσιάζουν μια ασθένεια και το αιτιολογικό παθογόνο είναι άγνωστο (Barzon et al., 2013). Ενώ οι μοριακές, ανοσο- και κυτταροκαλλιέργειες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό άγνωστων παθογόνων σε μια ερευνητική προσέγγιση "διαδικασίας εξάλειψης", το NGS προσφέρει μια πιο αποτελεσματική μέθοδο για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος (Adams et al., 2009). Επομένως, ενώ οι καθιερωμένες μέθοδοι μπορεί να είναι ταχύτερες στη διάγνωση γνωστών ιών, το NGS θα πρέπει να είναι ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος για τη μείωση του χρόνου μέχρι την ανακάλυψη νέων ή απροσδόκητων ιογενών παθογόνων.

Αναφέρονται περιπτώσεις εφαρμογής NGS που παρέχουν διάγνωση σε έναν προηγουμένως άγνωστο ιό ή εντοπίζουν απροσδόκητους ιούς σε δείγματα, υπογραμμίζοντας τη χρησιμότητά του (Palacios et al., 2008; Prachayangprecha κ.ά., 2014· Naccache κ.ά., 2015· Cordey κ.ά., 2016· Somasekar κ.ά., 2017· Rott et al., 2018). Το NGS θα μπορούσε επίσης να εφαρμοστεί στη διάγνωση αναδυόμενων ιών, όπου δεν υπάρχουν καθιερωμένες δοκιμασίες για τη δοκιμή του ιού. Ομοίως, η παρακολούθηση των επιπέδων του ιού σε έναν πληθυσμό θα μπορούσε επίσης να διευκολυνθεί από το NGS, με ιδιαίτερη έμφαση στην παρακολούθηση αναδυόμενων ή απροσδόκητων ιικών στελεχών. Η παθητική δειγματοληψία αερομεταφερόμενων ιών σε πολυσύχναστες περιοχές, όπως δίκτυα διαμετακόμισης, σχολεία, παιδικοί σταθμοί και αίθουσες έκτακτης ανάγκης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το NGS για την αξιολόγηση του ιικού φορτίου και των προτύπων σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα (Choi et al., 2018; Coleman κ.ά., 2018· Prussin κ.ά., 2019·

Coleman και Sigler, 2020). Με παρόμοιο τρόπο, ιικοί φορείς ή πομποί, όπως κουνούπια ή νυχτερίδες, μπορούν να ληφθούν δείγματα παθητικά και να ελέγχονται τακτικά, ώστε να επιτρέπεται η επιτήρηση του επιπολασμού του ιού στον πληθυσμό που φιλοξενεί (Eiras et al., 2018; Duarte κ.ά., 2020). Αυτό θα μπορούσε να είναι χρήσιμο για την πρόβλεψη εστιών ασθενειών ή εμφάνισης νέων ιών, Ένα άλλο πλεονέκτημα του NGS στην ιολογία είναι η υπόσχεση επέκτασης των δεδομένων αλληλούχισης του ιικού γονιδιώματος. Η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις ικές αλληλουχίες μπορεί να δυσχεράνει τον πειραματικό σχεδιασμό, για παράδειγμα, ο σχεδιασμός εκκινητών ενίσχυσης ευρέος φάσματος ή η ταυτοποίηση διατηρημένων αντιγόνων μπορεί να είναι δύσκολη όταν δεν είναι γνωστά όλα τα ιικά στελέχη (Barzon et al., 2011). Η ικανότητα αλληλουχίας πολλών ιών από έναν πληθυσμό και, ως εκ τούτου, η επίτευξη μιας πιο στρογγυλεμένης εικόνας της παραλλαγής αυτών των ιών, θα μπορούσε να βοηθήσει όχι μόνο στην επιτήρηση των αναδυόμενων ιών, αλλά και στην παροχή πρόσθετων πληροφοριών στους ερευνητές που επιθυμούν να αναπτύξουν νέες δοκιμασίες (Rosario and Breitbart, 2011; Radford κ.ά., 2012).

