DOI: 10.22122/jims.v39i611.13023 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۱۱/هفته‌ی سوم فروردین ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۷ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱/۲۱

مروری بر رویکردهای تشخیصی عفونت کرونا ویروس جدید (COVID-19)، امکانات و محدودیت‌ها

کاظم احمدی کیا[۱]، شهرام محمودی[۲]، فهیمه حسنعلی[۳]، محسن کشاورز[۴]، حسین میرهندی[۵]

مقاله مروری

چکیده

تشخیص به موقع بیماری COVID-19 برای بهبود پیامد بیماری و قطع زنجیره‌ی انتقال، ضروری است. آگاهی از راهکارهای تشخیصی Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)، چالش‌های آن‌ها، جمع‌آوری با ارزش‌ترین نمونه‌ی تشخیصی در زمان مناسب از محل آناتومی مناسب و تفسیر یافته‌های آن‌ها اهمیت زیادی دارد. این مطالعه‌ی مروری، با هدف بررسی چالش‌های فعلی و تفسیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) یا به عنوان روش مرجع، آزمایش Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)، تشخیص آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، ویژگی‌های تصویربرداری ریه، تغییرات غیر طبیعی در یافته‌های آزمایشگاهی مبتلایان به COVID-19 و تغییر نتایج با گذشت زمان انجام شد. نمونه‌های مایع لاواژ برونکوآلوئولار (۹۳ درصد) و خلط (۷۲ درصد)، بالاترین میزان مثبت را در تشخیص مولکولی COVID-19 نشان می‌دهند. از طرف دیگر، سنجش‌های مکرر RT-PCR توصیه می‌شود؛ چرا که با گذشت زمان، احتمال حضور SARS-CoV-2 در نازوفارنکس افزایش می‌یابد. ترکیب شواهد بالینی با نتایج توموگرافی کامپیوتری قفسه‌ی سینه (Computed tomography scan یا CT scan) و RT-PCR، می‌تواند خطاهای تشخیصی را به حداقل برساند. تصور می‌شود که سطح بالای اینترلوکین ۶ (IL-6) و D-dimer با بروز فرم شدید COVID-19 در بزرگسالان ارتباط نزدیکی دارد و تشخیص ترکیبی آن‌ها، می‌تواند به عنوان عوامل اولیه‌ی پیش‌بینی شدت بیماری باشد. همچنین، افزایش پروتئین‌های مرحله‌ی حاد با پیامد نامطلوب بیماری COVID-19 همراه است. تشخیص سرولوژی، همچنین ابزار مهمی برای درک میزان COVID-19 در جامعه و شناسایی افراد مصون است. سطح آنتی‌بادی‌ها از هفته‌ی دوم بیماری شروع به افزایش می‌کند.

واژگان کلیدی: بتا کروناویروس جدید؛ COVID-19؛ تشخیص؛ پنومونی ویروسی

ارجاع: احمدی کیا کاظم، محمودی شهرام، حسنعلی فهیمه، کشاورز محسن، میرهندی حسین. **مروری بر رویکردهای تشخیصی عفونت کرونا ویروس جدید (COVID-19)، امکانات و محدودیت‌ها.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۱): ۶۵-۵۵.

مقدمه

از دسامبر سال ۲۰۱۹، مواردی از پنومونی ویروسی با عامل ناشناخته‌ی مرتبط با یک بازار عمده‌فروشی غذاهای دریایی در شهر ووهان، استان هوبی چین گزارش شد (۱). مشخصات ژنتیکی عامل اتیولوژیک مسؤول ایجاد این طغیان، پنومونی از طریق توالی‌یابی نسل جدید (Next-generation sequencing یا NGS) ویروس موجود در نمونه‌های چندین بیمار مبتلا به پنومونی، تعیین و به عنوان یک RNA ویروس پوشش‌دار به نام بتا کرونا ویروس جدید شناخته شد. این ویروس در خانواده‌ی Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) و Middle East respiratory syndrome-related coronavirus (MERS-CoV) قرار داده شد و عفونت به دست آمده به نام سندرم حاد تنفسی ناشی از کرونا ویروس ۲ (SARS-CoV-2) و به دنبال آن، COVID-19 نامیده شد. تنها طی دو ماه، ویروس از ووهان به کل چین و پس از آن به سرعت به کشورهای دیگر رواج یافت. بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماری، همچنان به طور فاجعه‌باری ادامه دارد.

با توجه به فقدان درمان دارویی اختصاصی، تشخیص به موقع و درمان فوری و جداسازی بیماران در کاهش و کنترل آن نقش فوری و حیاتی دارد. طبق دستورالعمل تشخیص و درمان پنومونی ناشی از

۱- دانشجوی دکتری تخصصی قارچ‌شناسی پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- دکتری تخصصی قارچ‌شناسی پزشکی، مرکز پژوهش‌های علمی دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد پرستاری مراقبت‌های ویژه، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۴- استادیار، مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس، پژوهشکده‌ی علوم زیست‌پزشکی خلیج فارس، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

۵- استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین میرهندی؛ استاد، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: s.h.mirhendi@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

COVID-19، وجود عفونت باید با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) بر روی DNA حاصل از تبدیل RNA به DNA با روش Reverse transcriprase PCR (RT-PCR) یا توالی‌یابی ژنی (Sequencing) بر روی نمونه‌های بالینی تنفسی یا خون تأیید شود (۲). با این حال، به علت اشکالات موجود در جمع‌آوری نمونه و انتقال آن و نیز محدودیت عملکرد این روش و کیت‌های تجاری موجود، حساسیت RT-PCR برای نمونه‌های سواب گرفته شده از حلق بیماران مبتلا کافی نیست و این نکته، گویای آن است که ممکن است بسیاری از بیماران شناسایی نشوند، درمان مناسب و به موقع انجام نگیرد و خطر سرایت به جمعیت بیشتری را به وجود آورد.

اگر چه عفونت COVID-19 بیماری نوظهوری است و هنوز ابعاد مختلف آن از جمله راهکارهای بهتر تشخیصی و مزایا و محدودیت‌های هر روش به خوبی روشن نشده است، در این مطالعه‌ی مروری سعی شده است تا حد امکان نمایی از راهکارها و محدودیت‌های کنونی تشخیص‌های بالینی، پیرابالینی و آزمایشگاهی ارایه شود و به جنبه‌های دیگری از جمله بررسی نمونه‌های پر اهمیت و کم اهمیت‌تر، انتقال نمونه‌ها، اصول ایمنی در هنگام پردازش نمونه‌های بالینی و محیطی و نیز معرفی روش‌های تکمیلی پرداخته شود. این مطالعه، ممکن است برای کادر بهداشتی، درمانی و آزمایشگاهی و همچنین، مسؤولین پیش‌گیری و کنترل محلی و کشوری مفید باشد.

نمونه‌های بالینی مناسب برای تشخیص

اساسی‌ترین مرحله برای تحقق یک تشخیص دقیق و معتبر، نمونه‌گیری سریع و صحیح، آماده‌سازی بهینه‌ی آن و سپس، انجام آزمایش حساس و ویژه بر روی نمونه‌ها می‌باشد. از آن جایی که شواهد بالینی و آزمایشگاهی مختلفی برای تأیید COVID-19 لازم است و نقش عفونت مختلط (دو یا چند عفونت هم‌زمان) هنوز نامعلوم است، از این رو، ممکن است آزمایش‌های متعدد و تهیه‌ی مواد بالینی کافی لازم باشد. برای روش‌های تشخیصی اولیه، مرکز کنترل بیماری‌ها (Centers for Disease Control and Prevention یا CDC) در آمریکا نمونه‌برداری از ترشحات دستگاه تنفس فوقانی (سواب نازوفارنژیال و اوروفارنژیال) و تحتانی (خلط در بیمارانی که سرفه‌ی خلطی دارند) را توصیه می‌کند، اما به دلیل افزایش احتمال تولید و انتقال آئروسول آلوده، از القای ایجاد خلط باید پرهیز کرد (۳). نمونه‌ها باید در اسرع وقت و به محض ظن به وجود عفونت COVID-19 و بدون توجه به زمان شروع علایم، جمع‌آوری شوند (۴). در صورت وجود شواهد دال بر عفونت ملتحمه یا چشم، نمونه‌ی سواب ملتحمه‌ی چشم و در صورت بروز اسهال، گرفتن نمونه‌ی مدفوع لازم است (۶-۵). در صورت نیاز به اندازه‌گیری پاسخ ایمنی میزبان به SARS-CoV-2 که می‌تواند شواهد غیر مستقیمی از وجود عفونت در حال یا گذشته به دست دهد، نمونه‌ی خون لازم است (۷، ۳).

