دانشگاه الزهرا (س)

معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی

گزارش علمی وضعیت بیماری کووید 19

روش های تشخیصی ویروس کرونا

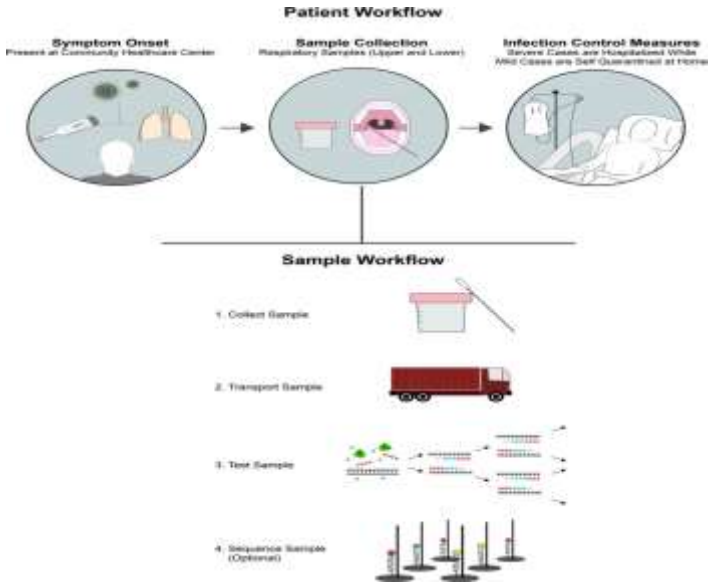
فرزانه قماش فروش*، نیما راد*، فاطمه فروتن*
(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری*)، عزت عسگرانی (دانشیار ژنتیک مولکولی، عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی)

دانشگاه الزهرا (س)
www.alzahra.ac.ir

بیماری cronavirus 2019 (COVID-19) در دسامبر سال 2019 در استان هوبی ، چین کشف شد. در آن زمان تعدادی از بیماران با علائمی از قبیل تب ، سرفه ، تنگی نفس و نشانه‌های دیگر بستری شدند. بیماران با استفاده از توموگرافی کامپیوتری (CT[1]) بررسی می‌شدند و نتایج آن نسبت به تصاویر مربوط به ریه‌های سالم دارای لکه‌های متنوع (متراکم ، پراکنده و مخلوط شده) بودند. در ابتدا بر اساس این تصاویر گمان می‌رفت که بیماران دچار ذات‌الریه شده‌اند. سپس با تجزیه‌وتحلیل اسید نوکلئیک اضافی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (rtPCR[2]) از نمونه‌های پاتوژن شناخته‌شده منجر به نتایج منفی شد که نشان می‌داد که علت وجود این علائم نمی‌تواند بیماری ذات‌الریه باشد. کرونا ویروس جدید به SARS-CoV-2 و پاتوژن عامل آن به COVID-19 نام‌گذاری شد. گمان می‌رود که تعداد کل عفونت‌های گزارش‌شده COVID-19 نسبت به آمار واقعی آن به دلیل این‌که بسیاری از موارد خفیف و بدون علامت هستند یا شناسایی مناسب صورت نمی‌گیرد متفاوت باشد.

SARS-CoV-2 می‌تواند از انسان به انسان منتقل شود. برخی از بیماران می‌توانند بدون علائم باشند.این علائم ممکن است مشابه بیماران مبتلابه آنفولانزا یا سرماخوردگی باشند. در این مرحله تصور می‌شود که به‌احتمال‌زیاد انتقال از طریق تماس مستقیم و پخش قطرات تنفسی صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ای که اخیراً در ارتباط با آئروسل‌ها و ثبات سطح SARS – CoV2 صورت گرفته است نشان می‌دهد که ویروس می‌تواند در آئروسل‌های به‌اندازه کمتر از 5 میکرومتر برای حداقل تا ۳ ساعت حضورداشته باشد و همچنین وجود ویروس در پلاستیک و فولاد ضدزنگ بیشتر از مس و مقوا است.

فعالیت های زیادی برای ساخت واکسن و دارو در حال انجام است ، اما در حال حاضر هیچ دارویی و یا واکسنی برای درمان بیماران COVID-19 به‌طور رسمی تصویب نشده است. تشخیص این بیماری می‌تواند نقش مهمی در مهار COVID-19 داشته باشد زیرا که اجرای سریع اقدامات کنترلی که باعث جلوگیری از گسترش انتشار آن از طریق شناسایی افراد بیمار ، جداسازی و ردیابی افراد ناقل می‌شوند (افرادی که ممکن است با بیمار آلوده در ارتباط باشند) را ممکن می‌سازد. سازوکار روش تشخیصی برای COVID-19 به‌طور شماتیک در شکل 1 تشریح شده است.