Ενώ το NGS είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία ως εργαλείο για την ανακάλυψη ιών, υπάρχουν προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν. Αυτά περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος, την ανάγκη τόσο για εκπαιδευμένο προσωπικό όσο και για βιοπληροφορικούς, το ενδεχόμενο χαμηλής ευαισθησίας σε λοιμώξεις χαμηλού ιικού φορτίου και την έλλειψη εργαλείων ανάλυσης δεδομένων καθολικής αλληλουχίας (Beerenwinkel et al., 2012; Barzon κ.ά., 2013· Massart κ.ά., 2014· Maree κ.ά., 2018). Μόλις αντιμετωπιστεί, το NGS θα μπορούσε να λειτουργήσει σε συνδυασμό με καθιερωμένες τεχνικές για να παρέχει ένα μέσο για τον εντοπισμό, τον χαρακτηρισμό και τη διάγνωση της ιογενούς λοίμωξης.

## 7. Συμπέρασμα

Η εισαγωγή διαγνωστικών εξετάσεων με βάση το νουκλεϊκό οξύ στη διαγνωστική ιολογία έχει επιφέρει τεράστια βελτίωση στην ανίχνευση ανθρώπινων ιογενών λοιμώξεων. Δεδομένου ότι οι διαγνωστικές εξετάσεις με βάση τα νουκλεϊκά οξέα

είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές, διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διάγνωση και τον έλεγχο των ιατρικών ιών. Οι μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι διαγιγνώσκουν ιογενείς λοιμώξεις ανιχνεύοντας ιικό RNA ή DNA. Επομένως, αυτές οι τεχνικές μπορούν να διαγνώσουν μολυσμένα άτομα πριν τοποθετηθεί απόκριση αντισωμάτων κατά του εν λόγω ιού. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε νέους, ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Ωστόσο, είναι πέρα από την εμβέλεια των εθνών με περιορισμένους πόρους λόγω του υψηλού κόστους, της πολυπλοκότητας των οργάνων και της απαίτησης για τεχνική εμπειρογνομosύνη. Οι ανοσολογικές δοκιμασίες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και την οροεπιτήρηση των ιογενών λοιμώξεων παγκοσμίως. Αν και οι ανοσοτεχνικές είναι εύκολες στην εκτέλεση και φθηνές σε σύγκριση με τις μοριακές μεθόδους, δεν είναι ευρέως διαθέσιμες σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Κατά συνέπεια, οι επιστήμονες εργάζονται σκληρά για να αναπτύξουν φθηνά τεστ καλής ποιότητας σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Επιπλέον, οι περισσότερες χώρες του αναπτυσσόμενου κόσμου εκπαιδεύουν τους πολίτες τους στο εξωτερικό και στην ενδοχώρα σε μεταπτυχιακό επίπεδο ανοίγοντας σχετικά τμήματα και ινστιτούτα.

Πρόσφατα, με την εφαρμογή βιοαισθητήρων και τεχνολογίας μικρορευστών, ο διαγνωστικός τομέας για λοιμώδη νοσήματα που προκαλούνται από ιούς γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη (Πίνακας 7.1). Οι συνήθεις μέθοδοι ανίχνευσης ιών, όπως η καλλιέργεια πλακών, οι ανοσολογικές δοκιμασίες ή η PCR, είναι συνήθως χρονοβόρες, δαπανηρές και περιορίζονται σε καλά ανεπτυγμένες περιοχές. Οι συμβατικές μέθοδοι δεν είναι επιρρεπείς σε ταχεία διάγνωση και επομένως εμποδίζουν τον έγκαιρο έλεγχο της εξάπλωσης της ιογενούς λοίμωξης. Οι αισθητήρες που βασίζονται σε μικρορευστά είναι γρήγοροι, απλοί στη χρήση, φορητοί και φθηνοί. Είναι κρίσιμο αυτές οι εφευρέσεις να μπορούν να φτάσουν σε όλες τις γωνίες του πλανήτη, από εξαιρετικά εξοπλισμένα εργαστήρια έως περιοχές χαμηλών πόρων, για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού και τον έλεγχο της εξάπλωσης της λοίμωξης. Αν και η ανάπτυξη αυτών των συσκευών είναι ταχεία και ελπιδοφόρα, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί όσον αφορά την ακρίβεια, την ευαισθησία και την ενσωμάτωση του συστήματος σε σύγκριση με τις τυπικές μεθόδους ανίχνευσης. Τα πραγματικά δείγματα, όπως τα κλινικά δείγματα, περιέχουν ένα σύμπλεγμα συστατικών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων πρωτεϊνών που τείνουν να προσροφούν μη ειδικά στην επιφάνεια των μικροδιαύλων και η μη ειδική προσρόφηση μπορεί να μειώσει την ακρίβεια και την ευαισθησία της δοκιμασίας σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών ουσιών. Μια άλλη πρόκληση στην ανάπτυξη συσκευών είναι η πλήρης ενσωμάτωση όλων των διαδικασιών ανάλυσης σε μία ενιαία πλατφόρμα. Συνήθως απαιτείται ογκώδης εξοπλισμός για το χειρισμό και τον έλεγχο του υγρού μέσα στο μικροκανάλι για ανάλυση, εμποδίζοντας την πλήρη ενσωμάτωση των μικρορευστολογικών συσκευών. Θα πρέπει να εφαρμοστούν μελλοντικές βελτιώσεις για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων και να

