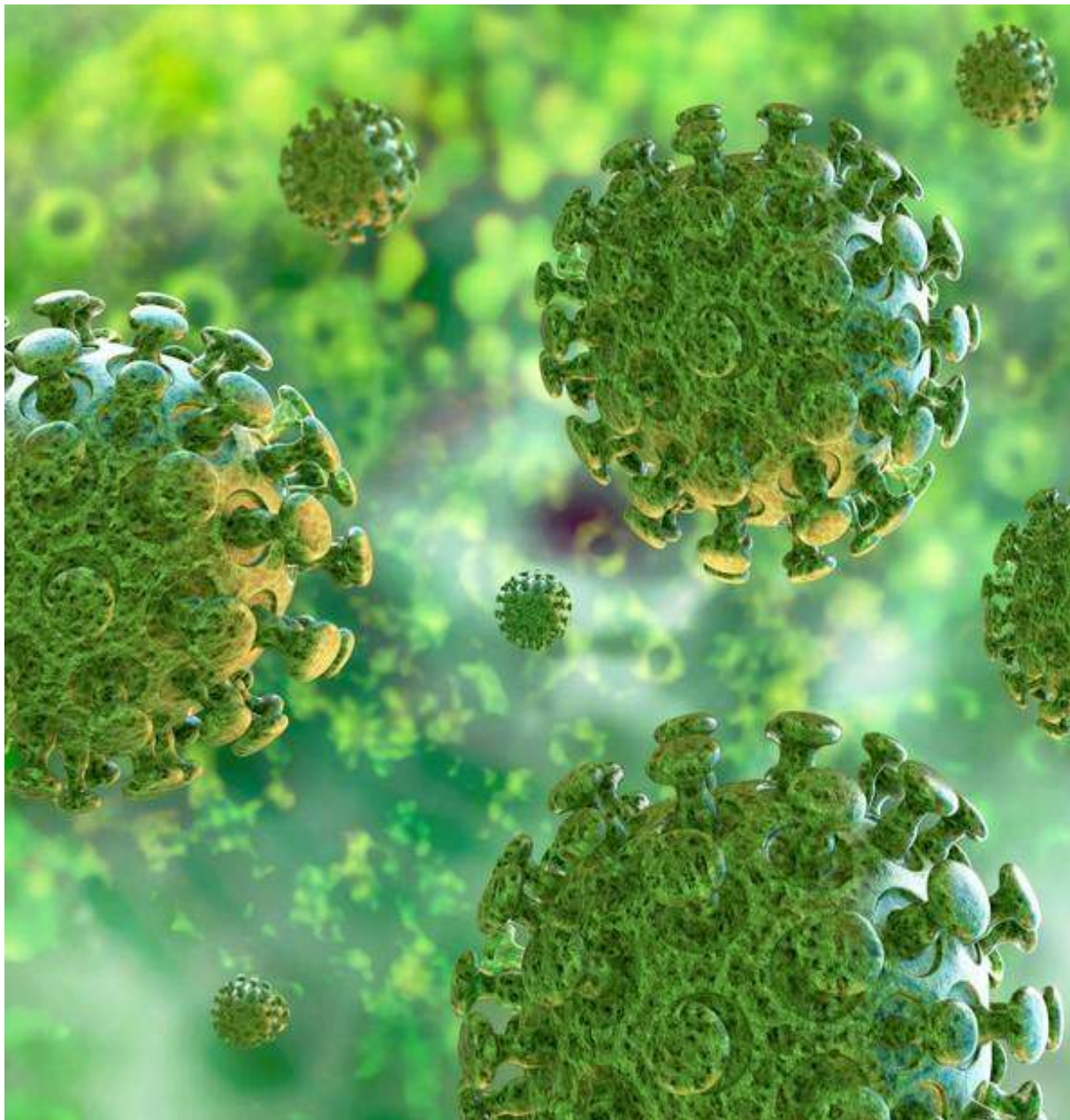


## معرفی و کاربرد تست های رایج آزمایشگاهی

### در ارزیابی و مدیریت بیماری کووید-۱۹

فروردین ۱۳۹۹



## انجمن علمی دکتراهای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

### هدف

همزمان با شیوع و گسترش بیماری کرونا در کشور و اعلام آن به عنوان یک پاندمی جهانی از طرف سازمان جهانی بهداشت، افراد و صاحب نظران بسیاری در داخل و خارج از کشور در مورد ابعاد مختلف بیماری و تشخیصی این بیماری، اظهار نظر نموده اند که با توجه به پراکندگی و حجم زیاد آن ها و همچنین وجود پاره ای از اطلاعات مخدوش و غیر معتبر، انجمن علمی دکتراهای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران در راستای تعهد اجتماعی خود و به منظور آشنایی و به روز نمودن اطلاعات مربوط به تشخیص آزمایشگاهی بیماری کرونا (کووید-۱۹) و استفاده آن در حوزه های مختلف بالینی و نظام مراقبت و مدیریت این بیماری، این راهنما را تدوین نموده است. امید است این راهنما مورد استفاده همه همکاران از جمله پزشکان درمان گر و همچنین سایر کارکنان نظام سلامت قرار گیرد

### مقدمه

در اواخر سال ۲۰۱۹، تعدادی پنومونی غیرقابل توضیح در شهر ووهان چین گزارش شد. دولت و محققان حوزه بهداشت در چین اقداماتی را برای کنترل این بیماری انجام دادند و تحقیقات گسترده ای را نیز را آغاز کردند و مشخص شد این ویروس به خانواده کرونا ویروس ها تعلق دارد ولی توالی ژنومی آن به هیچ یک از ویروس های قبلی این خانواده متعلق نیست و مشخص گردید که گونه ایی جدید از این خانواده ظاهر شده است. در اواسط ژانویه ۲۰۲۰ سازمان جهانی بهداشت این ویروس جدید را بیماری کرونا ویروس - 2019 (COVID-19) نامگذاری کرد. به نظر می رسد این ویروس برای اولین بار به صورت انتقال از حیوان به انسان باعث ایجاد بیماری در انسان شده است ولی پس از مدتی مشخص شد که این ویروس توان بسیار بالایی در انتقال انسان به انسان را دارد.