نمونه‌ای از سازوکار تشخیصی بیمار و نمونه‌گیری در هنگام شیوع COVID-19. بیماران در یک مرکز درمانی برای triage حضور دارند. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در صورت امکان، در محل مورد آزمایش قرار می‌گیرند و یا برای آزمایش و ترتیب مولکولی انتقال می‌یابند. سپس فعالیت‌های درمانی و نگهداری بر روی بیماران انجام می شود.

1- Computed Tomography
2- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

در این گزارش کوتاه، ما به ارائه ابزارهای شناسایی و نتایج بالینی برای تشخیص بیماری‌های عفونی‌شده با SARS – CoV2 و همچنین از روش‌های تشخیصی نوین، و فن‌آوری‌های نظارتی برای جلوگیری از گسترش بیماری خواهیم پرداخت.

خصوصیات بیولوژیکی SARS-CoV-2

SARS - CoV - 2 اولین بار از نمونه‌های بیمار در ووهان، چین شناسایی شدند. سلول‌های اپی تلیال تنفسی انسانی همراه با این ویروس از مایع bal جداشده از بیماران کشت شدند. سوپرناتانت از سلول‌هایی که آسیب‌دیده یا کشته شدند جمع‌آوری شد و با میکروسکوپ الکترونی انتقالی با اثر منفی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت(شکل 2) تصاویر نشان داد که این ویروس از قطر 60 تا 140 نانومتر برخوردار است که دارای یک پوشش با Spikes پروتئینی و دارای ماده ژنتیکی است. ساختار کلی شبیه سایر ویروس‌های خانواده Coronaviridae به نظر می‌رسد.

آزمایش‌های تشخیصی فعلی برای COVID-19

علائم بیان‌شده توسط بیماران COVID-19 غیراختصاصی است و نمی‌توان از آن‌ها برای تشخیص دقیق استفاده کرد. بسیاری از این علائم(تب, خلط, تنگی نفس) می‌تواند با سایر عفونت‌های تنفسی همراه باشد. آزمایش اسید نوکلئیک و CT اسکن برای تشخیص و غربالگری COVID-19 استفاده‌شده است. که این فن‌ها برای تشخیص دقیق‌تر و مناسب‌تر هستند زیرا می‌توانند پاتوژن های خاص را هدف قرار داده و شناسایی کنند. بر اساس گزارش مشترک سازمان بهداشت جهانی (WHO) و چین ، 104 گونه ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از روش توالی یابی Illumina و nonpore Oxford از اواخر دسامبر 2019 تا اواسط فوریه سال 2020 جدا و شناسایی شدند.

آزمایش اسید نوکلئیک

طراحی آزمایش اسید نوکلئیک برای SARS-CoV-2

تعدادی کیت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس (RT-PCR) برای شناسایی ژنتیکی SARS-CoV-2 طراحی‌شده استRT-PCR شامل رونویسی معکوس از SARS-CoV-2 RNA و تولید رشته‌های DNA مکمل (cDNA) و پس‌ازآن تکثیر مناطق خاصی از cDNA است. فرآیند طراحی تشخیص شامل یک مرحله ترازی توالی و طراحی پرایمر و یک مرحله‌ی بهینه‌سازی آزمایش است. در این میان ژنوم SARS مربوط به ویروس دارای سه ناحیه است که توالی‌های آن حفاظت‌شده هستند، یک ژن RdRP (ژن RNA polymerase) در محدوده چهارچوب خوانش باز ORF1ab، دوم ژن E (ژن پروتئین پوششی) و سومین ژن N (ژن پروتئین nucleocapsid) است

بعد از طراحی آغازگرها و پروب ها ، مرحله بعدی شامل بهینه‌سازی شرایط سنجش (به‌عنوان‌مثال ، شرایط معرف ، زمان انکوباسیون و دما) و به دنبال آن آزمایش PCR است. RT-PCR را می‌توان با روش یک مرحله‌ای یا دومرحله‌ای انجام داد. درروش یک مرحله‌ای رونویسی معکوس و محصول PCR در یک واکنش انجام می‌شوند. این فرمت سنجش می‌تواند نتایج سریع و قابل تکرار را برای تجزیه‌وتحلیل باقدرت بالا ارائه دهد. درروش دومرحله‌ای ، واکنش به‌صورت پی‌درپی در لوله‌های جداگانه انجام می‌شود. این فرمت سنجش حساس‌تر از روش یک مرحله‌ای است ، اما زمان‌برتر است و نیاز به بهینه‌سازی پارامترهای اضافی دارد. سرانجام ، برای اطمینان از قابلیت سنجش و شناسایی خطاهای آزمایشی ، باید کنترل‌ها به‌دقت انتخاب شوند.

