



«Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας»

«Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Διπλωματική Εργασία

«Μοριακές τεχνικές στη διάγνωση των μεταλλάξεων

του ιού SARS-CoV-2»

Ελισαμπέτα Μπάχο

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Σουλτάνα Μαρκοπούλου

Επιβλέπων καθηγητής: Διαμάντης Σίδερης

Πάτρα, Ιούνιος, 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο 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, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα δημιουργού. Ο συγγραφέας- δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.



ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΑΝΟΙΚΤΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

«Μοριακές τεχνικές στη διάγνωση των μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2»

Ελισαμπέτα Μπάχο

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Μαρκοπούλου Σουλτάνα

Μέλος ΣΕΠ, ΕΑΠ

Συν-επιβλέπων Καθηγητής:

Διαμάντης Σίδερης

Αναπληρωτής καθηγητής Βιολογίας, τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Πάτρα, Ιούνιος, 2023

Διπλωματική Εργασία

*«Ελισταμπέτα Μπάχο», «Μοριακοί Διαγνωστικοί Μέθοδοι των
Μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2»*

«Ολοκληρώνοντας το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και τη διπλωματική μου εργασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Σουλτάνα Μαρκοπούλου για την υπομονή της, την ενθάρρυνση και τη πολύτιμη καθοδήγησή της σε αυτό το ταξίδι της συγγραφής της παρούσας εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα επιστημόνων του Κεντρικού Εργαστηρίου Δημόσιας Υγείας του Μοριακού Εργαστηρίου για την πολύτιμη στήριξή τους και τέλος την οικογένειά μου η οποία στάθηκε αρωγός σε αυτή μου την προσπάθεια».

«Ελισαμπέτα Μπάχο», «Μοριακοί Διαγνωστικοί Μέθοδοι των Μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2»

Περίληψη

Τον Δεκέμβριο του 2019, εντοπίστηκε στην Κίνα ένας νέος κορωνοϊός, ο SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), ο οποίος προσβάλλει το αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού και είναι υπεύθυνος για τη τρέχουσα πανδημία του COVID-19. Ο ιός αυτός ευθύνεται για εκατομμύρια μολύνσεις στη παγκόσμια κοινότητα ενώ παράλληλα κρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ότι η θνησιμότητα του κυρίως για άτομα με υποκείμενα νοσήματα, ηλικιωμένους και ανοσοκατασταλμένους είναι μεγάλη. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας σε συνεργασία με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων των Ηνωμένων Πολιτειών είναι υπεύθυνοι για την υγειονομική επιτήρηση σε παγκόσμιο επίπεδο, συλλέγοντας δεδομένα από τις συνεργαζόμενες χώρες-μέλη και καταγράφοντας τις νέες μεταλλάξεις του ιού που επιφέρουν και νέα κύματα στη πανδημία καθώς επίσης προτρέπει τις κυβερνήσεις να λάβουν τα απαραίτητα υγειονομικά μέτρα για τον έλεγχο της εξάπλωσης του ιού. Ο έλεγχος των θετικών κρουσμάτων για τυχόν νέες μεταλλάξεις κρίνεται απαραίτητος και οι μοριακοί διαγνωστικοί μέθοδοι είναι πολύτιμα εργαλεία για την ανίχνευσή τους και τη παγκόσμια υγειονομική επιτήρηση του ιού.

Λόγω της υψηλής μολυσματικότητας του ιού SARS-CoV-2 και των ολοένα και περισσότερων αναδυόμενων παραλλαγών και μεταλλάξεων του παγκοσμίως, οι αρχές δημόσιας υγείας κάθε χώρας τα εντοπίζουν και τα επιτηρούν με ειδικές σχεδιασμένες μοριακές διαγνωστικές τεχνικές όπως η RT-PCR και με την αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS). Και οι δύο μέθοδοι χαρακτηρίζονται από ακρίβεια και αξιοπιστία.

Λέξεις Κλειδιά: COVID-19, SARS-CoV-2, μοριακοί διαγνωστικοί μέθοδοι, μεταλλάξεις, RT-PCR, NGS.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ/ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1 Μορφολογία του ιού SARS-CoV-2 (Udugama, etc., 2020).....	7
Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση της εισόδου του ιού SARS-CoV-2 σε κύτταρα ξενιστές (Bchethnia et al., 2020)	9
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση των κύριων συμπτωμάτων της νόσου COVID-19 (Rothan & Byrareddy, 2020).....	11
Εικόνα 4 Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των μεταλλάξεων SARS-CoV-2 από τον Δεκέμβριο του 2020 έως τον Νοέμβριο του 2021 (CDC, 2023)	15
Εικόνα 5 Παράδειγμα ειδικής τριπλής συσκευασίας για τη συλλογή και μεταφορά "Κατηγορίας Α, Λοιμωδών Παραγόντων" (ΕΟΔΥ, 2020).....	27
Εικόνα 6 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος SARS-CoV-2 και πού εντοπίζονται οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις (Spiess, et., 2023).....	29
Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου RT-qPCR (Feng, etc., 2020).....	32
Εικόνα 8 Αλληλουχίες ανιχνευτών και εκκινητών σχεδιασμένων ειδικά για τις δοκιμασίες ανίχνευσης μεταλλάξεων (Vega- Megana, etc., 2021)	35
Εικόνα 9 Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό διαγραφής 69/70. (B) Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό μετάλλαξης K417N. (C) Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό E484K/N501Y (Vega-Megana, etc., 2021).....	38
Εικόνα 10 Παρουσίαση διαγραμμάτων της εντόπισης των μεταλλάξεων E484K και N501Y (Vega-Megana, etc., 2021)	39
Εικόνα 11 Πίνακας με τις αντικαταστάσεις, διαγραφές ή παρεμβολές αμινοξέων χαρακτηριστικών πρωτεϊνών ακίδας (ECDC, 2022).....	44
Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων του NGS (Hess, et al., 2020)	47
Εικόνα 13 Φυλογενετικό δέντρο που συγκρίνει τα έξι Τυνησιακά SARS-CoV-2 με 268 προηγούμενως δημοσιευμένες αλληλουχίες (Fares et al., 2021)	50

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

SARS-COV-2 (Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο από Κορωνοϊό 2)

CDC (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων των ΗΠΑ)

ECDC (Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων)

GISAID (Παγκόσμια Πρωτοβουλία για την Ανταλλαγή Δεδομένων για τη Γρίπη)

ACE 2 (Υποδοχέας του μετατρεπτικού ενζύμου της Αγγειοτενσίνη 2)

Π.Ο.Υ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας)

Ε.Ο.Δ.Υ (Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας)

bp (Ζεύγη βάσεων)

RBD (Περιοχή δέσμευσης υποδοχέα)

RT-PCR (Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής)

COVID-19 (Νόσος Κορωνοϊού 2019)

SGTF (Αποτυχία στόχου γονιδίου ακίδας S)

WGS (Αλληλούχηση ολόκληρου γονιδιώματος)

NGS (Αλληλούχηση νέας γενιάς)

NCBI (Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των Ηνωμένων Πολιτειών)

VOC (Παραλλαγή ανησυχίας)

«Ελισταμπέτα Μπάχο», «Μοριακοί Διαγνωστικοί Μέθοδοι των Μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2»

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 Ανθρώπινος Κορωνοϊός SARS-CoV-2	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Προέλευση	4
1.3 Ταξινόμηση και Γονιδίωμα.....	5
1.4 Μόλυνση των ανθρώπινων κυττάρων με SARS-CoV-2 και η ανοσολογική απόκριση	8
1.5 Κλινικά Συμπτώματα	11
1.6 Μεταλλάξεις του SARS-CoV-2	13
1.7 Προηγούμενες παραλλαγές ανησυχίας (VOC) του SARS-CoV-2	16
1.8 Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων της νόσου COVID-19 στις παραλλαγές VOC του SARS-CoV-2.....	18
Κεφάλαιο 2 Κλινικά δείγματα και βασικές μεταλλάξεις των παραλλαγών VOC.....	24
2.1 Κατάλληλα Κλινικά Δείγματα.....	24
2.2 Συλλογή και μεταφορά των κλινικών δειγμάτων του ιού SARS-CoV-2.....	25
2.3 Απαραίτητα μέτρα για τη διαχείριση των κλινικών δειγμάτων για την εργαστηριακή μελέτη του SARS-CoV-2.....	28
2.4 Θέσεις βασικών μεταλλάξεων των παραλλαγών στο γονιδίωμα του ιού.....	29
Κεφάλαιο 3 RT-PCR (Reverse transcription –polymerase chain reaction ή Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης	31
Κεφάλαιο 4 Next Generation Sequencing - (Αλληλούχηση νέας γενιάς)	45
Κεφάλαιο 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	51

«Ελισαμπέτα Μπάχο», «Μοριακοί Διαγνωστικοί Μέθοδοι των Μεταλλάξεων του ιού SARS-CoV-2»

«Review of Molecular Detection Methods of Sars-CoV-2 mutations»

«Elisabeta Baho»

Abstract

In December 2019, a new coronavirus, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), which attacks the respiratory system of the human body and is responsible for the current COVID-19 pandemic, was identified in China. This virus is responsible for millions of infections in the global community, while at the same time it was judged by the WHO that its mortality is high, mainly for people with underlying diseases, the elderly and the immunosuppressed. The World Health Organization in collaboration with the Centers for Disease Control and Prevention are responsible for health surveillance at the global level, collecting data from cooperating member countries and recording the new mutations of the virus that bring about new waves in the pandemic as well as urging governments to take the necessary sanitary measures to control the spread of the virus. Screening positive cases for any new mutations is considered necessary and molecular diagnostic methods are valuable tools for their detection.

Due to the high infectivity of the SARS-CoV-2 virus and its increasingly emerging variants and mutations worldwide, the public health authorities of each country detect and monitor them with specially designed molecular diagnostic techniques such as RT-PCR and next generation sequencing (NGS). Both methods are characterized by accuracy and reliability.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, molecular diagnostic methods, mutations, RT-PCR, NGS.

Κεφάλαιο 1 Ανθρώπινος Κορωνοϊός SARS-CoV-2

1.1 Εισαγωγή

Τον Δεκέμβριο του 2019 η ανθρωπότητα θα ερχόταν αντιμέτωπη με την αρχή μιας πανδημίας οπού θα άλλαζε την κανονικότητα όλων. Η αρχή έλαβε χώρα στη Γιουχάν, μια επαρχιακή πόλη της Κίνας, όπου εκδηλώθηκαν τα πρώτα κρούσματα πνευμονίας άγνωστης προέλευσης. Στο τέλος του μήνα ήδη οι υγειονομικές υπηρεσίες της Κίνας ενημέρωσαν τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ), όπου με τη σειρά του στις 7 Ιανουαρίου του 2020 ανακοίνωσε ότι είχαν εντοπίσει έναν νέο κορωνοϊό σε ρινοφαρυγγικό επίχρισμα σε ασθενή με βαριά πνευμονία. Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses-ICTV) ο ιός ονομάστηκε SARS-CoV-2, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ασθένεια COVID-19 με κύριο χαρακτηριστικό την πρόκληση σοβαρού οξύ αναπνευστικού προβλήματος στον ασθενή (Harapan et al., 2020). Εν συνεχεία, στις 13 Ιανουαρίου εντοπίστηκε το πρώτο κρούσμα εκτός Κίνας, στην Ταϊλάνδη και μέχρι τέλος του μήνα καταγράφηκαν 7818 κρούσματα ανά τον κόσμο, κινητοποιώντας τις υγειονομικές αρχές κάθε χώρας σε λήψη μέτρων περιορισμού της εξάπλωσης του νέου κορωνοϊού, αφού ήδη η Κίνα κατέγραφε 170 θανάτους. Αυτό είχε σαν συνέπεια το ξέσπασμα μιας νέας πανδημίας που θα έφερνε την παγκόσμια κοινότητα σε πρωτόγνωρα μέτρα αντιμετώπισης της και τον Π.Ο.Υ να ανακοινώνει το ιστορικό αυτό συμβάν επίσημα τον Μάρτιο του 2020 (Ludwig & Zarbock, 2020).

Μέχρι τον Οκτώβριο του 2020 περισσότεροι από 39.000.000 ασθενείς είχαν μολυνθεί με τον ιό SARS-CoV-2 και ήταν η αιτία να καταλήξουν περισσότεροι από 1.100.000. Η παγκόσμια υγειονομική κοινότητα ήταν επί ποδός και η ανάγκη για την ανάπτυξη νέου αποτελεσματικού εμβολίου ήταν επιτακτική, με 42 πρότυπα εμβόλια να δοκιμάζονται κλινικά στη φάση II αλλά και η δοκιμή και η ανάπτυξη νέων μεθόδων για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου να είναι σε συνεχή πρόοδο. Χαρακτηριστικά, δοκιμάστηκαν θεραπείες με αντικά φάρμακα, αντιπαρασιτικά και ανοσορυθμιστικά. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Φαρμάκων ενέκρινε τη χορήγηση ορού ανάρρωσης ως θεραπεία αλλά και η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα προσέφερε ελπίδες για την εξουδετέρωση αλλά και τη πρόληψη της νόσου (Canedo-Marroquín, etc., 2020).

Με την αρχή της πανδημίας η επιστημονική κοινότητα σχετίζοντας και συλλέγοντας πληροφορίες από δημοσιευμένες έρευνες κυρίως για τον SARS-CoV (Σοβαρό Οξύ Αναπνευστικό Σύνδρομο) και σε κάποιο βαθμό για τον MERS (Αναπνευστικό Σύνδρομο της Μέσης Ανατολής) κατάφερε γρήγορα να συλλέξει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την ανάπτυξη κατάλληλων εμβολίων. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι ο SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί τον ίδιο υποδοχέα με τον SARS-CoV στο κύτταρο ξενιστή, δηλαδή το ανθρώπινο μετατρεπτικό ένζυμο αγγειοτενσίνη 2 (hACE2) ο οποίος είναι περίπου 79% γενετικά παρόμοιος με τον SARS-CoV. Η Κίνα ήταν η πρώτη χώρα που ξεκίνησε μόλις ξέσπασε η πανδημία τις διαδικασίες για την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου κατά της νόσου COVID-19 (Kaur & Gupta, 2020).

Τον Δεκέμβριο του 2020 και μέσα στο έτος του 2021 τα πρώτα εγκεκριμένα εμβόλια ήταν διαθέσιμα έτοιμα για χορήγηση κυρίως στις ευπαθείς ομάδες όπως ηλικιωμένοι, άτομα με υποκείμενα νοσήματα και επαγγελματίες υγείας που βρίσκονται στη πρώτη γραμμή μάχης κατά του ιού στα νοσηλευτικά ιδρύματα παγκοσμίως. Οι φαρμακευτικές εταιρίες παραγωγής τους χρησιμοποιούν μια ανασυνδυασμένη γλυκοπρωτεΐνη ακίδας: είτε με βάση mRNA (τα εμβόλια Moderna και Pfizer-BioNTech), είτε μέσω φορέα αδενοϊού (τα εμβόλια Oxford-AstraZeneca, CanSino και Johnson&Johnson), είτε μέσω ένεσης της ίδιας της πρωτεΐνης (το εμβόλιο Novax) (Williams & Burgers, 2021).

Επιπρόσθετα, παράλληλα με τις έρευνες για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων, λάμβαναν χώρα και εκτεταμένες προσπάθειες για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing-WGS). Περισσότερες από 360.000 αλληλουχίες SARS-CoV-2 προστέθηκαν στην πλατφόρμα Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAD). Αυτό το γεγονός βοήθησε τους ερευνητές να παρακολουθούν την εξάπλωση διαφορετικών γενεαλογικών γενεών παγκοσμίως. Γίνεται αντιληπτό ότι ορισμένες μεταλλάξεις του ιού παρέχουν πλεονεκτήματα φυσικής κατάστασης και διευκολύνουν την ταχύτερη εξάπλωση συγκεκριμένων παραλλαγών. Τέλος, μελέτες έχουν σχετίσει τη γονιδιωματική μεταβλητότητα του SARS-CoV-2 και της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή (Yuen, Fung, Cheung, Chan, Jin, 2021).

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτελεί η παρουσίαση των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων ανίχνευσης των μεταλλάξεων του SARS-CoV-2. Γίνεται μια εκτενή αναφορά στην αρχή μεθόδου τους, στα βασικά χαρακτηριστικά τους και στα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα τους. Τέλος, για τη συλλογή απαραίτητων πληροφοριών και δεδομένων για τον ιό SARS-CoV-2, τις μεταλλάξεις του και τους μοριακούς ελέγχους για τον προσδιορισμό τους, πραγματοποιήθηκε μελέτη βασισόμενη σε βιβλιογραφικές αναφορές της μηχανής αναζήτησης Pubmed και Elsevier. Επίσης, δεδομένα αντλήθηκαν από την επίσημη ιστοσελίδα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων των Ηνωμένων Πολιτειών (CDC), τον Ευρωπαϊκό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νόσων (ECDC) και τον Εθνικό Οργανισμό Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ).

1.2 Προέλευση

Η προέλευση του κορωνοϊού δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως όμως έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονικοί ιοί του SARS-CoV-2.

Ο πρώτος είναι ο κορωνοϊός της νυχτερίδας RaTG13 που βρέθηκε στο *Rhinolophus affinis* από την επαρχία Γιουχάν και συγκλίνει στο 96,2 της συνολικής ταυτότητας της αλληλουχίας του γονιδιώματος του SARS-CoV-2. Ωστόσο, ο κορωνοϊός RaTG13 πιθανολογείται να μην είναι άμεσος πρόγονος του SARS-CoV-2 καθώς ο ιός SARS-CoV-2 χρησιμοποιεί τον υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιωτενσίνη 2 (ACE2) και αυτό το διαφοροποιεί από τον RaTG13.

Ο δεύτερος είναι ο βήτα κορωνοϊός που εντοπίζεται στους Μαλαισιανούς παγκολίνους, μια ομάδα απειλούμενων μικρών θηλαστικών που παράνομα εμπορεύονται για βρώσιμη κατανάλωση στις αγορές κρεάτων της Νότιας Κίνας. Σύμφωνα με γονιδιωματικές αναλύσεις βρέθηκε ότι ο βήτα κορωνοϊός συγκλίνει με το 90% της γονιδιωματικής αλληλουχίας του SARS-CoV-2. Επιπρόσθετα, φέρει έναν τομέα δέσμησης που φέρεται να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ACE2 και η αλληλουχία του συγκλίνει στο 97,4% σε σχέση με αυτή του SARS-CoV-2. Παρόλα αυτά ο βήτα κορωνοϊός και ο SARS-CoV-2 δεν συγκλίνουν καθολικά στο σύνολο της γονιδιωματικής αλληλουχίας, άρα φαίνεται απίθανο να είναι και άμεσος πρόγονος του SARS-CoV-2 (Yuen, etc., 2021).

Συμπερασματικά, η εύρεση του ασθενή 0 στη Γιουχάν της Κίνας είναι εξαιρετικά δύσκολη και μόνο κάποιος που μπορεί να έχει άμεση πρόσβαση από πρώτο χέρι στα συγκεκριμένα δεδομένα θα μπορούσε να απαντήσει και να βοηθήσει καλή τη πίστη. Εφόσον, υπάρχουν ασυμπτωματικοί ασθενείς και αδιάγνωστοι που εντοπίστηκαν αναδρομικά ως κρούσματα που χρονολογούνται από τον Δεκέμβριο του 2019 ή ακόμη νωρίτερα, η θεωρία πως το πρώτο κρούσμα είναι μια γυναίκα πωλήτρια θαλασσινών στην αγορά Γιουχάν δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί με σιγουριά. Περαιτέρω έρευνες μελλοντικά θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν την προέλευση του SARS-CoV-2 (Shereen, Khan, Kazmi, Bashir & Siddique, 2020).