نمونه‌های تنفسی

بر اساس تظاهرات بالینی، هم نمونه‌های دستگاه تنفس فوقانی (نازوفارنژیال و اوروفارنژیال) و هم نمونه‌های دستگاه تنفس تحتانی (خلط، آسپیره‌ی تراکئال یا برونکوآلوئولار لاواژ) مفید است. جمع‌آوری نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی، از جمله مایع لاواژ برونکوآلوئولار، آسپیره‌ی تراکئال، خلط از سرفه‌های عمیق و نمونه های بیوپسی بافت ریوی اگر چه بسیار با ارزش است، اما در عمل به خاطر خطر انتقال به کادر بهداشتی- درمانی چندان عملی نیست (۳).

برای نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی (نازوفارنژیال و اوروفارنژیال) از سواب‌های واجد فیبرهای سنتتیک (Dacron or rayon) با دسته‌ی پلاستیکی یا آلومینیومی استفاده می‌شود. پس از اخذ نمونه، سواب‌ها بلافاصله در لوله‌ی استریل حاوی ۳-۲ میلی‌لیتر محیط انتقال ویروس (محلول نمکی ایزوتونیک، محلول کشت بافتی یا محلول بافر فسفات) قرار داده شد و برای افزایش غلظت ویروس، هر دو سواب در یک لوله قرار داده می‌شوند. برای اخذ نمونه‌ی نازوفارنژیال، سواب به موازات کام در سوراخ بینی وارد شد و چند ثانیه به حال خود رها گردید یا به آرامی چرخانده می‌شد تا ترشحات را به خود جذب نماید. در مورد نمونه‌ی اوروفارنژیال (مانند سواب حلقی) سواب به قسمت خلفی حلق تماس داده می‌شود، اما از تماس آن با زبان جلوگیری می‌شود. نمونه نباید از ابتدای مجرای بینی و یا لوزه‌ها گرفته شود. در مورد آسپیره‌ی نازال یا آسپیره/شستشوی نازوفارنژیال، مقدار ۳-۲ میلی‌لیتر نمونه در یک ظرف استریل در پیچدار جمع‌آوری می‌شود (۴-۳).

نمونه‌ی خون و سرم

آزمایش سرولوژی برای ردیابی آنتی‌ژن اختصاصی ویروس، یا تأیید پاسخ ایمونولوژیک (آنتی‌بادی) به کرونا ویروس بیشتر برای بررسی میزان ایمنی فرد (ابتلای قبلی)، یا مواردی که RT-PCR امکان پذیر نباشد، انجام می‌گیرد. برای داشتن نتیجه‌ی بهتر، دو نمونه‌ی سرمی، یکی در مرحله‌ی حاد و دیگری در مرحله‌ی بهبودی گرفته شود. نمونه‌ی سرم برای روش‌های مولکولی (بررسی وجود اسید نوکلئیک اختصاصی ویروسی) کاربرد ندارد. از نمونه‌ی خون تام برای ردیابی آنتی‌ژن، بررسی لکوپنی، لنفوپنی و سطح C-Reactive protein (CRP) در بیماران استفاده می‌شود. نمونه‌ی خون تام، باید به همراه ماده‌ی ضد انعقاد Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) و در طی ۷ روز ابتدایی از شروع علایم بیماری گرفته شود (۶).

نمونه‌ی سواب ملتحمه‌ی چشم

در صورت لزوم نمونه‌گیری از چشم، سواب به آرامی با سطح ملتحمه‌ی چشم تماس داده و سر سواب به درون لوله‌ی نمونه‌برداری انتقال داده شد.

سایر نمونه‌های بالینی

وجود کروناویروس جدید در دستگاه گوارش، بزاق و ادرار نیز محتمل است (۵) و از این رو، جمع‌آوری این قبیل نمونه‌ها، می‌تواند برای تشخیص یا برخی تحقیقات مفید باشد. احتمال وجود ویروس در مدفوع تا نزدیک پنج هفته بعد از منفی شدن آزمایش مولکولی نمونه‌های تنفسی افراد مبتلا، وجود دارد (۸)؛ هر چند اطلاعاتی که در این زمینه وجود دارد، هنوز کافی نیست (۵).

تکرار نمونه‌گیری

در بیمار مشکوک به COVID-19، به خصوص زمانی که پنومونی یا وضعیت وخیم داشته باشد، اخذ فقط یک نمونه از دستگاه تنفس فوقانی و منفی شدن آن، نمی‌تواند رد کننده‌ی بیماری باشد؛ بلکه باید نمونه‌های بیشتری از دستگاه تنفس فوقانی و تحتانی گرفته و بررسی شود. در بیماران بستری شده با عفونت اثبات شده‌ی COVID-19، به منظور بررسی پاک شدن بدن از ویروس، نمونه‌گیری از دستگاه تنفس فوقانی و تحتانی باید تکرار شود. تعداد تکرارها بستگی به شرایط بیمار و خدمات درمانی دارد، اما باید حداقل هر ۴-۲ روز صورت گیرد تا زمانی که ۲ نمونه‌ی متوالی با حداقل ۲۴ ساعت فاصله در بیماری که از نظر بالینی بهبود یافته، منفی شود. نمونه‌های دستگاه تنفس تحتانی در مقایسه با نمونه‌های دستگاه تنفس فوقانی شانس بیشتری برای مثبت شدن در دوره‌ی زمانی طولانی‌تر دارند (۳).

از آن جایی که در بیماران مبتلا به SARS و MERS، عفونت هم‌زمان با سایر ویروس‌های تنفسی دیده شده است، ممکن است لازم باشد نمونه‌های دستگاه تنفسی، از لحاظ سایر ویروس‌های تنفسی همچون آنفلوانزای A و B (شامل آنفلوانزای A زئونوتیک)، عفونت با Respiratory syncytial virus، ویروس پاراآنفلوانزا، رینوویروس‌ها، آدنوویروس‌ها، آنتروویروس‌ها (برای مثال EVD68)، متاپنوموویروس انسانی و کرونا ویروس‌های آندمیک (مانند HKU1، OC43، NL63 و 229E) بررسی شوند. همچنین ممکن است لازم باشد نمونه‌های دستگاه تنفس تحتانی از لحاظ پاتوژن‌های باکتریایی همچون لژیونلا پنوموفیلا و نیز برخی قارچ ها همچون آسپرژیلوس‌ها بررسی شوند (۳). از این رو، به نظر می‌رسد برای تشخیص افتراقی مبتنی بر روش‌های مولکولی، طراحی روش‌های چندگانه (Multiplex PCR) بر اساس نواحی ژنی اختصاصی عوامل ویروسی درگیر کننده‌ی دستگاه تنفس فوقانی و تحتانی مفید باشد.

به خاطر احتمال وجود باکتری‌های عامل سپسیس و پنومونی، توصیه می‌شود نمونه‌ی خون قبل از شروع درمان ضد میکروبی اخذ گردد؛ هر چند شروع درمان ضد میکروبی به دلیل اخذ نمونه نباید به تعویق بیفتد (۳).