سازوکار آزمایش اسید نوکلئیک برای SARS-CoV-2

تاکنون حداقل 11 روش مبتنی بر اسید نوکلئیک و هشت کیت تشخیص آنتی‌بادی در چین توسط اداره ملی داروهای پزشکی (NMPA) برای شناسایی SARS-CoV-2 تأییدشده است. بااین‌حال ، RT-PCR متداول‌ترین روش برای تشخیص COVID-19 با استفاده از نمونه‌های تنفسی است. نمونه‌گیری از قسمت‌های تنفسی فوقانی بیشتر توصیه می‌شود، اگرچه برای بیمارانی که دارای سرفه مولد هستند ، نمونه‌های تنفسی تحتانی توصیه می‌شود. نمونه‌های دستگاه تنفسی فوقانی شامل سواب های بینیای حلقی[1] ، سواب های دهانی و حلق و بینی و آسپیرات های بینی[2] است. نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی شامل خلط ، مایع BAL و آسپیرات های نایی است. همچنین لود ویروسی که برای تشخیص به‌روزهای بعد از شروع بیماری بستگی دارد. در 14 روز اول پس از شروع ، SARS-CoV-2 قابل‌اطمینان‌ترین نمونه‌ها در خلط و به دنبال آن سواب های بینی هستند ، درحالی‌که سواب های گلو 8 روز پس از شروع علائم غیرقابل‌اعتماد بودند. نکته قابل‌توجه این است که با توجه به تغییرات در لود ویروسی, نتیجه آن می‌تواند از نمونه‌های تنفسی منفی باشد اما بیماری وجود داشته باشد. این منفی‌ها کاذب می‌تواند ناشی از فن‌های نمونه‌گیری نادرست ، لود ویروسی پایین یا جهش در ژنوم ویروسی باشد.

توموگرافی کامپیوتری

به دلیل کمبود کیت و وجود منفی کاذب در RT-PCR ، چینی‌ها به‌طور موقت از CT اسکن به‌عنوان یک تشخیص بالینی برای COVID-19 استفاده کردند. CT اسکن قفسه سینه بدون شکاف و جراحی است که شامل اندازه‌گیری‌هایی با اشعه ایکس در زوایای مختلف سینه بیمار برای ایجاد تصاویر مقطعی است. تصاویر توسط رادیولوژیست‌ها موردبررسی قرار می‌گیرند تا به دنبال ویژگی‌های غیرطبیعی باشند که می‌تواند منجر به تشخیص شود. در چندین مطالعه نشان داده‌شده است که بر اساس این ویژگی‌های تصویربرداری ، سی‌تی‌اسکن از حساسیت بالاتری (98-86٪) برخوردار بوده و در مقایسه با RT-PCR دارای میزان منفی کاذب کمتر بوده است. نکته اصلی استفاده از CT برای COVID - 19 این است که اختصاصیت آن پایین (۲۵ ٪) است زیرا دارای شباهت‌های تصویری با ویروس ذات‌الریه است.

COVID-19 در حال حاضر با RT-PCR تشخیص داده می‌شود و با سی‌تی‌اسکن معاینه انجام می‌گیرد ، اما هر فنی اشکالات خاص خود را دارد. سه محدودیت در ارتباط با استفاده از RT-PCR وجود دارد اول ، کم بودن کیت‌های معرف دوم ، بیمارستان‌های خارج از شهرهای بزرگ فاقد زیرساخت‌ها برای انجام PCR هستند و در آخر، تشخیص SARS-CoV-2 با استفاده از RT-PCR به‌دقت در جمع‌آوری نمونه‌ها بستگی دارد. اگر یک بیمار بدون علامت به SARS-CoV-2 آلوده‌شده باشد اما بهبودیافته باشد ، PCR عفونت قبلی را شناسایی نمی‌کند و اقدامات کنترل اعمال نمی‌شود. در همین حال ، دستگاه‌های CT گران‌قیمت هستند ، نیاز به تخصص فنی دارند و به‌طور خاص نمی‌توانند COVID-19 را تشخیص دهند. برای رفع این نواقص ، باید سایر فن‌آوری‌ها به کمک تشخیص SARS-CoV-2 بیایند.

