

آزمایش های سرولوژیک کووید-۱۹ از انکار تا واقعیت





انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

چکیده

در پاسخ به شیوع بیماری کووید-۱۹ (COVID-19)^۱، ناشی از ویروس SARS-CoV-2^۲، آزمایش های متعددی جهت تشخیص بیماری حاد، ردیابی تماس، تشخیص عفونت های بدون علامت و ارزیابی ایمنی جمعی مورد نیاز است. در حالی که PCR^۳ آزمایش استاندارد در بیماری حاد است، آزمایش های سرولوژیک با توجه به شیوع گسترده بیماری، جهت رفع نیازهای تشخیصی مورد توجه قرار گرفته و توسعه یافته اند. برخلاف آزمایش PCR^۳ که ویژگی بالایی دارد، واکنش متقاطع یک چالش بزرگ برای آزمایش آنتی بادی COVID-19^۴ است. با توجه به این که ۶ کرونا ویروس دیگر که انسان را آلوده می کنند نیز وجود دارد، توسعه روش های سرولوژیک با ویژگی بالا در شناسایی بیماران آلوده از اهمیت خاصی برخوردار خواهد بود.

آزمایش های تشخیصی آزمایشگاهی نقش مهمی را برای واکنش در مقابل شیوع بیماری های عفونی ایفا می کنند، که این موضوع در مورد COVID-19^۴ نیز صادق است. در طی چند روز پس از انتشار ژنوم SARS-CoV-2^۲، آزمایش های PCR^۳ به سرعت در خط مقدم برای تشخیص بیماران مبتلا به پنومونی حاد در چین و در سطح جهانی به مرحله اجرا در آمد. با گسترش بیماری واضح بود که آزمایش PCR^۳ به تنهایی نمی تواند پاسخگوی نیازهای این بیماری مانند ردیابی تماس گذشته نگر، بررسی میزان بیماران بدون علامت و ارزیابی ایمنی جمعی باشد.

با توجه به این که در سایر کشورهای جهان از آزمایش های سرولوژیک در ردیابی تماس، مطالعات سرواپیدمیولوژیک و برنامه ریزی و تعیین استراتژی های مختلف در کنترل بیماری کووید-۱۹^۵ استفاده می کنند، متأسفانه اظهار نظرهای مختلفی در مورد استفاده و کیفیت آزمایش های سرولوژیک در فضای مجازی دیده شد که عمدتاً مبتنی بر اطلاعات اندک در ابتدای تولید کیت های سرولوژی و همزمانی آن با شیوع پایین بیماری بود.

در اینجا به مرور اجمالی استفاده از استراتژی های مختلف جهت افزایش حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی کنندگی مثبت در آزمایش های سرولوژیک پرداخته و تاثیر عوامل مختلف را بر روی آن ها مورد بررسی قرار می دهیم.

دانشمندان تعداد زیادی از سنجش های آنتی بادی را توسعه داده اند و اکنون بسیاری از این آزمایش ها به صورت تجاری در دسترس هستند. اگر چه هنوز هیچ یک از این سنجش ها به طور کامل تأیید نشده ولی، در حالی که FDA^۴ بر لزوم اعتبار سنجی بیشتر تأکید می کند، مجوز استفاده اضطراری (EUA)^۵ را برای برخی آزمایش ها صادر کرده

¹ Coronavirus disease 2019

² Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2

³ Polymerase Chain Reaction

⁴ Food and Drug Administration

⁵ Emergency Use Authorization



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

است. چرا که استفاده گسترده از آزمایش های تایید نشده می تواند منجر به سیاست هایی شود که به جای این که همه گیری فعلی SARS-CoV-2 را کنترل کند، آن را تشدید نماید.