1.3 Ταξινόμηση και Γονιδίωμα

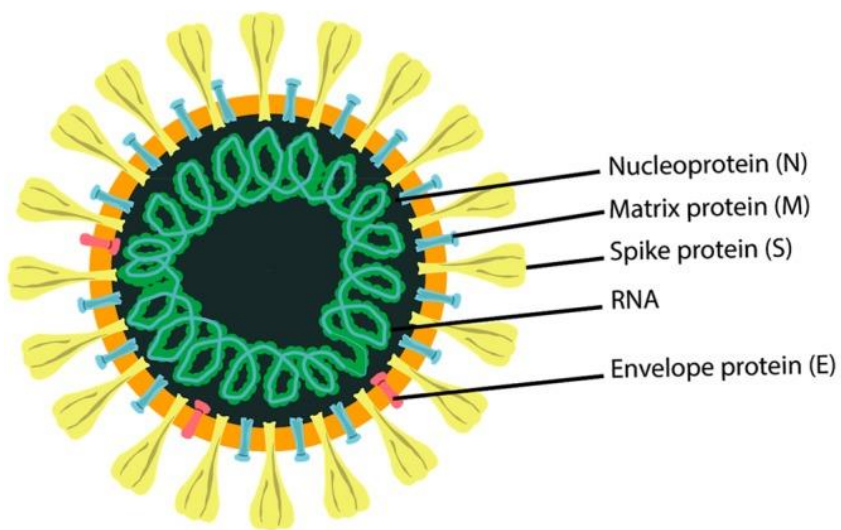
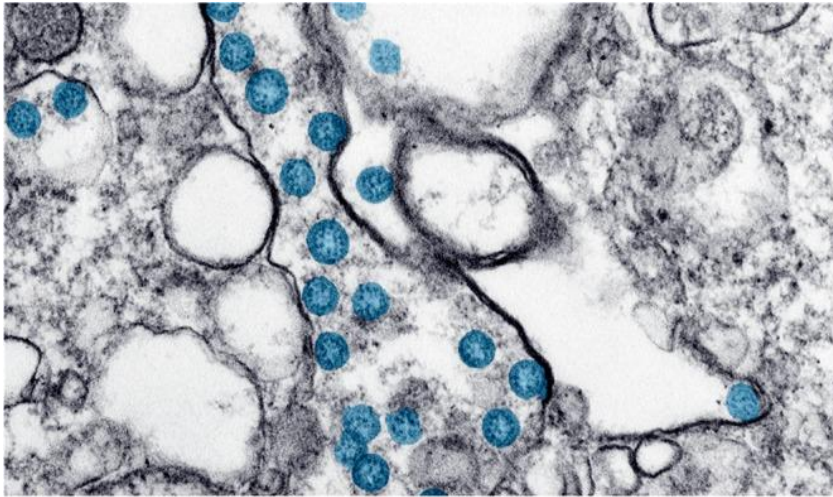
Οι κορωνοϊοί CoVs ανήκουν στη τάξη Nidovirales, στο γένος Coronaviridae και στην υποοικογένεια Coronavirinae. Έχουν χαρακτηριστικό στην εξωτερική επιφάνεια τους αιχμές που μοιάζουν με κορώνα γι' αυτό άλλωστε ονομάστηκαν και έτσι. Ο ιός αυτός είναι μικρός σε μέγεθος (65-125nm σε διάμετρο) και στον πυρήνα του φέρει ως γονιδίωμα ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους 26 με 32bp (Shereen, etc, 2020). Οι υποομάδες της οικογένειας των κορωνοϊών ταξινομούνται σε 4 γένη: σε άλφα κορωνοϊός (alpha-coronavirus), βήτα κορωνοϊός (beta-coronavirus), γάμα κορωνοϊός (gamma-coronavirus) και δέλτα κορωνοϊός (delta-coronavirus). Οι άλφα και βήτα κορωνοϊοί μολύνουν τα θηλαστικά κατ' επέκταση και τον άνθρωπο ενώ οι γάμμα και δέλτα κορωνοϊοί μολύνουν κυρίως τα πτηνά (Wertheim, Chu, Peiris, Pond&Poon, 2013). Επιπλέον, υπάρχουν εφτά ανθρώπινοι κορωνοϊοί ο 229E(HCoV-229E), OC43(HCoV-OC43), SARS-CoV, NL63(HCoV-NL63), HKU1(HCoV-HKU1), MERS-CoV και ο SARS-CoV-2 που είναι υπεύθυνος για τη πανδημία του COVID-19. Η προέλευση τους ποικίλλει, με τον MERS-CoV και SARS-CoV να πιθανολογείται ότι προέρχονται από νυχτερίδες και να εξαπλώθηκαν στις καμήλες πριν 30 χρόνια. Ο HCoV229E και HCoV-NL63 ανακαλύφθηκε πρόσφατα ότι προέρχονται από αφρικάνικες νυχτερίδες και καμήλες ωστόσο προκαλούν ένα ήπιο κρυολόγημα χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στο αναπνευστικό σύστημα γεγονός που δεν τα καθιστά επικίνδυνα. Οι HCoV-OC43 και HCoV-HKU1 θα μπορούσαν να προέρχονται από τρωκτικά. Τέλος, η θεωρία ότι οι Μαλαισιανοί παγκολίνοι θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδιάμεσοι ξενιστές, καθώς το γονιδίωμα τους αποκαλύφθηκε ότι έχει υψηλή ομοιότητα αλληλουχίας με τον SARS-CoV-2 δεν έχει τεκμηριωθεί αρκετά και χρειάζεται παραπάνω μελέτες από την επιστημονική κοινότητα (Tang, Liu & Chen, 2022).

Πιο αναλυτικά, ο SARS-CoV-2 ανιχνεύτηκε και αναγνωρίστηκε από την επιστημονική κοινότητα ως ένας νέο κορωνοϊός το 2019 και είναι η αιτία της πανδημίας πνευμονίας του COVID-19. Ανήκει στους βήτα κορωνοϊούς και αποτελείται από γονιδίωμα 27.000 έως 32.000 νουκλεοτίδια, με θετικό μονόκλωνο RNA (+ssRNA), έχει σχήμα στρόγγυλο ή ωοειδές και διάμετρο 60-140nm και ηλεκτρονική απεικόνιση κορώνας, χαρακτηριστικό από το οποίο ονομάστηκε κιόλας. Το γονιδίωμα του αποτελείται από μια 5'-τερματική μη κωδικοποιητική περιοχή, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame-ORF) 1a/b η οποία είναι

κωδικοποιητική περιοχή, την S περιοχή η οποία κωδικοποιεί την γλυκοπρωτεΐνη ακίδας (πρωτεΐνη Spike,S), την περιοχή E η οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φακέλου (πρωτεΐνη Envelope,E), την πρωτεΐνη M που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη μεμβράνης (πρωτεΐνη Membrane,M), την περιοχή που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη νουκλεοκαψίδιου (πρωτεΐνη Nucleocapsid,N) και την 3' - μη κωδικοποιητική περιοχή.

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF1a/b κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη, η οποία με την συμβολή των πρωτεϊνών 3CLpro και PLpro κόβεται για να σχηματιστεί η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση και ελικάση (Zumla et al., 2016). Αυτές με τη σειρά τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης του ιού. Ο ρόλος της δομικής πρωτεΐνης S είναι να συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα του κύτταρου ξενιστή ώστε να λάβει χώρα η εισχώρηση του ιού στα ευαίσθητα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες M και E, με τη σειρά τους βοηθούν στο σχηματισμό του περιβλήματος του ιού και η πρωτεΐνη N στη συναρμολόγηση του (Yang & Wang, 2020).

Τέλος, κύριο χαρακτηριστικό των κορωνοϊών είναι η ευαισθησία τους στις υψηλές θερμοκρασίες καθώς και τις υπεριώδης ακτίνες UV. Για αυτό τον λόγο η αποθήκευσή τους μπορεί να συμβεί σε θερμοκρασίες των -80°C αλλά και να αδρανοποιηθούν τελείως στο εργαστήριο στους 56°C για μισή ώρα. Επίσης, άλλες ουσίες που μπορούν να αδρανοποιήσουν τον ιό είναι η Αιθανόλη περιεκτικότητας 75%, το υπεροξικό οξύ και όσα απορρυπαντικά που περιέχουν χλώριο (Zhou et al., 2020).

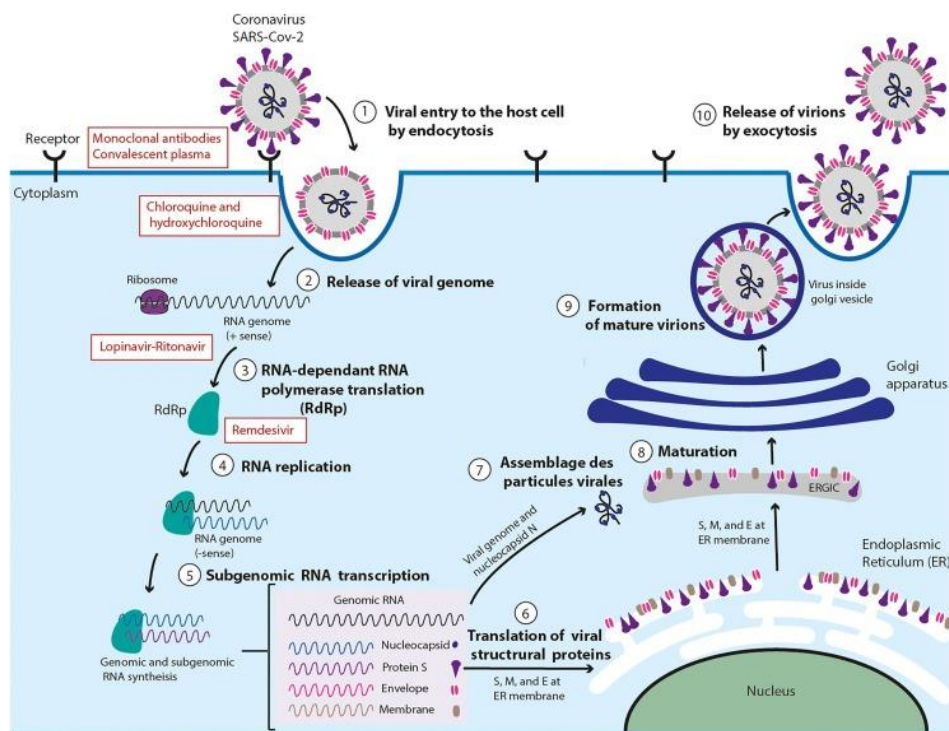


Εικόνα 1 Μορφολογία του ιού SARS-CoV-2 (Udugama, etc., 2020).

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται επάνω στιγμιότυπο από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο όπου εμφανίζεται ο ιός στο κύτταρο με τη μορφή σφαιρικών ικών σωματιδίων (μπλε χρωματισμένος). Στη κάτω εικόνα εμφανίζεται η δομή του με τις δομικές ικές πρωτεΐνες (Udugama, etc., 2020).

1.4 Μόλυνση των ανθρώπινων κυττάρων με SARS-CoV-2 και η ανοσολογική απόκριση

Ο ιός SARS-CoV-2 μεταδίδεται μέσω σταγονιδίων κατά τη στενή μη απροστάτευτη επαφή μεταξύ του μολυσμένου ατόμου και του μη μολυσμένου ατόμου. Οι συμπτωματικοί και ασυμπτωματικοί ασθενείς είναι η κύρια πηγή μόλυνσης. Επίσης, άλλοι τρόποι μόλυνσης πιο έμμεσοι είναι το αερόλυμα που περιέχει τον ιό να μεταφερθεί στα χέρια και ύστερα να μολύνει τον άνθρωπο και τους βλεννογόνους του στόματος, της μύτης και των ματιών. Εφόσον, το άτομο εκτεθεί στον ιό και μολυνθεί από αυτόν ξεκινά η διαδικασία της ενδοκυττάρωσης. Αρχικά, η πρωτεΐνη S συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα ACE2 (Rabi et al., 2020). Ενεργοποιείται οπότε η πρωτεΐνη S και ακολουθεί η σύντηξη της ιικής μεμβράνης με τη μεμβράνη του κύτταρου ξενιστή. Αυτή η σύντηξη επιτρέπει στον ιό να εισέλθει στα κύτταρα (Simmons et al., 2013). Ο SARS-CoV-2 απελευθερώνει το γενετικό του υλικό στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου όπου μεταφράζεται στις ικές πολυπρωτεΐνες ρεπλικάσης pp1a και 1ab. Στη συνέχεια, τα pp1a και 1ab διασπώνται από τις ικές πρωτεΐνες για να σχηματίσουν λειτουργικές μη δομικές πρωτεΐνες (NSPs) όπως μια ελικάση (Hel) και η εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση RNA (RdRp) η οποία είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του δομικού πρωτεϊνικού RNA (Zhavoronkov, 2020). Οι δομικές πρωτεΐνες S1, S2, E και M μεταφράζονται από ριβοσώματα συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση υπογονιδιωματικών προτύπων αρνητικού κλώνου που χρησιμεύουν ως πρότυπα για τη σύνθεση mRNA από το συν-κλώνο γονιδίωμα RNA του SARS-CoV-2 (Shin et al., 2018). Το γονιδιωματικό RNA και τα ιικά νουκλεοκαψίδια (N) συναρμολογούνται πριν εκβλαστήσουν στον αυλό του ενδιάμεσου διαμερίσματος ER-Golgi (ERGIC) (Stertz et al., 2007). Μετά τη σύντηξη του πρόδρομου νουκλεοκαψιδίου-ισωωματίου, τα σχηματισμένα ισωώματα μεταφέρονται μέσω μικρών κυστιδίων από το ER στη συσκευή Golgi, την κυτταρική επιφάνεια και την εξωκυττάρωση, όπου απελευθερώνονται από το κύτταρο ξενιστή (Masters, 2006). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται σχηματικά βήμα βήμα ο τρόπος εισόδου του ιού στα κύτταρα του ξενιστή.



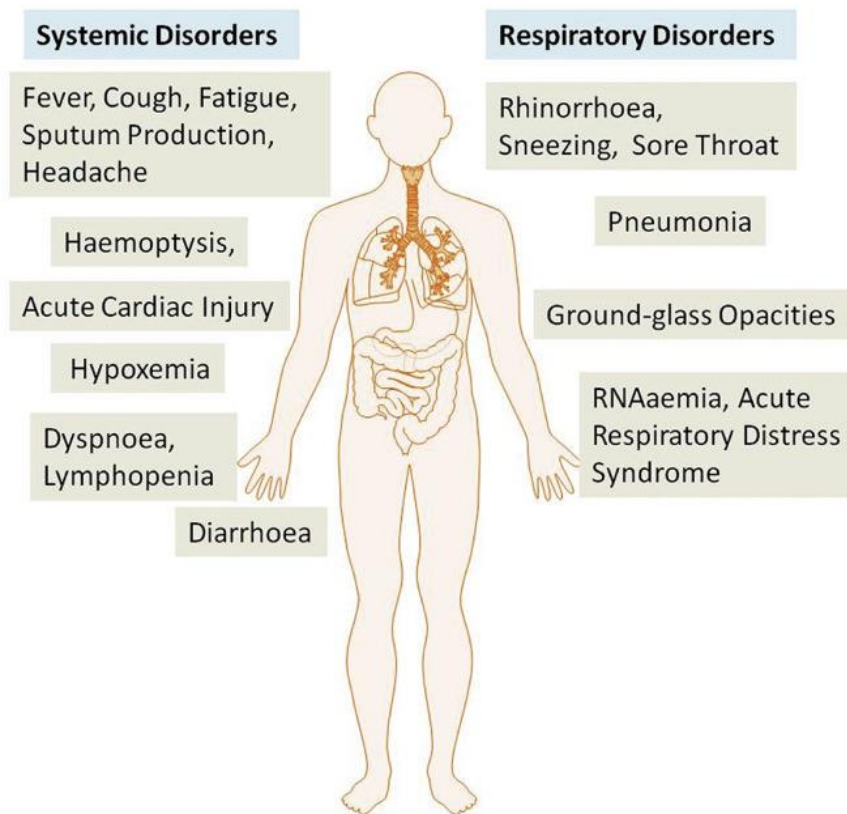
Εικόνα 2 Σχηματική απεικόνιση της εισόδου του ιού SARS-CoV-2 σε κύτταρα ξενιστές (Bchetnia et al., 2020)

Το κύτταρο-ξενιστής υφίσταται πυρόπτωση και απελευθερώνει μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με βλάβη όπως ATP, νουκλεϊκά οξέα και ολιγομερή ASC όταν ο SARS-CoV-2 μολύνει κύτταρα που εκφράζουν τους επιφανειακούς υποδοχείς, το ένζυμο μετατροπής της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) και TMPRSS2. Αυτά προκαλούν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, όπως IL-6, IP-10, φλεγμονώδη πρωτεΐνη μακροφάγου 1α (MIP1α), MIP1β και MCP1, όταν αναγνωρίζονται από κοντινά επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα. Αυτές οι πρωτεΐνες προσελκύουν μονοκύτταρα, μακροφάγα και T κύτταρα στο σημείο της μόλυνσης, προάγοντας περαιτέρω φλεγμονή (με την προσθήκη IFN που παράγεται από T κύτταρα) και δημιουργώντας έναν προφλεγμονώδη βρόχο ανάδρασης. Αυτά αναγνωρίζονται από κοντινά επιθηλιακά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και κυψελιδικά μακροφάγα. Η προκύπτουσα «καταιγίδα» κυτοκινών κυκλοφορεί σε άλλα όργανα, προκαλώντας πολυοργανική βλάβη σε μια ελαττωματική ανοσολογική απόκριση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω συσσώρευση ανοσοκυττάρων στους πνεύμονες και υπερβολική παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών.

Αντίθετα, σε μια υγιή ανοσολογική απόκριση, η αρχική φλεγμονή προσελκύει ειδικά για τον ιό T κύτταρα στο σημείο της μόλυνσης, όπου μπορούν να εξαλείψουν τα μολυσμένα κύτταρα πριν εξαπλωθεί ο ιός. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα σε αυτά τα άτομα μπορούν να εμποδίσουν την ιογενή λοίμωξη και τα κυψελιδικά μακροφάγα, αναγνωρίζουν εξουδετερωμένους ιούς και αποπτωτικά κύτταρα και τα καθαρίζουν με φαγοκυττάρωση. Συνολικά, αυτές οι διαδικασίες οδηγούν σε κάθαρση του ιού και ελάχιστη βλάβη στους πνεύμονες, με αποτέλεσμα την ανάρρωση (Tay et al., 2020).

1.5 Κλινικά Συμπτώματα

Τα συμπτώματα της λοίμωξης που προκαλείται από τον SARS-CoV-2 εκδηλώνονται μετά από μια περίοδο επώασης έως περίπου 5 ημερών και ποικίλουν ανάλογα την ηλικία του ασθενή και την ανοσολογική του κατάσταση. Τα πιο κοινά συμπτώματα κατά την έναρξη της νόσου COVID-19 είναι ο πυρετός, ο βήχας και η κόπωση ενώ άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν παραγωγή πτυέλων, πονοκέφαλο, αιμόπτυση, διάρροια, δύσπνοια και λεμφοπενία. Επίσης, σύμφωνα με την αξιολόγηση αξονικών τομογραφιών θώρακος οι οποίες παρουσιάστηκαν ως πνευμονία, υπήρχαν και μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά όπως RNAαίμα, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, οξεία καρδιακή βλάβη και συχνότητα θολότητας γυαλού που οδήγησε σε θάνατο (Rothan & Byrareddy, 2020).



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση των κύριων συμπτωμάτων της νόσου COVID-19 (Rothan & Byrareddy, 2020)

Σύμφωνα με το CDC κατά τη διάρκεια της πανδημίας αναφέρθηκαν και προστέθηκαν και άλλα συμπτώματα όπως ρίγη, μυϊκός πόνος, απώλεια γεύσης και όσφρησης (CDC, 2020).

Τέλος, το COVID-19 έχει συνδεθεί με υπερπηκτική νόσο, αυξάνοντας τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωση. Επίσης έχουν αναφερθεί νευρολογικά συμπτώματα όπως ζάλη και διαταραχή

επίγνωσης. Ισχαιμικά και αιμορραγικά εγκεφαλικά επεισόδια και μυϊκή βλάβη, δερματολογικά και οφθαλμολογικά συμπτώματα συγκαταλέγονται στη λίστα με τα περαιτέρω συμπτώματα της νόσου COVID-19 (Mohanmadian, etc., 2021).

1.6 Μεταλλάξεις του SARS-CoV-2

Σύμφωνα με το CDC όλοι οι ιοί αλλάζουν ή μεταλλάσσονται καθώς αναπαράγονται και εξαπλώνονται σε έναν πληθυσμό. Οι RNA ιοί, όπως είναι ο SARS-CoV-2, μεταλλάσσονται πιο γρήγορα απ'ότι οι DNA ιοί. Όμως, αυτό το γεγονός δεν σημαίνει ότι όλες οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την ικανότητα του ιού να εξαπλώνεται ή να προκαλεί ασθένεια, καθώς μπορεί να μην έχουν επηρεαστεί οι δομικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την εισβολή και στη μετάδοση του.

Μια μετάλλαξη ορίζεται ως μια μεμονωμένη αλλαγή στο γονιδίωμα ενός ιού (γενετικό κώδικα), ενώ η παραλλαγή ορίζεται ως μια ή ένα σύνολο μεταλλάξεων στο γενετικό κώδικα του ιού. Παρουσιάζονται περιπτώσεις όπου παρόμοιες γενετικές αλλαγές σε μια γενεαλογία ή σε ομάδα γενεαλογικών γενεών οι οποίες χρήζουν ένα σύστημα κατάταξης. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει ορίσει τέσσερις τύπους κατάταξης, σύμφωνα με τον οποίο υπάρχουν οι εξής παραλλαγές:

α) Παραλλαγή ενδιαφέροντος (Variant of Interest-VOI)

β) Παραλλαγή ανησυχίας (Variant of Concern-VOC)

γ) Παραλλαγή υψηλών συνεπειών (Variant of High Consequence)

δ) Παραλλαγή που παρακολουθείτε (Variants Being Monitored)

Αυτό το σύστημα κρίθηκε χρήσιμο εργαλείο για την επιτήρηση της πανδημίας και της εξέλιξης της σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς βοηθάει τους επιστήμονες να περιγράψουν και να επικοινωνήσουν τις ομοιότητες και τις διαφορές μεταξύ των ιών SARS-CoV-2.