καταστούν ένα από τα τυποποιημένα διαγνωστικά εργαλεία για την ανίχνευση της λοίμωξης από ιούς.

Πίνακας 7.1, Μια επισκόπηση των μοριακών και ανοσολογικών διαγνωστικών πλατφορμών για την ανίχνευση ιών.

Detection Method	Sensing Platform	Virus	Target Analytes	LOD	Assay Time	Year of Publication
Immunoassay methods	Immuno-chromatic probe based LFA	Japanese Encephalitis	Non-structural 1 (NS1) secretory protein	10 pg/mL	10 min	2022
	Magnetic quantum dot nanobeads based LFA	Influenza A	Virus particle	22 PFU/mL	35 min	2020
	SER-based LFA	Influenza A	Virus particle	$1.9 \times 10^4$ PFU/mL	-	2016
	Portable SERS-LFA system	SARS-CoV-2	Nucleocapsid protein	3.53 PFU/mL	15 min	2022
	ELISA-based microfluidic chip	SARS-CoV-2	Nucleocapsid (N) protein	0.1 pg/mL	40 min	2022
	Multicolorimetric ELISA integrated with microfluidic device	Hepatitis C	Core antigen	9.1 ng/ $\mu$ L	50 min	2021
	Electrochemical immunoassay	SARS-CoV-2	Antigen (Nasopharyngeal samples)	50 PFU/mL	70 min	2022
	ELISA-based microfluidic immunoassay	SARS-CoV-2	Antigens and antibodies (Serum sample)	0.3 pg/mL	10 min	2021
	Graphene-based FET biosensing	SARS-CoV-2	Spike protein (Nasopharyngeal samples)	1 fg/mL	-	2020

Detection Method	Sensing Platform	Virus	Target Analytes	LOD	Assay Time	Year of Publication
Molecular methods	Portable Magnetofluidic real-time RT-PCR instrument	HIV	RNA extraction (Whole blood sample)	500 copies/mL	15 min	2023
	“FilmArray”: Nested multiplex PCR	21 common viral and bacterial respiratory pathogens	DNA/RNA extraction	Coronavirus HKU1 ( $1.9 \times 10^6$ RNA copies/mL)	60 min	2011
	Continuous-flow digital PCR device	Hepatitis B	DNA extraction (Serum sample)	$10^3$ to $10^5$ IU/mL	-	2020
	Pocket-size Reverse transcription (RT)-LAMP device	SARS-CoV-2	RNA extraction (Oropharyngeal swab samples)	300 RNA copies/reaction	35 min	2021
	Paper-based colorimetric LAMP device	SARS-CoV-2	Virus particle	200 genomic copies/ $\mu$ L (Saliva sample)	60 min	2021
	Wearable RPA microfluidic device	HIV-1	DNA	100 copies/mL	24 min	2019
	RT-RPA and CRISPR-based paper microdevice	SARS-CoV-2	Nucleoprotein (N) gene and spike (S) gene	$10^2$ copies viral RNA/test	60 min	2021
	Microfluidic Chip-Powered CRISPR/Cas12a System	Multiple respiratory viruses	DNA/RNA extraction (Swab samples)	50–200 copies/mL	<40 min	2022
	Graphene-based FET biosensing	SARS-CoV-2	Unamplified nucleic acids (Nasopharyngeal samples)	1–2 copies/100 $\mu$ L	<4 min	2022