کلمات کلیدی: آزمایش های سرولوژیک، کووید-۱۹، آنتی ژن اسپایک، آنتی ژن نوکلئوکپسید، واکنش متقاطع، الگوریتم متعامد (ارتوگونال)

مقدمه

سندرم تنفسی شدید حاد کروناویروس ۲ (SARS-CoV-2) و پاندمی حاصل از آن، از چالش های تشخیصی مهم به شمار می رود. کاربرد اصلی آزمایش سرولوژی، شناسایی افرادی است که قبلا به SARS-CoV-2 مبتلا شده اند. از این دانش می توان برای هدایت مطالعات اپیدمیولوژیک و شیوع سرمی و همچنین تسهیل ردیابی تماس استفاده کرد. همچنین ممکن است آزمایش های سرولوژی برای شناسایی اهدا کنندگان احتمالی پلاسماي خون و ارزیابی پاسخ ایمنی نسبت به واکسن ها مورد استفاده قرار گیرد و در نهایت، امکان استفاده از آزمایش های سرولوژیک در تشخیص بیماران علامت دار یا بدون علامت COVID-19 که RT-PCR منفی بوده و یا این آزمایش را انجام نداده باشند، وجود دارد.

انجام آزمایش های سرولوژیک با کیت های تایید شده، می تواند در شناسایی افرادی که ممکن است به درمان نیاز داشته یا برای پیشگیری از گسترش عفونت، باید خود را ایزوله نمایند، کمک کننده باشد. عدم تشخیص افراد مبتلا به کووید-۱۹ در صورت وجود ابتلا (نتیجه منفی کاذب)، ممکن است باعث به تعویق افتادن درمان شده و همچنین خطر گسترش بیشتر عفونت را به دیگران به همراه داشته باشد. شناسایی نادرست کووید-۱۹ در صورت عدم وجود بیماری (نتیجه مثبت کاذب) ممکن است منجر به انجام آزمایش بیشتر، درمان و جدا سازی غیرضروری شخص بیمار شود. شناسایی صحیح افرادی که قبلا کووید-۱۹ داشته اند، در اندازه گیری گسترش بیماری، ارزیابی موفقیت جداسازی و به طور بالقوه در شناسایی افراد ایمن اهمیت خاصی دارد.

مسئله مهم این است که با انتخاب یک روش با ویژگی بالا و همچنین با آزمایش جمعیت ها و افرادی که دارای احتمال بالایی مبنی بر آلودگی قبلی با SARS-CoV-2 (احتمال پیش آزمون بالا) دارند، نتایج آزمایش مثبت کاذب



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

را به حداقل برسانیم. روش دیگر استفاده از الگوریتم متعامد^۶ است. بدین معنی که وقتی ارزش پیشگویی کننده مثبت یک آزمون واحد کم است از دو آزمایش مستقل برای افزایش ارزش پیش بینی کنندگی آزمایش استفاده نماییم.

زمان مثبت شدن آزمایش های سرولوژیک

یکی از مواردی که موجب می شود آزمایش های سرولوژیک زیر سوال قرار گیرند نتایج منفی آن در بیمارانی است که علائم بالینی یا رادیولوژی مثبت دارند. به نظر می رسد در بیشتر موارد این نتایج منفی کاذب به دلیل درخواست آزمایش در زمان نامناسب (عمدتا کمتر از یک هفته از شروع بیماری) باشد.

مطالعات نشان می دهند که سروکانونورژن بیماری کووید-۱۹ بسیار شبیه سایر عفونت های حاد ویروسی است بدین معنی که با به حداکثر رسیدن غلظت IgM غلظت IgG شروع به افزایش می کند. با این حال مطالعات نشان دادند که افزایش تیتراژ IgM و IgG نسبت به سایر ویروس های تنفسی کندتر بوده که احتمالا بیانگر پاتولوژی نسبتا هتروژن این ویروس است.

مورد دیگری که در برخی مقالات به آن استناد شده این است که سروکانونورژن در بیماران کووید-۱۹ ممکن است به صورت سروکانونورژن معمول (تولید IgM و سپس IgG) سروکانونورژن همزمان (تولید همزمان IgM و IgG) و سروکانونورژن معکوس (تولید IgG و سپس IgM) باشد و این موضوع می تواند تفسیر آزمایش های سرولوژیک را پیچیده نماید. از طرفی در ۲-۳ درصد بیماران ممکن است پاسخ ایمنی ایجاد نشود (non responder) و یا دیر ایجاد شود (late responder) که باید مورد توجه همکاران گرامی قرار گیرد.