احتیاطات ایمنی برای کار با نمونه‌ها

نمونه‌های بیماران بستری در بیمارستان، باید توسط پرسنل پزشکی واجد شرایط جمع آوری شود. از افرادی که در تماس نزدیک با بیماران مبتلا به کرونا بوده‌اند نیز باید توسط مراکز ذی‌صلاح نمونه‌گیری شود. پرسنل نمونه گیری باید آموزش کافی در ارتباط با جمع‌آوری و شناسایی عوامل بیماری‌زا دیده باشند. نکات حفاظتی مهم این است که برای جلوگیری از پراکنده شدن یا تماس با قطرات ریز و درشت نمونه‌های دستگاه تنفس فوقانی و تحتانی بایستی به طور الزامی از تجهیزات حفاظت فردی مناسب استفاده شود. کار با این نمونه‌ها در آزمایشگاه باید در هود بیولوژی درجه‌ی II و مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی زیستی سطح ۲ یا بالاتر انجام گیرد و به طور الزامی، از ابزار حفاظت شخصی مناسب همچون ماسک N95 یا سطح بالاتر حفاظت تنفسی، عینک، شیلد صورت، دستکش دوتایی لاتکس یا نیتریل، لباس محافظ و چکمه‌های مقاوم در برابر نفوذ پذیری مایعات استفاده شود. در صورت تماس با خون بیمار، مایعات بدن، ترشحات یا مدفوع، دستکش‌های خارجی باید به سرعت تعویض گردد (۷، ۴).

انتقال و نگهداری نمونه‌ها

برای انتقال نمونه‌ها، باید از محیط کشت مخصوص انتقال ویروس (Viral Transport Medium یا VTM) حاوی مکمل‌های ضد قارچی و ضد میکروبی استفاده شود. در صورت نیاز به بررسی نمونه از جهت عفونت‌های هم‌زمان قارچی و باکتریایی، نمونه باید بدون محیط انتقالی یا به همراه مقدار بسیار کمی آب استریل انتقال داده شود (۷). بر روی ظرف نمونه، باید برچسب حاوی شماره‌ی اختصاصی نمونه، نوع نمونه (برای مثال سرم) و تاریخ جمع‌آوری نمونه درج شود. نمونه‌ها به مدت ۷۲حداکثر ساعت پس از اخذ و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. اگر انتظار می‌رود استخراج با تأخیر صورت گیرد، نمونه‌ها باید در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد یا کمتر نگه داشته شوند. در صورت لزوم، اسید نوکلئیک استخراج شده نیز برای باید در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد یا کمتر نگهداری شود (۷-۶، ۴). نمونه‌هایی که شرط نگهداری در دمای زیر ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا حداکثر ۴ روز و یا فریز شدن در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد رعایت نشده باشد، نمونه‌هایی که دارای اطلاعات و برچسب مناسب نباشند، نمونه‌های بالینی غیر مرتبط با عفونت و نمونه‌های با حجم ناکافی مورد پذیرش قرار نمی‌گیرند (۷، ۴).

نمونه‌گیری محیطی

نمونه‌گیری محیطی برای اهداف اپیدمیولوژی و پژوهشی و اطمینان از پاک‌سازی محل نگهداری بیماران مبتلا، اماکن عمومی و غیره می‌تواند مفید باشد. نمونه‌های محیطی را می‌توان با استفاده از سواب با سرهای سنتتیک و دسته‌ی پلاستیکی جمع‌آوری نمود. سواب در لوله‌ی حاوی ۳-۱ میلی‌لیتر محیط انتقالی ویروس‌ها (دارای ترکیبات Protein stabilizer، antibiotics and buffer solution) که شامل بافر خنثی کننده (مانند توئین ۸۰) و مواد آنتی‌باکتریال است، قرار داده می‌شوند. این محیط‌ها در شرایطی همچون زمان انتقال طولانی، دمای کنترل نشده نگهداری و مقادیر اندک ویروس کارایی زیادی ندارد و مواقعی که امکان رعایت شرایط مناسب نگهداری و انتقال نمونه‌ها فراهم نیست و یا غلظت ویروس در نمونه‌ها کم باشد، استفاده از بافر لیز کائوتروپیک (Chaotropic lysis) توصیه می‌شود (۹).

تشخیص مولکولی

با توجه به سرعت انتشار بالای این ویروس و امکان انتقال عفونت از بیماران بدون علایم به سایرین، تشخیص حساس، دقیق، سریع و ارزان قیمت برای شناسایی بیماران و کنترل عفونت، ضرورتی قطعی است. تشخیص قطعی COVID-19 باید با نمونه‌های تنفسی یا خون به روش RT-PCR یا توالی‌یابی ژنی تأیید شود (۱۰، ۲). در این زمینه، گروه‌های متعددی اقدام به طراحی روش‌های مولکولی برای شناسایی این ویروس کرده‌اند که عمده‌ی آن‌ها بر مبنای روش RT-PCR است. در این رویکرد، ابتدا RNA ویروس از نمونه، استخراج و تخلیص و آن گاه با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase از روی RNA استخراج شده، DNA مکمل (complementary DNA یا cDNA) سنتز می‌شود. در مرحله‌ی بعد، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس و با روش PCR، قطعه‌ی ژنی مورد نظر تکثیر می‌شود و وجود و میزان آن ردیابی می‌گردد. در روش‌های معمول فعلی برای سرعت، حساسیت و ویژگی بیشتر و پرهیز از آلودگی مولکولی، روش Real time PCR مبتنی بر پروب‌های اختصاصی به کار می‌رود (۱۱، ۶).

همچنین، مرحله‌ی سنتز cDNA با مرحله‌ی PCR تلفیق شده است. کیت‌های طراحی شده توسط مرکز کنترل و پیش‌گیری بیماری‌های آمریکا (CDC) که تأییدیه‌ی سازمان غذا و دارو (Food and Drug Administration یا FDA) را نیز کسب کرده است، One-step RT-PCR بر مبنای روش RT-PCR عمل می‌کند (۱۲-۱۱). تعدادی کیت ایرانی نیز بر مبنای روش RT-PCR برای تشخیص مولکولی این عفونت طراحی، ارزیابی و عرضه شده است.

در مجموع، روش RT-PCR با وجود ویژگی مطلوبش محدودیت‌هایی نیز دارد. به خاطر مشکلات جمع‌آوری مطلوب نمونه و انتقال آن و نیز عملکرد کیت‌های موجود، در بررسی‌های اولیه میزان موارد مثبت RT-PCR برای نمونه‌های سواب گرفته شده از حلق بین ۶۰-۳۰ درصد گزارش شده است (۱۰). حساسیت کم RT-PCR، گویای آن است که در شرایط بحرانی اپیدمیک، ممکن است بسیاری از بیماران مبتلا به کرونا شناسایی نشوند و در نتیجه، درمان یا پی‌گیری مناسب و به موقع انجام نگیرد (۲). انجام این روش، نیاز به تخصص، دقت و تجربه‌ی کافی در زمینه‌ی استخراج RNA و آن گاه انجام PCR و تفسیر نتایج مربوط دارد.

در صورت فقدان تعداد کافی ارگانیسم در نمونه (به خصوص در بیماران بدون علامت یا با علایم خفیف و یا مرحله‌ی ابتدایی بیماری)، عدم دقت کافی در جمع‌آوری نمونه یا انتقال نامناسب آن، حضور موارد مداخله‌گر در واکنش مولکولی و نیز بروز خطاهای انسانی، امکان بروز نتایج منفی کاذب وجود دارد. همچنین، باید اشاره کرد که RNA ویروس‌ها دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند و اگر چه در طراحی این روش‌ها سعی شده است که نواحی حفاظت شده و ثابت (Conserved) ژنوم ویروس‌ها استفاده شود، تغییرات ژنتیکی ممکن است منجر به عدم اتصال نوکلئیک اسیدهای پرایمر یا پروب به توالی هدف شود و در نهایت، عملکرد روش را کاهش دهد و باعث نتایج منفی کاذب گردد.