## 8. Βιβλιογραφία

1. Seyed Hamid Safiabadi Tali, Jason J LeBlanc, Zubi Sadiq, Oyejide Damilola Oyewunmi, Carolina Camargo, Bahareh Nikpour, Narges Armanfard, Selena M Sagan, Sana Jahanshahi-Anbuhi, Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection, 2021 May 12;34(3):e00228-20. doi: 10.1128/CMR.00228-20
2. Daniel Hussien Reta, Tesfaye Sisay Tessema, Addis Simachew Ashenef, Adey Feleke Desta, Wajana Lako Labisso, Solomon Tebeje Gizaw, Solomon Mequanente Abay, Daniel Seifu Melka, Fisseha Alemu Reta, Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses, 2020 Sep 4;2020:8832728. doi: 10.1155/2020/8832728
3. Lipkin, W. I., & Anthony, S. J. (2015). Virus hunting. *Virology*, 479-480, 194–199. doi:10.1016/j.virol.2015.02
4. Kieu The Loan Trinh, Hoang Dang Khoa Do, Nae Yoon Lee, Recent Advances in Molecular and Immunological Diagnostic Platform for Virus Detection: A Review, 2023 Apr 19;13(4):490. doi: 10.3390/bios13040490
5. Harsh, Pratima Tripathi, Medical viruses: diagnostic techniques, 2023 Jul 11;20:143. doi: 10.1186/s12985-023-02108-w
6. A Cassedy, A Parle-McDermott, R O’Kennedy, Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods, 2021 Apr 20;8:637559. doi: 10.3389/fmolb.2021.637559
7. Reta, D. H., Tessema, T. S., Ashenef, A. S., Desta, A. F., Labisso, W. L., Gizaw, S. T., ... Reta, F. A. (2020). Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1–19. doi:10.1155/2020/8832728
8. Dowd, S. E., Halonen, M. J., & Maier, R. M. (2009). Immunological Methods. *Environmental Microbiology*, 225–241. doi:10.1016/b978-0-12-370519-8.00012-2
9. Rehmann, B., & Naoumov, N. V. (2007). Immunological techniques in viral hepatitis. *Journal of Hepatology*, 46(3), 508–520. doi:10.1016/j.jhep.2007.01.002
10. John Charles Rotondo, Fernanda Martini, Martina Maritati, Elisabetta Caselli , Carla Enrica Gallenga, Matteo Guarino, Roberto De Giorgio, Chiara Mazziotta, Maria Letizia Tramarin, Giada Badiale , Mauro Tognon 1 and Carlo Contini, Advanced Molecular and Immunological Diagnostic Methods to Detect SARS-CoV-2 Infection, *Microorganisms* 2022, 10, 1193,
11. Kieu The Loan Trinh, Hoang Dang Khoa Do and Nae Yoon Lee, Recent Advances in Molecular and Immunological Diagnostic Platform for Virus Detection: A Review, *Biosensors* 2023, 13, 490, doi:10.3390