### ویروس کرونای جدید SARS-CoV-2

ویروس جدید که سبب ایجاد پاندمی COVID-19 شده است، یک سوش جدید از کرونا ویروس های خفاشی است به این معنا که مخزن اصلی ویروس در طبیعت خفاش است.

دو سوش مشهور دیگر کرونا ویروس ها هم که در هزاره جدید ایجاد پاندمی نموده اند یعنی ویروس SARS و ویروس MERS هم مخزن اصلی شان در طبیعت خفاش بود.

اپیدمی SARS یا Severe Acute Respiratory Syndrome در سال ۲۰۰۲ از چین شروع شد و به وسیله شرکت های خطوط هوایی به ۵ کشور دیگر گسترش پیدا کرد. مجموعاً حدود ۸۰۰۰ نفر را مبتلا کرد که ۷۴ نفر از آنان فوت کردند. در مورد SARS ویروس از خفاش به میزبان واسط که سگ های راکون بودند منتقل شده و انسان این ویروس را از این حیوان گرفته است.

اما اپیدمی MERS یا Middle-East Respiratory Syndrome نخستین بار از شبه جزیره عربستان شروع شد و به تدریج به ۲۷ کشور دیگر انتقال پیدا نمود. در مورد MERS هم مخزن اصلی خفاش بود و آنجا هم میزبان واسطی وجود داشت که همان شتر بود.

اما در مورد پاندمی COVID-19، نخستین موارد ابتلا در منطقه ووهان چین و در بین افرادی مشاهده شد که در بازار فروش حیوانات دریایی کار می کردند و یا از غذاهای دریایی این مراکز تغذیه نموده بودند.

لذا در ابتدا عنوان شد که بیماری از حیوان به انسان منتقل می شود. (zoonotic transmission)

ولی به سرعت بیماران دیگری شناسایی شدند که هیچ ترددی در این بازارها نداشتند و از غذای دریایی هم استفاده نکرده بودند، بنابراین معلوم شد که بیماری از انسان به انسان منتقل شده است.

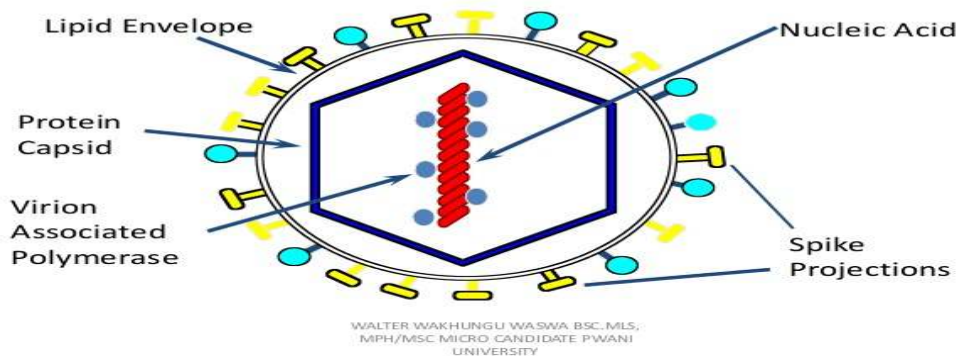
## ویروس شناسی

ویروس جدید که از سوی سازمان جهانی بهداشت تحت عنوان SARS-CoV-2 نامگذاری شده است متعلق به خانواده coronaviridae است. این گروه از ویروس ها بر اساس خصوصیات ژنتیکی و ساختار ژنوم ویروس به ۴ جنس اصلی تقسیم می شوند:

- Alphacoronaviruses
- Betacoronaviruses
- Gammacoronaviruses
- Deltacoronaviruses

خانواده کرونا ویروس ها شامل ویروس های RNA دار تک رشته ای بوده و دارای envelope می باشند در تصویر زیر شکل شماتیک ویروس های دارای envelope نشان داده شده است:

## Virion Structure



همان گونه که در شکل فوق مشخص است، اسید نوکلئیک ویروس توسط یک پوشش به نام capsid احاطه شده است و مجموع کپسید و RNA مجدداً از بیرون توسط غشایی لیپیدی به نام envelope

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

محاصره شده است. در قسمت خارجی envelope هم زواید میخی شکل از جنس پروتئین وجود دارد که به آن ها پروتئین یا آنتی ژن های spike گفته می شود.

درک و فهم این ساختمان برای بررسی آنتی ژن های ویروس کرونای جدید لازم و ضروری است.

اما طیف وسیعی از حیوانات می توانند به عنوان میزبان ویروس های کرونا ویروس ها عمل کنند. عموماً جنس های آلفا کرونا ویروس و بتا کرونا ویروس می توانند پستانداران را آلوده کنند و جنس های گاما و دلتا کرونا ویروس ها غالباً پرنده ها را آلوده می کنند هر چند گاهی هم پستانداران را درگیر می کنند.

### آنتی ژن های ویروس SARS-CoV-2

ژنوم کرونا ویروس ها کدینگ و سنتز ۴ گروه از پروتئین های ساختمانی ویروس را به عهده دارد. ژنوم انواع کرونا ویروس ها خصوصاً ویروس هایی که سبب ایجاد پاندمی های قرن بیست و یکم شده اند (SARS، MERS و SARS-CoV-2) شباهت زیادی با یکدیگر داشته و آنالیز ژنوم آن ها نشان داده که تفاوت های ناچیزی با یکدیگر دارند.