Επιπρόσθετα, οι κορωνοϊοί έχουν την ικανότητα να υποστούν μια φυσική διαδικασία που ονομάζεται «ανασυνδυασμός». Αυτό μπορεί να συμβεί όταν δύο διαφορετικές σειρές μολύνουν τον ίδιο κύτταρο σε κάποιον ασθενή την ίδια στιγμή. Αυτό το γεγονός μπορεί να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά του ιού δηλαδή της ικανότητας του να εξαπλώνεται, να προκαλεί σοβαρή ασθένεια ή να κάνει τις θεραπείες ή τα εμβόλια λιγότερο αποτελεσματικά. Το CDC είναι υπεύθυνο για την αξιόπιστη ανίχνευση και παρακολούθηση της εξάπλωσης των παραλλαγών, συμπεριλαμβανομένων και των ανασυνδυασμένων.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθούμε και στο πολύτιμο γενεαλογικό σύστημα Pango, το οποίο είναι ιεραρχικό και λειτουργεί σαν οικογενειακό δέντρο. Ορίζουμε ως γενεαλογία τους απόγονους μιας «γονικής» γενεαλογίας. Μια γενεαλογία μπορεί να περιγραφεί ως «υπογραμμική γραμμή» όταν αναφέρεται σε σχέση με τη μητρική της καταγωγή. Συγκεκριμένα, για να ονομάσουμε τις γενεαλογικές σειρές χρησιμοποιούμε ένα αλφαβητικό πρόθεμα (όπως B ή BA) και αριθμητικό επίθημα (‘‘.1’’ ή (‘‘1.1.5’’)). Στη περίπτωση που ορίζεται μια νέα γενεαλογία, το σύστημα Pango προσδίδει έναν πρόσθετο αριθμό στο όνομα μια μητρικής γενεαλογίας του (π.χ., το BA.2.75 είναι υπογραμμή του BA.2). Όπως ο ιός παρουσιάζει συνεχώς αλλαγές τα ονόματα του συστήματος Pango μπορεί να γίνουν πολύ μεγάλα. Σε αυτή τη περίπτωση προσδίδονται αλφαβητικά ψευδώνυμα και η αρίθμηση συνεχίζεται (π.χ., το ‘‘BA’’ σημαίνει ‘‘B.1.1.529 άρα το BA.2 είναι ίδιο με το B.1.1.529.2).

Με τα σημερινά δεδομένα για την εξάπλωση του ιού παγκοσμίως συνεχώς να αλλάζουν και να μεταβάλλονται, σύμφωνα με τον CDC σε συνεργασία με τα κράτη μέλη του, συγκεντρώνουν σε έναν πίνακα όλες τις μεταλλάξεις που εμφανίζονται από την αρχή της πανδημίας τον Δεκέμβριο του 2019 έως τον Νοέμβριο του 2021. Παρακάτω παρουσιάζεται η εικόνα 4 με όλα τα νέα στελέχη του SARS-CoV-2. Η μετάλλαξη Omicron και οι υποπαραλλαγές της είναι οι κυρίαρχες στον πληθυσμό σύμφωνα με τα δεδομένα έως τον Μάιο 2023 (CDC, 2023).

WHO Label	Pango Lineage	Current Status	Date of Designation
Alpha	B.1.1.7 and Q lineages	VBM	VOC: December 29, 2020 VBM: September 21, 2021
Beta	B.1.351 and descendent lineages	VBM	VOC: December 29, 2020 VBM: September 21, 2021
Gamma	P.1 and descendent lineages	VBM	VOC: December 29, 2020 VBM: September 21, 2021
Delta	B.1.617.2 and descendant lineages	VBM	VOC: June 15, 2021 VBM: April 14, 2022
Epsilon	B.1.427 and B.1.429	VBM	VOC: March 19, 2021 VOI: February 26, 2021 VOI: June 29, 2021 VBM: September 21, 2021
Eta	B.1.525	VBM	VOI: February 26, 2021 VBM: September 21, 2021
Iota	B.1.526	VBM	VOI: February 26, 2021 VBM: September 21, 2021
Kappa	B.1.617.1	VBM	VOI: May 7, 2021 VBM: September 21, 2021
N/A	B.1.617.3	VBM	VOI: May 7, 2021 VBM: September 21, 2021
Omicron	B.1.1.529 and descendant lineages	VOC	VOC: November 26, 2021
Zeta	P.2	VBM	VOI: February 26, 2021 VBM: September 21, 2021
Mu	B.1.621, B.1.621.1	VBM	VBM: September 21, 2021

Εικόνα 4 Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των μεταλλάξεων SARS-CoV-2 από τον Δεκέμβριο του 2020 έως τον Νοέμβριο του 2021 (CDC, 2023)

1.7 Προηγούμενες παραλλαγές ανησυχίας (VOC) του SARS-CoV-2

Παραλλαγή Alpha (B.1.1.7)

Στα τέλη του 2020, τον Δεκέμβριο εντοπίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο μια νέα παραλλαγή του SARS-CoV-2 που προκάλεσε την έντονη ανησυχία της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας, η γενεαλογία B.1.1.7, αναφέρεται επίσημα ως παραλλαγή Alpha ή GRY(πρώηνGR/501Y.V1) (Galloway et al., 2021). Περιέχει 17 μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του ιού από αυτές, οκτώ μεταλλάξεις (διαγραφή Δ69-70, διαγραφή Δ144, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) βρίσκονται στην πρωτεΐνη ακίδας (S) (Davies et al., 2021). Το N501Y δείχνει αυξημένη συγγένεια της πρωτεΐνης ακίδας με τους υποδοχείς ACE 2, ενισχύοντας την ιική προσκόλληση και την επακόλουθη είσοδο στα κύτταρα ξενιστές.

Η νέα παραλλαγή κυκλοφορούσε στο Ηνωμένο Βασίλειο από το Σεπτέμβριο του 2020 και βασιζόταν σε διάφορες προβλέψεις μοντέλων. Μελέτες έδειξαν ότι η παραλλαγή ήταν από 43% έως 82% πιο μεταδοτική, ξεπερνώντας τις προϋπάρχουσες παραλλαγές του SARS-CoV-2 για να αναδειχθεί κυρίαρχη στο Ηνωμένο Βασίλειο και τον Δεκέμβριο του 2020 να πρωτοεμφανίζεται και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Τα άτομα που μολύνθηκαν με την νέα παραλλαγή της γενεαλογίας B.1.1.7 είχαν αυξημένη σοβαρότητα της νόσου σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν μολυνθεί με άλλες κυκλοφορούσες μορφές παραλλαγών του ιού. Σε αυτό το πρώιμο στάδιο της πανδημίας αυτή η νέα παραλλαγή εμφανίστηκε ως ένα από τα πιο κυρίαρχα στελέχη SARS-CoV-2 που κυκλοφορούσαν στις ΗΠΑ.

Παραλλαγή Beta (B.1.351)

Τον Δεκέμβριο του 2020 εντοπίστηκε στην Νότια Αφρική για πρώτη φορά μια νέα παραλλαγή, η παραλλαγή Beta ή GH501Y.V2 με πολλαπλές μεταλλάξεις ακίδας, που οδήγησε στο δεύτερο κύμα λοιμώξεων COVID-19. Η παραλλαγή αυτήν περιλαμβάνει εννέα μεταλλάξεις (L18F, D80A, D215G, R246I, K4417N, E484K, N501Y, D614G και A701V) που αυξάνουν τη συγγένεια δέσμευσης για τους υποδοχείς MEA. Στα τέλη του Ιανουαρίου του 2021 εντοπίστηκε η νέα παραλλαγή και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και οι μελέτες που προέκυψαν αναφέρουν ότι έχει αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης και μειωμένη εξουδετέρωση από θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα, ορούς ανάρρωσης και από εμβολιασμό (Wang et al., 2021).

Παραλλαγή Gamma (P.1)

Τον Δεκέμβριο του 2020 εντοπίστηκε στη Βραζιλία αρχικά η παραλλαγή P.1 γνωστή και ως παραλλαγή Gamma ή GR/501Y.V3 και αργότερα τον Ιανουάριο του 2021 εντοπίστηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Η παραλλαγή B.1.1.28 περιέχει δέκα μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ακίδας (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K και K501Y (Faria et al., 2021). Χαρακτηριστικό της είναι η μειωμένη εξουδετέρωση της από θεραπείες με μονοκλωνικά αντισώματα, ορούς ανάρρωσης και η μειωμένη κάλυψη του εμβολίου .

Παραλλαγή Delta (B.1.617.2)

Τον Δεκέμβριο του 2020 αρχικά εντοπίστηκε στην Ινδία η παραλλαγή B.1.617.2 γνωστή και ως παραλλαγή Delta και έως τον Απρίλιο του 2021 είχε εξαπλωθεί και ήταν υπεύθυνη για το δεύτερο θανατηφόρο κύμα της πανδημίας του COVID-19 στην Ινδία. Στις ΗΠΑ αυτή η παραλλαγή εντοπίστηκε πρώτη φορά τον Μάρτιο του 2021. Αρχικά, η παραλλαγή Delta ταξινομήθηκε από τον Π.Ο.Υ ως παραλλαγή ενδιαφέροντος (VOI) αλλά εξαιτίας της γρήγορης εξάπλωσης της, τον Μάιο του 2021 ο Π.Ο.Υ τη κατέταξε ως παραλλαγή ανησυχίας (VOC). Τέλος, η παραλλαγή αυτή περιέχει δέκα μεταλλάξεις στη πρωτεΐνη ακίδας, πιο συγκεκριμένα τις εξής: T19R, G142D, 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N.

Παραλλαγή Omicron (B.1.1.529)

Στις 23 Νοεμβρίου του 2021 εντοπίστηκε για πρώτη φορά στη Νότια Αφρική η παραλλαγή B.1.1.529 γνωστή και ως παραλλαγή Omicron, μετά από αύξηση του αριθμού κρουσμάτων COVID-19. Η Omicron φέρει τριάντα αλλαγές στη πρωτεΐνη ακίδας του ιού, πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνονται οι εξής: T91 στο φάκελο, P13L, E31Del, R32Del, S33Del, R203K, G204R στο νουκλεοκαψίδιο, D3G, Q19E, A63T, N211Del/L212I, Y145Del, Y144DEL, Y143DEL, G142D, T95D Ελ, H69Del, A67V στη Ν-τερματική περιοχή της ακίδας, Y505H, N501Y, Q498R, G496S, Q493R, E484A, T478K, S477N, G446S, N440K, K417N, S357F, S373P, S371L, G339D στο υποδοχέα ακίδας, D796Y στο πεπτίδιο σύντηξης της ακίδας, L981F, N969K, Q954H, στην επανάληψη 2 της στην επτάδα καθώς και άλλες μεταλλάξεις στις μη δομικές πρωτεΐνες και της πρωτεΐνης ακίδας (Poon et al., 2021). Επιπρόσθετα, έρευνες

δηλώνουν ότι η παραλλαγή Omicron εκδηλώνει 13πλασια αύξηση στη μολυσματικότητα του ιού και είναι 2,8 φορές πιο μολυσματική από την παραλλαγή Delta (Chenetal., 2022). Όσον αφορά τη θεραπεία του ιού με μονοκλωνικά αντισώματα στη συγκεκριμένη παραλλαγή αποτελεσματικά εξακολουθούν να είναι αυτά του REGN-COV2 (Casirivimab και Imdevimab) και το αντίσωμα C135 του πανεπιστημίου Rockefeller ενώ λιγότερα αποτελεσματικά είναι το αντίσωμα C144 του πανεπιστημίου Rockefeller και του Bamlanivimab. Τέλος, η μετάλλαξη ακίδας K417N φαίνεται να παρουσιάζει συντριπτικά διασπαστική επίδραση, χρίζοντας απαραίτητο ένα νέο αποτελεσματικότερο εμβόλιο κατά της νέας παραλλαγής Omicron (Cascella, 2023).

1.8 Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων της νόσου COVID-19 στις παραλλαγές VOC του SARS-CoV-2

Έως το έτος 2022 το εμβόλιο Janssen-Ad26.COV2.S, το εμβόλιο Moderna-mRNA-1273, το εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty, το εμβόλιο Sinovac-CoronaVac και το AstraZeneca-Vaxzevria/SII-Covishield εγκρίθηκαν επίσημα από τον Π.Ο.Υ και ήταν διαθέσιμα για χορήγηση στον γενικό πληθυσμό. Λόγω της διαφυγής αντιγόνου που προκαλείται από τη μετάλλαξη σε παραλλαγές, η αποτελεσματικότητα των εμβολίων, που είναι επί του παρόντος τα κύρια μέσα πρόληψης και θεραπείας, έχει επηρεαστεί σε διάφορους βαθμούς. Ευτυχώς, έχουν χορηγηθεί περισσότερες από 10 δισεκατομμύρια δόσεις εμβολίων, ενισχύοντας τη γραμμή άμυνας για τον άνθρωπο. Παρόλο όμως που η διάγνωση και το σχέδιο θεραπείας ενημερώνονται συνεχώς με εις βάθος έρευνα και οι μέθοδοι θεραπείας γίνονται όλο και πιο ώριμες, ο COVID-19 συνεχίζει να εξαπλώνεται παγκοσμίως και δεν έχει τεθεί πλήρως υπό έλεγχο.

Όλα τα εμβόλια που εγχέονται επί του παρόντος έχουν ποικίλους βαθμούς παρενεργειών, όπως πυρετό, πονοκέφαλο, κόπωση, μυϊκό πόνο και πόνο στις αρθρώσεις, ακόμη και αλλεργικές αντιδράσεις. Επιπλέον, σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες και περιοχές, ο εμβολιασμός δεν έχει προωθηθεί και η προληπτική δράση του εμβολίου δεν έχει επιτύχει τον αναμενόμενο στόχο. Αυτό δείχνει ότι η τεχνολογία και η διαδικασία έρευνας και ανάπτυξης εμβολίων έχουν ακόμη περιθώρια βελτιστοποίησης, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης νέων τεχνολογιών όπως η νανοτεχνολογία στην παράδοση εμβολίων και ο έλεγχος επιβλαβών ουσιών και θερμοκρασίας στη διαδικασία παραγωγής. Στο μέλλον, ερευνητές από διαφορετικές χώρες θα μπορούν να σχεδιάζουν εμβόλια κατά συγκεκριμένων παραλλαγών με διαφορετικές θέσεις μετάλλαξης, χρησιμοποιώντας πιο αποτελεσματικές και επιστημονικές τεχνικές για την

παροχή βιώσιμης προστασίας. Αντιμετωπίζοντας αυτές τις προκλήσεις, πιστεύεται ακράδαντα ότι ο COVID-19 θα νικηθεί από την ανθρωπότητα τελικά.

Όπως, προαναφέρθηκε εγκεκριμένα εμβόλια στην λίστα του Π.Ο.Υ είναι το εμβόλιο Janssen-Ad26.COV 2.S, το εμβόλιο Moderna-mRNA-1273, το εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty, το εμβόλιο Sinovac-CoronaVac και το εμβόλιο AstaZeneca-Vaxzevria/SII-Covishield. Παρακάτω, θα αναλυθεί η δράση του κάθε εμβολίου και η αποτελεσματικότητά του (Zhou et al., 2022).

Εμβόλιο Janssen-Ad26.COV 2.S

Το Janssen-Ad.26.COV2. S εμβόλιο, που αναπτύχθηκε από την Janssen Pharmaceutical Companies της Johnson & Johnson, είναι ένα εμβόλιο ανασυνδυασμένου αδενοϊικού φορέα, το οποίο προκάλεσε ισχυρές αντιδράσεις εξουδετέρωσης αντισωμάτων και παρείχε σχεδόν πλήρη προστασία μετά τη μόλυνση από SARS-CoV-2 (Mercado et al., 2020).

Στην παραλλαγή Alpha (B.1.1.7) μια μελέτη στην Ισπανία έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Janssen-Ad26.COV2.S αξιολογήθηκε σε ποσοστό 77% έναντι της λοίμωξης μεταξύ των ασθενών μολυσμένων με αυτή τη παραλλαγή (Martínez-Baz et al., 2021).

Στην παραλλαγή Beta (B.1.351) μία δόση του εμβολίου Janssen-Ad26.COV2.S έδειξε να παρέχει σταθερή προστασία έναντι του COVID-19 σε διάφορες χώρες κατά τη διάρκεια μιας περιόδου κατά την οποία κυριαρχούσε η παραλλαγή αυτή (Karim & De Oliveira, 2021).

Στην παραλλαγή Gamma (P.1) η αποτελεσματικότητα του εμβολίου κατά των συμπτωμάτων της νόσου, της νοσηλείας καθώς και των θανάτων από αυτήν ήταν σε ποσοστό 50,9% σε έρευνα που διεξάχθηκε στη Βραζιλία (Ranzani et al., 2021).

Στη παραλλαγή Delta (B.1.617.2) μια μελέτη στην Ισπανία έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Janssen-Ad26.COV2.S κατά της λοίμωξης από την παραλλαγή αυτή ήταν 42%, το οποίο είναι χαμηλότερο από αυτό της παραλλαγής Alpha (Martínez-Baz et al., 2021). Εν τω μεταξύ, μια άλλη μελέτη από την Τσεχική Δημοκρατία έδειξε ότι το εμβόλιο Janssen-Ad.26.COV2.S ήταν 60% πιο αποτελεσματικό έναντι τεκμηριωμένης λοίμωξης για την παραλλαγή Omicron ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Šmíd et al., 2022).

Στην παραλλαγή Omicron (B.1.1.529) τα αποτελέσματα μιας μελέτης από τη Νότια Αφρική έδειξαν ότι η αναμνηστική δόση του εμβολίου Janssen-Ad.26.COV2.S ήταν 63% αποτελεσματική κατά της νοσηλείας για την παραλλαγή μετά από 0-13 ημέρες (Gray et al., 2021). Εννοώ, σύμφωνα με τη μελέτη από την Τσεχική Δημοκρατία, η αποτελεσματικότητα των δύο δόσεων του εμβολίου Janssen-Ad.26.COV2.S ήταν 47% έναντι τεκμηριωμένης λοίμωξης για την παραλλαγή μετά από ≥ 14 ημέρες (Šmíd et al., 2022).

Εμβόλιο Moderna-mRNA-1273

Το εμβόλιο Moderna-mRNA-1273, που αναπτύχθηκε από τη Moderna, είναι ένα παράδειγμα εμβολίου με βάση το RNA που σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό ξενιστή για την έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων μετά την παράδοση μιας γενετικής αλληλουχίας σε ένα κύτταρο ξενιστή. Σε αυτό το εμβόλιο, ο στόχος είναι η πρωτεΐνη ακίδας (S) που προκαλεί μια ανοσολογική απόκριση. Τα αποτελέσματα μιας κλινικής δοκιμής φάσης III έδειξαν ότι δύο δόσεις του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 ήταν 94,1% αποτελεσματικές έναντι της νόσου COVID-19.

Στην παραλλαγή Alpha (B.1.1.7) μια μελέτη στην Ισπανία έδειξε επίσης ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 βρέθηκε να είναι 86% έναντι της μόλυνσης των ασθενών με τη συγκεκριμένη παραλλαγή (Martínez-Baz et al., 2021). Επιπλέον, το αποτέλεσμα μιας άλλης έρευνας έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 κατά της λοίμωξης ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση ήταν 98,4% για την παραλλαγή (Bruxvoort et al., 2021).

Στην παραλλαγή Beta (B.1.351) σύμφωνα με μία μελέτη το εμβόλιο παρείχε συνεχή προστασία έναντι λοίμωξης για την παραλλαγή (Boloko et al., 2021).

Στην παραλλαγή Gamma (P.1) τα αποτελέσματα μελέτης έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα έναντι μόλυνσης ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση ήταν 95,5% (Bruxvoort et al., 2021).

Στη παραλλαγή Delta (B.1.617.2) τα αποτελέσματα μελέτης έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 βρέθηκε ότι είναι υψηλή έναντι της λοίμωξης για την παραλλαγή, 14 έως 60 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση 94,1% και 95% αντίστοιχα, ενώ μειώθηκε στο 80,0% στις 151–180 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Bruxvoort et al., 2021). Ομοίως, μια αναδρομική μελέτη από τον Καναδά διαπίστωσε ότι δύο δόσεις του εμβολίου Moderna-

mRNA-1273 κατά της μόλυνσης και της νοσηλείας ήταν 92% και 97%, αντίστοιχα, μεταξύ ατόμων ηλικίας ≥ 18 ετών στη Βρετανική Κολομβία (Skowronski et al., 2022). Η αποτελεσματικότητα του τρίτου αναμνηστικού εμβολίου εκτιμάται ότι είναι 86,5% (Willett et al., 2022).

Στην παραλλαγή Omicron (B.1.1.529) σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης περίπτωσης-ελέγχου από τη Σκωτία, δύο δόσεις του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 έδειξαν 23,7% αποτελεσματικότητα στην πρόληψη τεκμηριωμένης μόλυνσης, ενώ η τρίτη αναμνηστική έδειξε 46,3% αποτελεσματικότητα (Willett et al., 2022). Επιπρόσθετα, η αποτελεσματικότητα δύο δόσεων του εμβολίου Moderna-mRNA-1273 εκτιμήθηκε ότι είναι 47% έναντι τεκμηριωμένης μόλυνσης για την παραλλαγή Omicron με βάση την αναδρομική μελέτη από την Τσεχική Δημοκρατία (Šmíd et al., 2022).

Εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty

Το εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty, που αναπτύχθηκε από την Pfizer και τη BioNTech, είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα εμβολίων που βασίζονται σε RNA. Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Pfizer BioNTech-Comirnaty κατά της συμπτωματικής λοίμωξης ήταν 95% (Zhou et al., 2022). Μια μεγάλη αναδρομική μελέτη από το Ισραήλ έδειξε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Pfizer BioNTech-Comirnaty κατά λοιμώξεων, συμπτωματικής νόσου, σοβαρής νόσου και θανάτων μετά από επτά ή περισσότερες ημέρες μετά την αναμνηστική δόση ήταν 88%, 91%, 92% και 81% αντίστοιχα (Barda et al., 2021).