زمان درخواست و انجام آزمایش های سرولوژیک بسیار مهم بوده و اگر از آن ها در زمان مناسب استفاده نشود جواب های قابل قبولی حاصل نمی گردد. در صورت امکان به خصوص در شرایطی که افراد علائم بالینی کمتری را نشان می دهند باید تجزیه و تحلیل داده ها ادامه یافته و بیماران را در مدت زمان طولانی تری مورد بررسی قرار داد.

در یک مطالعه کوهورت نتایج تجمع شده با استفاده از نمونه ۸۵۲۶ بیمار مبتلا به بیماری کووید-۱۹ و استفاده از روش های سرولوژیک کمی لومینسانس، الایزا و روش جریان جانبی (LFIA) برای اندازه گیری IgA, IgM, IgG، آنتی بادی های توتال و IgG/IgM نشان داد که همگی طی هفته اول شروع علائم بیماری، حساسیت پائینی دارند

^۶Orthogonal algorithm

انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

همگی کمتر از ۳۰٪، در هفته دوم حساسیت آزمایش‌ها افزایش یافته و در هفته سوم به بالاترین مقدار خود می‌رسند.

حساسیت ترکیبی IgG/IgM به ترتیب در:

هفته اول: ۱ تا ۷ روز بعد از شروع علائم معادل ۳۰٪ (۲۱/۴ تا ۴۰/۷ با محدوده اطمینان ۹۵٪)

هفته دوم: ۸ تا ۱۴ روز بعد از شروع علائم معادل ۷۲٪ (۶۳/۵ تا ۷۹/۵ با محدوده اطمینان ۹۵٪)

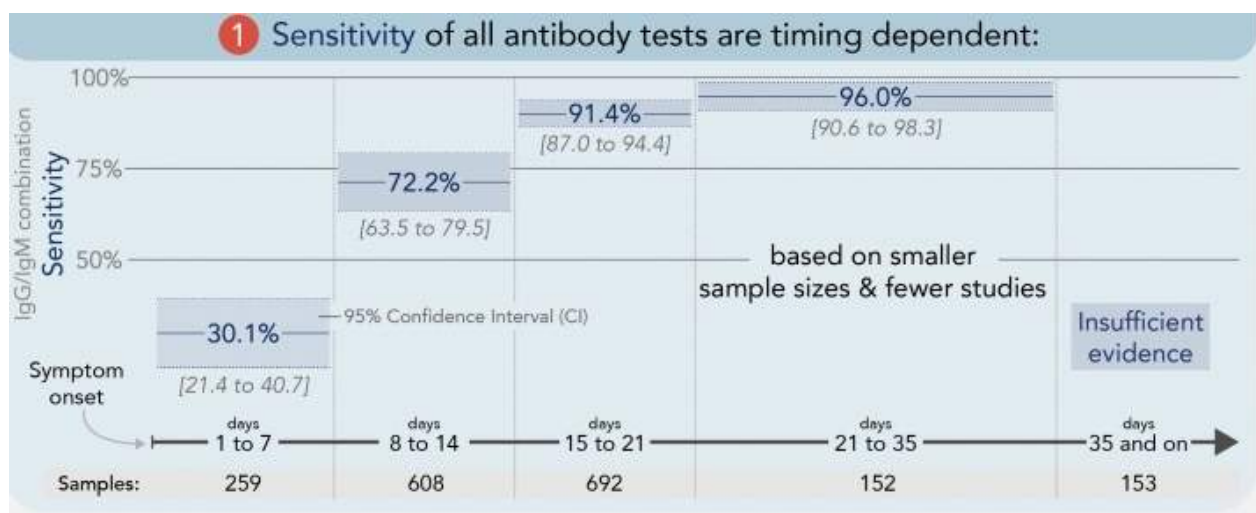
هفته سوم: ۱۵ تا ۲۱ روز بعد از شروع علائم معادل ۹۱٪ (۸۷/۰ تا ۹۴/۴ با محدوده اطمینان ۹۵٪) بود.