1- Nasopharyngeal
2- Nasal aspirates

سنجش‌های تشخیصی نوین برای COVID-19

سنجش پروتئین

آنتی‌ژن‌های پروتئین ویروسی و آنتی‌بادی‌هایی که در پاسخ به عفونت SARS-CoV-2 ایجاد می‌شوند می‌توانند برای تشخیص COVID-19 استفاده شوند. تغییر در لودهای ویروس در طول عفونت ممکن است تشخیص پروتئین‌های ویروسی را دشوار کند. در مقابل، آنتی‌بادی تولیدشده در واکنش به پروتئین‌های ویروسی ممکن است یک پنجره بزرگ‌تر زمانی را برای تشخیص غیرمستقیم SARS – CoV-2 فراهم کند. آزمایش آنتی‌بادی می‌تواند به‌ویژه برای مراقبت بر COVID-19 مفید باشد. یک چالش بالقوه با ایجاد آزمون‌های دقیق سرولوژیکی شامل واکنش متقابل بالقوه آنتی‌بادی‌های SARS-CoV-2 با آنتی‌بادی‌های تولیدشده در مقابل سایر ویروس‌های کرونا است. در حال حاضر ، آزمایش‌های سرولوژیکی (نمونه‌گیری از خون برای آنتی‌بادی‌های خاص) در حال انجام هستند. در مطالعه‌ای ایمونوگلوبولین M و G ازسرم انسانی بیماران COVID-19 با استفاده از یک روش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA[1]) شناسایی شد. سپس از پروتئین نوکلوکپسید SARS-CoV-2 Rp3 استفاده کردند که دارای 90٪ همولوژی توالی اسیدآمینه با سایر ویروس‌های مرتبط با SARS است.

آزمون نقطه مراقبت[2]

از آزمایش‌های نقطه مراقبت برای تشخیص بیماران بدون ارسال نمونه به مراکز متمرکز استفاده می‌شود و بدین ترتیب مجموعه‌های بدون زیرساخت‌های آزمایشگاهی امکان شناسایی بیماران آلوده را فراهم می‌کنند. تشخیص آنتی‌ژن جریان جانبی[3] برای SARS-CoV-2 یکی از روش‌های مراقبت درحال‌توسعه برای تشخیص COVID-19 است. در سنجش‌های جریان جانبی تجاری ، یک نوار غشایی مانند کاغذ با دو خط پوشیده شده است، ترکیبات نانو ذرات طلا-آنتی بادی در یک خط و آنتی‌بادی‌های اتصالی در خط دوم وجود دارند. نمونه بیمار (به‌عنوان‌مثال خون و ادرار) روی غشاء قرار می‌گیرد و پروتئین‌ها با عمل موینگی در سراسر نوار کشیده می‌شوند. با عبور از خط اول ، آنتی‌ژن‌ها به ترکیبات نانو ذرات طلا و آنتی‌بادی متصل می‌شوند و این کمپلکس از طریق غشاء جریان می‌یابد. با رسیدن به خط دوم ، این کمپلکس توسط آنتی‌بادی‌های اتصالی بی‌حرکت می‌شود و یک خط قرمز یا آبی قابل‌مشاهده ایجاد می‌کنند. نانو ذرات طلا جداگانه به رنگ قرمز است ، اما محلول حاوی نانو ذرات طلا خوشه‌ای به دلیل اتصال باند پلاسمون به رنگ آبی است. سنجش جریان جانبی حساسیت بالینی ، اختصاصیت و دقت 57٪ ، 100٪ و 69٪ برای IgM و ٪81 ، ٪100 و 86٪ برای IgG را نشان داده است. سنجشی که هر دو آنتی‌بادی IgM و IgG را شناسایی می‌کند حساسیت بالینی ۹۸ ٪ را نشان می‌دهد.

در جدول 1 برخی از فنّاوری‌های تشخیصی را توصیف کردیم که امکان‌پذیری بالینی دارند. این‌ها فهرستی گسترده‌تر از فن‌آوری‌های نوظهور است که می‌تواند برای شناسایی SARS-CoV-2 سازگار شوند. چنین رویکردهایی در مراحل اولیه توسعه هستند و نمی‌توان از آن‌ها برای تشخیص سریع COVID-19 استفاده کرد.

1- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
2- Point-of-Care Testing
3- Lateral Flow Test

جدول 1- فناوری های نوین در حالی توسعه برای تشخیص SARS-COV-19

platform	biomarker	POC (Y/N)	type of technology	how it works	types of clinical sample	clinical sample tested
CRISPR[109]	nudeic acid	Y	RPA	PCR, perform CRISPR/Ca9-mediated lateral flow nucleic assay (CASLFA)	serum	110
CRISPR[68]	nudeic acid	Y	RT-RPA	RPA, SHERLOCK multiplexed signal detection *via* fluorescence	nasopharyngeal swabs	384
LAMP[110]	nudeic acid	N	LAMP	isothermal DNA synthesis using self-recurring strand displacement reactions; positive detection leads to increased sample turbidity	throat swabs	53
RPA[111]	nudeic acid	N	RPA	forward and reverse primars blind to DNA and amplify strands at 37 °C	fecal and nasal swabs	30
NASBA[112]	nudeic acid	N	real-time NASBA	transcription-based amplification for RNA targets	nasal swabs	138
RCA[113]	nudeic acid	N	rolling circle amplification	DNA polymerase used to extend a circular primer and repeatedly replicate the sequence	serum	7
RT-LAMP[114]	nudeic acid	N	LAMP	reverse transcriptase LAMP reaction for RNA targets	nasopharyngeal aspirates	59
smartphone dongle[81]	protein	Y	ELISA	microfluidics-based cassette operating an ELISA	blood	96
quantum dot barcode[63]	nudeic acid	Y	barcode	multiplexed quantum beads capture viral DNA for RPA detection	serum	72
magnetic bead[115]	nudeic acid	N	magnetic	magnetic beads isolate bacteria for PCR detection	stool	17
paramagnetic bead[116]	protein	N	magnetic biosensor	magnetic separation of protein targets	serum	12
magnetic bead isolation[117]	whole bacteria	N	magnetic separation	magnetic isolaation of bacteria	synovia	12
ELISA[118]	protein	N	ELISA	enzymatic reaction to produce colored product in presence of target	serum	30
SIMOA[119]	protein	N	digital ELISA	digital readout of colored product by enzymatic reaction in presence of target	serum	30
biobarcode assay[120]	protein	N	DNA-assisted immunoassay	protein signal is indirectly detected by amplifying DNA conjugated to gold nanoparticle	serum	18
rapid antigen test[121]	protein	Y	lateral flow	gold-coated antibodies produce colorimetric signal on paper in presence of target	serum	117

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز

در دسترس بودن فن‌آوری‌های تشخیصی مستقر (مرحله 3 ، شکل 3) محققان را قادر ساخته است تا در طراحی تشخیص COVID-19 بتوانند از آن‌ها کمک بگیرند. چنین فناوری‌هایی برای بهینه‌سازی، چندین دهه به طول می‌انجامد ، اما اکنون آن‌ها نقش مهمی در شناسایی و مدیریت گسترش COVID-19 ایفا می‌کنند. تجربیات قبلی در مورد شیوع SARS در سال 2002 ، در توسعه شناسایی COVID-19 بسیار کمک کرده است. در آن زمان شناسایی SARS-CoV حدوداً 5 ماه طول کشید اما فن‌های مشابه برای شناسایی SARS-CoV-2 تنها در 3 هفته موجب شناسایی شد. شناسایی سریع و تعیین توالی SARS-CoV-2 باعث پیشرفت سریع آزمایش‌های اسید نوکلئیک شده است. این رویکردها خط اول دفاع در برابر شیوع را فراهم می‌کنند. مرحله بعدی که روی آن کار می‌شود ، ایجاد آزمایش‌های سرولوژیکی است زیرا اجرای آن‌ها ساده‌تر است و می‌توانند آزمایش‌های اسید نوکلئیک را برای تشخیص عفونت COVID-19 تکمیل کنند. درنتیجه ، تشخیص بخش مهمی از جعبه‌ابزار برای مقابله با شیوع بیماری‌ها است زیرا می‌تواند به کارکنان درمانی این امکان را دهد تا امکانات و تلاش‌های خود را برای بیماران همچون مبتلایان به COVID-19 هدایت کنند. این فرایند می‌تواند شیوع پاتوژن های عفونی را مهار کرده و مرگ‌ومیر را کاهش دهد.