#### این پروتئین ها عبارتند از:

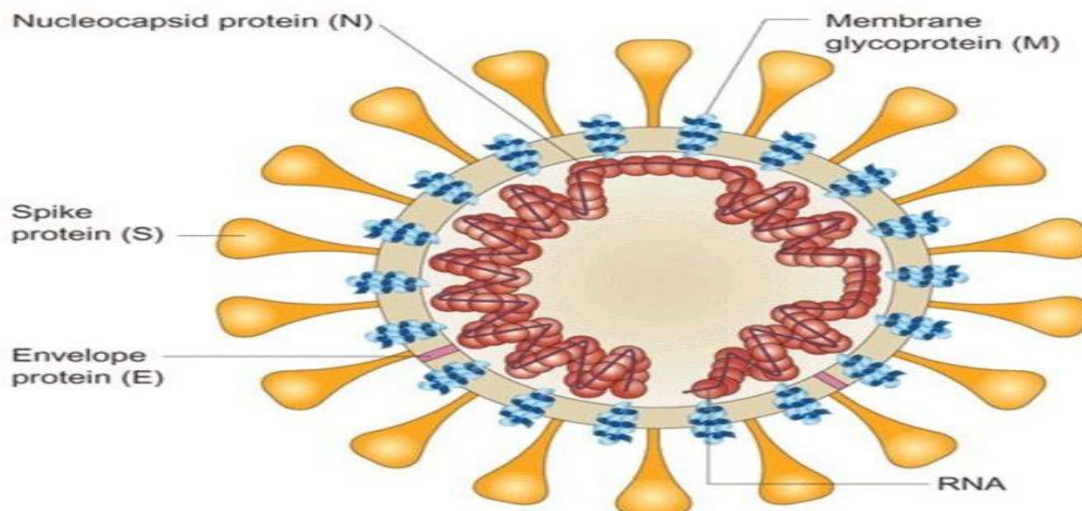
▶ پروتئین Spike یا آنتی ژن S

▶ پروتئین نوکلئوکپسید یا آنتی ژن N

▶ پروتئین غشایی یا Membrane protein یا آنتی ژن M

▶ پروتئین Envelope یا آنتی ژن E

در شکل زیر تصویر پروتئین های ویروس به صورت شماتیک به تصویر درآمده اند.



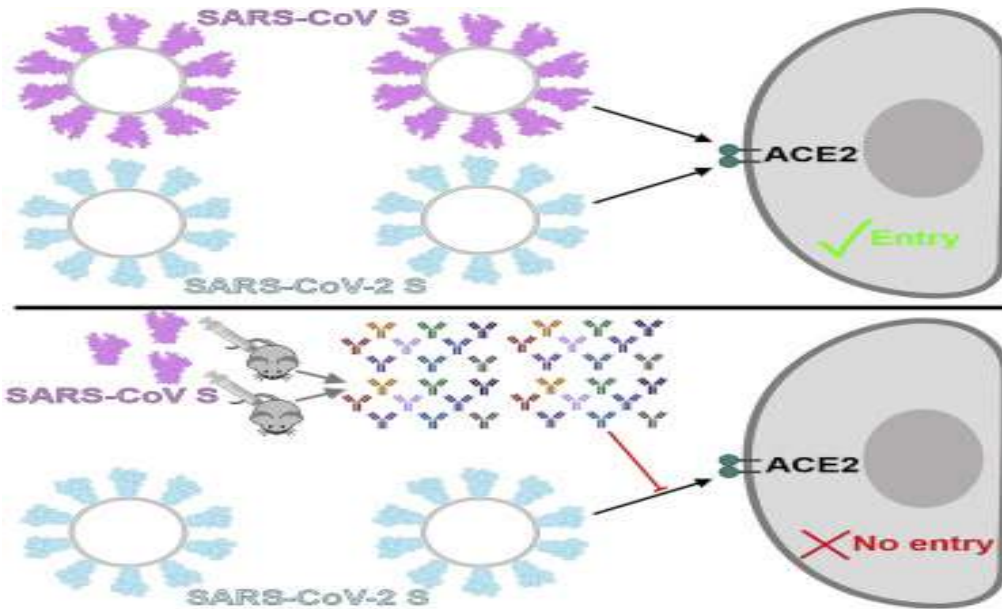
## پروتئین Spike یا آنتی ژن S

این آنتی ژن ها به صورت زواید میخی شکل بر روی قسمت خارجی envelope قرار گرفته اند. پروتئین Spike خودش دارای ۲ زیر واحد مجزا به نام های S1 و S2 است.

پروتئین S1 مسئول شناسایی رسپتورهای سطح سلول میزبان است. در واقع S1 دارای حوزه اتصال به رسپتور است که به آن Receptor binding domain یا RBD می گویند. تحقیقات نشان داده که آنتی ژن S1 به رسپتورهای ACE2 در سطح سلول های اپی تلیال مجاری تنفسی می چسبد.

سپس نوبت عملکرد آنتی ژن S2 می شود. آنتی ژن S2 شامل المنت های اساسی مورد نیاز جهت مرحله فیوژن یا دخول به سلول میزبان می باشد.

**\*\*** آنتی ژن Spike در ساخت واکسن نقش اساسی دارند در واقع آنتی بادی های ضد این آنتی ژن می توانند نقش محافظت کننده در ابتلاء به بیماری را داشته باشند (تصویر زیر)



پروتئین S ویروس جدید زنجیره ای متشکل از ۱۲۵۵ اسید آمینه است که حدوداً ۲۰ الی ۲۷ درصد با آنتی ژن S سایر کرونا ویروس ها مشابهت دارد.

## پروتئین غشایی (Membrane protein) یا آنتی ژن M

این پروتئین دارای ۳ تا domain است که در بین غشاء قرار می گیرد و واقع به ویروس شکل می دهد و انحناى غشایی را تقویت می کند و به نوکلئوکپسید اتصال می یابد (به شکل ویروس توجه نمایید).

**پروتئین E:** در مونتاژ (assembly) و رهاسازی (release) ویروس نقش داشته همچنین در پاتوژنز ویروس هم نقش مهمی دارد.

**پروتئین N:** این پروتئین حاوی دو domain است و در تکثیر ویروس اهمیت دارد. در واقع این پروتئین در سنتز RNA نقش اساسی دارد. همچنین مشخص شده که پروتئین N یک آنتاگونیست اینترفرون می باشد.