برآورد برای بیش از سه هفته، براساس حجم کمتری از نمونه و مطالعات بنا شده بودند.

هفته های چهارم و پنجم: برای روزهای ۲۱ تا ۳۵، حساسیت های ترکیبی IgG/IgM معادل ۹۶٪ (۹۰/۶ تا ۹۸/۳ با محدوده اطمینان ۹۵٪) بودند.

مطالعات کافی برای تخمین حساسیت آزمایش‌ها برای بیش از ۳۵ روز از شروع علائم وجود نداشت.

ویژگی (ارائه شده در ۳۵ مطالعه) برای کلیه آنتی بادی‌ها، بیشتر از ۹۸٪ بوده و در محدوده مورد انتظاری است که به طور معمول رخ می‌دهد.



در یک مطالعه دیگر کینتیک پاسخ های IgM و IgG اختصاصی ضد آنتی ژن های N و S در بیماران مبتلا به COVID-19 پس از شروع علائم مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه ۱۳۰ نمونه خون از ۳۸ بیمار مبتلا به COVID-19 مورد آزمایش قرار گرفت و بررسی‌ها نشان داد که:



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

- با اندازه گیری همزمان آنتی بادی های S-IgM، N-IgG، S-IgG و N-IgG می توان تا ۷۵ درصد عفونت را در هفته اول تشخیص داد.

- اندازه گیری همزمان N-IgM + N-IgG یا N-IgG + S-IgG می تواند تا ۹۴/۷ درصد عفونت را در هفته دوم تشخیص دهد.

- در هفته سوم پس از شروع علائم، میزان مثبت شدن آن برای N-IgG و S-IgG به ۱۰۰٪ رسید. در مقابل، درصد موارد مثبت برای N-IgM و S-IgM در برخی از بیماران در نتیجه سوئیچ ایزوتایپ Igm به IgG کاهش می یابد، که ممکن است به تولید آنتی بادی های مؤثرتری که می توانند از عفونت و ویروسی جلوگیری کنند، کمک کند.

انواع روش های تشخیص آنتی بادی

اساس آزمایش سرولوژی COVID-19 بر پایه اتصال آنتی بادی ها به آنتی ژن های اختصاصی SARS-CoV-2 می باشد. اساس روش های مختلف سرولوژی کووید -۱۹ شامل سنجش های جریان جانبی^۷، الایزا^۸ و کمی لومینسانس^۹ است. این سنجش ها در نحوه شناسایی اتصال آنتی بادی-آنتی ژن و نوع آنتی ژن به کار رفته با هم متفاوتند. اگر بیمار در برابر SARS-CoV-2 آنتی بادی هایی ایجاد کرده باشد، آنتی بادی های مربوطه آنتی ژن ها را تشخیص داده و به آن متصل می شوند و این نشانه قرار گرفتن در معرض SARS-CoV-2 است.

نوع آنتی ژن به کار رفته و روش انجام آزمایش

تفسیر دقیق آزمایش های سرولوژی به ویژگی آنتی ژن آن بستگی دارد. آنتی ژن ها می توانند پروتئین، پلی ساکراید یا لیپید باشند، اما اگر ویژگی بالایی برای عامل عفونت زانداشته باشند، احتمال واکنش متقاطع افزایش یافته و اطمینان از نتایج به دست آمده کاهش می یابد. آنتی ژن های ویروسی زیر برای تشخیص آنتی بادی های SARS-CoV-2 مورد استفاده قرار می گیرد.

دو آنتی ژن مهم ویروس SARS-CoV-2 که علیه آن ها آنتی بادی ها تولید می شود، گلیکوپروتئین اسپایک (S) و فسفو پروتئین نوکلئوکسپید (N) هستند. در حالی که پروتئین S برای ورود ویروس به سلول میزبان ضروری است و در سطح ویروسی وجود دارد، پروتئین N یک پروتئین ایمنی زای بسیار قوی است که با RNA ویروسی همراه می باشد.