Στην παραλλαγή Alpha (B.1.1.7) η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Pfizer BioNTech-Comirnaty κατά της τεκμηριωμένης μόλυνσης από αυτήν ήταν 87% με βάση μια αναδρομική μελέτη από το Κατάρ (Abu-Raddad et al., 2021). Ομοίως, μια μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο διαπίστωσε ότι το Pfizer BioNTech-Comirnaty ήταν 85% αποτελεσματικό έναντι της λοίμωξης αυτής μεταξύ των μολυσμένων ατόμων με Alpha ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Eyre et al., 2022).

Στην παραλλαγή Beta (B.1.351) σύμφωνα με μελέτη που έλαβε χώρα στο Κοτόρ αποδείχθηκε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου παρείχε 75% κάλυψη (Abu-Raddad et al., 2021).

Στην παραλλαγή Gamma (P.1) μια μελέτη στο Κατάρ έδειξε ότι η ανάλυση 20 δειγμάτων ορού από 15 συμμετέχοντες από τη δοκιμή κλινικής αποτελεσματικότητας εμβολίου Pfizer

BioNTech-Comirnaty εξουδετέρωσε αποτελεσματικά τις παραλλαγές Alpha και Gamma εξίσου (Liu et al., 2021).

Στη παραλλαγή Delta (B.1.617.2) μια μελέτη στην Ισπανία έδειξε επίσης ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Pfizer BioNTech-Comirnaty βρέθηκε ότι είναι 67% (Martínez-Baz et al., 2021b). Ωστόσο, μια μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο διαπίστωσε ότι το εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty είχε 90% αποτελεσματικότητα έναντι της λοίμωξης για Delta ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Sheikh et al., 2021). Τέλος, η αποτελεσματικότητα του αναμνηστικού εμβολίου εκτιμήθηκε ότι είναι 85,9% (Willett et al., 2022).

Στην παραλλαγή Omicron (B.1.1.529) μια μελέτη από τις Ηνωμένες Πολιτείες αποκάλυψε ότι το εμβόλιο Pfizer BioNTech-Comirnaty ήταν 25% αποτελεσματικό έναντι τεκμηριωμένης λοίμωξης ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Zhou et al., 2022). Η αναδρομική μελέτη από το Ισραήλ έδειξε ότι το αναμνηστικό εμβόλιο ήταν 30% αποτελεσματικό έναντι λοιμώξεων μεταξύ εργαζομένων στον τομέα της υγείας που ολοκλήρωσαν τη χορήγηση με τρεις δόσεις τουλάχιστον 4 μήνες πριν (Regev-Yochay et al., 2022). Τέλος, με βάση τη μελέτη από το Κατάρ, δύο δόσεις του εμβολίου Pfizer BioNTech-Comirnaty κατά της συμπτωματικής λοίμωξης λόγω της παραλλαγής Omicron BA.1 και της παραλλαγής BA.2 μεταξύ των ατόμων που είχαν μολυνθεί προηγουμένως εκτιμήθηκαν σε 51,7% και 55,1% αποτελεσματικά, αντίστοιχα (Altarawneh et al., 2022).

Εμβόλιο Sinovac-CoronaVac

Το εμβόλιο Sinovac-CoronaVac, που αναπτύχθηκε από τη Sinovac Research and Development Co., Ltd., μπορεί να χορηγηθεί ενδομυϊκά και απαιτεί ένα ανοσοενισχυτικό για να πυροδοτήσει μια ανοσοαπόκριση. Προκαλώντας την ανοσοαπόκριση που κατευθύνεται σε διαφορετικές πρωτεΐνες του ιού, ολόκληρος ο ιός χρησιμοποιείται για να προκαλέσει το ανοσοποιητικό σύστημα (Zhang et al., 2021). Μια μελέτη από τη Βραζιλία διαπίστωσε ότι δύο δόσεις του εμβολίου Sinovac-CoronaVac ήταν 46,8% και 55,5% αποτελεσματικές έναντι του συμπτωματικού COVID-19 και της νοσηλείας, αντίστοιχα, για την παραλλαγή Gamma ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Ranzani, Hitchings, et al., 2021). Τέλος, με βάση μια αναδρομική μελέτη από τη Χίλη, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου Sinovac-CoronaVac ήταν 37,9% έναντι τεκμηριωμένης λοίμωξης για την παραλλαγή Omicron σε παιδιά ηλικίας 3-5 ετών ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Skowronski et al., 2022).

Εμβόλιο AstraZeneca-Vaxzevria/SII-Covishield

Το εμβόλιο AstraZeneca-Vaxzevria (AZD1222) είναι ένα ανασυνδυασμένο εμβόλιο, παλαιότερα γνωστό ως ChAdOx1 nCoV-19, που αναπτύχθηκε από κοινού από το Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης και την AstraZeneca. Το εμβόλιο SII-Covishield είναι ένα εμβόλιο AstraZeneca-Vaxzevria που παράγεται στην Ινδία από τη SII, με άδεια χρήσης από την AstraZeneca (Van Doremalen et al., 2020).

Μια μελέτη στην Ισπανία έδειξε ότι το AZD1222 είχε 38% αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της μόλυνσης μεταξύ των στενών επαφών έναντι του Alpha (B.1.1.7) ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση. Ωστόσο, τα πειραματικά αποτελέσματα όσων επηρεάστηκαν από το Alpha (B.1.1.7) παρεμποδίστηκαν από την έλλειψη μεγάλου δείγματος ατόμων που είχαν μολυνθεί με την παραλλαγή Alpha (Martínez-Baz et al., 2021). Μια άλλη μελέτη από το Ηνωμένο Βασίλειο αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα του AZD1222 έναντι τεκμηριωμένης λοίμωξης για τον πληθυσμό της Σκωτίας στο 73% (Sheikh, McMenamin, et al., 2021).

Για τη παραλλαγή Beta (B.1.351) τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής αποκάλυψαν ότι η αποτελεσματικότητα της διπλής δόσης AZD1222 ήταν 70,4% έναντι της συμπτωματικής λοίμωξης από την παραλλαγή αυτή (Emary et al., 2021).

Για τη παραλλαγή Gamma (P.1) μελέτη από τον Καναδά έδειξε ότι το AZD1222 έναντι της τεκμηριωμένης μόλυνσης για Gamma ήταν εκπληκτικά αποτελεσματικό (Skowronski et al., 2022). Ωστόσο, μια άλλη μελέτη από τη Βραζιλία αποκάλυψε ότι η αποτελεσματικότητα του εμβολίου διπλής δόσης AstraZeneca-Vaxzevria ήταν 88,1% (Marra et al., 2022).

Για τη παραλλαγή Delta (B.1.617.2) μελέτες από την Ισπανία κατέδειξαν ότι το AZD1222 ήταν 55% αποτελεσματικό έναντι της τεκμηριωμένης μόλυνσης από την συγκεκριμένη παραλλαγή (Martínez-Baz et al., 2021). Τα αποτελέσματα από μελέτη που έλαβε χώρα στον Καναδά αποκάλυψαν ότι η αποτελεσματικότητα κατά της νοσηλείας λόγω Delta ήταν $>90\%$ ≥ 14 ημέρες μετά τη 2η δόση (Skowronski et al., 2022). Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα του AZD1222 έναντι των θανάτων που προκλήθηκαν από την παραλλαγή Delta ήταν 91% σε σχετική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του AZD1222 που αποτρέπει το θάνατο μεταξύ 380.532 κατοίκων στη Βρετανική Κολομβία συμπεριλαμβανομένων 27.439 περιπτώσεων ≥ 14 ημέρες μετά τη δεύτερη δόση (Sheikh et al., 2021).

Για τη παραλλαγή Omicron (B.1.1.529) σε μελέτη από τη Σκωτία, δύο δόσεις AZD1222 ήταν 11,44% αποτελεσματικές έναντι τεκμηριωμένης μόλυνσης από αυτή (Willett et al., 2022). Τέλος, αναδρομική μελέτη από την Τσεχική Δημοκρατία αποκάλυψε ότι η αποτελεσματικότητα του AZD1222 ήταν 51% έναντι τεκμηριωμένης μόλυνσης για την παραλλαγή (Šmíd et al., 2022).

Κεφάλαιο 2 Κλινικά δείγματα και βασικές μεταλλάξεις των παραλλαγών VOC

2.1 Κατάλληλα Κλινικά Δείγματα

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Εθνικού Οργανισμού Δημόσιας Υγείας (Ε.Ο.Δ.Υ) οι οποίες ακολουθούν αυστηρά τις συστάσεις του Π.Ο.Υ., καταλληλότερα δείγματα ως προς τον αρχικό εντοπισμό του SARS-CoV-2 κρίνονται τα κλινικά δείγματα που εξάγονται από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα. Τα δείγματα αυτά θεωρούνται υψηλότερης διαγνωστικής αξίας από τα κλινικά δείγματα που λαμβάνονται από το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα, ωστόσο στις περιπτώσεις όπου ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός ή η λήψη του βιολογικού δείγματος από

το κατώτερο αναπνευστικό δεν μπορεί να επιτευχθεί, θα μπορούσε να ληφθεί δείγμα από το ανώτερο αναπνευστικό.

Άρα, θα μπορούσαμε συνοψίζοντας να κατατάξουμε τα κλινικά δείγματα σε δύο μεγάλες υποκατηγορίες σε αυτά του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και στο κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Βέβαια, ο ιός θα μπορούσε να ανιχνευτεί για τη παρουσία ή την αποβολή του και από άλλα βιολογικά δείγματα όπως το αίμα, τα κόπρανα και τα ούρα.

Κλινικά Δείγματα από το ανώτερο αναπνευστικό:

- ❖ Ρινοφαρυγγικό επίχρισμα
- ❖ Ρινικό επίχρισμα ή ρινικό έκπλυμα και υλικό ρινικής αναρρόφησης
- ❖ Συνδυασμός ρινοφαρυγγικού ή ρινικού επιχρίσματος με στοματοφαρυγγικό επίχρισμα.

Κλινικά δείγματα από το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα:

- ❖ Πτύελα
- ❖ Υλικό ενδοτραχειακής αναρρόφησης
- ❖ Βροχοκυελιδικό έκπλυμα
- ❖ Βιοψία από τραχεία ή πνεύμονες

Τα πρώτα τρία βιολογικά αυτά υγρά συλλέγονται σε ειδικά αποστειρωμένα κενά φιαλίδια κυρίως από ασθενείς που βρίσκονται υπό διασωλήνωση. Ενώ η βιοψία λαμβάνει χώρα σε PM (νεκροτομικό υλικό) και φυλάσσεται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο.

2.2 Συλλογή και μεταφορά των κλινικών δειγμάτων του ιού SARS-CoV-2

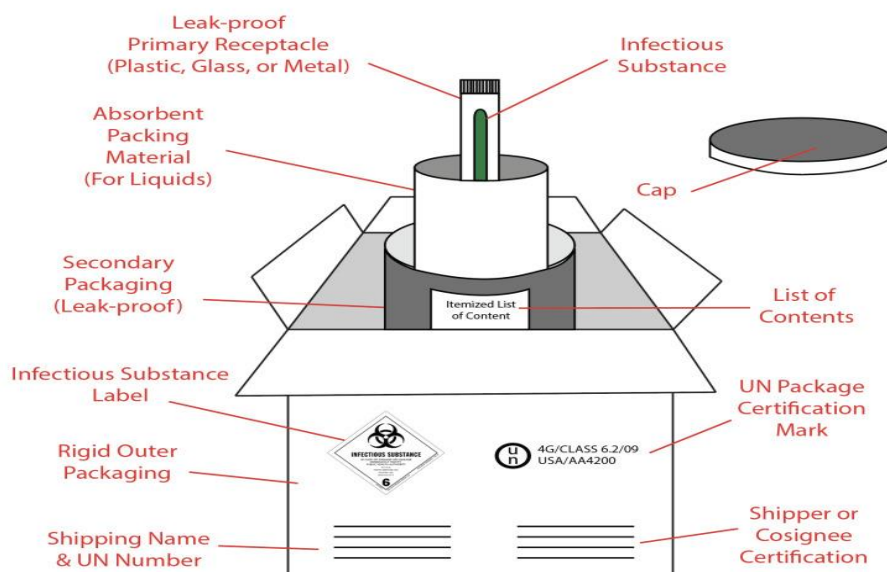
Αφού, συλλεχθούν τα κλινικά δείγματα, μεταφέρονται σε κατάλληλο αποστειρωμένο φιαλίδιο που περιέχει 1 έως 3ml ειδικού υλικού μεταφοράς ιών, το οποίο καθορίζεται από το εργαστήριο. Για τη λήψη του υλικού δεν πρέπει να γίνει χρήση βαμβακοφόρων στυλεών. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί στυλεός με άξονα αλουμινένιο ή πλαστικό και βύσμα από συνθετικό υλικό.

Στη περίπτωση όπου κατά την εξέταση ο ασθενής με έντονα συμπτώματα της νόσου COVID-19 εμφανίζεται ως «ψευδώς αρνητικός», επαναλαμβάνεται η λήψη από πολλαπλές θέσεις του

αναπνευστικού. Τέλος, για την ανοσολογική ανταπόκριση κατά του SARS-CoV-2 του ασθενούς, εξετάζονται δείγματα ορού με διαφορά δεκατεσσάρων ημερών.

Οι επαγγελματίες υγείας θα πρέπει αφού συλλέξουν τα κλινικά δείγματα με όλα τα απαραίτητα μέτρα προστασίας που θα αναφερθούν εκτενώς παρακάτω, να τα αποθηκεύσουν και να τα μεταφέρουν στα εργαστήρια για τον έλεγχο τους. Η μεταφορά των κλινικών δειγμάτων λαμβάνει χώρα με μια ειδική τριπλή συσκευασία όπως φαίνεται στη εικόνα και η παραλαβή γίνεται χέρι με χέρι (ΕΟΔΥ, 2020).

Category A Packaging Diagram



Εικόνα 5 Παράδειγμα ειδικής τριπλής συσκευασίας για τη συλλογή και μεταφορά "Κατηγορίας Α, Λοιμωδών Παραγόντων" (ΕΟΔΥ, 2020)

Αρχικά, το δείγμα συσκευάζεται σε ένα υδατοστεγές δοχείο με σήμανση έτσι ώστε να περιοριστεί κάθε διαρροή. Στη περίπτωση που υπάρχουν παραπάνω δείγματα, θα πρέπει κάθε φιαλίδιο να τυλιχθεί με απορροφητικό προϊόν για να μην σπάσει κατά τη μεταφορά. Στη συνέχεια, το υδατοστεγές δοχείο τοποθετείται εντός ενός άλλου ανθεκτικότερου υδατοστεγές δοχείου. Τέλος, το δείγμα το οποίο είναι τοποθετημένο σε δύο συσκευασίες όπως προαναφέρθηκε, τοποθετείται σε μια τρίτη συσκευασία, η οποία είναι ένα κουτί και ο ρόλος του είναι να το προστατεύσει από φυσικές φθορές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Η τελική συσκευασία θα πρέπει να έχει ειδική σήμανση για μολυσματικά υλικά και σήμανση για τον προσανατολισμό της συσκευασίας. Η μεταφορά του δείγματος θα πρέπει να περιέχει και πάγο στη τελική συσκευασία. Το υλικό μεταφοράς παρέχει τη δυνατότητα το δείγμα να συντηρηθεί στους 4°C σε κοινό ψυγείο για έως τρεις μέρες.

2.3 Απαραίτητα μέτρα για τη διαχείριση των κλινικών δειγμάτων για την εργαστηριακή μελέτη του SARS-CoV-2

Οι επαγγελματίες υγείας οι οποίοι καλούνται να διενεργήσουν τη δειγματοληψία στα ύποπτα κρούσματα για τη νόσο COVID-19, θα πρέπει να τηρούν όλα τα κατάλληλα μέτρα για τη δική τους προστασία καθώς και τη πρόληψη της μη διασποράς του ιού SARS-CoV-2. Συγκεκριμένα, τα απαραίτητα μέτρα περιλαμβάνουν ένα σύνολο ειδικού εξοπλισμού το οποίο παρέχει στον εργαζόμενο επαγγελματία υγείας την βασική ασφάλεια στην εργασία του. Σε αυτά ανήκουν:

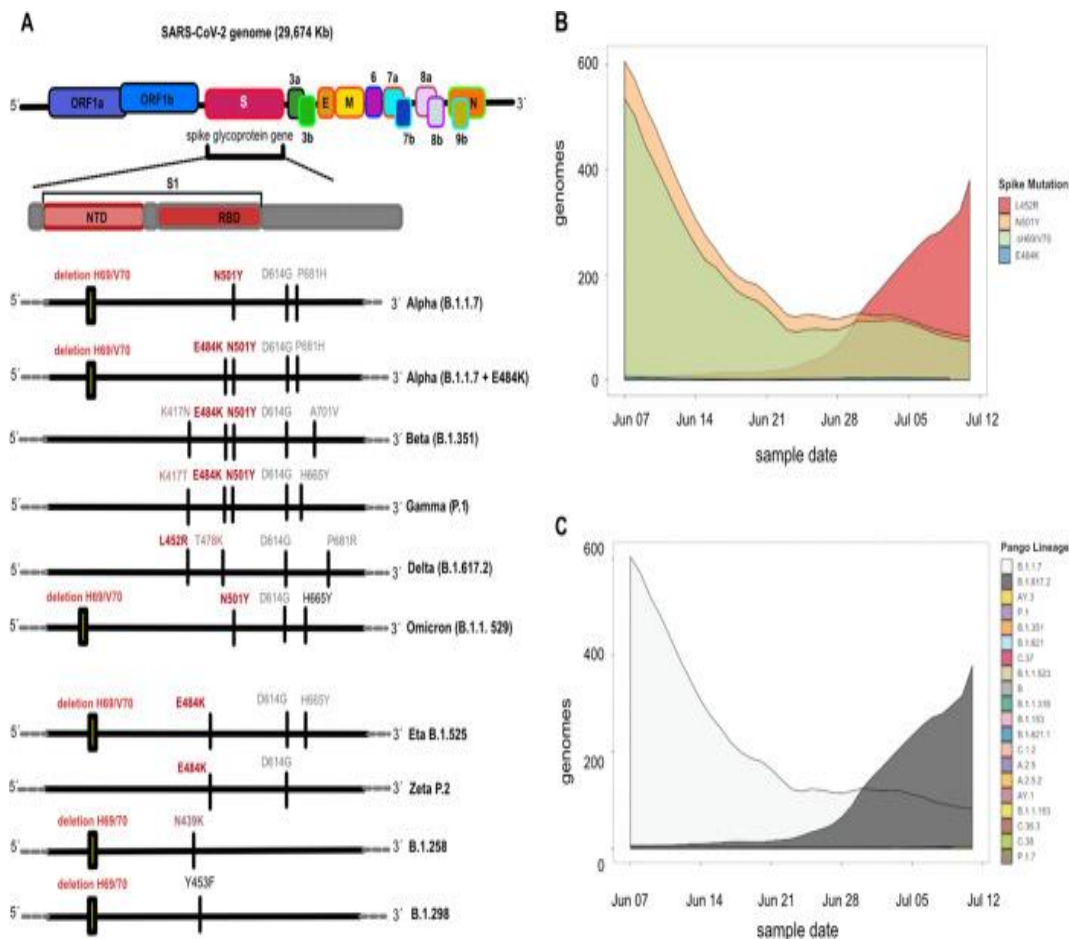
- ❖ Μάσκα υψηλής αναπνευστικής προστασίας
- ❖ Διπλά αποστειρωμένα γάντια
- ❖ Προστατευτικά γυαλιά ευρέως πεδίου ή ασπίδα
- ❖ Καθαρή μακριά ρόμπα με μακριά μανίκια

Επιπρόσθετα, η σχολαστική υγιεινή των χεριών καθώς και η προσεκτική αφαίρεση της ποδιάς σύμφωνα με τους κανονισμούς που ορίζει ο Π.Ο.Υ κρίνονται μείζων σπουδαιότητας για την ασφάλεια του υγειονομικού προσωπικού. Αξίζει να σημειωθεί και η ανάγκη σχολαστικής απολύμανσης των επιφανειών του χώρου όπου λαμβάνει χώρα η δειγματοληψία, με τη χρήση κοινών απολυμαντικών (ΕΟΔΥ, 2020).

2.4 Θέσεις βασικών μεταλλάξεων των παραλλαγών στο γονιδίωμα του ιού

Από την αρχή της πανδημίας έως σήμερα έχουν παρουσιαστεί πολλαπλές ανησυχητικές παραλλαγές (VOC) του ιού SARS-CoV-2, οι οποίες αυξάνουν την εξάπλωση του ιού, τη σοβαρότητα της νόσου COVID-19 και την ανοσολογική αντίσταση. Χαρακτηριστικά στη γλυκοπρωτεΐνη ακίδας (S) παρουσιάστηκαν τέσσερις τέτοιες μεταλλάξεις οι οποίες είναι:

- 1) οι ΔΗ69/Υ70 στις παραλλαγές Alpha και Omicron
- 2) L452R στη παραλλαγή Delta
- 3) E484K στις παραλλαγές Beta και Gamma
- 4) και N501Y στην παραλλαγή Alpha, Beta, Gamma και Omicron.