در حال حاضر آنتی ژن های نو ترکیب S و N برای تولید آنتی بادی های مختلف و استفاده در روش های ایمونواسی کاربرد دارند.

### سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در روند مقابله با ویروس

در ابتدا سیستم ایمنی ذاتی وارد عمل شده و از طریق ریسپتورهای خود مثل (TLR) Toll-like receptor ها قادر به شناسایی ویروس کرونا می باشد. به دنبال این شناسایی و فعال شدن فاکتورهای رونویسی از جمله NFkB و IRF، بیان سایتوکاین های التهابی و اینترفرون های ضد ویروسی صورت گرفته و دفاع علیه ویروس آغاز می شود. البته ذکر این نکته ضروری است که ویروس راهکارهایی را جهت مقابله به کار می گیرد که از جمله آن اختلال در مسیر سیگنال های مربوط به تولید اینترفرون ها است.

اما سیستم ایمنی اختصاصی از طریق ایمنی سلولی و همورال جهت مقابله فعالیت می کند سلوهای T سایتوتوکسیک که نقش مهمی در دفاع ضد ویروسی داشته و سلول های T یاریگر که تحریک تولید آنتی بادی را هدایت می کنند.

پاسخ آنتی بادی در بدن شامل مجموعه دینامیک و پیچیده ای از آنتی بادی های مونوکلونال می باشد که آنتی ژن های مختلف سطح ویروس را هدف قرار می دهند. از جمله مهم ترین این آنتی ژن ها، آنتی ژن نوع N یا همان نوکلئوکپسید است که در سال ۲۰۱۳ یک نمونه از این آنتی ژن با عنوان SARSr-CoV Rp3 NP (SARS related-CoV Rp3 NP) در حین مطالعه بر روی ویروس عامل سارس به دست آمد. این آنتی ژن یک پروتئین مشترک بین ویروس های کروناست که ۹۰ درصد دارای تشابه ساختاری در بین اعضای این خانواده است. به طور کلی سیستم ایمن ذاتی با کمک سلول های پردازشگر و بیگانه خوار نظیر ماکروفاژ، ویروس را به دام انداخته و آن را به لنفوسیت های اختصاصی موجود در محل ایمنولوژیک مانند غدد لنفاوی عرضه می نماید. به این ترتیب لنفوسیت های B ابتدا تولید آنتی بادی از جنس IgM را آغاز کرده و به مدت محدود این روند ادامه می یابد. تولید IgM علیه این آنتی ژن از حدود روزهای پنجم الی ششم بیماری آغاز می شود و می تواند تا حدودی جهت تشخیص مؤثر واقع گردد. با گذشت زمان و دریافت سیگنال ها جهت تعویض کلاس تولید آنتی بادی، سیستم ایمنی کلاس سوئیچینگ انجام داده و تولید IgG می نماید که به دلیل ایجاد خاطره ایمنی،



## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

میزان تولید این آنتی بادی بیشتر بوده و با توجه به نیمه عمر آن مدت زمان بیشتری، حتی بعد از برطرف شدن بیماری، در سرم قابل سنجش است. به این ترتیب، وجود این آنتی بادی در فردی که علائم بالینی را بروز نمی‌دهد اغلب دلالت بر عفونت پیشین دارد. در چند مطالعه که به بررسی سطوح سرمی آنتی بادی های IgM و IgG در بیماران مبتلا به COVID-19 پرداخته بودند نشان داده شده است که به صورت کلی ۱۰ روز بعد از بروز علائم میزان IgM و IgG در بیش از ۸۰ درصد بیماران مثبت می‌شود. در یک مطالعه بر بروی ۲۳۸ بیمار مبتلا به COVID-19 نشان داده شده است که بعد از روز دهم از بروز علائم بررسی سطوح سرمی میزان IgM و IgG به تدریج در سرم بیماران قابل شناسایی است.

### مصونیت:

جزء اصلی پاسخ ایمنی هومورال نسبت به عفونت‌های ویروسی تولید آنتی بادی های اختصاصی خنثی کننده است، که نقش مهمی در محدود کردن و کنترل بیماری ایفا می‌کنند. آنتی بادی های ضد ویروس SARS-COV-2 در تشخیص و بررسی های اپیدمیولوژیک می‌توانند مفید واقع گردند. مشابه سایر بیماری های شایع ویروسی پاسخ فاز حاد شامل تولید آنتی بادی های IgM و IgG است.

این امکان وجود دارد که مصونیت در مقابل بیماری کووید-۱۹ ایجاد شود. وجود آنتی بادی های ضد ویروس SARS-COV-2 می‌تواند محافظت کننده باشد اما در این خصوص به اطلاعات بیشتری نیازمندیم.

با این حال مشخص نیست که وجود آنتی بادی در این بیماران واقعا چه نقشی دارد. برخی از ویروس ها مانند واریسلا زوستر (آبله مرغان) موجب ایمنی دائمی می‌شوند از طرف دیگر عفونت طبیعی با کلستریدیوم تنانی (کزاز) مصونیت موقتی ایجاد می‌کند و حتی کسانی که واکسن زده اند به دوز های تقویتی نیاز دارند. در انتهای این طیف افراد آلوده ویروس HIV قرار دارد که مقادیر زیادی آنتی بادی تولید می‌کند که تاثیری در پاکسازی ویروس از بدن ندارد.