⁷ Lateral flow Immunochromatographic assay(LFIA)

⁸ Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

⁹ Chemiluminescence Immuno Assay(CIA)



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

اشکال متعدد پروتئین S مانند S کامل (S_1+S_2)، زیر واحد S_1 یا دامنه اتصال گیرنده (RBD) به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار می گیرند. زیر واحد S_2 ، که شامل مناطق حفاظت شده بین کرونا ویروس هاست، ویژگی کمتری از RBD دارد.

پروتئین نوکلئوکپسید (پروتئین N)¹⁰: پروتئینی است که به RNA متصل شده و نقش ساختاری و غیر ساختاری را در عفونت SARS-CoV-2 ایفا می کند. داده ها حاکی از آن است که این آنتی ژن نقش مهمی در پاتوژنز بیماری دارد.

پروتئین اسپایک (پروتئین های S)¹¹: پروتئین های سطحی قارچ مانند منحصر به فردی هستند که به سلول های میزبان متصل شده و ورود ویروس را تسهیل می کنند. هر مونومر پروتئین S حاوی دو زیر واحد S_1 و S_2 است که به ترتیب اتصال و همجوشی غشایی را تسهیل می کنند. زیر واحد های S_1 و S_2 ممکن است به صورت جداگانه یا به صورت کامل به عنوان آنتی ژن برای آزمایش سرولوژیک استفاده شوند.

دامنه اتصال گیرنده یا RBD¹²: بخشی از پروتئین S_1 است که به آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE_2)، که گیرنده SARS-CoV-2 است متصل می شود.

آنتی ژن مورد استفاده در روش های الایزا واکنش متقاطع و ویژگی آن را تعیین می کند. آنتی ژن N در بین کرونا ویروس ها بیشتر از (S)، و در آنتی ژن های اسپایک، RBD بیشتر از S_1 یا S کامل (S_1, S_2) محافظت می شوند. منطقه RBD نسبت به سایر دامنه های پروتئین اسپایک بین کرونا ویروس ها کمتر حفاظت شده و دارای ویژگی بالایی است. بنابراین می تواند به عنوان هدف اصلی برای آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 به کار رود. مشخص شده است که آنتی بادی های ضد اسپایک می توانند اتصال پروتئین S به گیرنده سلولی hACE2 که واسطه اتصال SARS-CoV-2 و ورود به سلول های هدف است را مسدود کنند. هیچ مدرکی مبنی بر این که آنتی بادی های ضد نوکلئوکپسید بتوانند مانع ورود ویروس به سلول های بدن شوند، وجود ندارد. پروتئین N به دلیل قدرت ایمنی بالایی آن و تجمع داخل سلولی قبل از بسته بندی ویروس، کاندید مناسبی برای تشخیص زود هنگام عفونت است. نگرانی عمده در شناسایی آنتی بادی به هنگام استفاده از RBD به جای اسپایک با طول کامل (S_1, S_2)، کاهش احتمالی حساسیت سنجش است. با این حال، در یک تحقیق مشاهده شد که بیش از ۹۵٪ از بیماران مبتلا به

¹⁰ Nucleocapsid proteins

¹¹ Spike proteins

¹² Receptor Binding Domain



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

SARS-CoV-2، ۹ روز پس از شروع علائم آنتی بادی ضد RBD را تولید نموده اند. سرم بیماران درگیر با SARS-CoV-2 آنتی بادی هایی دارند که با دامنه اتصال گیرنده SARS-CoV-1¹³ واکنش متقابل نشان می دهد. از آنجا که شیوع SARS-CoV-1 و MERS-COV در حال حاضر در انسان بسیار کم است، واکنش متقاطع آنتی بادی SARS-CoV-2 با SARS-CoV-1 بعید است که چالش های تشخیصی ایجاد کند. همچنین نشان داده شده که یک رابطه مشخص بین سطح آنتی بادی های RBD در بیماران و توانایی سرم بیمار جهت خنثی سازی ویروس SARS-CoV-2 وجود دارد. بنابراین یک روش الایزای ساده مبتنی بر RBD می تواند ابزاری مفید برای شناسایی اهدا کنندگان پلاسما خون باشد.