Εικόνα 6 Σχηματική απεικόνιση του γονιδιώματος SARS-CoV-2 και πού εντοπίζονται οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις (Spiess, et., 2023)

Η γλυκοπρωτεΐνη ακίδας βρίσκεται μεταξύ ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης 1b (ORF-1b) και ORF3a εντός του γονιδιώματος SARS-CoV-2. Στην N-τερματική περιοχή (NTD) της γλυκοπρωτεΐνης ακίδας εντοπίζεται η μετάλλαξη ΔΗ69/Υ70 (όπου διαγράφονται 2 αμινοξέα)

και στη περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RDB) οι μεταλλάξεις L452R, E484K και N501Y. Επιπρόσθετα, παρατηρούμε ότι οι παραλλαγές Beta (B.1.351), το Gamma (P.1), το Alpha (B.1.1.7) και το Omicron (B.1.1.529) εκδηλώνουν όμοιες μεταλλάξεις συγκεκριμένα την N501Y. Οι βασικές αυτές μεταλλάξεις παρουσιάζονται σε παραλλαγές ανησυχίας και μη, οπότε αποτελούν πρόκληση για ένα εργαστήριο μελέτης της νόσου COVID-19 το οποίο με τη χρήσιμη συνεισφορά της μοριακής διαγνωστικής μεθόδου RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcription -Polymerase Chain Reaction ή Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής) καλείτε όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, να τα εντοπίσει με γνώμονα τον ιό άγριου τύπου Wuhan-Hu-1(SARS-CoV-2 Wild-TypeWT) (Spiess, et., 2023).

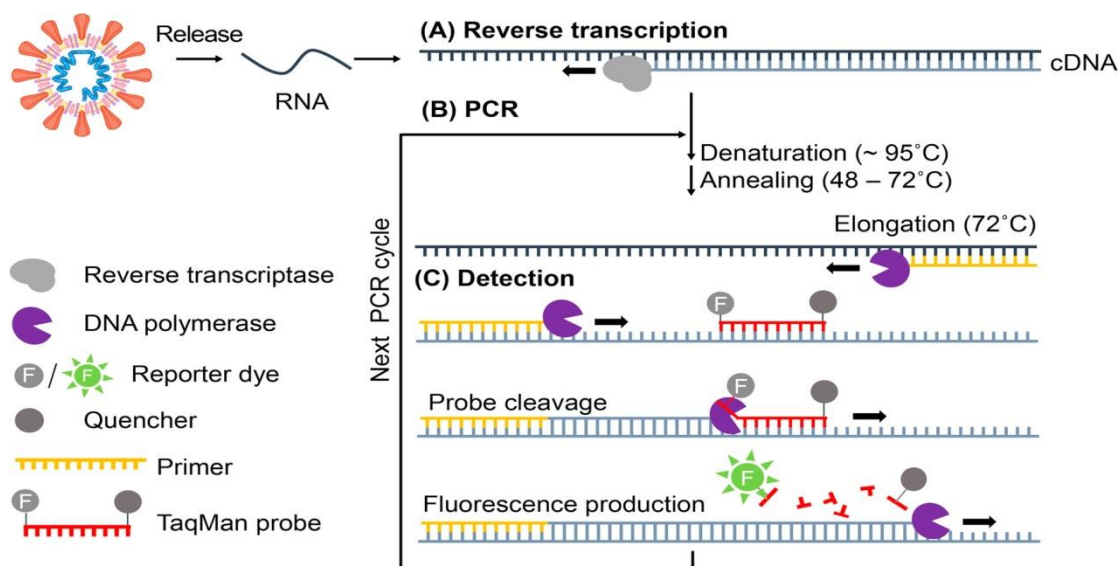
Κεφάλαιο 3 RT-PCR (Reverse transcription –polymerase chain reaction ή Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης

Η βασική λειτουργία της RT-qPCR είναι η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA. Το ολικό RNA του SARS-CoV-2 μεταγράφεται πρώτα σε συμπληρωματικό DNA(cDNA). Στη συνέχεια το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την ποσοτική PCR ή την qPCR πραγματικού χρόνου. Στην qPCR η ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης μετράται σε κάθε κύκλο PCR χρησιμοποιώντας φθορισμό. Η μέθοδος RT-PCR μπορεί να συμβεί σε ένα στάδιο (one step RT-PCR) ή σε δύο στάδια (two step RT-PCR).

Η RT-PCR σε ένα στάδιο λαμβάνει χώρα σε έναν σωλήνα αντίδρασης όπου γίνεται σύνθεση του cDNA του πρώτου κλώνου (Reverse Transcription-RT) και ακολουθεί η διαδικασία της PCR. Τα πλεονεκτήματα της είναι η επεξεργασία μεγάλου όγκου δειγμάτων, να απλοποιεί την ροή της εργασίας στο εργαστήριο και να μειώνει τις πιθανές επιμολύνσεις των δειγμάτων προς εξέταση. Τέλος, χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο ως προς ενίσχυση περιορίζοντας την ανάλυση σε λίγα γονίδια ανά δείγμα.

Η RT-PCR δύο σταδίων λαμβάνει χώρα σε δύο ξεχωριστά σωληνάκια, στο πρώτο συμβαίνει η σύνθεση του cDNA πρώτου κλώνου (Reverse Transcription-RT) και σε έναν δεύτερο σωλήνα στη συνέχεια με τη διαδικασία της PCR γίνεται ενίσχυση ενός τμήματος του προκύπτοντος cDNA. Επομένως, ένα βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτή είναι ότι η ικανότητα ανίχνευσης πολλαπλών γονιδίων σε ένα μόνο δείγμα RNA. Επίσης, με τον διαχωρισμό των αντιδράσεων RT και PCR βελτιστοποιούνται οι συνθήκες αντίδρασης για κάθε στάδιο καθώς και η ευελιξία με εκκίνηση της αντίστροφης μεταγραφής (εναρκτήρες oligo, dt), τυχαία εξαμερή ή ειδικοί για εκκινητές για το γονίδιο) αλλά και η ρύθμιση της PCR (όπως η επιλογή πολυμεράσης DNA και συστατικά της PCR). Στα μειονεκτήματα της σε σύγκριση με τη RT-PCR ενός σταδίου είναι η απαίτηση πολλών βημάτων κατά τον εργαστηριακή εκτέλεση της με αυξημένο κίνδυνο για επιμόλυνση των δειγμάτων και διακύμανση των αποτελεσμάτων.

Αυτή η εργασία παρέχει χαμηλού κόστους δοκιμές RT-qPCR για ταχεία διαλογή και μοριακή επιτήρηση μεταλλάξεων με πιθανή κλινική επίπτωση (ThermoFisher Scientific).



Εικόνα 7 Σχηματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου RT-qPCR (Feng, etc., 2020)

Πιο αναλυτικά η αρχή της μεθόδου της ανάλυσης RT-PCR έχει ως εξής:

Σαν πρώτο βήμα, η αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription) του ιικού RNA παράγει συμπληρωματικό DNA (cDNA). Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η ενίσχυση του στόχου cDNA με τη διαδικασία της PCR, όπου απαραίτητο είναι να συμβεί η αποδιάταξη των RNA-cDNA στους 95°C και ο υβριδισμός των ειδικών εκκινήτων στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του cDNA στους 48°C με 72°C. Έπειτα, η DNA πολυμεράση αναλαμβάνει την επιμήκυνση της νέας συντιθέμενης αλυσίδας.

Ως ανιχνευτής ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια ειδικά σχεδιασμένη ειδική ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία επισημασμένη με μια χρωστική αναφοράς (φθορίζον χρωστική) στο 5' άκρο της και έναν αποσβεστήρα της χρωστικής στο 3' άκρο του.

Οι άθικτοι ανιχνευτές που συνήθως είναι οι ανιχνευτές Taqman δεν εκπέμπουν καθόλου ή αμελητέο φθορισμό, εξαιτίας της μεταφοράς ενέργειας FRET. Οπότε, όταν το cDNA ενισχύεται, τα αμπλικόνια δρουν ως εκμαγεία στα οποία συνδέονται οι ανιχνευτές ανίχνευσης TaqMan. Η πολυμεράση DNA χρησιμοποιεί τη δραστηριότητα της εξωνουκλεάσης 5'-3' για να διασπάσει τον ανιχνευτή TaqMan, απομακρύνοντας το φθορίζον μόριο από τον αποσβέστη φθορισμού, αποκαθιστώντας με αυτόν τον τρόπο τον φθορισμό.

Άρα, όσο περισσότερο DNA με αλληλουχίες του θραύσματος που μας ενδιαφέρει παράγεται στην αντίδραση qPCR τόσο περισσότερος φθορισμός ανιχνεύεται και ταυτόχρονα ποσοτικοποιείται σε πραγματικό χρόνο (Feng, etc., 2020).

Οι στόχοι για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 περιλαμβάνουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες N, E και S, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης 1ab (Orflab) και το γονίδιο RNA πολυμεράσης που εξαρτάται από το RNA (RdRP), το οποίο βρίσκεται εντός του Orflab. Η επιλογή των στόχων επηρεάζει την αναλυτική ειδικότητα των αναλύσεων RT-PCR. Το γονίδιο E διατηρείται σε μεγάλο βαθμό μεταξύ όλων των βήτα κορωνοϊών και το γονίδιο N μπορεί να αντιδράσει διασταυρούμενη με άλλους κορωνοϊούς (Lu et al., 2020). Το γονίδιο RdRP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση του SARS-CoV-2 από τον ιό SARS-CoV (Zhou et al., 2020). Το γονίδιο S είναι επίσης χρήσιμο για τη διαφοροποίηση του SARS-CoV-2 επειδή αποκλίνει σε μεγάλο βαθμό από άλλους κορωνοϊούς. Γίνεται αντιληπτό ότι οι ερευνητές μπορούν να επιλέξουν διαφορετικούς στόχους ή πολλαπλούς στόχους αναλύσεων RT-PCR ανάλογα με τις ανάγκες τους, γεγονός πολύτιμο για την ανίχνευση και τον έλεγχο των νέων μεταλλάξεων και παραλλαγών του SARS-CoV-2 (Feng, etc., 2020).

RT-qPCR Screening των παραλλαγών του SARS-CoV-2

Σύμφωνα με την έρευνα Vega-Megana για να τον έλεγχο για αντικατάσταση των αμινοξέων ειδικών για τις παραλλαγές ανησυχίας του ιού εφαρμόζεται ειδική RT-qPCR που στοχεύει μεμονωμένους πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων (single nucleotide polymorphism-SNP) για το screening με τη βοήθεια κατάλληλων ανιχνευτών-εκκινητών. Λόγω της ετερογένειας των μεταλλάξεων που πρέπει να ανιχνευθούν, αναπτύχθηκαν τρία τεστ, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης των μεταλλάξεων που ενδιαφέρουν σχετικά με το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδας S του SARS-CoV-2. Το τεστ διαγραφής 69/70 στοχεύει στη διάκριση των αλληλουχιών που περιέχουν τη διαγραφή των αμινοξέων 69 και 70, ενώ το τεστ K417N ανιχνεύει μια υποκατάσταση μίας βάσης που προκαλεί την ανταλλαγή μιας Λυσίνης (K) με μια Ασπαραγίνη (N) και η ανάλυση E484K/N501Y ανιχνεύει τις μεταλλάξεις μίας βάσης που ανταλλάσσουν Γλουταμικό Οξύ (E) με Λυσίνη (K) στη θέση 484, ενώ ανιχνεύει επίσης την αλλαγή μιας Ασπαραγίνης (N) για μια Τυροσίνη (Y) στη θέση 501.

Οι εκκινητές και οι ανιχνευτές σχεδιάστηκαν από τις συναινετικές αλληλουχίες που ελήφθησαν από την ευθυγράμμιση αλληλουχιών για κάθε περιοχή ενδιαφέροντος (Εικόνα 8). Για τον υπολογισμό της θερμοκρασίας τήξης (T_m) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό OligoCalc, ενώ για την πρόβλεψη δευτερογενών δομών το εργαλείο που επιλέχθηκε ήταν το λογισμικό OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια και οι ανιχνευτές συντέθηκαν από την εταιρεία T4 Oligo.

Assay	Oligonucleotide names	oligonucleotide sequences	Modifications	Tm °C
69/70 deletion	Del 69/70 FW	GACTTGTCTTACCTTTCTTTCC		60.3
	Del 69/70 RV	CATCATTAATGGTAGGACAGGG		60.9
	Probe 69/70	TCCATGCTATACA(T)GTCTCTGGGACCAAT	3'C3 T-BHQ1 5'FAM	69.1
			3'C3 T-BHQ2	
	Probe Del 6970	GTTCCATGCTATC(T)CTGGGACCAATGGT	5'Cal Fluor Red 610	70.1
K417N mutation	K417N RV	AATTACCACCAACCTTAGAATCAAG		60.9
	417K FW	CTCCAGGGCAAACCTGGAAA+G	G LNA	65
	417N FW	GCTCCAGGGCAAACCTGGAAA+T	T LNA	66
	Probe K417N	CCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAG	3'BHQ3	67
			5'Quasar 670	
E484K/N501Y mutations (duplex-assay)	484/501 FW	ATCTATCAGGCCGGTAGCAC		60.5
	484/501 RV	GTACTACTACTCTGTATGGTTGG		60.9
	Probe 484E	CTTGTAATGGTGTGAAGGTTTAAATTG	3'BHQ1 5'FAM	62.7
			3'BHQ2	
	Probe 484K	CTTGTAATGGTGTAAAGGTTTAAATTG	5'Cal Fluor Red 610	61.5
			3'BHQ1	
	Probe 501N	TCCAACCCACT+AATGGTGTGG	A LNA	66
			5'HEX	
	Probe 501Y	TCCAACCCACT+TATGGTGTGG	3'BHQ3 T LNA	66
			5'Quasar 670	

The letter "T" in parentheses denotes the position of the internal quencher. The symbol "+" indicates that the next base is a modified base (LNA).

Εικόνα 8 Αλληλουχίες ανιχνευτών και εκκινητών σχεδιασμένων ειδικά για τις δοκιμασίες ανίχνευσης μεταλλάξεων (Vega- Megana, etc., 2021)

RT-qPCR για την ανίχνευση της διαγραφής 69/70

Αυτή η ανάλυση στοχεύει την περιοχή όπου βρίσκεται η διαγραφή 69/70 από την κωδικοποιητική αλληλουχία για την ακίδα SARS-CoV-2 και έχει ένα σύνολο εκκινητών που επιτρέπουν την ενίσχυση τόσο των μεταλλαγμένων όσο και των μη μεταλλαγμένων αλληλουχιών. Ο ανιχνευτής "Probe del69/70", επισημασμένος με CFR 610 εκτελεί την ανίχνευση των ιικών RNA που έχουν τη διαγραφή και ο ανιχνευτής "Probe 69/70" με σήμανση FAM για την ανίχνευση των αλληλουχιών που δεν υπάρχει η διαγραφή, επιτρέποντας τη διάκριση της αλληλουχίας σε μία μόνο αντίδραση.

RT-qPCR για την ανίχνευση της μετάλλαξης K417N

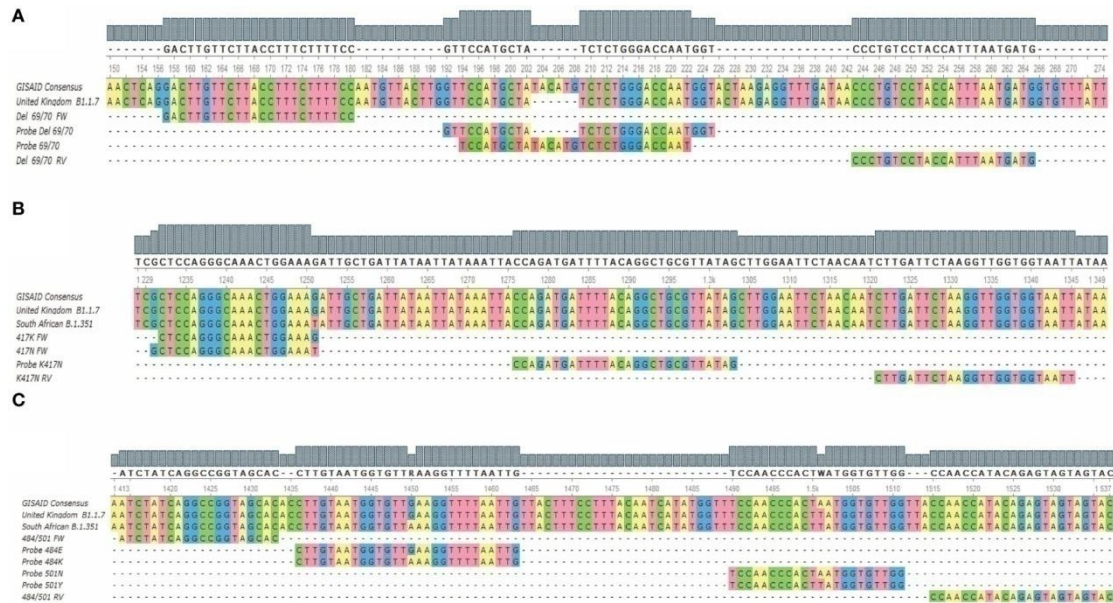
Η περιοχή που αντιστοιχεί στη μετάλλαξη K417N παρουσιάζει υψηλή πολυπλοκότητα στο σχεδιασμό τυπικών ανιχνευτών που επιτρέπουν τη διάκριση της αλληλουχίας. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να γίνει η διάκριση σε δύο ανεξάρτητες αντιδράσεις. Χρησιμοποιήθηκε τόσο ένας ανιχνευτής όσο και ένας αντίστροφος εκκινητής που και οι δύο δεν κάνουν διάκριση μεταξύ μεταλλαγμένων και μη μεταλλαγμένων αλληλουχιών, καθώς και ένας εμπρόσθιος εκκινητής «417K FW» για την πρώτη αντίδραση, όπου ανιχνεύονται οι αλληλουχίες χωρίς τη μετάλλαξη και τον εκκινητή «417N FW» για τη δεύτερη αντίδραση, όπου ανιχνεύονται οι αλληλουχίες που παρουσιάζουν τη μετάλλαξη. Και οι δύο εκκινητές ("417K FW" και "417N FW") τροποποιήθηκαν στο 3' άκρο με μια κλειδωμένη βάση νουκλεϊκού οξέος (LNA) για να αυξηθούν οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας τήξης (ΔT_m) του υβριδισμού μεταξύ της συμπληρωματικής βάσης, ενώ δεν ταιριάζουν για να ευνοηθεί ο υβριδισμός του κατάλληλου εκκινητή.

RT-qPCR για την ανίχνευση E484K/N501Y

Οι μεταλλάξεις E484K και N501Y είναι παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου κοντά η μία στην άλλη. Αυτό επέτρεψε το σχεδιασμό μιας δοκιμασίας που χρησιμοποιεί ένα σύνολο εκκινητών που ενισχύουν και τις δύο αλληλουχίες, που περιέχουν τις μεταλλάξεις ή τη βάση άγριου τύπου. Επομένως, αυτή η δοκιμασία χρησιμοποιεί τέσσερις φθορίζοντες ανιχνευτές που υβριδοποιούνται ειδικά με τις αλληλουχίες-στόχους για να διακρίνουν κάθε βάση/μετάλλαξη.

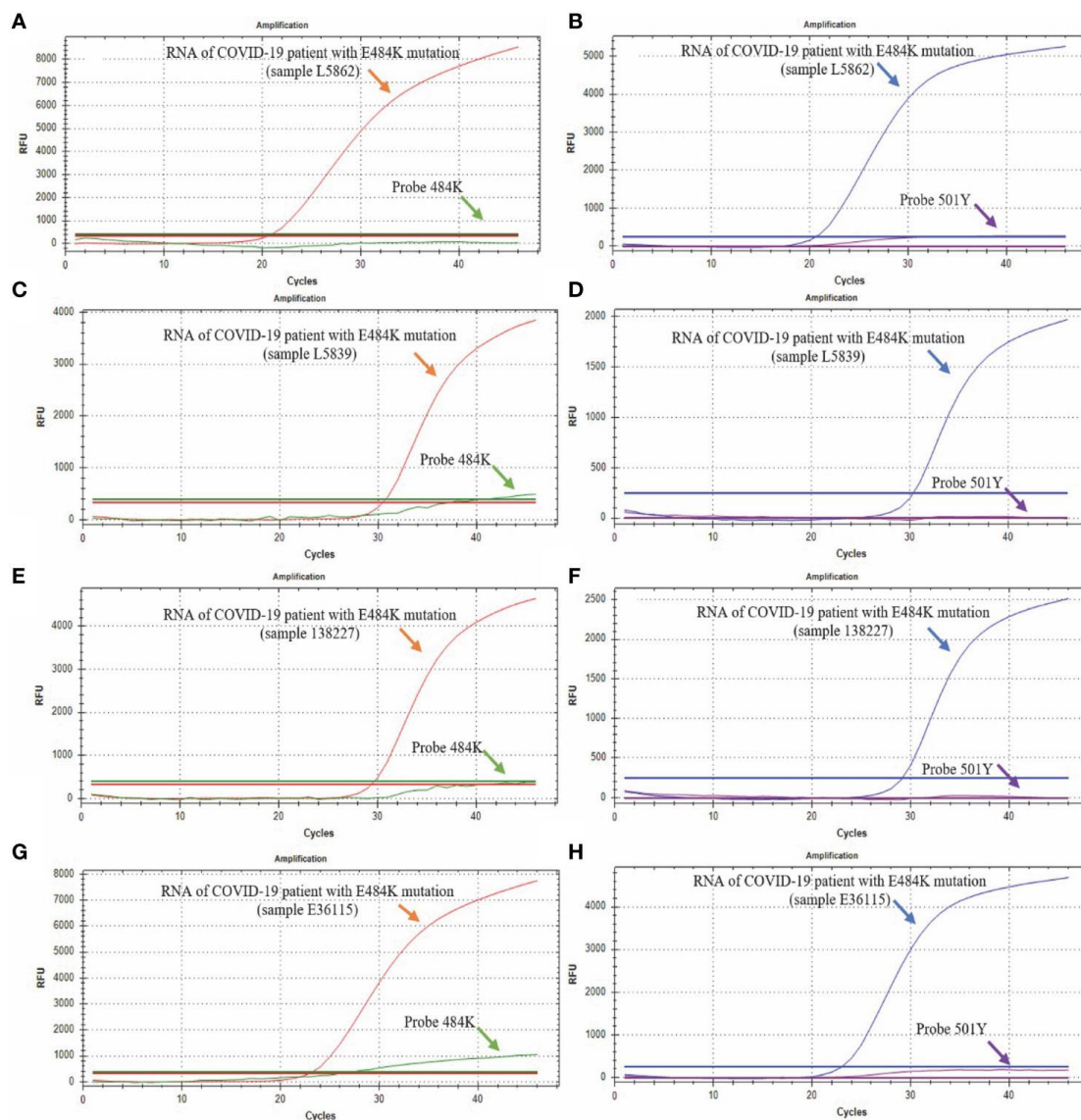
Έτσι, η ανίχνευση και η διάκριση πραγματοποιήθηκαν σε μια τετραπλή δοκιμασία, που είναι τα κανάλια για τα φθοροφόρα FAM και HEX όπου οι αλληλουχίες χωρίς μεταλλάξεις E484K και N501Y θα ανιχνευθούν μέσω των ανιχνευτών «Probe 484E» και «Probe 501N» αντίστοιχα. Οι μεταλλάξεις E484K και N501Y ανιχνεύθηκαν στα κανάλια Cal Fluor Red 610 (Probe 484K) και Quasar 670 (Probe 501Y) αντίστοιχα.