12. Landry, M. L. (2009). *Developments in Immunologic Assays for Respiratory Viruses. Clinics in Laboratory Medicine*, 29(4), 635–647. doi:10.1016/j.cll.2009.07.003
13. Scott N Mueller, Barry T Rouse, Immune responses to viruses, *Clinical Immunology*. 2009 May 15;421–431. doi: 10.1016/B978-0-323-04404-2.10027-2
14. Jan Vinjé, Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus, *J Clin Microbiol*. 2015 Jan 23;53(2):373–381. doi: 10.1128/JCM.01535-14
15. Avinash Premraj, Abi George Aleyas, Binita Nautiyal 1, Thaha J Rasool, Nucleic Acid and Immunological Diagnostics for SARS-CoV-2: Processes, Platforms and Pitfalls, *Diagnostics (Basel)*. 2020 Oct 23;10(11):866. doi: 10.3390/diagnostics10110866
16. Wang, C.-S., Chang, C.-Y., & Wen, C.-M. (2015). Developing immunological methods for detecting *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus using a recombinant protein preparation. *Journal of Fish Diseases*, 39(6), 715–727. doi:10.1111/jfd.12404
17. Gratiela Gradisteanu Pircalabioru, Florina Silvia Iliescu, Grigore Mihaescu, Alina Irina Cucu, Octavian Narcis Ionescu, Melania Popescu, Monica Simion, Liliana Burlibasa, Mihaela Tica, Mariana Carmen Chifiriuc, Ciprian Iliescu, Advances in the Rapid Diagnostic of Viral Respiratory Tract Infections, *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 10;12:807253. doi: 10.3389/fcimb.2022.807253
18. Xianshu Fu, Qian Wang, Biao Ma, Biao Zhang, Kai Sun, Xiaoping Yu, Zihong Ye, Mingzhou Zhang, Advances in Detection Techniques for the H5N1 Avian Influenza Virus, 2023 Dec 5;24(24):17157. doi: 10.3390/ijms242417157
19. Tatti, K. M., Gentsch, J., Shieh, W.-J., Ferebee-Harris, T., Lynch, M., Bresee, J., ... Glass, R. (2002). Molecular and immunological methods to detect rotavirus in formalin-fixed tissue. *Journal of Virological Methods*, 105(2), 305–319. doi:10.1016/s0166-0934(02)00124-6
20. Dagfinn Lunde Markussen, Harleen M. S. Grewal, Siri Tandberg Knoop, Sondre Serigstad, Øyvind Kommedal, Marit Ebbesen, Elling Ulvestad, Rune Bjørneklett & The CAPNOR Study Group, Comparison of rapid molecular testing methods for detecting respiratory viruses in emergency care: a prospective study, Published online: 30 Nov 2021, doi:10.1080/23744235.2021.2003857
21. S Asad Ali, James E Gern, Tina V Hartert, Kathryn M Edwards, Marie R Griffin, E Kathryn Miller, Tebeb Gebretsadik, Tressa Pappas, Wai- ming Lee, John V Williams, Real-world comparison of two molecular methods for detection of respiratory viruses, *Virology*. 2011 Jun 29;533:332. doi: 10.1016/j.virol.2011.06.032
22. Catherine Hennechart-Collette, Océane Dehan, Michel Laurentie, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Sylvie Perelle, Method for detecting norovirus, hepatitis A and hepatitis E viruses in tap and bottled drinking water, *Journal of Virological Methods*, Volume 377, 16 September 2022, 109757
23. Artika, I. M., Wiyatno, A., & Ma'roef, C. N. (2020). Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infection, Genetics and Evolution*, 104215. doi:10.1016/j.meegid.2020.104215
24. James B Mahony, Detection of Respiratory Viruses by Molecular Methods, *Clin Microbiol Rev*. 2008 Oct;21(4):716–747. doi: 10.1128/CMR.00037-07