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

مصونیت در مقابل کورونا ویروس های فصلی مانند سرماخوردگی چند هفته پس از عفونت اولیه کاهش یافته و در عرض یک سال افراد برابر عفونت مجدد آسیب پذیر هستند. مطالعات در مورد بیماری SARS که اشتراک آنتی ژنیک با SARS-COV-2 دارد نشان داد که قله تولید آنتی بادی چهار ماه پس از عفونت اولیه بوده و تقریباً این آنتی بادی ها در طی ۲ تا ۴ سال محافظت کننده بوده اند. آنتی بادی های خنثی کننده به بخشی از ویروس که برای اتصال و ورود به سلول های میزبان لازم است متصل شده و موجب جلوگیری از عفونت می گردند. تحقیقات در مورد چگونگی مصونیت واقعی نسبت به این ویروس در مراحل اولیه بوده و ابهامات آن همچنان باقی است. همچنین در یک مطالعه مشخص شد که هیچ ارتباطی بین بار ویروسی و آنتی بادی های تولید شده وجود ندارد اما تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد. آزمایش آنتی بادی می تواند کلید بازگشت به زندگی و اقتصاد در جهان باشد.

### معیارهای تشخیصی بیماری COVID-19

به طور کلی معیارهای تشخیصی بیماری COVID-19 به سه دسته تقسیم بندی می گردند:

▶ علائم بالینی

▶ یافته های رادیولوژیک

▶ تست های آزمایشگاهی

علائم بالینی در COVID-19 غیر اختصاصی هستند به طوری که به راحتی قابل افتراق از سایر علل اتیولوژیک پنومونی های شدید اکتسابی نمی باشند. بنابراین نقش و اهمیت یافته های رادیولوژیک و تست های تشخیصی آزمایشگاهی در ارزیابی و مدیریت بیماری COVID-19 بسیار مهم و حیاتی می باشد.

### تست های تشخیصی آزمایشگاهی ویروس SARS-COV-2

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

پس از شیوع بیماری COVID-19 تاکنون انواع مختلفی از تست های آزمایشگاهی برای شناسایی ویروس SARS-COV-2 عرضه شده اند که عمدتاً در دو گروه تشخیص مولکولی بر پایه PCR و تست های سرولوژیک طبقه بندی می شوند. تست مولکولی بر پایه PCR عمده ترین روش تشخیص آزمایشگاهی SARS-COV-2 می باشد. با توجه به اینکه استاندارد فرانس برای تشخیص COVID-19 هنوز وجود ندارد، حساسیت و ویژگی تست های تشخیصی نامشخص است. علاوه بر آن تکنیک جمع آوری و نوع نمونه بیولوژیک نیز می تواند از حساسیت تست بکاهد.

### کاربرد RT-PCR در بیماری COVID-19

هر فردی نیاز به تست آزمایشگاهی برای تشخیص بیماری COVID-19 ندارد. برای تصمیم گیری درباره این که چه کسانی نیاز به تست دارند به توصیه CDC باید به نکات زیر توجه نمود:

(۱) بیشتر افراد مبتلا به شکل خفیف بیماری بدون تست آزمایشگاهی می توانند در خانه استراحت نموده و بهبود یابند.

(۲) درمان قطعی و اختصاصی و تایید شده ای تا کنون برای این ویروس ارائه نشده است.

(۳) نتایج تست های آزمایشگاهی می تواند برای تصمیم سازی در مدیریت بیماری در افراد جامعه سودمند باشد.

تست RT-PCR برای شناسایی SARS-COV-2-RNA در نمونه های تنفسی بیماران کاربرد دارد. یک تست مثبت RT-PCR برای ویروس SARS-COV-2 تأیید کننده تشخیص بیماری COVID-19 می باشد. اگر چه نتایج مثبت کاذب نیز وجود دارد که عمدتاً ناشی از آلودگی محیط و نمونه ها هنگام انجام آزمایش است. نتایج منفی کاذب از نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی نیز گزارش شده است. چنانچه در فردی تست اولیه RT-PCR منفی شد اما همچنان به بیماری COVID-19 مشکوک هستید، برای اثبات عفونت و مدیریت یا کنترل عفونت باید آزمایش تکرار شود. همچنین در این موارد WHO پیشنهاد می کند در صورت امکان نمونه مجدد از دستگاه تنفسی تحتانی تهیه گردد و

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

تا آماده شدن نتیجه تست، بیمار مشکوک را مبتلا در نظر گرفت و احتیاط های لازم را درباره آن مبذول داشت. صحت و ارزش پیش گویی کننده [predictive value] تست RT-PCR برای شناسایی SRAS-COV-2-RNA هنوز به طور سیستماتیک مورد ارزیابی قرار نگرفته است و حساسیت آزمایش احتمالاً وابسته به دقت تست و همچنین نوع نمونه بیولوژیک می باشد.

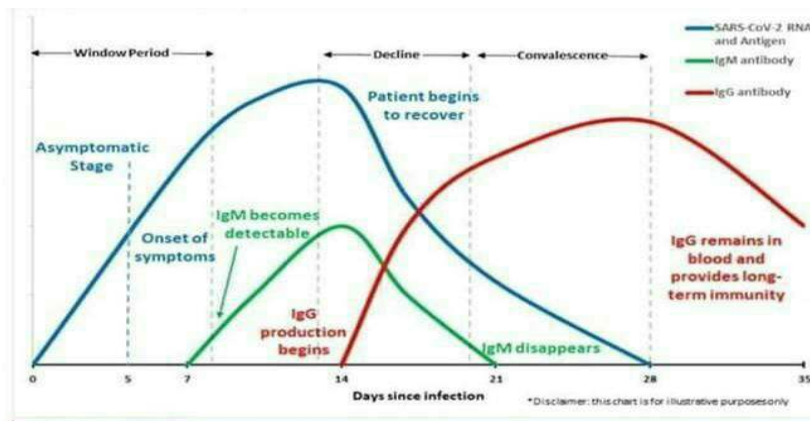
### تفسیر:

میزان بار ویروسی (Viral Load) در نمونه های تنفسی مختلف، متفاوت است و همین موضوع می تواند در نتایج تست های RT-PCR بیماران تأثیر بگذارد. نمونه های جمع آوری شده از دستگاه تنفسی تحتانی مانند نمونه BAL دارای بار ویروسی بالاتری است که سبب نتایج مثبت بیشتری نسبت به نمونه های دستگاه تنفسی فوقانی می گردد. در مطالعات متعدد نشان داده شده است بالاترین میزان نتایج مثبت RNA ویروسی به روش RT-PCR به ترتیب در نمونه های زیر بوده است: نمونه BAL (۹۵٪)، خلط (۷۲٪)، سوآب اروفارنژیال (۳۲٪). همچنین مقادیر RNA ویروسی در نمونه های نازال بیشتر از اورال شناسایی شده است. به توصیه CDC برای تست شناسایی SARS-COV-2 بهتر است در بیشتر بیماران سوآب های نازوفارنژیال اخذ شود. سوآب اروفارنژیال هم می شود تهیه کرد ولی در اولویت قرار ندارد ولی چنانچه سوآب اروفارنژیال از بیمار اخذ گردد بهتر است در همان ویال نازوفارنژیال قرار داده و به آزمایشگاه منتقل شود. به طور کلی به هر علتی امکان اخذ سوآب های نازوفارنژیال از بیمار نبود می توانید از سوآب های دیگر به عنوان آلترناتیو استفاده نمود مانند سوآب نازال، اروفارنژیال یا nasal mid-turbinate نمونه خلط باید از بیماران با سرفه پروداکتیو گرفته شود. نمونه BAL هم کلاً در بیماران اینتوبه توصیه می گردد. بعضی مواقع ممکن است در بیماران با یافته های Chest CT منطبق با COVID-19 ولی نتیجه RT-PCR منفی برای SARS-COV-2؛ در نمونه گیری های بعدی نتیجه تست RT-PCR مثبت به دست آید. بر همین مبنا پیشنهاد می شود که بیماران خاصی (مثلاً با یافته ها رادیولوژیک مشخص و سازگار) ممکن است نیاز به جمع آوری نمونه های متعدد از قسمت های مختلف دستگاه تنفسی باشند. بنابراین باید تأکید کنیم بسته به

تظاهرات بالینی بیماری؛ یک نتیجه منفی RT-PCR به ویژه با وجود سایر شواهد، نمی تواند بیماری COVID-19 را رد کند.

### جایگاه آزمایش های سرولوژیک در مدیریت بیماری کووید-۱۹:

با شیوع هرچه بیشتر بیماری یک آزمایش راحت و سریع برای غربالگری گسترده تعداد زیادی از بیماران با علائم خفیف و ناقلین بدون علامت برای قرنطینه سریع و درمان به موقع بیماران مورد نیاز است. مطالعات نشان دادند استفاده ترکیبی از تست های متکی بر RNA ویروسی و آزمایش های سرولوژیک موجب افزایش حساسیت تشخیصی شده و از ویژگی بالایی نیز در شناسایی بیماران برخوردار است. در حال حاضر تشخیص بر اساس وجود ویروسی با کمک تکنیک بسیار است. با این حال موارد مثبت گزارش شده در بیماران کووید-۱۹ زیاد نیست.



### پروفایل پاسخ ایمنی هومورال در بیماران کووید-۱۹

گزارش شده که برخی از بیماران مبتلا که دارای یافته های رادیولوژیک مرتبط بودند دارای RT-PCR منفی هستند. علاوه بر این، بیمارانی که دارای عفونت بدون علامت هستند و همچنین کسانی که در دوره نهفته بیماری قرار دارند یک تهدید بالقوه برای پیشگیری و کنترل بیماری هستند. در حال حاضر به دلیل نبود دارو های اختصاصی درمان کننده و واکسن در خصوص بیماری کووید-۱۹

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

لازم است که بیماری را در مراحل اولیه خود تشخیص داده و بیماران را بلافاصله از جمعیت سالم جدا نمود.

میزان مثبت شدن آنتی بادی به طور معمول بعد از علائم اولیه بیماری و به طور کلی ۱۰ روز است و ۸۰ درصد بیماران آنتی بادی را ده روز بعد از شروع علائم بالینی در سرم خود خواهند داشت.

چندین پژوهش جهت نشان دادن آنتی بادی های ضد ویروس در سراسر جهان انجام شده و خوشبختانه همکاران آزمایشگاهی ما در شرکت های دانش بنیان ایرانی نیز به این امر مهم دست یافتند. اکنون آزمایش های سرولوژیک با استفاده از آنتی ژن نوکلئوکپسید ویروسی جهت شناسایی آنتی بادی های IgG&IgM در دسترس قرار دارد.

آزمایش های متکی بر وجود آنتی بادی در سرم بیماران مبتلا به بیماری کووید-۱۹ در تعیین این که کسی قبلا در معرض ویروس قرار گرفته است یا خیر می تواند کمک کننده باشد. این آزمایش های موجب می شوند که بینش ما در مورد چگونگی شیوع و گسترش بیماری و حتی مرگبار بودن آن افزایش یابد.

مطالعات نشان داده اند که اندازه گیری آنتی بادی جهت ردیابی تماس افراد بدون علامت RT-PCR منفی ارزشمند می باشد. ویروس عامل بیماری کووید-۱۹ تنوعی از علائم بالینی را نشان می دهد. در حالی که برخی بدون علامت هستند برخی دارای علائم خفیف بوده و عده معدودی ممکن است دچار ذات الریه شده و نارسایی تنفسی را تجربه کنند. به همین دلیل تشخیص کووید-۱۹ بر اساس علائم بالینی درست نبوده و بایستی به استفاده از تست های تشخیصی توجه بیشتری نمود.

نوع آنتی بادی و سطح نسبی آن نیز می تواند برای نشان دادن مرحله عفونت و تخمین زمان تماس و ردیابی تماس افراد مورد استفاده قرار گیرد. ایمونوگلوبولین M به طور متوسط در روزهای ۵ تا ۷ بیماری و در طی فاز حاد بیماری در خون بیماران (به جز مبتلایان به نقص ایمنی ذاتی و اکتسابی و

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

مصرف داروهای سرکوبگر ایمنی و ... ظاهر می شود و کاربرد آن در تشخیص بیمارانی است که RT-PCR منفی دارند.