روش الایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA): روش الایزای غیر مستقیم دارای حساسیت بالایی برای شناسایی آنتی بادی در سرم بیمار است. در این روش آنتی ژن اختصاصی N یا S در کف چاهک الایزا متصل شده سپس سرم حاوی آنتی بادی به آن اضافه شده و بر اساس این که چه ایزوتایی را بخواهیم اندازه گیری نماییم از آنتی هیومن ایمونوگلوبولین نشاندار شده با HRP¹⁴ استفاده می کنیم. یکی از معایب این روش امکان واکنش متقاطع با آنتی ژن ثابت شده در کف چاهک الایزا است که موجب افزایش سیگنال زمینه می گردد.

روش الایزای کپچر (Capture ELISA): استفاده از این روش موجب افزایش ویژگی سنجش می گردد. در این روش از یک آنتی ژن نشاندار مانند (HRP-RBD) استفاده می شود. چاهک ELISA با آنتی بادی های ضد hIgG یا ضد hIgM اختصاصی به ایزوتایپ انسانی از قبل پوشانده شده است. پس از افزودن سرم انسانی و شستشو، HRP-RBD اضافه شد و پس از آن شستشو و محلول رنگزا اضافه می گردد. نتایج نشان داده که این روش نسبت به الایزای غیر مستقیم حساسیت و ویژگی بیشتری (ویژگی ۱۰۰٪ و حساسیت ۹۶٪) در بیماران PCR مثبت دارد. این آزمایش را به راحتی می توان با همان قالب برای شناسایی سایر ایزوتایپ ها (IgA، IgE، IgD) یا ساب تایپ ها (IgG1-4) با اندکی تغییر سازگار کرد. آنتی ژن HRP-RBD در دسترس بوده و پروتکل عملیاتی کلی آن نیز وجود دارد. در این روش به جای استفاده از HRP-RBD می توان از پروتئین X با HRP، (HRP-X) که در آن X می تواند پروتئین یا آنتی ژن های دیگری از SARS-CoV-2 باشد، برای شناسایی آنتی بادی استفاده نمود.

¹³ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-1

¹⁴ Horseradish Peroxidase



واکنش متقاطع

با افزایش شیوع بیماری کووید-۱۹ و به دنبال آن تولید واکسن، نیاز به آزمایش های سرولوژی یا آنتی بادی بیشتر از پیش احساس می شود. آزمایشگاه های تحقیقاتی و شرکت های مختلف در جهان برای تولید آزمایش هایی که می توانند عفونت COVID-19 را با ویژگی و حساسیت کافی تشخیص دهند، با هم در حال رقابت هستند. علاوه بر SARS-CoV-2، شش ویروس دیگر (MERS-CoV و HKU1، NL63، SARS-CoV، 229E، OC43) وجود دارد که انسان را آلوده می کنند. هنگامی که هدف ما طراحی یک روش با ویژگی بالا باشد این ها چالش جدی محسوب می شوند. اگر چه احتمال واکنش متقاطع آنتی بادی در بین ویروس های کرونای انسانی (hCoVs)^{۱۵} وجود دارد، SARS-CoV-1 بالاترین شانس واکنش متقاطع را با SARS-CoV-2 را به دلیل روابط نزدیک فیلوژنتیک و هویت بالای توالی ژنوم و پروتئین دارد.

واکنش متقاطع با کرونا ویروس های معمول (cCoV)^{۱۶} بسیار مضر است زیرا ۶۰ تا ۷۵٪ از کودکان یک یا چند آنتی بادی علیه cCoV دارند و ۹۰٪ از بزرگسالان بالای ۵۰ سال دارای آنتی بادی بر علیه هر ۴ نوع cCoV هستند. خوشبختانه به دلیل پایین بودن درصد هومولوژی اسیدهای آمینه (تقریباً ۳۴-۲۱٪) اشتراک زیادی بین SARS-CoV-2 و cCoV's وجود ندارد.