25. Ewa Kwit, Artur Rzeżutka, Molecular methods in detection and epidemiologic studies of rabbit and hare viruses: a review, *J Vet Diagn Invest.* 2019 May 25;31(4):497–508. doi: 10.1177/1040638719852374
26. Yoonhyuk Choi, Younghee Kim, Application of multiplex realtime PCR detection for hemorrhagic fever syndrome viruses, *Journal of Infection and Public Health* Volume 16, Issue 12, December 2023, Pages 1933-1941, doi:10.1016/j.jiph.2023.10.012
27. Katsarou, K., Bardani, E., Kallemi, P., & Kalantidis, K. (2019). Viral Detection: Past, Present, and Future. *BioEssays*, 1900049. doi:10.1002/bies.201900049
28. *Lancet Microbe* 2024; 5: 100880 Published Online May 8, 2024, doi.: 10.1016/S2666-5247(23)00375-0
29. Coralie Coudray-Meunier, Audrey Fraisse, Sandra Martin-Latil, Sabine Delannoy, Patrick Fach, Sylvie Perelle, A Novel High-Throughput Method for Molecular Detection of Human Pathogenic Viruses Using a Nanofluidic Real-Time PCR System, *PLoS One.* 2016 Jan 29;11(1):e0147832. doi: 10.1371/journal.pone.0147832
30. Yeh, H.-Y., Yates, M. V., Chen, W., & Mulchandani, A. (2009). Real-time molecular methods to detect infectious viruses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20(1), 49–54. doi:10.1016/j.semcd.2009.01.012
31. Mäkelä, O., Sarvas, H., & Seppälä, I. (1980). Immunological methods based on antigen-coupled bacteriophages. *Journal of Immunological Methods*, 37(3-4), 213–223. doi:10.1016/0022-1759(80)90308-7
32. Ma, H., Cassedy, A., & O’Kennedy, R. (2021). The role of antibody-based troponin detection in cardiovascular disease: A critical assessment. *Journal of Immunological Methods*, 497, 113108. doi:10.1016/j.jim.2021.113108
33. Ndumbe, P. M., & Levinsky, R. J. (1985). Immunological cross-reactivities among three herpesviruses. *Journal of Immunological Methods*, 83(2), 337–342. doi:10.1016/0022-1759(85)90255-8
34. Chayna Singha Mahapatra, Priya Sharma, Sanchay Kumar Biswas, Karam Chand, Development of ELISA for the detection of antibodies against VP2 protein of bluetongue virus serotype-1, *Journal of Immunological Methods*, Volume 511, December 2022, 113386
35. Prabhakaran, Narpala, S., Andrews, S. F., O’Connell, S., Lin, C. L., Coates, E. E., Flach, B., Ledgerwood, J. E., & McDermott, A. B. (2021). A sensitive method to quantify HIV-1 antibodies in mucosal samples. *Journal of Immunological Methods*, 491, 112995. doi:10.1016/j.jim.2021.112995
36. A. Cassedy, A. Parle-McDermott and R. O’Kennedy, Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods, *Front. Mol. Biosci.*, 20 April 2021, Sec. Molecular Diagnostics and Therapeutics, Volume 8 - 2021 | doi: 10.3389/fmolb.2021.637559
37. Spel, L., & Martinon, F. (2021). Detection of viruses by inflammasomes. *Current Opinion in Virology*, 46, 59–64. doi:10.1016/j.coviro.2020.10.001
38. ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥ ΒΟΝΤΑ, «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΝΟΡΟΪΩΝ, ΑΔΕΝΟΪΩΝ, ΡΟΤΑΪΩΝ, ΑΣΤΡΟΪΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΜΕ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ», Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly 30/10/2024 11:18:45 EET - 46.176.85.6