از سوی دیگر، به واسطه‌ی فقدان زیر ساخت مناسب برای انجام این روش، استفاده از اهداف ژنتیکی غیر اختصاصی جهت تکثیر، آلوده شدن نمونه‌ها در حین انجام کار و غیره، امکان بروز نتایج مثبت کاذب نیز وجود دارد. فقدان حمایت مالی و کمبود نیروی انسانی آموزش دیده و مجرب، برای انجام سریع و دقیق روش‌های درخواستی و غیره نیز از دیگر محدودیت‌های این روش است (۱۳-۱۰، ۲). استفاده از کنترل‌های مختلف حین کار، مورد تأکید بسیار است. لازم به ذکر است که اپیدمی کروناویروس نوظهور، ابعاد بهداشتی، اجتماعی و اقتصادی گسترده‌ای را به همراه دارد. انجام تشخیص‌های میکروبیولوژیک (RT-PCR) که به طور معمول به عنوان استاندارد طلایی مطرح هستند، بطور ماهوی نیازمند زیر ساخت‌های فنی، مالی و نیروی انسانی ویژه است و از این رو، به طور معمول توسط سازمان‌های عالی دولتی مدیریت می‌شوند (۱۲، ۱۰).

نوع نمونه نیز می‌تواند در نتیجه‌ی آزمایش RT-PCR مؤثر باشد. در مطالعه‌ای مشخص شد که نمونه‌ی خلط (۷۶/۹ درصد) به طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌ی سواب حلقی (۴۴/۲ درصد) مثبت می‌شود (۱۴). همچنین، در مطالعه‌ی دیگری که به منظور مقایسه‌ی حساسیت RT-PCR در نمونه‌های مختلف بالینی پرداخته است (۱۵)، میزان مثبت شدن آزمایش RT-PCR در نمونه‌های مختلف در مبتلایان به COVID-19 به ترتیب شامل لاواژ برونکوآلوئولار (۹۳ درصد)، خلط

(۷۲ درصد)، سواب بینی (۶۳ درصد)، بیوپسی برونکوسکوپیک (۴۶ درصد)، سواب حلق (۳۲ درصد)، مدفوع (۲۹ درصد)، خون (۱ درصد) و ادرار (صفر درصد) بود.

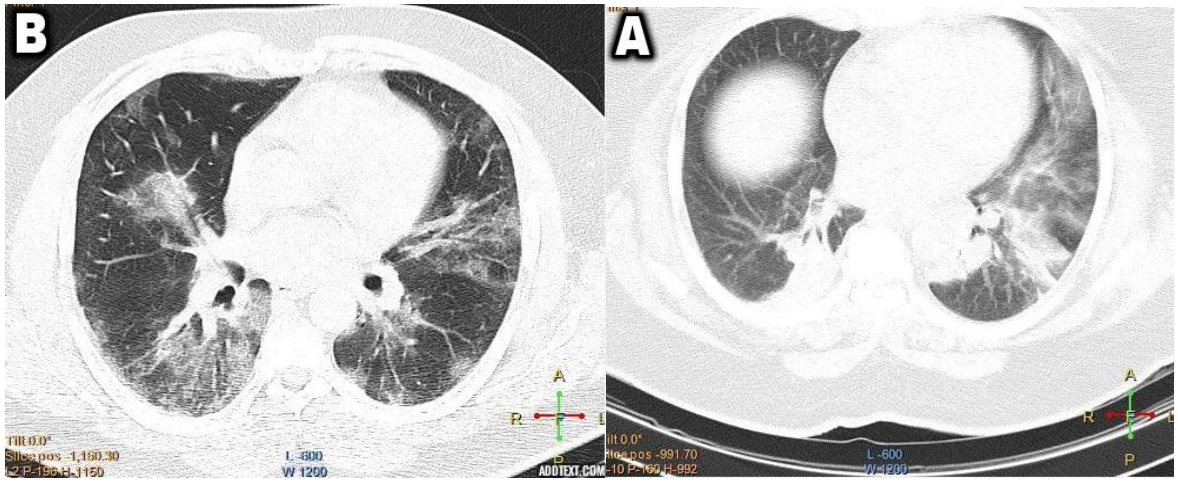
از آن جایی که تعدادی از عوامل خارجی از جمله اقدامات نمونه‌برداری، منبع نمونه (دستگاه تنفسی فوقانی یا تحتانی)، زمان نمونه‌گیری (دوره‌ی مختلف پیشرفت بیماری) (۱۰) و عملکرد کیت‌های تشخیصی ممکن است بر نتایج آزمایش RT-PCR تأثیر بگذارد، بهتر است نتایج آزمایش‌های منفی RT-PCR به ویژه در افراد علامت‌دار یا دارای مواجهه با بیماران با احتیاط تفسیر شود (۲). با بررسی‌های دوره‌ای آزمایش RT-PCR در بیماران مبتلا دیده شده است که میانگین فاصله‌ی زمانی بین نتایج اولیه‌ی منفی تا موقع مثبت شدن RT-PCR حدود ۵ روز است. همچنین، تغییر نتایج مثبت اولیه تا منفی شدن RT-PCR به دنبال درمان بیماران چیزی در حدود ۷ روز زمان می‌برد (۲).

علاوه بر روش‌های مبتنی بر RT-PCR، روش های دیگری نیز همچون Reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) معرفی شده‌اند که حساسیت مشابه با RT-PCR دارند و به تناسب مقدار ویروس موجود در نمونه، طی ۴۰-۱۵ دقیقه قابل انجام هستند. این روش، حتی با وجود ۱۰ کپی از ناحیه‌ی هدف، نتایج مثبت داشته است. RT-LAMP نسبت به RT-PCR نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی کمتری است و در شرایط عدم دسترسی به تجهیزات پیچیده‌ی آزمایشگاهی نیز قابل اجرا است (۱۶). با این اوصاف، باید دانست این روش نیز محدودیت‌ها و اشکالات ویژه‌ی خود را دارد که در این مطالعه، قابل ذکر نیست. همچنین، روش نمونه‌های بالینی غیر تهاجمی مثل بزاق نیز با موفقیت همراه بوده است، اما هنوز رایج نشده است.

سی‌تی اسکن قفسه‌ی سینه با تفکیک پذیری بالا (HRCT یا High resolution computed tomography):