بنا به مطالب گفته شده دسترسی وسیع به آزمایش های سرولوژی با حساسیت و ویژگی مناسب که بتواند تعداد زیادی از بیماران با علایم خفیف و ناقلین بدون علامت را برای قرنطینه سریع و درمان به موقع شناسایی کند ضروری است.

### کاربرد آزمایش های سرولوژیک در اپیدمی کرونا ویروس را می توان به شرح زیر خلاصه نمود:

#### الف) غربالگری و مدیریت بیماران با تماس های نزدیک

۱- جهت شناسایی بیماران مشکوک و همین طور بیمارانی که از نظر بالینی مبتلا بوده ولی آزمایش RT-PCR منفی دارند.

۲- از آزمایش های سرولوژیک می توان برای اندازه گیری آنتی بادی در پلاسمای بیماران بهبود یافته با تیترا بالا جهت درمان بیماران مبتلا به بیماری شدید به کووید-۱۹ استفاده نمود.

#### ب) غربالگری جمعیت های خاص

ترکیبی از آزمایش RT-PCR و اندازه گیری سطح آنتی بادی، جهت غربالگری مسافرانی که از سایر کشورها و یا مناطق با شیوع بالا به کشور سفر می کنند، شرکت کنندگان در کنفرانس ها و یا رویداد های مهم کشوری و همچنین جمعیت هایی که می خواهند بعد از قرنطینه به مدرسه یا سرکار بازگردند، می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

### ج) تحقیقات اپیدمیولوژیک

۱- با تلفیق آزمایش های سرولوژی و RT-PCR و علائم بالینی می توان طیف کامل عفونت کووید-۱۹، توزیع عفونت، عفونت های آتیپیک، عفونت با علائم خفیف، عفونت های شدید را مشخص و سهم هر نوع از این عفونت ها را در انتقال ویروس تجزیه و تحلیل نمود.

۲- با استفاده از آزمایش های سرولوژیک می توان شیوع بیماری در مناطق مختلف جغرافیایی، در سنین مختلف، در مشاغل مختلف و در افراد مبتلا به بیماری های زمینه ای را بررسی نموده و مداخلات کنترلی لازم را پیشنهاد نمود.

۳- با جمع آوری نمونه از بیماران مشکوک و تایید شده جهت انجام آزمایش های PCR و سرولوژیک و سایر آزمایش های بالینی و تجزیه و تحلیل دینامیک آن ها می توان به بهبود روش های تشخیص بیماری کووید - ۱۹ و استراتژی درمان کمک نمود.

۴- تجزیه و تحلیل آنتی بادی و طیف اپی توپ های آنتی بادی در بیماران بهبود یافته برای طراحی و ارزیابی واکسن و آنتی بادی درمانی در آینده.

۵- از آنجا که بیماری کووید-۱۹ یک بیماری نو ظهور بوده و تنها چند ماه است که از شیوع آن می گذرد، میزان آنتی بادی در جمعیت کشور پایین است، به واسطه آن می توان تخمینی از میزان شیوع بیماری به دست آورد.

### مزایا و معایب روش های تشخیص آزمایشگاهی کووید-۱۹

#### ۱- RT-PCR

الف) تشخیص SARS-CoV-2 از سواب های حلقی نیاز به نمونه هایی با کیفیت بالا دارد.

ب) بار ویروسی SARS-CoV-2 در دستگاه تنفسی افراد مختلف با هم متفاوت بوده همچنین در نقاط مختلف دستگاه تنفسی یک فرد نیز بار ویروسی یکسان نیست.



## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

پ) انجام PCR بر روی نمونه های COVID-19 نیاز به آزمایشگاه های تخصصی با کنترل ایمنی زیستی بالا و کارشناسان بسیار مجرب داشته و معمولاً فقط در مراکز خاصی انجام می شود. در حالی که این ظرفیت به طور معمول کافی است، اما با همه گیری COVID-19 این امکانات کافی نیست.

ت) از آنجا که آزمایشگاه ها و بیمارستان ها با افزایش تعداد زیادی بیمار مبتلا روبرو می شوند، تأخیر در انجام آزمایش ها و عدم کیفیت نمونه های ارسالی دور از انتظار نیست.

ث) در بسیاری از سیستم های مراقبت های بهداشتی تنها تعداد محدودی آزمایشگاه و کارشناس مجرب در مناطق مختلف جغرافیایی وجود دارد و توزیع امکانات روش PCR در کلیه کشورها و حتی در داخل یک کشور یکنواخت نیست.

ج) این روش RNA ویروسی را شناسایی می کند و نه ویروس زنده را

### ۲- روش های تشخیصی مبتنی بر وجود آنتی بادی

#### مزایا:

الف) آنتی ژن ها و آنتی بادی ها به طور قابل توجهی پایدارتر از RNA هستند که باعث می شود در هنگام حمل و نقل کیت و ذخیره سازی کمتر حساس بوده، بنابراین احتمال نتایج منفی کاذب را کاهش می دهد.

ب) بزرگترین مزیت ایمنی سنجی توانایی آن ها در تشخیص عفونت های گذشته است.

هنگامی که بیمار از COVID-19 بهبود یافت و ویروس از بدن پاک شد، RNA ویروسی دیگر برای تشخیص در دستگاه تنفسی موجود نیست و تنها در مرحله حاد عفونت که در آن آزمایش جهت SARS-CoV-2 مثبت است.

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

پ) بر خلاف RNA، آنتی بادی ها نسبتا ماندگار هستند و می توانند مدت ها پس از عفونت در جریان خون باقی بمانند. به همین ترتیب، سنجش ایمنی ما را قادر می سازد بیمارانی را که COVID-19 داشته اند را به صورت گذشته نگر شناسایی کنیم.

ت) نوع آنتی بادی و سطح نسبی آن نیز می تواند برای نشان دادن مرحله عفونت و تخمین زمان آن استفاده شود.