Συγκεντρωτικά παρακάτω παρουσιάζονται (στην Εικόνα 9) η ευθυγράμμιση των περιοχών υβριδισμού των ολιγονουκλεοτιδίων και των ανιχνευτών με τις αλληλουχίες-στόχους για τους τρεις προσδιορισμούς.



Εικόνα 9 Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό διαγραφής 69/70. (B) Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό μετάλλαξης K417N. (C) Παρουσιάζεται η αλληλουχία για τον προσδιορισμό E484K/N501Y (Vega-Megana, etc., 2021)

Τέλος, η έρευνα καταλήγει μέσω της ανάλυσης 517 δειγμάτων, ότι εντόπισαν 9 θετικά δείγματα για τη μετάλλαξη E484K, υποδεικνύοντας επικράτηση 1,74% σε Μεξικανούς ασθενείς από αυτή τη μελέτη, που έλαβε χώρα από τις 11 Ιανουαρίου έως τις 12 Φεβρουαρίου 2021. Οι ερευνητές δεν εντόπισαν τις άλλες τρεις μεταλλάξεις (69 -70del, K417N και N501Y) σε οποιονδήποτε ασθενή. Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 10) παρουσιάζονται τέσσερις αντιπροσωπευτικές καμπύλες RT-qPCR από τέσσερις περιπτώσεις με τη μετάλλαξη E484K. Και τα 9 δείγματα που ανιχνεύθηκαν ως μεταλλαγμένα E484K είχαν παρόμοιες καμπύλες RT-qPCR.



Εικόνα 10 Παρουσίαση διαγραμμάτων της εντόπισης των μεταλλάξεων E484K και N501Y (Vega-Megana, etc., 2021)

Η πράσινη καμπύλη λοιπόν αντιστοιχεί στον ανιχνευτή που ανιχνεύει την αλληλουχία χωρίς τη μετάλλαξη E484K (Probe 484E), η κόκκινη καμπύλη αντιστοιχεί στον ανιχνευτή που ανιχνεύει την αλληλουχία με τη μετάλλαξη E484K (Probe 484K). Η μπλε καμπύλη αντιστοιχεί στον ανιχνευτή που ανιχνεύει την αλληλουχία χωρίς τη μετάλλαξη N501Y και η μωβ καμπύλη αντιστοιχεί στον ανιχνευτή που ανιχνεύει την αλληλουχία με τη μετάλλαξη N501Y. (A, B) δείχνουν τα αποτελέσματα από τον ασθενή L5862. (C, D) δείχνουν τα αποτελέσματα από τον ασθενή L5039. (E, F) δείχνουν τα αποτελέσματα από τον 138227 ασθενή (G, H) δείχνουν τα αποτελέσματα από τον ασθενή E36115.

Συμπερασματικά, αυτή η μέθοδος παρέχει στους επιστήμονες μια γρήγορη εκτίμηση για τα θετικά δείγματα του SARS-CoV-2, αν περιέχουν μεταλλάξεις χαρακτηριστικές του VOC/VOI. Με αυτό τον τρόπο η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα αποκτά συνεχώς δεδομένα για την εξέλιξη και εξάπλωση των νέων παραλλαγών του ιού (Vega-Magana, etc., 2021).

Δοκιμασίες RT-PCR και Screening για τον εντοπισμό της έλλειψης του γονιδίου S

Οι δοκιμασίες ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (Nucleic Acid Amplification Tests-NAATs) που βασίζονται σε PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (RT-PCR) είναι ευρέως χρησιμοποιημένες ως τυπική μέθοδος για την ανίχνευση του SARS-CoV-2. Όπως, αναλύθηκε προηγουμένως τέτοιες δοκιμές RT-PCR μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα ή πολλαπλά γονίδια στόχους για ενίσχυση.

Αυτή η ικανότητα της RT-PCR έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ή μέθοδος ελέγχου (screening) για ορισμένες μεταλλάξεις VOC SARS-CoV-2 (π.χ. Alpha [B.1.1.7] και Omicron [B.1.1.529]), οι οποίες παράγουν αρνητικό ή σημαντικά ασθενέστερο θετικό S - αποτέλεσμα γονιδίου σε προσδιορισμούς Multiplex RT-PCR, με θετικά αποτελέσματα για τους άλλους στόχους. Κατά σύμπτωση, αυτό συμβαίνει σε ορισμένες αναλύσεις που περιλαμβάνουν στόχο του γονιδίου S (π.χ. ανάλυση ThermoFisher TaqPath), αλλά όχι σε όλες. Προκαλείται από μια διαγραφή στα νουκλεοτίδια (nt) 207-212 (διαγραφή των αμινοξέων 69-70) στο αντίστοιχο γονίδιο και είναι γνωστή ως αποτυχία στόχου του γονιδίου S (Spike Gene Target Failure-SGTF).

Συγκεκριμένα, η Alpha και η πλειονότητα των παραλλαγών της Omicron δίνουν θετικό σήμα σε RT-PCR στοχευμένες στο ORF1 και N-γονίδιο, αλλά όχι σε RT-PCR στοχευμένες στο γονίδιο S (Erster et al., 2021). Οι πρωτεΐνες ακίδας των BA.4 και BA.5 είναι πανομοιότυπες και συγκρίσιμες με τις BA.2 εκτός από την προσθήκη 69-70, L452R, F486V και του αμινοξέος του ιού δείκτη στο Q493.

Προκειμένου να υποδηλωθεί η παρουσία των BA.4 και BA.5 στο επιδημιολογικό υπόβαθρο μιας κυρίαρχης παραλλαγής που δεν έχει αυτές τις μεταλλάξεις (π.χ. BA.2), το SGTF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για προκαταρκτική εξέταση και ως δείκτης υποκατάστασης (ECDC, 2021). Υπάρχουν, ωστόσο, αλληλουχίες ιών της γενεαλογίας που δεν είναι Omicron που διαθέτουν επίσης 69-70 και, ως εκ τούτου, θα δώσουν ένα αποτέλεσμα SGTF. Αυτό τονίζει πόσο κρίσιμη είναι η αλληλουχία για τον χαρακτηρισμό των παραλλαγών του SARS-CoV-2.

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) έχει καταγράψει μοριακές δοκιμές που μπορεί να επηρεαστούν από μεταλλάξεις στην SARS-CoV-2 Omicron παραλλαγή. Ομοίως, το Κοινό Κέντρο Ερευνών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (European Commission Joint Research Centre -JRC) παρακολουθεί την απόδοση των αναλύσεων RT-PCR και εμφανίζει τις πληροφορίες στον πίνακα ελέγχου του JRC. Ως εκ τούτου, τα εργαστήρια προτρέπονται να επιβεβαιώσουν την αποτελεσματικότητα των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται με τα δεδομένα στον αντίστοιχο πίνακα ελέγχου JRC.

Η αποκοπή μπορεί να επιλεγεί με βάση το εάν το SGTF χρησιμοποιείται για το screening, για την ανίχνευση μεμονωμένων περιπτώσεων σε πρώιμο στάδιο (και όλα τα θετικά στη συνέχεια πρέπει να αλληλουχηθούν) ή ως αντιπρόσωπος όταν επικρατεί η θετική σε SGTF VOC (π.χ. Omicron). Τα δείγματα με χαμηλότερο Ct<30(Cycle threshold) μπορούν να αξιολογηθούν πιο αξιόπιστα. Όταν η συγκεκριμένη VOC κυκλοφορεί ήδη με υψηλό επιπολασμό σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, απαιτούνται γρήγορα εργαστηριακά αποτελέσματα ή η ικανότητα προσδιορισμού αλληλουχίας είναι περιορισμένη, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται το SGTF ως δείκτης.

Στην πρώτη περίπτωση, η ευαισθησία θα πρέπει να μεγιστοποιηθεί, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η ειδικότητα είναι πιο σημαντική και μπορεί να επιλεγεί μια πιο συντηρητική αποκοπή. Ανεξάρτητα από τον επιπολασμό, τουλάχιστον ένα υποσύνολο δειγμάτων SGTF (τουλάχιστον 10% ή ανάλογα με τους διαθέσιμους πόρους) θα πρέπει να χαρακτηρίζεται έπειτα με γονιδιωματική αλληλούχηση. Συνιστάται ιδιαίτερα η επιβεβαίωση της διαγραφής στα νουκλεοτίδια 207-212 (69-70) με προσδιορισμό αλληλουχίας, ειδικά σε περιβάλλον χαμηλού επιπολασμού.

Η αλληλουχία όλων των SGTF απαιτείται σε ρυθμίσεις όπου κυκλοφορούν άλλες παραλλαγές χωρίς VOC με την ίδια διαγραφή και θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά για να αυξηθεί η εμπιστοσύνη και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Εάν η συσχέτιση είναι πολύ υψηλή, το

SGTF μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της συχνότητας των VOC με μια διαγραφή στο γονίδιο S. Η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων αλληλουχίας που ελέγχονται από SGTF μπορεί να ληφθεί υπόψη για την αξιολόγηση της περιφερειακής συσχέτισης μεταξύ του SGTF και της συγκεκριμένης VOC, καθώς αυτό ποικίλλει ανάλογα με τις περιφερειακά κυκλοφορούσες παραλλαγές.

Στη Multiplex RT-PCR, η οποία συνδυάζει τις κοινές αναλύσεις στόχων E και/ή N και/ή ORF-1 με τον στόχο του γονιδίου S, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα αποτελέσματα δεν πρέπει να ερμηνεύονται υπερβολικά και πρέπει να ελέγχονται και να επικυρώνονται συνεχώς με τη χρήση γονιδιωματικής ανάλυσης (Korukluoglu et al., 2021).

Στον έλεγχο (screening) στις SNP δοκιμασίες, οι ειδικές για τις VOC υποκαταστάσεις αμινοξέων μπορούν να αναγνωριστούν χρησιμοποιώντας ειδικές αναλύσεις RT-PCR που στοχεύουν ένα πολυμορφισμό μονονουκλεοτιδίου (SNP) που υπάρχει σε ορισμένες VOC (Korukluoglu et al., 2021). Θα χρειαστούν κατάλληλοι θετικοί έλεγχοι. Αυτή η μέθοδος επιτρέπει μια γρήγορη εκτίμηση του επιπολασμού των συγκεκριμένων παραλλαγών που είναι θετικές για μετάλλαξη στη κοινότητα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν υποκαταστάσεις αμινοξέων (π.χ. N501Y) που υπάρχουν σε περισσότερα από μια SARS-CoV-2 γενεαλογία, που δεν ανήκουν σε κυκλοφορούντες VOC. Αρκετές VOC που κυκλοφορούν αυτή τη στιγμή μοιράζονται κοινές μεταλλάξεις. Επομένως, τουλάχιστον ένα υποσύνολο δειγμάτων θα πρέπει να επαληθεύεται με τη χρήση αλληλουχίας. Για τις παραλλαγές Omicron συγκεκριμένα, ορισμένες εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ελέγχου για SNP για τη ταυτοποίηση των T478K, N501Y και P681H αποτυγχάνουν να αναγνωρίσουν αξιόπιστα αυτές τις μεταλλάξεις, παρά το γεγονός ότι αυτές οι παραλλαγές φέρουν τις μεταλλάξεις αυτές στο γονίδιο S (FDA, 2023). Νέες αναλύσεις έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση της Omicron. Τα εργαστήρια πρέπει να παραμείνουν σε επαγρύπνηση για να διασφαλίσουν ότι εντοπίζουν τυχόν μείωση της ευαισθησίας ή αποτυχία ειδικών αναλύσεων για τον εντοπισμό των πτητικών οργανικών ενώσεων.

Οι ποιοτικές δοκιμές RT-PCR μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ των διαφόρων υπο-παραλλαγών Omicron, συγκεκριμένα BA.1 έως BA.5. Η ειδική για το BA.1 προσδιορισμός βασίζεται στη διαγραφή 69-70 και στην εισαγωγή ins214EPE που παρατηρείται στο γονίδιο BA.1 S, και ένα δείγμα αναγνωρίζεται ως BA.1 μόνο εάν και οι δύο στόχοι (69-70 και ins214EPE) είναι θετικοί. Αν δεν διαθέτουν το ins214EPE, τα BA.3 έως BA.5 έχουν τα 69-70 στο γονίδιο S (https://cov-lineages.org/lineage_list.html) , καθιστώντας τα θετικά για το 69-70

και αρνητικά για το ins214EPE όταν δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας την ειδική για BA.1 προσδιορισμό RT-PCR. Στο τρέχον επιδημιολογικό υπόβαθρο όπου το BA.2 είναι η κυρίαρχη παραλλαγή, τα εργαστήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν την παρουσία των αλλαγών αιχμής L452R ή F486V ή SGTF (TaqPath™ COVID-19 qPCR assay) ως έλεγχο (screening) για την παραλλαγή, όμως τουλάχιστον η ακίδα RBD θα πρέπει να αλληλουχηθεί για επιβεβαίωση (Tegally et al., 2022).

Η νουκλεοτιδική υποκατάσταση G12160A είναι ένας ειδικός δείκτης για τις παραλλαγές BA.4 και BA.5, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου δεν μπορεί να ανακτηθεί ολόκληρη η ακολουθία RBD. Για να είναι δυνατή η διαφοροποίηση μεταξύ BA.4 και BA.5, απαιτούνται αναλύσεις που στοχεύουν ασύμφωνα μέρη του ιικού γονιδιώματος ή της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS). Ωστόσο, τουλάχιστον η ακίδα RBD θα πρέπει να αλληλουχηθεί για επιβεβαίωση. Όταν κυκλοφορούν άλλες παραλλαγές με χαμηλό επιπολασμό, η ανίχνευση της διαγραφής μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιπρόσωπος για την παρουσία των παραλλαγών BA.4 και BA.5 λόγω της μετάλλαξης 69-70 σε αυτές τις παραλλαγές.

Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται οι αντικαταστάσεις, οι διαγραφές ή οι παρεμβολές αμινοξέων χαρακτηριστικών πρωτεϊνών ακίδων για τον έλεγχο και το screening διαφορετικών VOC. Όμως, ιδιαίτερη προσοχή χρήζει το γεγονός ότι οι αναντιστοιχίες εκκινητή/ανιχνευτή σε γειτονικές θέσεις σε παραλλαγές Omicron (ή άλλες) μπορεί να προκαλέσουν αποτυχία ανίχνευσης της υποκατάστασης αμινοξέος ακόμα και αν η παραλλαγή φέρει αυτήν την υποκατάσταση. Επομένως, συνιστάται η επικύρωση για τον εντοπισμό/χαρακτηρισμό νέων παραλλαγών (ECDC, 2022).

Spike amino acid variation	Alpha (B.1.1.7)	Beta (B.1.351)	Gamma (P.1)	Delta (B.1.617.2)	Omicron (B.1.1.529)				
					BA.1	BA.2	BA.3	BA.4	BA.5
Δ69-70	x				x		x	x	x
ins214EPE					x				
S371L/S373P					x				
S371F/S373P						x	x	x	x
K417T			x						
K417N		x			x	x	x	x	x
L452R				x				x	x
T478K				x	x	x	x	x	x
E484K		x	x						
E484Q	(x)								
E484A					x	x	x	x	x
F486V								x	x
N501Y	x	x	x		x	x	x	x	x
P681H	x				x	x	x	x	x
P681R				x					

Εικόνα 11 Πίνακας με τις αντικαταστάσεις, διαγραφές ή παρεμβολές αμινοξέων χαρακτηριστικών πρωτεϊνών ακίδας (ECDC, 2022)

Τέλος, για τον έλεγχο (screening) των SNP χρησιμοποιούνται ειδικές μέθοδοι PCR πραγματικού χρόνου που επιτρέπουν την ανάλυση καμπύλης τήξης. Εμπορικές αναλύσεις έχουν αναπτυχθεί για χρήση αυτής της μεθόδου γονότυπου για τον εντοπισμό ειδικών υποκαταστάσεων αμινοξέων (π.χ. Δ69-70, S371L/S373P, K417N, N439K, Y453F, E484K, N501Y, A570D, D614G, P681H ή V1176F). Τέτοιες αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση των VOCs (ECDC, 2022).

Κεφάλαιο 4 Next Generation Sequencing - (Αλληλούχηση νέας γενιάς)

Η επιτήρηση για την εξέλιξη και τη πορεία των νέων παραλλαγών του ιού SARS-CoV-2 πραγματοποιείται με τη χρήση της αλληλουχίας νέα γενιάς (NGS). Η τεχνική αυτή προσδιορίζει αλληλουχίες DNA ή RNA και μπορεί να ανιχνεύσει τυχόν μεταλλάξεις/παραλλαγές. Σε συνδυασμό με τη βιοπληροφορική και της μοναδικής χημικής αλληλουχίας των διαφορετικών μητρών αλληλουχίας, δίνετε η δυνατότητα μαζικής παράλληλης αλληλούχησης διάφορων μικρών αλληλουχιών RNA ή DNA ή και ολόκληρου του γονιδιώματος σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η διαδικασία του NGS περιλαμβάνει διάφορα βήματα όπως τον κατακερματισμό του DNA/RNA, τη προετοιμασία της βιβλιοθήκης, τη μαζική παράλληλη αλληλουχία, την ανάλυση βιοπληροφορικής και τον σχολιασμό και την ερμηνεία των παραλλαγών/μεταλλάξεων.

Κατακερματισμός του DNA

Στοχευόμενο DNA κατακερματίζεται σε πολλά μικρά τμήματα, μήκους 100-300bp. Αυτό συμβαίνει με διάφορες μεθόδους όπως μηχανικές μεθόδους, ενζυματική χώνευση ή άλλες μεθόδους. Για παράδειγμα, η μέθοδος σύλληψης υβριδισμού μπορεί με εφαρμογή υπερήχων να σπάσει σε πολλά μικρά τμήματα DNA και οι στοχευμένες αλληλουχίες DNA εξάγονται με τη χρήση ειδικών συμπληρωματικών ανιχνευτών διαφόρων σχεδίων.

Η «Amplicon assay»

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται και για την αλληλούχηση του RNA του ιού SARS-CoV-2 σε θετικά κλινικά δείγματα για COVID-19, είναι η ενίσχυση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στη μέθοδο αυτής χρησιμοποιούνται πολλά ζεύγη εκκινητών για τον πολλαπλασιασμό των στοχευμένων τμημάτων cDNA. Οπότε, τα παραγόμενα προϊόντα της PCR χρησιμεύουν ως μικρά τμήματα DNA, τα οποία στο επόμενο βήμα χρησιμοποιούνται για τη προετοιμασία της βιβλιοθήκης.

Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης, τμήματα DNA τροποποιούνται έτσι ώστε κάθε τμήμα DNA να μπορεί να έχει έναν ειδικό δείκτη όπως η αναγνώριση δείγματος που επιτρέπει την αντιστοίχιση με τον ασθενή από τον οποίο πραγματοποιήθηκε η αλληλουχία

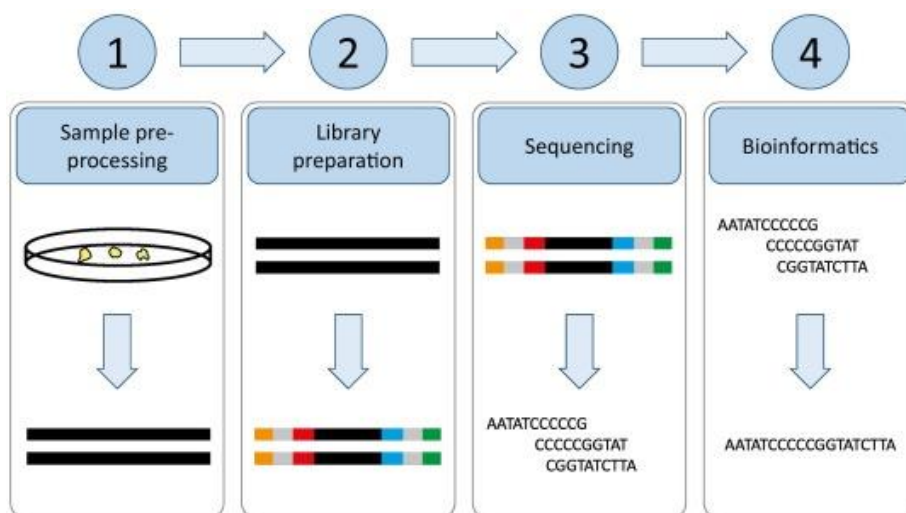
DNA. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει στους προσαρμογείς προσδιορισμού αλληλουχίας να προστεθούν στα τμήματα DNA. Με αυτή τη τροποποίηση επιτρέπεται στους εκκινητές προσδιορισμού αλληλουχίας να δεσμεύονται σε όλα τα τμήματα DNA και ξεκινάει να λαμβάνει χώρα η μαζική παράλληλη αλληλουχία σαν επόμενο βήμα.

Αλληλούχηση

Η χρήση NGS sequencer (προσδιοριστή) επιτρέπει τη μαζική παράλληλη αλληλούχηση. Με αυτό τον τρόπο η βιβλιοθήκη μεταμορφώνεται σε έναν πίνακα αλληλουχίας σε ένα πρόγραμμα αλληλουχίας. Επίσης, διαφορετικοί προσδιοριστές έχουν διαφορετικούς πίνακες αλληλουχίας. Για παράδειγμα, η εταιρία Illumina NGS sequencer χρησιμοποιεί κελιά ροής και το Ion Torrent NGS sequencer χρησιμοποιεί τσιπ αλληλούχησης. Ωστόσο, ο στόχος του παραμένει ίδιος, δηλαδή να επιτρέψει μαζική παράλληλη αλληλούχηση όλων των τμημάτων DNA ταυτόχρονα. Τέλος, οι αλληλουχίες αυτές καθώς και οι πληροφορίες που μας δίνουν επεξεργάζονται με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής.

Βιοπληροφορική ανάλυση και παρουσίαση δεδομένων.

Για την επεξεργασία των δεδομένων που αντλούμε από τη διαδικασία της αλληλούχησης, γίνεται μια ανάλυση της κλίσης της βάσης, την ευθυγράμμιση της αναγνώρισης, την ανάγνωση και τον σχολιασμό της παραλλαγής. Για να επιτευχθεί αυτό, εφαρμόζεται η σύγκριση μιας αλληλουχίας αναφοράς ανθρώπινου γονιδιώματος με τις πληροφορίες αλληλουχίας από την αλληλούχηση των στοχευμένων τμημάτων DNA προς διερεύνηση για το εάν εμπεριέχουν παραλλαγές ή μεταλλάξεις. Έπειτα, όλες οι πληροφορίες που αντλούνται για κάθε αλληλουχία ξεχωριστά συγκεντρώνονται όλα μαζί για την δημιουργία ενός συνόλου αποτελεσμάτων για το ως προς μελέτη DNA, τα οποία αποτελέσματα αποστέλλονται πίσω στον χρήστη για ερμηνεία. Τέλος, με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων προσδιορίζεται ακριβώς ποια παραλλαγή ή μετάλλαξη εμπεριέχει το DNA που μελετάμε καθώς και η ενδεχόμενη κλινική και βιολογική σημασία του (Qin, 2019).



Εικόνα 12 Σχηματική απεικόνιση των σταδίων του NGS (Hess, et al., 2020)

Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται μια γενική ροή εργασιών για το NGS. Αρχικά, το δείγμα νουκλεϊκού οξέος πρέπει να εξαχθεί από το δείγμα (όπως αίμα, πτύελα, μυελός των οστών, καλλιέργειες βακτηρίων κ.λπ.). Η προετοιμασία της βιβλιοθήκης παράγει έναν πληθυσμό θραυσμάτων DNA καθορισμένων μηκών με καθορισμένες αλληλουχίες ολιγομερών και στα δύο άκρα ώστε να είναι συμβατές με την εφαρμοσμένη τεχνική προσδιορισμού αλληλούχησης (Hess et al., 2020).

Η υιοθέτηση του NGS για ευρεία χρήση προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας τεράστιων ποσοτήτων δεδομένων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη παθογόνων μικροοργανισμών. Ερευνητές στον ακαδημαϊκό χώρο, στις δημόσιες δομές υγείας και τη βιομηχανία χρησιμοποιούν επίσης τεχνολογία και τα δεδομένα αλληλούχησης για να βοηθήσουν στην κατανόηση των ιδιοτήτων, των διαδικασιών ανάπτυξης και της φυλογενετικής του ιού SARS-CoV-2. Το CDC των Ηνωμένων Πολιτειών ηγείται ενός προγράμματος που αποκαλείται «SARS-CoV-2 Sequencing for Public Health Emergency Response, Epidemiology and Surveillance (SPHERES)». Το πρόγραμμα στοχεύει στον συντονισμό της αλληλουχίας μεγάλης κλίμακας του ιού SARS-CoV-2 για τη διευκόλυνση της υγειονομικής επίβλεψης για όποιες νέες παραλλαγές και μεταλλάξεις του ιού (John et al., 2021).

Επομένως, το NGS είναι μια μέθοδος για την ταυτοποίηση παραλλαγών VOCs. Λόγω των πολλών χαρακτηριστικών μεταλλάξεων ορισμένων από τις VOCs, μπορούν να αναγνωριστούν

από την μερική ή ολόκληρη αλληλούχηση του γονιδίου S. Αυτό θα πρέπει κατά προτίμηση να περιλαμβάνει τον τομέα δέσμευσης υποδοχέα (RBD), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε περιοχή, υπό τον όρο ότι καλύπτει αρκετές χαρακτηριστικές μεταλλάξεις για να συμπεράνουμε ότι είναι μια συγκεκριμένη παραλλαγή του ιού. Ιδιαίτερως, πρέπει να δοθεί προσοχή στην παρουσία μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP) γνωστών μεταλλάξεων που οδηγούν σε μια αλλαγή στα βιολογικά χαρακτηριστικά του ιού. Τα εργαστήρια Δημόσιας Υγείας μπορούν να αντλήσουν συγκεκριμένα πρωτόκολλα για ειδικές δοκιμασίες RT-PCR στοχευμένες για την περιοχή του S γονιδίου που είναι χαρακτηριστικό για διάφορα VOCs και πρωτόκολλο κατάλληλης αλληλούχησης στον ιστότοπο του Π.Ο.Υ (ECDC, 2022).

Χαρακτηριστικά, οι Coutard et al. ανέλυσαν τα δεδομένα αλληλούχησης του SARS-CoV-2 και εντόπισαν μια θέση διάσπασης παρόμοια με τη Φουρίνη που υπάρχει στην αλληλουχία αμινοξέων της πρωτεΐνης S που δεν υπάρχει σε κορωνοϊούς του ίδιου clade (Coutard et al., 2020). Πρότειναν ότι η προσθήκη αυτής της θέσης διάσπασης στη δομή αμινοξέων της πρωτεΐνης S μπορεί να ήταν μια επιπρόσθετη μετάλλαξη λειτουργίας που επέτρεψε την αποτελεσματική εξάπλωση στον ανθρώπινο πληθυσμό. Συμπληρώνουν την υπόθεσή τους με στοιχεία ότι τα επίπεδα έκφρασης της Φουρίνης είναι υψηλά στους πνεύμονες και ότι τα κύτταρα ξενιστές προσπαθούν να αναστείλουν τη δραστηριότητα και τη διαθεσιμότητα ενζύμων που μοιάζουν με Φουρίνη κατά τη διάρκεια ιογενών λοιμώξεων (Braun & Sauter 2019). Οι συγγραφείς σημειώνουν ότι η παρουσία παρόμοιων θέσεων διάσπασης Φουρίνης έχει συνδεθεί με υψηλότερη παθογένεια στον ιό της λοιμώδους βρογχίτιδας, στους ιούς της γρίπης και σε άλλους ανθρώπινους κορωνοϊούς. Την υπόθεση συμπλήρωσε η έρευνα των Anand et al., η οποία παρείχε αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με τη σημασία αυτής της θέσης διάσπασης της Φουρίνης (Anand et al., 2020). Πραγματοποίησαν υπολογιστικές αναλύσεις σε 10.967 γονιδιώματα SARS-CoV-2 που είναι διαθέσιμα στη δημόσια βάση δεδομένων GISAID και αναφέρουν ότι η θέση διάσπασης της Φουρίνης στην πρωτεΐνη ακίδας (S) είναι πανομοιότυπη με τη θέση διάσπασης Φουρίνης που υπάρχει στην Άλφα υπομονάδα καναλιού νατρίου του ανθρώπινου επιθηλίου (ENaC-a). Η υπομονάδα EnaC-a απαιτεί διάσπαση από πρωτεάσες Φουρίνης για ενεργοποίηση με τον ίδιο τρόπο όπως η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 και ο διάυλος EnaC υπάρχει σε υψηλά επίπεδα σε περιοχές αρχικής λοίμωξης SARS-CoV-2 (αναπνευστικό επιθήλιο, ρινική κοιλότητα κ.λπ.). Υποθέτουν ότι η θέση διάσπασης της Φουρίνης που υπάρχει στον ιό SARS-CoV-2 θα μπορούσε να ανταγωνιστεί για την ενεργοποίηση με τη θέση διάσπασης της Φουρίνης EnaC-a, προκαλώντας δυσρύθμιση της ισορροπίας των κυτταρικών ηλεκτρολυτών, οδηγώντας στα υψηλά επίπεδα υγρού που

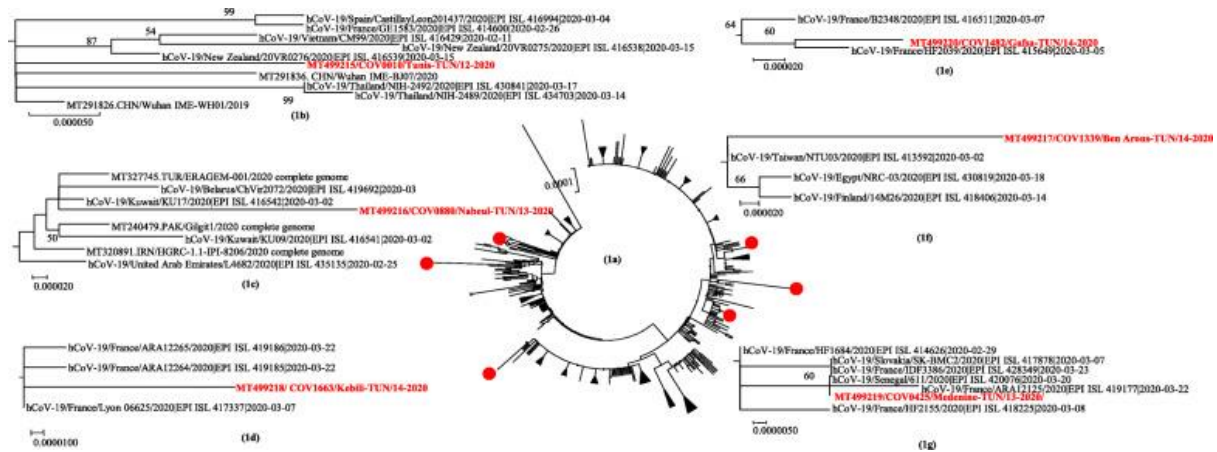
βρίσκονται στους πνεύμονες ορισμένων COVID -19 ασθενείς. Συνολικά, αυτή η ανάλυση των δεδομένων αλληλουχίας παρέχει μια άλλη ενδιαφέρουσα πρόταση που θα μπορούσε να υποδείξει ένα υποψήφιο αντικό φάρμακο για το SARS-CoV-2 και να ρίξει φως στην υψηλή ικανότητα μετάδοσης του ιού (John et al., 2021).

Στην έρευνα των Fares et al. για τη πλήρη γονιδιωματική αλληλούχηση με NGS και φυλογενετική ανάλυση έξι Τυνησιακών στελεχών SARS-CoV-2 έχει ως συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα των SNPs ευνοούν την κατανομή των αναφερόμενων Τυνησιακών αλληλουχιών σε 3 κύριους γονότυπους. Αναλυτικότερα, οι έξι Τυνησιακές αλληλουχίες SARS-CoV-2 δεν ήταν πανομοιότυπες, με 0,1% νουκλεοτιδική απόκλιση μεταξύ τους. Σε σύγκριση με την αλληλουχία αναφοράς Γιουχάν (NC045512), οι αναφερόμενες αλληλουχίες SARS-CoV-2 της Τυνησίας έδειξαν αρκετές συνωνύμες και μη μεταλλάξεις, κατανεμημένες σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 43 μεταλλάξεις SNP με 27 και 16 SNP στη μη δομική και δομική περιοχή αντίστοιχα. Κάθε ακολουθία έδειξε ένα διαφορετικό προφίλ SNPs. Ο αριθμός των ανιχνευθέντων SNPs σε κάθε αλληλουχία κυμαινόταν μεταξύ 6 και 13. Τα περισσότερα από αυτά εντοπίστηκαν στη μη δομική περιοχή επηρεάζοντας 08 από τα 16 μη δομικά γονίδια. Στη δομική περιοχή, τα περισσότερα SNP ανιχνεύθηκαν στο γονίδιο S που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδας.

Σε αυτήν την μελέτη, οι πλήρεις αλληλουχίες γονιδιώματος έξι στελεχών SARS-CoV-2 ελήφθησαν από θετικά δείγματα RT-PCR που συλλέχθηκαν σε Τυνησίους ασθενείς μεταξύ Μαρτίου και Απριλίου 2020. Τρεις περιπτώσεις είχαν πρόσφατο ιστορικό ταξιδιού. Ένα προερχόμενο από το Βιετνάμ, ένα από την Τουρκία και ένα από τη Γαλλία, ενώ τα τρία υπόλοιπα κρούσματα μολύνθηκαν τοπικά εντός της Τυνησίας. Οι έξι αλληλουχίες ήταν μη ταυτόσημες με 0,1% απόκλιση νουκλεοτιδίων μεταξύ τους και είχαν αρκετές νουκλεοτιδικές αλλαγές σε σύγκριση με την πρώτη δημοσιευμένη αλληλουχία COVID-19 από τη Γιουχάν της Κίνας (NC045512). Η φυλογενετική ανάλυση που περιλαμβάνει αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες από 61 χώρες χώρισε τις έξι αλληλουχίες από την Τυνησία σε 6 διαφορετικές ομάδες, μαζί με αλληλουχίες από διάφορες άλλες χώρες. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πολλαπλές εισαγωγές του ιού SARS-CoV-2 στην Τυνησία. Σύμφωνα με πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα από τον Yin το 2020, προτάθηκαν τέσσερις κύριοι γονότυποι ανάλογα με τις θέσεις των SNPs (Yin, 2020).

Οι SNPs που αναφέρονται εδώ στις θέσεις 3037, 8782, 11.083, 14.408, 23.403 και 28.144 μας επέτρεψαν να ταξινομήσουμε τις Τυνησιακές αλληλουχίες σε 3 διακριτούς γονότυπους μεταξύ

των τεσσάρων κύριων γονότυπων (Genotype COV0)) (COV0425, COV1339, COV1482 και COV1663). Πράγματι, αυτά τα SNP αναγνωρίστηκαν ως οι πιο συχνές μεταλλάξεις που περιγράφονται από την αρχή της αναφοράς της πανδημίας σε σύγκριση με το γονίδιο SARS-CoV-2 της Γιουχάν NC045512.2 (Fares et al., 2021).



Εικόνα 13 Φυλογενετικό δέντρο που συγκρίνει τα έξι Τυνησιακά SARS-CoV-2 με 268 προηγούμενες δημοσιευμένες αλληλουχίες (Fares et al., 2021)

Το φυλογενετικό δέντρο εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο γειτονικής ένωσης και το μοντέλο παραμέτρων kimura-2. Η τοπολογία υποστηριζόταν από 1000 αντίγραφα bootstrap. Για καλύτερη σαφήνεια του δέντρου, οι γενεαλογίες από την ίδια χώρα κατέρρευσαν και δεν υποδείχθηκαν τιμές bootstrap μικρότερες από 50 (a). Οι φυλογενετικές συστάδες συμπεριλαμβανομένων των αλληλουχιών γονιδιώματος του Τυνησίου SARS-CoV-2 αναφέρθηκαν λεπτομερώς στα (b έως g). Οι αλληλουχίες που αναφέρονται σε αυτή τη μελέτη εμφανίζονται με κόκκινο έντονους χαρακτήρες και υποδεικνύονται από τον αριθμό συμμετοχής, τον κωδικό εργαστηρίου, την περιοχή, τον κωδικό χώρας, την εβδομάδα και το έτος απομόνωσης. Οι ακολουθίες που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων GISAID και NCBI υποδεικνύονται από τον αριθμό εισόδου τους, ακολουθούμενο από τον κωδικό χώρας και το έτος απομόνωσης (Fares et al., 2021).

Κεφάλαιο 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Ο SARS-CoV-2 είναι ένας εξαιρετικά μολυσματικός και παθογόνος ιός που έχει στερήσει εκατομμύρια ζωές παγκοσμίως από την αρχή της πανδημίας τον Δεκέμβριο του 2019. Ο τρόπος εισβολής του στα κύτταρα-ξενιστών, η εξάπλωση του στον πληθυσμό καθώς και η μολυσματικότητα σε συνάρτηση με την θνησιμότητα του αποτελούν κομβικά σημεία διερεύνησης από τους επιστήμονες καθώς και για τους κρατικούς φορείς παγκοσμίως που καλούνται να επιτηρούν την εξέλιξη της πανδημίας COVID-19 για την καλύτερη υγειονομική προστασία των πολιτών.

Πιο συγκεκριμένα η παρακολούθηση των νέων μεταλλάξεων στον SARS-CoV-2 παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για τον εντοπισμό διαγνωστικών και θεραπευτικών στόχων και σημαντικές πληροφορίες για την επίτευξη μιας πιο αποτελεσματικής στρατηγικής ελέγχου του COVID-19. Στην παρούσα εργασία γίνεται εκτενής αναφορά στις μοριακές διαγνωστικές μεθόδους για τον έγκαιρο και ακριβή εντοπισμό των μεταλλάξεων του SARS-CoV-2.

Οι τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) του SARS-CoV-2. Το NGS μας παρέχει ακριβείς πληροφορίες για τη θέση μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του SARS-CoV-2 και αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την φυλογενετική ανάλυση και κατάταξη των νέων παραλλαγών του. Ενώ έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι NGS, ένας κύριος περιορισμός θεωρείται η πολυπλοκότητα της ροής εργασίας, περιορίζοντας την επεκτασιμότητα της μεθόδου. Αλλά και το υψηλό κόστος της τεχνικής αυτής και ο όγκος των μηχανημάτων δεν την καθιστά προσιτή μέθοδο για τα μικρά εργαστήρια διαγνωστικής ρουτίνας με λίγα δείγματα προς μελέτη. Επιπρόσθετα, απαιτείται η τεχνογνωσία του προσωπικού για την ολοκληρωμένη ανάλυση και ερμηνεία των μετέπειτα δεδομένων. Τέλος, ο όγκος των δεδομένων πρέπει να διαχειρίζεται επιδέξια για την εξαγωγή των κλινικά σημαντικών πληροφοριών.

Αντιθέτως, η διαγνωστική τεχνική της RT-PCR επιτρέπει και σε μικρότερα εργαστήρια τη στοχευόμενη διερεύνηση συγκεκριμένων μεταλλάξεων/παραλλαγών αφού μπορεί να στοχεύει μεμονωμένους πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίων με τη χρήση κατάλληλων ειδικών εκκινητών-ανιχνευτών για καθεμία τους ξεχωριστά. Το Κοινό Κέντρο Ερευνών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής παρακολουθεί την απόδοση των αναλύσεων RT-PCR και εμφανίζει τις

πληροφορίες στον πίνακα ελέγχου του JRC. Επομένως, οι εργαστηριακοί επιστήμονες μπορούν να ανατρέξουν στις σχετικές πληροφορίες που παρέχονται από το JRC για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας των πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται στο εκάστοτε εργαστήριο με τα αντίστοιχα του πίνακα ελέγχου του JRC.