39. Hana Hoffmeisterová, Kateřina Kratochvílová, Noemi Čerovská, Lucie Slavíková, Jakub Dušek, Karel Muller, Jan Fousek, Helena Plchová, Oldřich Navrátil, Jiban Kumar Kundu, Tomáš Morave, One-Enzyme RTX-PCR for the Detection of RNA Viruses from Multiple Virus Genera and Crop Plants, *Viruses*. 2022 Jan 31;14(2):298. doi: 10.3390/v14020298
40. Idrissa DIENG, Mignane Ndiaye, Moussa Dia, Moufid Mhamadi, Cheikh Talibouya Toure, Aboubacry Gaye, Cheikh Tidiane Diagne, Ahmed El Wahed, Manfred Weidmann, Ousmane Faye, Amadou Alpha Sall, Oumar Faye, Quantitative real time PCR detection of Saboya virus: A flavivirus member of yellow fever genetic group, *Journal of Virological Methods*, Volume 311, January 2023, 114638
41. Nimrat Khehra; Inderbir S. Padda; Cathi J. Swift, Polymerase Chain Reaction (PCR), March 6, 2023.
42. Li, K., & Brownley, A. (2010). Primer Design for RT-PCR. *RT-PCR Protocols*, 271–299. doi:10.1007/978-1-60761-629-0\_18
43. Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582. doi:10.1038/nprot.2006.236
44. Marianna Soroka, Barbara Wasowicz, Anna Rymaszewska, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The Better Sibling of PCR?, *Cells*. 2021 Jul 29;10(8):1931. doi: 10.3390/cells10081931
45. Kieu The Loan Trinh, Hoang Dang Khoa Do, Nae Yoon Lee, Recent Advances in Molecular and Immunological Diagnostic Platform for Virus Detection: A Review, *Biosensors (Basel)*. 2023 Apr 19;13(4):490. doi: 10.3390/bios13040490
46. Harsh, Pratima Tripathi, Medical viruses: diagnostic techniques, *Virol J*. 2023 Jul 11;20:143. doi: 10.1186/s12985-023-02108-w
47. Goldin John, Nikhil Shri Sahajpal, Ashis K Mondal, Sudha Ananth, Colin Williams, Alka Chaubey, Aryn M Rojiani, Ravindra Kolhe, Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology, *Curr Issues Mol Biol*. 2021 Jul 30;43(2):845–867. doi: 10.3390/cimb43020061
48. Josep Quer, Sergi Colomer-Castell, Carolina Campos, Cristina Andrés, Maria Piñana, Maria Francesca Cortese, Alejandra González-Sánchez, Damir Garcia-Cehic, Marta Ibáñez, Tomàs Pumarola, Francisco Rodríguez-Frías, Andrés Antón, David Taberner, Next-Generation Sequencing for Confronting Virus Pandemics, *Viruses*. 2022 Mar 14;14(3):600. doi: 10.3390/v14030600
49. Harsh, Pratima Tripathi, Medical viruses: diagnostic techniques, *Virol J*. 2023 Jul 11;20:143. doi: 10.1186/s12985-023-02108-w
50. Hornbeck, P. V. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 2.1.1–2.1.23. doi:10.1002/0471142735
51. Natalie J Kingston, Keith Grehan, Joseph S Snowden, Mona Shegdar, Helen Fox, Andrew J Macadam, David J Rowlands, Nicola J Stonehouse, Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of the Native Conformation of Enterovirus A71, *mSphere*. 2022 Jun 1;7(3):e00088-22. doi: 10.1128/msphere.00088-22

52. Wenjun Zhu, Greg Smith, Bradley Pickering, Logan Banadyga, Ming Yang, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Henipavirus-Receptor EphrinB2 and Monoclonal Antibodies for Detecting Nipah and Hendra Viruses, *Viruses*. 2024 May 16;16(5):794. doi: 10.3390/v16050794
53. Kavya L Singampalli, Jiran Li, Peter B Lillehoj, Rapid magneto-enzyme-linked immunosorbent assay for ultrasensitive protein detection, *Anal Chim Acta*. 2022 Sep 8;1225:340246. doi: 10.1016/j.aca.2022.340246
54. Harsh, Pratima Tripathi, Medical viruses: diagnostic techniques, *Virol J*. 2023 Jul 11;20:143. doi: 10.1186/s12985-023-02108-w
55. Mariano A Molina, Monique Vink, Ben Berkhout, Elena Herrera-Carrillo, In-house ELISA protocols for capsid p24 detection of diverse HIV isolates, *Virol J*. 2023 Nov 17;20:269. doi: 10.1186/s12985-023-02242-5
56. Lee, C. (2007). Western Blotting. *Circadian Rhythms*, 391–399. doi:10.1007/978-1-59745-257-1\_30
57. Meads, M. B., & Medveczky, P. G. (n.d.). Application of Western Blotting to Diagnosis of Viral Infections. *Clinical Virology Manual*, Fourth Edition, 150–155. doi:10.1128/9781555815974.ch13
58. Ling, M., & Murali, M. (2019). Antinuclear Antibody Tests. *Clinics in Laboratory Medicine*. doi:10.1016/j.cl.2019.07.001
59. MARIE LOUISE LANDRY AND YI-WEI TANG, Immunologic and Molecular, *Methods for Viral Diagnosis*, Sun, 18 Jun 2017, doi: 10.1128/9781555818722.ch57
60. Leland, D. S., & French, M. L. V. (1988). Virus Isolation and Identification. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice*, 39–59. doi:10.1007/978-1-4612-3900-0\_3