ث) با ارزش ترین استفاده از تست آنتی بادی در مقیاس گسترده به عنوان یک ابزار بهداشت عمومی جدا نباشد.

ج) با انجام نمونه برداری تصادفی برای سنجش آنتی بادی از عموم مردم، نهادهای بهداشت عمومی می توانند سطح واقعی در معرض قرار گرفتن مردم به ویروس و در نتیجه مصونیت جامعه را بهتر تخمین بزنند.

چ) سیستم های بهداشتی با شناسایی کانون های جغرافیایی بالقوه ایمن می توانند منابع بیشتری را برای جلوگیری یا مدیریت بیماری اختصاص دهند.

ح) امکانات استفاده از روش اندازه گیری آنتی بادی در کشورها گسترده تر از PCR است.

خ) آزمایش آنتی بادی ممکن است در تشخیص موارد زیر نقش مهمی داشته باشد:

- بیماران مشکوک در ویزیت اولیه یا بیماران با تشخیص بالینی با آزمایش RNA تأیید نشده، نتیجه مثبت آنتی بادی باعث افزایش موارد تشخیصی می شود.

- افراد سالم با سابقه تماس نزدیک که در دوره قرنطینه قرار دارند، باید در صورت مثبت بودن آنتی بادی، به عنوان حامل احتمالی در نظر گرفته شده و پس از آن باید از نظر RNA آزمایش شوند.

## انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

د) در صورت تولید واکسن بایستی بتوان افراد قبلاً بیمار شده را از کسانی که واکسن در یافت کرده اند متمایز نمود و این در صورتی میسر است که بتوان ابتدا افرادی را که قبلاً به ویروس آلوده شده اند را شناسایی نمود.

### محدودیت ها:

الف) اگرچه داده ها در این مرحله هنوز محدود هستند به نظر می رسد پاسخ ایمنی بدن به COVID-19 از آنچه که انتظار داریم کند تر است.

ب) برای تشخیص اولیه نمی توان از سنجش آنتی بادی استفاده نمود.

### ۳- آزمایش های ترکیبی Ab/RT-PCR

مطالعات اولیه نشان داده اند که آزمایش ترکیبی RT-PCR / آنتی بادی می تواند نرخ منفی کاذب ناشی از آزمایش PCR به تنهایی را کاهش دهد.

- آنتی بادی تام (IgG, IgA, IgM) نسبت به IgM و IgG برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2 حساس تر است.

- ترکیب دو روش PCR و اندازه گیری آنتی بادی تام حساسیت تشخیصی را از ۶۰٪ (در مورد PCR) به بیشتر از ۸۰٪ افزایش می دهد.

### **References:**

1-Zhang P, Gao Q, Wang T, Ke Y, et al. Evaluation of recombinant nucleocapsid and spike protein serological diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19).

2-Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medrxiv [Internet]. 2020;

3-Okba N.M.A, Muller M.A., Li W, Wang C, et al. SARS-COV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medrxiv [Internet]. 2020;

4-Gorse GJ, Donovan MM, Patel GB. Antibodies to coronaviruses are higher in older compared with younger adults and binding antibodies are more sensitive than neutralizing antibodies identifying coronaviruses associated illnesses. Journal of medical virology. 10.1002/jmv.25715

5-Lin D, Liu L, Zhang M, Hu Y, et al. Evaluation of serological tests in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. medrxiv [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045153>

6-Wölfel R, Corman V, Guggemos W, Seilmaier M, Mueller M, Niemeyer D, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature [Internet]. 2020; Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2196-x>

7-Lou B, Li T, Zheng S, Su Y, Li Z, Liu W, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. medrxiv[Internet]. 2020; Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.23.20041707v1.full.pdf>

8-Liu W, Liu L, Kou G, Zheng Y, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. medrxiv[Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/9.1101/2020.03.16.20035014> medRxiv preprint

9-Zhang W, Du R, Li B, Zheng X, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging microbes and infections*. 2020; 9(1):386-389.

10-Zhou P, Yang XL, Wang X, Hu B, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7. Epub 2020 Feb 3.

11-Wang N, Li SY, Yang XL, et al. Serological Evidence of Bat SARS-Related Coronavirus Infection in Humans, China. *Virol Sin*. 2018;33(1):104–107. doi:10.1007/s12250-018-0012-7

12-Che X, Qiu L, Liao Z, Wang Y, et al. Antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 191, Issue 12, 15 June 2005, Pages 2033–2037, <https://doi.org/10.1086/430355>

13-Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis

*14-Serology testing for COVID-19 February 28, 2020 This is up to date as of February 21, 2020*

*15-coronavirus infection Hsueh-Ling Janice Oh<sup>1,2</sup>, Samuel Ken-En Gan<sup>3</sup>, Antonio Bertoletti<sup>4,5,6</sup> and Yee-Joo Tan<sup>2,7</sup>*

*16-Systematic Comparison of Two Animal-to-Human Transmitted Human Coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV Jiabao Xu <sup>1,†</sup>, Shizhe Zhao <sup>1,†</sup>, Tieshan Teng <sup>1</sup>, Abualgasim Elgaili Abdalla <sup>2</sup>, Wan Zhu <sup>3</sup>, Longxiang Xie <sup>1,</sup>, Yunlong Wang <sup>4,</sup>, Xiangqian Guo <sup>1,\*</sup> 6-Serological test is an efficient supplement of RNA detection for confirmation of SARS-CoV-2 infection Ningshao Xia, Guiqiang Wang, Wenfeng Gong*

*17-A detailed protocol for a serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans: antigen production and test setup. Daniel Stadlbauer, Fatima Amanat, Veronika Chromikova<sup>1</sup>, Kaijun Jiang, Shirin Strohmeier, Guha Asthagiri Arunkumar, Jessica Tan Disha Bhavsar, Christina Capuano, Ericka Kirkpatrick, Philip Meade, Nichalle Britto<sup>1</sup>, Catherine Teo, Meagan, McMahan, Viviana Simon, Florian Krammer*

# انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