اسکن CT قفسه‌ی سینه، یک روش تصویربرداری معمول غیر تهاجمی و با دقت و سرعت بالا است، اما در ارتباط با COVID-19، همچنان نیاز به مطالعه‌ی بیشتری دارد. در مطالعات مربوط به کرونا ویروس جدید، تاکنون بیشتر بر نقش توموگرافی کامپیوتری (HRCT) برای شناسایی بیماران و ارزیابی پیشرفت بیماری تأکید شده است (۱۷، ۲). در مطالعات در مقیاس کوچک‌تر، معلوم شده است که RT-PCR دارای حساسیت ناکافی می‌باشد؛ در حالی که CT قفسه‌ی سینه، ممکن است قادر باشد ناهنجاری‌های ریوی مرتبط با COVID-19 را در بیماران با نتایج اولیه‌ی RT-PCR منفی نشان دهد (۱۹-۱۸). بررسی‌های دوره‌ای در ۱۰۱۴ بیمار مشکوک به کروناویروس جدید، نشان داد که CT قفسه‌ی سینه با دامنه‌ی حساسیت بین ۸۸-۸۶ درصد، می‌تواند مکمل با ارزشی برای RT-PCR در تشخیص COVID-19 باشد (۲). برای مستند شدن تشخیص زودرس بیماری، مقایسه‌ای بین زمان مورد نیاز برای نمایان شدن الگوهای تیپیک پنومونی کرونایی و مثبت شدن آزمایش RT-PCR انجام و معلوم شد که در بیماران دارای آزمایش مکرر RT-PCR، میانگین فاصله ی زمانی بین نتایج RT-PCR منفی اولیه تا مثبت حدود ۵ روز (با دامنه ی ۸-۴ روز) می‌باشد. همچنین، میانگین زمان بین آزمایش RT-PCR مثبت اولیه و تغییر آن به منفی، به دنبال درمان، حدود ۷ روز (با دامنه‌ی ۱۵-۴ روز) بوده است (۲). با این وجود، در ۶۷ درصد از بیماران با نتایج RT-PCR منفی، تصویربرداری اولیه‌ی CT قفسه‌ی سینه، الگوی حاکی از بیماری را نشان داد. به علاوه، در ۹۳ درصد موارد قبل از مثبت شدن RT-PCR، CT قفسه‌ی سینه‌ی اولیه (با فاصله‌ی زمانی متوسط ۸ روز) دارای ویژگی‌های مرتبط با COVID-19 بود (۲). این یافته، نشان می‌دهد که تصویربرداری CT می‌تواند در تشخیص زودهنگام موارد مشکوک بسیار مفید باشد. علاوه بر این، در مطالعه‌ی حاضر در ۴۲ درصد موارد، بهبودی در CT اسکن قفسه ی سینه قبل از این که نتایج RT-PCR منفی شود، نمایان شد. در نتیجه، به نظر می‌رسد CT اسکن قفسه‌ی سینه می‌تواند در ارزیابی بهبودی و روند درمان، سریع‌تر از RT-PCR عمل کند. با این وجود، بر خلاف رادیوگرافی، آزمایش RT-PCR به نوعی آزمایشی میکروبیولوژیک (ویرولوژیک) محسوب می‌شود و مثبت شدن آن، به طور دقیق، نشانگر وجود ویروس در نمونه (ویژگی بالا) است. همچنین، با جداسازی و نگهداری ویروس یا ژنوم آن، امکان به دست آوردن اطلاعات تشخیصی، پاتولوژیکی و اپیدمیولوژیکی در زمان بروز اپیدمی و نیز در شرایط آرامش بعد از آن میسر می‌باشد.

بر اساس داده‌های منتشر شده (۲۱-۱۹، ۱۷)، به طور تقریبی تمام بیماران مبتلا به COVID-19 در سیر بیماری خود دارای ویژگی های CT مشخصی از جمله درجات مختلفی از GGO با یا بدون Crazy-paving sign، پنومونی چند کانونی و تغییرات ساختاری با انتشار محیطی (Architectural distortion in a peripheral distribution) هستند (شکل ۱). الگوی کانسولیداسیون به ندرت در مرحله‌ی ابتدایی بیماری نمایان می‌شود (۱۹). در مجموع و به طور خلاصه، از آن جایی که تشخیص زودرس بیماری کروناویروس جدید برای درمان و کنترل بیماری بسیار مهم است، در مقایسه با RT-PCR، تصویربرداری از قفسه‌ی سینه ممکن است روشی مطمئن‌تر، عملی‌تر و سریع‌تر برای تشخیص و ارزیابی روند درمانی یک فرد ساکن در ناحیه‌ی دچار اپیدمی باشد. همچنین، بررسی های مکرر و مجدد CT قفسه‌ی سینه، می تواند به طور عینی منعکس کننده‌ی پیشرفت بیماری و پایش اثرات درمان باشد (۲۱). با در نظر گرفتن نتایج RT-PCR به عنوان روش مرجع تشخیص بیماری، حساسیت و ویژگی CT قفسه ی سینه در



شکل ۱. عکس‌های تصویربرداری سی‌تی اسکن قفسه‌ی سینه. (A): نمای عرضی تصویربرداری CT قفسه‌ی سینه‌ی خانم ۶۲ ساله‌ی مبتلا به COVID-19 نشان دهنده‌ی الگوی کانسولیداسیون دو طرف ریه به همراه الگوی Ground-glass opacification/opacity (GGO)، (B): تصویربرداری سی‌تی اسکن قفسه‌ی سینه آقای ۵۷ ساله با الگوی GGO دو طرف و مولتی لوبولار ریه

تشخیص عفونت به ترتیب ۹۷ درصد و ۲۵ درصد گزارش شده است (۲). لازم به ذکر است که به دلیل وجود برخی تشابهات در الگوهای تصویربرداری CT قفسه‌ی سینه‌ی بیماران مبتلا به COVID-19 و سایر پنومونی‌های ویروسی، موارد مثبت کاذب را نیز می‌توان در CT قفسه‌ی سینه مشاهده نمود. از طرف دیگر، با توجه به حساسیت ناکافی RT-PCR، برخی از موارد ذکر شده تحت عنوان «مثبت کاذب» در CT ممکن است در واقع مثبت باشند، به ویژه اگر سنجش RT-PCR، فاقد استاندارد کافی و لازم باشد. بدین ترتیب، بهتر است در شرایط کنونی بیمارانی که دارای الگوهای مطرح کننده‌ی بیماری COVID-19 در CT قفسه ی سینه هستند، اما نتایج RT-PCR منفی دارند، بر اساس بررسی علایم بالینی و پی‌گیری‌های مجدد قفسه‌ی سینه، به عنوان موارد محتمل در نظر گرفته شوند (۲). با این وجود، استفاده از CT ریه با محدودیت‌هایی همراه است: ۱) بین شدت علایم بیماری و تغییرات CT ریه هم‌خوانی وجود ندارد؛ به عبارت دیگر، بیماری با علایم شدید بالینی، ممکن است تغییرات شدیدی در CT نداشته باشد. ۲) اغلب افراد بدون علامت، به طور معمول مراجعه‌ای به بیمارستان ندارند و در واکاوی آماری، میزان حساسیت CT در تشخیص افراد علامت‌داری که به بیمارستان مراجعه می‌کنند، ممکن است به طور کاذبی بالا گزارش شود. از این رو، نمی‌توان به طور دقیق گفت که در چند درصد افراد COVID-19 مثبت، CT ریه مثبت می‌شود. ۳) فاصله‌ی زمانی ۸ روز از زمان ابتلا تا تغییرات CT ریه، فاصله طولانی است و در طی این مدت، فرد مبتلا، می‌تواند افراد زیادی را مبتلا کند.

تغییرات آزمایشگاهی شایع

در مقایسه با بیماران مبتلا به فرم خفیف یا بدون علامت، بیماران مبتلا به فرم شدید بیماری، ناهنجاری‌های برجسته‌ی آزمایشگاهی از جمله لنفوسیتوپنی و لوکوپنی را نشان می‌دهند (۵، ۱). در مطالعات قبلی، دیده شده است که لنفوسیتوپنی در ۸۳/۲ درصد بیماران، ترومبوسیتوپنی در ۳۶/۲ درصد و لوکوپنی در ۳۳/۷ درصد وجود دارد (۵). این نتایج نشان می‌دهد که ویروس کرونای جدید، ممکن است به طور عمده روی لنفوسیت‌ها، به خصوص لنفوسیت‌های T، مشابه SARS-CoV عمل کند. از آن جایی که ذرات ویروس از طریق مخاط تنفسی پخش می‌شود و سلول‌های دیگر را آلوده می‌کند، طوفان سیتوکین را در بدن القا می‌کند و یک سری واکنش‌های ایمنی و التهابی ایجاد می‌نماید که باعث تغییر در تعداد سلول‌های ایمنی مانند لنفوسیت‌ها و سطح پروتئین‌های مرحله‌ی حاد می‌شود (۲۳-۲۲، ۵). بر اساس برخی مطالعات، چنین استنباط می‌شود که کاهش قابل توجه تعداد کل لنفوسیت‌ها حاکی از آن است که کرونا‌ویروس سلول‌های ایمنی زیادی را به کار می‌گیرد و عملکرد سیستم ایمنی سلولی بدن را مختل می‌کند (۲۲). آسیب به لنفوسیت‌های T، ممکن است عامل مهمی باشد که منجر به تشدید وضعیت بیماری شود (۲۴). همچنین، از نسبت نوتروفیل به لنفوسیت (بالای ۳/۱۳)، می‌توان به عنوان شاخصی برای پیش‌بینی (Predictor) شدت بیماری و بستری شدن در بخش مراقبت‌های ویژه به خصوص برای بیماران بالای ۵۰ سال استفاده کرد (۲۵).