Με αυτή τη μοριακή διαγνωστική μέθοδο όμως μπορούν να εντοπιστούν μόνο συγκεκριμένες μεταλλάξεις παραλλαγών και ελλοχεύει ο κίνδυνος μη ανίχνευσης κάποιας νέας μετάλλαξης. Ως εκ τούτου, κρίνεται απαραίτητο τα θετικά κλινικά δείγματα για τη νόσο COVID-19 να εξετάζονται περαιτέρω με γονιδιωματική ανάλυση που όπως αναφέρθηκε παραπάνω εντοπίζει με ακρίβεια τις θέσεις των μεταλλάξεων. Επομένως, για πλήρη και ακριβή εντοπισμό νέων μεταλλάξεων και παραλλαγών συνιστάται ο συνδυασμός των μεθόδων RT-PCR και έπειτα γονιδιωματική ανάλυση των θετικών σε SARS-CoV-2 δειγμάτων με τη μέθοδο της νέας γενιάς αλληλούχησης.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δε προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/ εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Harapan, H., Itoh, N., Yufika, A., Winardi, W., Keam, S., Te, H., Megawati, D., Hayati, Z., Wagner, A. L., & Mudatsir, M. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of Infection and Public Health*, 13(5), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>
2. Ludwig, S., & Zarbock, A. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2: A brief overview. *Anesthesia & Analgesia*, 131(1), 93–96. <https://doi.org/10.1213/ane.0000000000004845>
3. Canedo-Marroquín, G., Saavedra, F., Andrade, C. A., Berrios, R. V., Rodríguez-Guilarte, L., Opazo, M. C., Riedel, C. A., & Kalergis, A. M. (2020). SARS-CoV-2: Immune Response Elicited by Infection and Development of Vaccines and Treatments. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569760>
4. Kaur, S., & Gupta, V. (2020). COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus Research*, 288, 198114. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198114>
5. Williams, T. N., & Burgers, W. A. (2021). SARS-CoV-2 evolution and vaccines: cause for concern? *The Lancet Respiratory Medicine*, 9(4), 333–335. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(21\)00075-8](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(21)00075-8)
6. Yuen, K. S., Ye, Z. W., Fung, S. Y., Chan, C. P., & Jin, D. Y. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. *Cells and Bioscience*, 10, 40. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00404-4>
7. Yuen, K., Ye, Z., Fung, S., Cheung, P. H., Chan, C., & Jin, D. (2021). SARS-CoV-2 and COVID-19: revisiting the most important research questions. *Cell & Bioscience*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00730-1>
8. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020b). COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>

9. Wertheim, J. O., Chu D.K.W., Peiris J.S.M., Pond S.L.K., Poon (2013). L.L.M A Case for Ancient Origin of Coronaviruses. *Journal of Virology*, 87(12), 7039-7045. <https://doi.org/10.1128/jvi.03273-12>
10. Tang, G., Liu, Z., & Chen, D. (2022). Human coronaviruses: Origin, host and receptor. *Journal of Clinical Virology*, 155, 105246. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105246>
11. Zumla, A., Chan, J. F., Azhar, E. I., Hui, D. S., & Yuen, K. (2016). Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(5), 327–347. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.37>
12. Yang, P., & Wang, X. (2020). COVID-19: a new challenge for human beings. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(5), 555–557. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0407-x>
13. Zhou, P., Yang, X., Wang, X., Hu, B. Y., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C., Chen, H. S., Chen, J. M., Luo, Y., Guo, H., Di Jiang, R., Liu, M., Chen, Y., Shen, X., Wang, X., . . . Shi, Z. (2020). Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 588(7836), E6. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2951-z>
14. Rabi, F., Zoubi, M. S. A., Kasasbeh, G. A., Salameh, D. M., & Al-Nasser, A. D. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens*, 9(3), 231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
15. Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A., & Pöhlmann, S. (2013). Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Research*, 100(3), 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028>
16. Zhavoronkov, A. (2020b). Geroprotective and senoremediative strategies to reduce the comorbidity, infection rates, severity, and lethality in gerophilic and gerolavic infections. *Aging*, 12(8), 6492–6510. <https://doi.org/10.18632/aging.102988>
17. Shin, J. W., Jung, E., Kim, M., Baric, R. S., & Go, Y. Y. (2018). Saracatinib Inhibits Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus Replication In Vitro. *Viruses*, 10(6), 283. <https://doi.org/10.3390/v10060283>

18. Stertz, S., Reichelt, M., Spiegel, M., Kuri, T., Martinez-Sobrido, L., García-Sastre, A., Weber, F., & Kochs, G. (2007). The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology*, 361(2), 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.027>
19. Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in Virus Research* (pp. 193–292). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(06)66005-3)
20. Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V. Y. C., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. C. W. (2020b). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*, 14(4), 3822–3835. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>
21. Bchetnia, M., Girard, C., Duchaine, C., & Laprise, C. (2020). The outbreak of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A review of the current global status. *Journal of Infection and Public Health*, 13(11), 1601–1610. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.011>
22. Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
23. Rothan, H. A., & Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 109, 102433. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102433>
24. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>
25. Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *Journal of Gene Medicine*, 23(2). <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>
26. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
27. Galloway, S. E., Paul, P., MacCannell, D., Johansson, M. A., Brooks, J. T., MacNeil, A., Slayton, R. B., Tong, S., Silk, B. J., Armstrong, G. T., Biggerstaff, M., & Dugan, V. G. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January

- 12, 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(3), 95–99.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7003e2>
28. Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., Pearson, C. a. B., Russell, T. W., Tully, D. C., Washburne, A. D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K. L. M., Van Zandvoort, K., Silverman, J. D., Diaz-Ordaz, K., Keogh, R. H., Eggo, R. M., . . . Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 372(6538).
<https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
29. Wang, P., Casner, R. G., Nair, M. S., Wang, M., Yu, J. Z., Cerutti, G., Liu, L., Kwong, P. D., Huang, Y., Shapiro, L., & Ho, D. D. (2021). Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*.
<https://doi.org/10.1101/2021.03.01.433466>
30. Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Da Silva Candido, D., Mishra, S., Crispim, M. a. E., Sales, F. C. S., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R. J., Franco, L. a. M., Ramundo, M. S., De Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C. D., Manuli, E. R., . . . Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, 372(6544), 815–821.
<https://doi.org/10.1126/science.abh2644>
31. Poon, L. L., Krishnan, P., Ng, D. Y. M., Chang, L., Liu, G., Cheng, S., Hui, M. M. Y., Fan, M. C., Wan, J. H., Lau, L. W. M., Cowling, B. J., Peiris, J. S. M., & Poon, L. L. (2021). Probable Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Quarantine Hotel, Hong Kong, China, November 2021. *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 460–462.
<https://doi.org/10.3201/eid2802.212422>
32. Chen, J., Wang, R., Gilby, N. B., & Wei, G. (2022). Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(2), 412–422. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01451>
33. Cascella, M. (2023b, January 9). Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

34. Zhou, Z., Zhu, Y., & Chu, M. (2022). Role of COVID-19 vaccines in SARS-COV-2 variants. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.898192>
35. Mercado, N. B., Zahn, R., Wegmann, F., Loos, C., Chandrashekar, A., Yu, J., Liu, J., Peter, L., McMahan, K., Tostanoski, L. H., He, X., Martinez, D. R., Rutten, L., Bos, R., Van Manen, D., Vellinga, J., Custers, J., Langedijk, J. P. M., Kwaks, T., Barouch, D. H. (2020). Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 586(7830), 583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z>
36. Martínez-Baz, I., Trobajo-Sanmartín, C., Miqueleiz, A., Guevara, M., Fernández-Huerta, M., Burgui, C., Casado, I., Portillo, M. E., Navascués, A., Ezpeleta, C., & Castilla, J. (2021). Product-specific COVID-19 vaccine effectiveness against secondary infection in close contacts, Navarre, Spain, April to August 2021. *Eurosurveillance*, 26(39). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2021.26.39.2100894>
37. Karim, S. S. A., & De Oliveira, T. (2021). New SARS-COV-2 variants — clinical, public health, and vaccine implications. *The New England Journal of Medicine*, 384(19), 1866–1868. <https://doi.org/10.1056/nejmc2100362>
38. Ranzani, O. T., Leite, R. D. S., Castilho, L. D., Gonçalves, C. C. M., De Resende, G. M., De Melo, R. L., & Croda, J. (2021). Vaccine effectiveness of Ad26.COV2.S against symptomatic COVID-19 and clinical outcomes in Brazil: a test-negative study design. *medRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2021.10.15.21265006>
39. Šmíd, M., Berec, L., Příbylová, L., Májek, O., Pavlík, T., Jarkovský, J., Weiner, J., Barusova, T., & Trnka, J. (2022). Protection by vaccines and previous infection against the Omicron variant of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(8), 1385–1390. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac161>
40. Gray, G., Collie, S., Garrett, N., Goga, A., Champion, J., Zylstra, M., Reddy, T., Yende, N., Seocharan, I., Takalani, A., Sanne, I., Mayat, F., Odhiambo, J., Bamford, L., Moultrie, H., Fairall, L., & Bekker, L. (2021). Vaccine effectiveness against hospital admission in South African health care workers who received a homologous booster of Ad26.COV2 during an

Omicron COVID19 wave: Preliminary Results of the Sisonke 2 Study. medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2021.12.28.21268436>

41. Bruxvoort, K., Sy, L. S., Qian, L., Ackerson, B., Luo, Y., Lee, G. S., Tian, Y., Florea, A., Aragonés, M., Tubert, J., Takhar, H., Ku, J., Paila, Y. D., Talarico, C., & Tseng, H. F. (2021). Effectiveness of mRNA-1273 against delta, mu, and other emerging variants of SARS-CoV-2: test negative case-control study. *BMJ*, e068848. <https://doi.org/10.1136/bmj-2021-068848>

42. Boloko, L., Lifson, A., Little, F., De Wet, T., Papavarnavas, N., Marais, G., Hsiao, N., Roslee, M., Doolabh, D., Iranzadeh, A., Williamson, C., Dlamini, S., Mendelson, M., Ntusi, N., Wilkinson, R. J., Hussey, H., Davies, M., Meintjes, G., & Wasserman, S. (2021). Severity and inpatient mortality of COVID-19 pneumonia from Beta variant infection: a clinical cohort study in Cape Town, South Africa. medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2021.11.04.21265916>

43. Skowronski, D. M., Febriani, Y., Ouakki, M., Setayeshgar, S., Adam, S. E., Zou, M., Talbot, D., Prystajecky, N., Tyson, J. R., Gilca, R., Brousseau, N., Deceuninck, G., Galanis, E., Fjell, C. D., Sbihi, H., Fortin, É., Barkati, S., Sauvageau, C., Naus, M., . . . De Serres, G. (2022). Two-Dose Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 vaccine effectiveness with mixed schedules and extended dosing intervals: Test-Negative design Studies from British Columbia and Quebec, Canada. *Clinical Infectious Diseases*, 75(11), 1980–1992. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac290>

44. Willett, B. J., Grove, J., MacLean, O. A., Wilkie, C., Logan, N., De Lorenzo, G., Furnon, W., Scott, S., Manali, M., Szemiel, A. M., Ashraf, S., Vink, E., Harvey, W. T., Davis, C., Orton, R., Hughes, J., Holland, P., Silva, S. V., Pascall, D., . . . Thomson, E. C. (2022). The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism. medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2022.01.03.21268111>

45. Barda, N., Dagan, N., Cohen, C. J., Hernán, M. A., Lipsitch, M., Kohane, I. S., Reis, B. Y., & Balicer, R. D. (2021). Effectiveness of a third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine for preventing severe outcomes in Israel: an observational study. *The Lancet*, 398(10316), 2093–2100. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02249-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02249-2)

46. Abu-Raddad, L. J., Chemaitelly, H., & Butt, A. A. (2021). Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *The New England Journal of Medicine*, 385(2), 187–189. <https://doi.org/10.1056/nejmc2104974>
47. Eyre, D. W., Taylor, D., Purver, M. B., Chapman, D., Fowler, T., Pouwels, K. B., Walker, A. S., & Peto, T. (2022). Effect of COVID-19 vaccination on transmission of Alpha and Delta variants. *The New England Journal of Medicine*, 386(8), 744–756. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2116597>
48. Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Zhang, X., Fontes-Garfias, C. R., Swanson, K. A., Cai, H., Sarkar, R., Chen, W., Cutler, M., Cooper, D. A., Weaver, S. C., Muik, A., Sahin, U., Jansen, K. U., Xie, X., Dormitzer, P. R., & Shi, P. Y. (2021). Neutralizing activity of BNT162b2-Elicited serum. *The New England Journal of Medicine*, 384(15), 1466–1468. <https://doi.org/10.1056/nejmc2102017>
49. Sheikh, A., Robertson, C., & Taylor, B. (2021). BNT162b2 and ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine Effectiveness against Death from the Delta Variant. *The New England Journal of Medicine*, 385(23), 2195–2197. <https://doi.org/10.1056/nejmc2113864>
50. Regev-Yochay, G., Gonen, T., Gilboa, M., Mandelboim, M., Indenbaum, V., Amit, S., Meltzer, L., Asraf, K., Cohen, C., Fluss, R., Biber, A., Nemet, I., Kliker, L., Joseph, G., Doolman, R., Mendelson, E., Freedman, L. S., Harats, D., Kreiss, Y., & Lustig, Y. (2022). 4th Dose COVID mRNA Vaccines' Immunogenicity & Efficacy Against Omicron VOC. medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2022.02.15.22270948>
51. Altarawneh, H. N., Chemaitelly, H., Ayoub, H. H., Tang, P., Hasan, M. R., Yassine, H. M., Al-Khatib, H. A., Smatti, M. K., Coyle, P., Al-Kanaani, Z., Kuwari, E. A., Jeremijenko, A., Kaleeckal, A. H., Latif, A. N., Shaik, R. M., Abdul-Rahim, H. F., Nasrallah, G. K., Al-Kuwari, M. G., Butt, A. A., . . . Abu-Raddad, L. J. (2022). Effect of prior infection, vaccination, and hybrid immunity against symptomatic BA.1 and BA.2 Omicron infections and severe COVID-19 in Qatar. medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2022.03.22.22272745>
52. Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., Li, C., Hu, Y., Cui, K., Han, W., Chen, Z., Tang, R., Yin, W., Chen, X., Hu, Y., Liu, X., Jiang, C., Li, J., Yang, M., Song, Y., Wang, X., Gao, Q., & Zhu, F.

(2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infectious Diseases*, 21(2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30843-4)

53. Ranzani, O. T., Hitchings, M. D. T., Dorion, M., D’Agostini, T. L., De Paula, R. C., De Paula, O. F. P., De Moura Villela, E. F., Torres, M. S., De Oliveira, S. B., Schulz, W., Almiron, M., Said, R. F. D. C., De Oliveira, R. D. I., Da Silva, P. V., De Araújo, W. N., Gorinchteyn, J. C., Andrews, J. R., Cummings, D. A., Ko, A. I., & Croda, J. (2021). Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study. *BMJ*, n2015. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2015>

54. Skowronski, D. M., Febriani, Y., Ouakki, M., Setayeshgar, S., Adam, S. E., Zou, M., Talbot, D., Prystajecky, N., Tyson, J. R., Gilca, R., Brousseau, N., Deceuninck, G., Galanis, E., Fjell, C. D., Sbihi, H., Fortin, É., Barkati, S., Sauvageau, C., Naus, M., . . . De Serres, G. (2022). Two-Dose Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 vaccine effectiveness with mixed schedules and extended dosing intervals: Test-Negative design Studies from British Columbia and Quebec, Canada. *Clinical Infectious Diseases*, 75(11), 1980–1992. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac290>

55. Van Doremalen, N., Lambe, T., Spencer, A. J., Belij-Rammerstorfer, S., Purushotham, J. N., Port, J. R., Avanzato, V. A., Bushmaker, T., Flaxman, A., Ulaszewska, M., Feldmann, F., Allen, E., Sharpe, H., Schulz, J., Holbrook, M. G., Okumura, A., Meade-White, K., Pérez-Pérez, L., Edwards, N. J., . . . Munster, V. J. (2020). ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*, 586(7830), 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y>

56. Emary, K. R. W., Golubchik, T., Aley, P. K., Ariani, C. V., Angus, B., Bibi, S., Blane, B., Bonsall, D., Cicconi, P., Charlton, S., Clutterbuck, E. A., Collins, A., Cox, T., Darton, T. C., Dold, C., Douglas, A. D., Duncan, C., Ewer, K., Flaxman, A., . . . Pollard, A. J. (2021). Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10282), 1351–1362. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00628-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00628-0)

57. Marra, A. R., Miraglia, J. L., Malheiros, D. T., Guozhang, Y., Teich, V., Da Silva Victor, E., Pinho, J. R. R., Cypriano, A. S., Vieira, L. W., Polonio, M., Ornelas, R. H., De Oliveira, S. M., Borges, F. A., Junior, Shibata, A. R. O., De Paula Pinto Schettino, G., De Oliveira, K. G., Santana, R. a. F., De Mello Malta, F., Amgarten, D., . . . Rizzo, L. V. (2022). Effectiveness of two coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccines (viral vector and inactivated viral vaccine) against severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) infection in a cohort of healthcare workers. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 44(1), 75–81. <https://doi.org/10.1017/ice.2022.50>
58. <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2020/03/covid-19-ergastiriaki-diagnosi.pdf>
59. Spiess, K., Gunalan, V., Marving, E., Nielsen, S. V., Jørgensen, M. G. P., Fomsgaard, A. S., Nielsen, L., Alfaro-Núñez, A., Karst, S. M., Mortensen, S., Rasmussen, M. A., Lassaunière, R., Rosenstjerne, M. W., Polacek, C., Fonager, J., Cohen, A., & Nielsen, C. (2023). Rapid and Flexible RT-qPCR Surveillance Platforms To Detect SARS-CoV-2 Mutations. *Microbiology Spectrum*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03591-22>
60. <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
61. Feng, W., Newbigging, A. M., Le, C., Li, J., Peng, H., Cao, Y., Wu, J., Abbas, G., Song, J. D., Wang, D., Cui, M., Tao, J., Tyrrell, D. L., Zhang, X., Zhang, H., & Le, X. C. (2020). Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. *Analytical Chemistry*, 92(15), 10196–10209. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02060>
62. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Li, H., . . . Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8)
63. Zhou, P., Yang, X., Wang, X., Hu, B. Y., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C., Chen, H. S., Chen, J. M., Luo, Y., Guo, H., Di Jiang, R., Liu, M., Chen, Y., Shen, X., Wang, X., . . . Shi, Z. (2020a). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus

of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

64. Vega-Magaña, N., Sánchez-Sánchez, R., Hernández-Bello, J., Venancio-Landeros, A., Peña-Rodríguez, M., Vega-Zepeda, R. A., Galindo-Ornelas, B., Díaz-Sánchez, M., García-Chagollán, M., Macedo-Ojeda, G., García-González, O., & Muñoz-Valle, J. F. (2021). RT-qPCR Assays for Rapid Detection of the N501Y, 69-70del, K417N, and E484K SARS-CoV-2 Mutations: A Screening Strategy to Identify Variants With Clinical Impact. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.672562>

65. Erster, O., Din, A. B., Asraf, H., Levy, V., Kabat, A., Mannasse, B., Azar, R. M., Shifman, O., Lazar, S., Mandelboim, M., Fleishon, S., Mendelson, E., & Zuckerman, N. S. (2021). SPECIFIC DETECTION OF SARS-COV-2 B.1.1.529 (OMICRON) VARIANT BY FOUR RT-qPCR DIFFERENTIAL ASSAYS. *medRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.21267293>

66. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Methods-for-the-detection-and-characterisation-of-SARS-CoV-2-variants-first-update.pdf>

67. Center for Devices and Radiological Health. (2023). SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests. *U.S. Food And Drug Administration*. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>

68. Korukluoglu, G., Kolukirik, M., Bayrakdar, F., Gg, O., Altaş, A. B., Cosgun, Y., & Cz, K. a. N. (2021). 40 minutes RT-qPCR Assay for Screening Spike N501Y and HV69-70del Mutations. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2021.01.26.428302>

69. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>

70. Phan, T. G., Boes, S. S., McCullough, M., Gribschaw, J., Marsh, J. W., Harrison, L. H., & Wells, A. (2022). First detection of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 variant in Western Pennsylvania, United States. *Journal of Medical Virology*, 94(9), 4053–4055. <https://doi.org/10.1002/jmv.27846>

71. Tegally, H., Moir, M., Everatt, J., Giovanetti, M., Scheepers, C., Wilkinson, E., Subramoney, K., Moyo, S., Amoako, D. G., Baxter, C., Althaus, C. L., Anyaneji, U. J., Kekana, D., Viana, R., Giandhari, J., Lessells, R. J., Maponga, T., Maruapula, D., Choga, W. T., . . . Tanser, F. (2022). Continued Emergence and Evolution of Omicron in South Africa: New BA.4 and BA.5 lineages. *medRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2022.05.01.22274406>
72. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Methods-for-the-detection-characterisation-and-genomic-surveillance-of-SARS-CoV-2-variants_2nd%20update_final.pdf
73. Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
74. Hess, J., Kohl, T., Kotrova, M., K, R., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S., & Paust, N. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnology Advances*, 41, 107537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>
75. John, G., Sahajpal, N. S., Mondal, A. K., Ananth, S., Williams, C. C., Chaubey, A., Rojiani, A. M., & Kolhe, R. (2021). Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 845–867. <https://doi.org/10.3390/cimb43020061>
76. Coutard, B., Valle, C., De Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, 176, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
77. Braun, E., & Sauter, D. (2019). Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clinical & Translational Immunology*, 8(8). <https://doi.org/10.1002/cti2.1073>
78. Anand, P., Puranik, A., Aravamudan, M., Venkatakrishnan, A., & Soundararajan, V. (2020). SARS-CoV-2 strategically mimics proteolytic activation of human ENaC. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/elife.58603>

79. Yin, C. (2020). Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. *Genomics*, 112(5), 3588–3596. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.016>
80. Fares, W., Chouikha, A., Ghedira, K., Gdoura, M., Rezig, D., Boubaker, S., Dhifallah, I. B., Touzi, H., Hammami, W., Meddeb, Z., Sadraoui, A., Hogga, N., Abouda, I., Kwasiborski, A., Hourdel, V., Mikaty, G., Caro, V., Manuguerra, J., Alaya, N. B., & Triki, H. (2021c). Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of six SARS-CoV-2 strains isolated during COVID-19 pandemic in Tunisia, North Africa. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07870-1>