در مطالعه ای که به منظور مقایسه‌ی مؤلفه‌های شمارش سلول‌های خونی بر روی ۵۳ بیمار آزمایش منفی و ۵۲ بیمار آزمایش مثبت از نظر Real time PCR برای نمونه‌های سواب حلق انجام شد (۲۶)، هر دو گروه به طور مشابه علایم شبه پنومونی شامل تب و علایم تنفسی

داشتند. در بررسی‌های آزمایشگاهی، تعداد بیماران با «لوکوسیت‌های طبیعی یا کاهش یافته» و «لنفوپنی» که در دستورالعمل کنونی برای تعیین بیماران Suspected توصیه شده است، در دو گروه تفاوتی نداشت. با این حال، ائوزینوپنی (کمتر از ۱۰۹ × ۰/۰۲ در میلی‌لیتر) در عمده‌ی بیماران آزمایش مثبت (۷۸/۸ درصد) دیده شد؛ در حالی که فقط ۳۵/۸ درصد بیماران آزمایش منفی این حالت را داشتند. میانگین تعداد ائوزینوفیل‌ها نیز در گروه آزمایش مثبت (۱۰۹ × ۰/۰۲ در میلی‌لیتر) به صورت معنی‌داری کمتر از بیماران آزمایش منفی (۱۰۹ × ۰/۰۵ در میلی‌لیتر) بود (P = ۰/۰۰۴) (۲۶).

به نظر می‌رسد که ائوزینوپنی در مراحل اولیه‌ی بیماری حتی قبل از علایم خاص رادیولوژیک اتفاق می‌افتد؛ بدین ترتیب؛ در بیماران دارای تب و علایم تنفسی، ائوزینوپنی می‌تواند به عنوان یک متغیر در شناسایی زودهنگام بیماران بسیار مظنون به بیماری (Highly suspected) در تریاژ کلینیک تب مؤثر باشد و به عنوان یک عامل پیش‌بینی کننده‌ی عفونت COVID-19 در کنار علایم بالینی مورد بررسی قرار گیرد. در متاآنالیزی که به منظور ارزیابی تمایز بین فرم شدید و خفیف بیماری COVID-19 با استفاده از شمارش پلاکت‌ها انجام شد، مشخص گردید که شاخص ترومبوسایتوپنی با بیش از پنج برابر شدن افزایش خطر فرم شدید COVID-19 همراه است و تعداد پلاکت کم خون، با افزایش خطر ابتلا به بیماری شدید و مرگ و میر در بیماران مبتلا به COVID-19 همراه است. بنابراین، می‌تواند به عنوان اندیکاسیون بالینی وخیم‌تر شدن بیماری در طول بستری مد نظر قرار گیرد (۲۷). درصد بالایی از بیماران مبتلا به COVID-19، پروتئین واکنشی C (CRP) و شاخص سرعت رسوب گلبول قرمز (Erythrocyte sedimentation rate یا ESR) افزایش یافته‌ای را نشان می‌دهند (۲۸، ۲۲، ۵). با این حال، به نظر نمی‌رسد در بیماران مبتلا شاخص التهابی، پروکلسیتونین از ارزش تشخیصی بالایی برخوردار باشد؛ اگر چه نتایج یک مطالعه‌ی متاآنالیز نشان می‌دهد که مقدار پروکلسیتونین بالا با حدود ۵ برابر شدن شدت بیماری COVID-19 همراه می‌باشد و در نتیجه، اندازه‌گیری دوره‌ای آن، می‌تواند در تعیین شدت بیماری COVID-19 نقش داشته باشد (۲۶).

مطالعه‌ی مروری دیگری که با واکاوی آماری ۱۴۵۱ بیمار مبتلا به COVID-19 انجام گرفت، نشان داد که شدت COVID-19 با غلظت سرمی پایین سدیم، پتاسیم و کلسیم همراه است (۲۹). در کسری از بیماران، افزایش سطح آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز، لاکتات دهیدروژناز، کراتین کیناز و D-dimer نیز ممکن است دیده شود (۲۸، ۵) (جدول ۱). همچنین، نتایج مطالعه‌ی متاآنالیز دیگری که یافته‌های آزمایشگاهی ۵۳۵۰ بیمار از ۲۵ مطالعه را جمع‌آوری کرده بود، نشان داد که افزایش CRP، پروکلسیتونین، D-dimer و فریتین با یک پیامد ضعیف در COVID-19 همراه است (۳۰).

جدول ۱. درصد فراوانی علایم شایع بالینی، یافته‌های غیر طبیعی آزمایشگاهی، اسکن و رادیوگرافی قفسه‌ی سینه در بیماران مبتلا به (COVID-19) Corona virus disease-19

علایم بالینی شایع، روش آزمایشگاهی خارج از محدوده‌ی طبیعی و تغییرات غیر طبیعی در CT قفسه‌ی سینه	درصد فراوانی	منبع
تب در مدت بستری بودن در بیمارستان	۸۸/۷–۹۸	(۱، ۵)
سرفه	۶۷/۸–۸۲	(۱، ۵، ۲۲)
تنگی نفس	۱۸/۷–۳۱	(۱، ۵، ۲۲)
ناهنجاری در CT قفسه‌ی سینه مطابق با پنومونی ویروسی	۸۶–۸۸–۱۰۰	(۱، ۲، ۵)
ناهنجاری در رادیوگرافی قفسه‌ی سینه	۵۹	(۵)
نسبت قطعی RT-PCR	۵۹	(۲)
آسپارتات آمینوترانسفراز بیش از ۴۰ واحد/لیتر	۲۲/۲	(۵)
آلانین آمینوترانسفراز بیش از ۴۰ واحد/لیتر	۲۱/۳	(۵)
بیلی‌روبین تام بیش از ۱۷/۱ میکرومول/لیتر	۱۰/۵	(۵)
کراتینین کیناز ≤ ۲۰۰ واحد/لیتر	۱۳/۷	(۵)
کراتینین ≤ ۱۳۳ میکرومول/لیتر	۱/۶	(۵)
d-dimer ≤ ۰/۵ میلی گرم/لیتر	۴۶/۴	(۵)
پروتئین واکنشگر C ≤ ۵ یا ۱۰ میلی گرم/لیتر	۶۰/۷–۸۶	(۲۲ ,۵)
میزان رسوب اریتروسیت < ۱۵	۸۵	(۲۲)
اینترلوکین ۶ < ۷ پیکوگرم/میلی‌لیتر	۵۲	(۲۲)
آهن سرم < ۲۴۷ نانوگرم/میلی‌لیتر	۶۳	(۲۲)
پروکلسیتونین ≤ ۰/۵ نانوگرم/میلی‌لیتر	۵/۵–۸	(۱، ۵، ۲۲)
لاکتات دهیدروژناز < ۲۵۰ واحد/لیتر	۴۱–۷۶	(۱، ۵، ۲۲)
لکوپنی	۲۵–۳۳/۷۲	(۱، ۵)
لنفوسیتوپنیا < ۱۰۰۰ یا ۱۵۰۰ سلول در میلی‌متر مکعب	۶۳–۸۳/۲	(۱، ۵)

یافته‌های مطالعات قبلی نشان می‌دهد که سطح اینترلوکین ۶ (IL-6) و D-dimer می‌تواند برای تخمین شدت COVID-19 استفاده شود. در صورت لزوم، سطح IL-6 و D-dimer باید اندازه‌گیری شود؛ چرا که می‌تواند به تشخیص شدت بیماران مبتلا به

COVID-19 بزرگسالان کمک کند (۳۱). بدین ترتیب، کاهش مقادیر مطلق لنفوسیت خونی به همراه تغییرات سطوح پروتئین‌های مرحله‌ی حاد، اینترلوکین-۶ و D-dimer، می‌توانند به عنوان شاخص مرجع در تشخیص بیماری، تعیین شدت و پیش‌آگهی عفونت کروناویروس جدید در کلینیک مورد استفاده قرار گیرد.

سرولوژی و آزمایش‌های سریع

بر اساس نظریه‌های موجود، ردیابی سریع آنتی‌ژن، تشخیص سریع‌تر و کم هزینه‌تری برای COVID-19 فراهم می‌کند، اما بر اساس تجربیات قبلی، این روش برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزا از حساسیت کمی برخوردار است. یک روش فلورسانس ایمونوکروماتوگرافی فلورسانس به عنوان روشی دقیق، سریع و ساده برای تشخیص پروتئین نوکلئوکپسید SARS-CoV-2 در سواب نازوفارنکس برای تشخیص COVID-19 گزارش شده است (۳۲)، اما اگر جمع‌آوری نمونه در هنگامی که تیترهای ویروسی در بالاترین حد خود باشد، انجام گیرد، حساسیت تشخیصی آزمایش آنتی‌ژن کروناویروس جدید، می‌تواند بهبود یابد (۳۲).

از سوی دیگر، سرولوژی مبتنی بر ردیابی آنتی‌بادی می‌تواند در پایش جمعیت‌های بزرگ از جهت بررسی ابتلای اخیر به COVID-19 ارزش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد (۳۳). این روش‌ها، درک بهتری از شرایط اپیدمی، طیف عفونت در جامعه به خصوص در موارد بدون علامت و نیز شناسایی افراد مصون به دست می‌دهند و می‌توانند تماس و یا ابتلای قبلی فرد با ویروس عامل COVID-19 در زمان گذشته، اخیر و یا حال را نشان دهند (۳۴)، اما ارزش تشخیصی و پیش‌آگهی این روش برای یک فرد کافی نیست و به طور معمول در عرض دو هفته پس از شروع تظاهرات بالینی بیماری، مثبت می‌گردد (۳۵-۳۴). اگر چه ایمنوگلوبین‌های M و G حتی در روز چهارم پس از شروع علایم مثبت هستند، اما در هفته های دوم و سوم بیماری، سطوح بالاتری از آنتی‌بادی دیده می‌شود (۳۵-۳۴). با این حال، همان‌طور که در بررسی‌های انجام شده بر روی ۲۳ و ۸۵ بیمار نشان داده شده است (۳۷-۳۶)، پدیدار شدن IgM و IgG در تمام بیماران بین هفته‌های سوم و چهارم از ابتدای تظاهرات بالینی به طور قطعی اتفاق می‌افتد (۳۴). پس از آن، IgM شروع به کاهش می‌کند و در هفته‌ی ۵ به پایین‌ترین حد قابل تشخیص خود می‌رسد و در هفته‌ی ۷ به طور تقریبی از بین می‌رود؛ در حالی که IgG بعد از ۷ هفته نیز همچنان باقی می‌ماند.

در یک مطالعه بر روی ۱۴۰ بیمار، حساسیت تشخیصی بررسی همزمان PCR و IgM در تشخیص COVID-19، به ترتیب ۹۸/۶ درصد و ۵۱/۹ درصد بود (۳۸). در طول ۵/۵ روز اول از شروع علایم بالینی، روش PCR میزان مثبت بالاتر از IgM را نشان داد؛ در حالی که IgM بعد از روز پنجم دارای میزان مثبت بالاتر بود (جدول ۲) (۳۸).

جدول ۲. حساسیت روش‌های تشخیصی Corona virus disease-19 (COVID-19) در روزهای متفاوت از شروع علایم بالینی

منبع	روزهای بعد از شروع علایم (درصد)			آزمایش تشخیص SARS-CoV-2
	۱۵-۳۹	۸-۱۴	۱-۷	
(۳۵)	۴۵	۵۴	۶۷	RT-PCR
	۱۰۰	۹۰	۳۸	آنتی‌بادی تام
	۹۴	۷۳	۲۹	IgM
	۸۰	۵۴	۱۹	IgG

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
IgM: Immunoglobulin M

از سوی دیگر، آزمایش RT-PCR نوکلئیک اسید ویروس اگر چه به عنوان روش استانداردی برای تشخیص عفونت SARS-CoV-2 پذیرفته شده است، اما این روش علاوه بر وقت‌گیر بودن، هزینه‌بر است و میزان منفی کاذب آن، بالا گزارش شده است. بدین ترتیب، برای غربالگری جوامع با جمعیت‌های بالا و شناسایی سریع تعداد زیادی از بیماران آلوده و حاملین بدون علامت، به منظور جلوگیری از انتقال ویروس و اطمینان از معالجه ی به موقع بیماران، همچنان نیاز به یک روش آزمایش دقیق و سریع، وجود دارد. نتایج مطالعات قبلی، گویای قابلیت تشخیص و ارزیابی هم‌زمان آنتی بادی های IgM و IgG در برابر ویروس SARS-CoV-2 در خون انسان طی ۱۵ دقیقه می‌باشد که می‌تواند بیماران را در مراحل مختلف عفونت تشخیص دهد. آزمایش‌هایی که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه نوکلئوکپسید را تشخیص می‌دهند، حساس‌تر هستند (۳۴). از طرف دیگر، آنتی‌بادی تولید شده علیه پروتئین receptor-binding domain-S (RBD-S) که مسؤول اتصال به سلول‌های میزبان است، اختصاصی‌تر می‌باشد و انتظار می‌رود خاصیت نوترالیزان داشته باشد. بنابراین، استفاده از یک یا هر دو آنتی‌ژن برای تشخیص IgG و IgM منجر به حساسیت بالایی خواهد شد (۳۶). این قبیل روش ها، با توجه به کم هزینه بودن و سرعت عمل بالا، می توانند برای غربالگری سریع ناقلین SARS-CoV-2 افراد علامت دار یا بدون علامت و نیز در بیمارستان‌ها، درمانگاه‌ها و آزمایشگاه‌ها برای آزمایش جمعیت‌های زیاد مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

مهار اپیدمی بیماری کروناویروس جدید در جهان و ایران، عزم و همکاری عمومی و همه جانبه‌ای را می‌طلبد و این تنها با آموزش و جلب همکاری همگانی برای پیش‌گیری و کنترل عفونت امکان پذیر

است، اما برای آن دسته از افرادی که علایم اولیه را دارند، در مواجهه با بیماران با تشخیص قطعی و یا ساکن مناطق اپیدمیک و البته بیمارانی که به خاطر ظن به عفونت در بیمارستان بستری هستند، تشخیص سریع، حساس و ویژه‌ی عفونت برای اقدام به قرنطینه و درمان به موقع، امری ضروری است. تنها تشخیص ویروس‌شناسی موجود برای این بیماری، آزمایش RT-PCR است، اما شاخص‌های دیگری همچون HRCT ریه، بسیار با ارزش است. با توجه به وقت‌گیر بودن روش، حساسیت ناکافی، وجود تعداد ناکافی ارگانیسم در نمونه (به خصوص در بیماران بدون علامت یا علامت‌دار خفیف و یا مرحله‌ی ابتدایی بیماری) و در نتیجه، احتمال وجود نتایج منفی کاذب در آزمایش RT-PCR، قضاوت برای رد کردن بیماری COVID-19 تنها بر اساس یک بار نتیجه ی منفی RT-PCR، منطقی به نظر نمی رسد. در این شرایط، نمونه‌برداری از دستگاه تنفسی تحتانی و بررسی‌های مجدد با استفاده از روش RT-PCR و ارزیابی‌های هم‌زمان تغییرات الگوهای تصویربرداری در قفسه‌ی سینه در بیماری با سیر پیش‌رونده توصیه و تأکید می‌شود. CT ریه زودتر از RT-PCR مثبت می‌شود. برای برآورد سرولوژی و سایر متغیرهای آزمایشگاهی، پژوهش‌ها و شواهد بیشتری لازم است. به نظر می‌رسد در شرایط اپیدمی کنونی، روش‌های استاندارد طلایی ویرولوژیک همچنان ضروری است. همچنین، استفاده از روش‌های غربالگری سریع (Rapid tests) برای ارزیابی همگانی جمعیت‌ها مورد نیاز است

تشکر و قدردانی

این مقاله منبع حمایت مالی ندارد.

References

1. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet 2020; 395(10223): 497-506.
2. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases. Radiology 2020; 296(2): E32-E40.
3. World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected: interim guidance, 25 January 2020. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Atlanta, GA: CDC; 2021.
5. Guan Wj, Ni Zy, Hu Y, Liang Wh, Ou CQ, He JX, et al. clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. N Engl J Med 2020; 382(18): 1708-20.
6. National Health Commission of the People's Republic of China. Technical guidance for laboratory testing of 2019-nCoV infection (Third Edition). Biosaf Health 2020; 2(1): 3-5.
7. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19): Interim guidance, 12 February 2020. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.
8. Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, Zhou J, Dong X, et al. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. Lancet Gastroenterol Hepatol 2020; 5(5): 434-5.
9. World Health Organization. Surface sampling of coronavirus disease (COVID-19): A practical "how to" protocol for health care and public health professionals, 18 February 2020. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2020.
10. Yang Y, Yang M, Shen C, Wang F, Yuan J, Li J, et al. Laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. medRxiv. 2020.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Real-time RT-PCR Panel for detection 2019-novel coronavirus. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Viruses Branch, Division of Viral Diseases; 2020.
12. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. J Clin Microbiol 2020; 58(5): e00310-20.
13. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Clin Chem Lab Med 2020; 58(7): 1070-6.
14. Lin C, Xiang J, Yan M, Li H, Huang S, Shen C. Comparison of throat swabs and sputum specimens for viral nucleic acid detection in 52 cases of novel coronavirus (SARS-Cov-2)-infected pneumonia (COVID-19). Clin Chem Lab Med 2020; 58(7): 1089-94.
15. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA 2020; 323(18): 1843-4.
16. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. Clin Chem 2020; 66(7): 975-7.
17. Chung M, Bernheim A, Mei X, Zhang N, Huang M, Zeng X, et al. CT imaging features of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). Radiology 2020; 295(1): 202-7.
18. Xie X, Zhong Z, Zhao W, Zheng C, Wang F, Liu J. Chest CT for typical coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia: Relationship to negative RT-PCR testing. Radiology 2020; 296(2): E41-E45.

19. Han R, Huang L, Jiang H, Dong J, Peng H, Zhang D. Early clinical and CT manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia. AJR Am J Roentgenol 2020; 215(2): 338-43.
20. Lei J, Li J, Li X, Qi X. CT Imaging of the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia. Radiology 2020; 295(1): 18.
21. Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, et al. Time course of lung changes at chest CT during recovery from coronavirus disease 2019 (COVID-19). Radiology 2020; 295(3): 715-21.
22. Li Q, Ding X, Xia G, Geng Z, Chen F, Wang L, et al. A simple laboratory parameter facilitates early identification of COVID-19 patients. medRxiv. 2020.
23. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. Rev Med Virol 2020; 30(3): e2107.
24. Liu WJ, Zhao M, Liu K, Xu K, Wong G, Tan W, et al. T-cell immunity of SARS-CoV: Implications for vaccine development against MERS-CoV. Antiviral Res 2017; 137: 82-92.
25. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts severe illness patients with 2019 novel coronavirus in the early stage. medRxiv. 2020.
26. Lippi G, Plebani M. Procalcitonin in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. Clin Chim Acta 2020; 505: 190-1.
27. Lippi G, Plebani M, Henry BM. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. Clin Chim Acta 2020; 506: 145-8.
28. Rokni M, Ahmadikia K, Asghari S, Mashaei S, Hassanali F. Comparison of clinical, para-clinical and laboratory findings in survived and deceased patients with COVID-19: diagnostic role of inflammatory indications in determining the severity of illness. BMC Infect Dis 2020; 20(1): 869.
29. Lippi G, South AM, Henry BM. Electrolyte imbalances in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). Ann Clin Biochem 2020; 57(3): 262-5.
30. Huang I, Pranata R, Lim MA, Oehadian A, Alisjahbana B. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: A meta-analysis. Ther Adv Respir Dis 2020; 14: 1753466620937175.
31. Gao Y, Li T, Han M, Li X, Wu D, Xu Y, et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. J Med Virol 2020; 92(7): 791-6.
32. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. Emerg Microbes Infect 2020; 9(1): 747-56.
33. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: Implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect 2020; 9(1): 386-9.
34. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. JAMA 2020; 323(22): 2249-51.
35. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. Clin Infect Dis 2020; 71(16): 2027-34.
36. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: An observational cohort study. Lancet Infect Dis 2020; 20(5): 565-74.
37. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with coronavirus disease 2019. Clin Infect Dis 2020; 71(8): 1930-4.
38. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). Clin Infect Dis 2020; 71(15): 778-85.

DOI: *10.22122/jims.v39i611.13023* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 611, 3rd Week, April 2021**

Received: 03.05.2020 Accepted: 05.02.2021 Published: 19.04.2021

A Review on the Diagnostic Approaches of COVID-19 Infection; Features and Limitations

Kazem Ahmadikia[1], Shahram Mahmoudi[2], Fahimeh Hassanali[3], Mohsen Keshavarz[4], Hossein Mirhendi[5]

Review Article

Abstract

Detection of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in early stage is indispensible for outcome improvement and interruption of transmission chain. Clear understanding of the nature of the diagnostic tests for severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and their challenges, collecting the most diagnostically valuable specimen at the right time from the right anatomic site, and interpretation of their findings is important. This review scrutinizes current challenges and interpretation of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), as the reference method, loop-mediated isothermal amplification (LAMP), antibody and antigen detection, typical lung imaging characteristics and prominent abnormal changes in laboratory findings of patients with proven COVID-19, and describes how the results may vary over time. Bronchoalveolar lavage fluid and sputum specimens demonstrate the highest positive rates (93% and 72 %, respectively) in molecular diagnosis of COVID-19. Alternatively, repeated RT-PCR assays can be performed; as over time, it is an increase in the likelihood of the SARS-CoV-2 being present in the nasopharynx. Combining clinical evidence with results of chest computed tomography (CT) and RT-PCR can minimize the risk of diagnostic errors. Elevated levels of interleukin 6 (IL-6) and D-dimer are thought to be closely associated with the occurrence of severe COVID-19 in adults, and their combined detection can serve as early factors predicting the severity of COVID-19. Moreover, elevated acute phase proteins are associated with a poor outcome in COVID-19. Serological diagnosis also is an important tool to understand the extent of COVID-19 in the community, and to identify individuals, who are immune. Antibodies begin to increase from the second week of symptom onset.

Keywords: Betacoronavirus; COVID-19; Diagnosis; Pneumonia, viral

Citation: Ahmadikia K, Shahram Mahmoudi S, Fahimeh Hassanali F, Mohsen Keshavarz M, Mirhendi H. **A Review on the Diagnostic Approaches of COVID-19 Infection; Features and Limitations.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(611): 55-65.

1- PhD Candidate in Medical Mycology, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health AND Students Research Committee, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- PhD in Medical Mycology, Students' Scientific Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- MSc Student in Critical Care Nursing, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, The Persian Gulf Tropical Medicine Research Center, The Persian Gulf Biomedical Sciences Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

5- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Etesam Malekzadeh, Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: s.h.mirhendi@gmail.com