SARS-CoV-1 و SARS-CoV-2 در حدود ۹۰٪ هومولوژی اسید آمینه را برای پروتئین های N مربوطه و ۷۷٪ پروتئین های S دارند. SARS-CoV-2 و MERS-CoV^{۱۷} ۴۹٪ هومولوژی اسید آمینه را برای پروتئین N و ۳۳٪ را برای پروتئین S دارند. این داده ها ارزش استفاده از آنتی ژن های پروتئین S را برای افزایش ویژگی تست های سرولوژی برجسته می کند.

پروتئین S کرونا ویروس یک پروتئین بزرگ است که توسط پروتئاز میزبان به دو زیر واحد تجزیه می شود، زیر واحد S1 در ناحیه N ترمینال (اسید آمینه ۱ تا ۶۸۵) مسئول اتصال به گیرنده و زیر واحد S2 در ناحیه C-ترمینال که مسئول همجوشی غشایی است. دامنه اتصال گیرنده (RBD) در منطقه C ترمینال زیر واحد S1 (اسیدهای آمینه ۳۱۹ تا

¹⁵ Human coronaviruses

¹⁶ Common Coronaviruses

¹⁷ Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

(۵۹۱) واقع شده است، نشان داده شده است که RBD نو ترکیب به تنهایی برای اتصال به گیرنده سلولی (ACE2) کافی است.

در یک مطالعه عملکرد پروتئین های S1، N و RBD از SARS-CoV-2 و SARS-CoV در چهار روش مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد که پروتئین RBD بهترین ویژگی (specificity) را در این روش ها داشته اند، در حالی که پروتئین N هر دو ویروس به دلیل سطح بسیار بالای واکنش متقاطع برای تشخیص آنتی بادی های ویروسی مناسب تشخیص داده نشدند. همین طور در این مطالعه مشخص شد که الیزای کپچر می تواند ویژگی آزمایش را بیشتر نموده و بهبود بخشد. همچنین این سنجش را می توان به راحتی برای مطالعه ایزوتایپ ها (IgA, IgE, IgE) و ساب تایپ های ایمونوگلوبولین ها (IgG1-IgG4) جهت نیازهای تحقیقاتی سازگار کرد. از سوی دیگر به وجود یک سنجش حساس نیاز است تا از عدم شناسایی افراد مبتلا به عفونت های خفیف در مطالعات اپیدمیولوژیک جلوگیری شود. به همین منظور لازم است در مطالعات سرولوژیک جهت شناسایی آنتی بادی ها از دو آنتی ژن مختلف برای تأیید یافته ها و جلوگیری از منفی های کاذب استفاده شود.

حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی کننده تست های سرولوژیک

همان طور که قبلا گفته شد تعیین حساسیت و ویژگی آزمایش های سرولوژیک به هدفی که از انجام آن متصور است، بستگی دارد و بایستی قبل از اجرای آن در نظر گرفته شود. برای ارزیابی بیماران علامت دار و تشخیص آن ها حساسیت بالایی لازم است (به طور کلی بیشتر از ۹۰ درصد) در این حالت کاهش جزئی در ویژگی و وجود برخی نتایج مثبت کاذب ممکن است قابل تحمل باشد مشروط بر این که نتیجه سایر اقدامات تشخیصی و ارزیابی های آزمایشگاهی در نظر گرفته شود زیرا وجود نتایج مثبت کاذب ممکن است به مداخلات، آزمایش ها و درمان های غیر ضروری و حتی قرنطینه فرد منجر گردد. با این حال اگر آزمایش ها برای حذف محدودیت های اجتماعی و بازگشت به فعالیت های عادی به کار گرفته شود بایستی ویژگی بالایی داشته باشد، زیرا نتایج مثبت کاذب افراد غیر ایمن را ممکن است به خطر اندازد. بنابراین موارد فوق باید با توجه به میزان شیوع بیماری تعیین شوند.

محققان از این موضوع نگرانند که ممکن است حساسیت و ویژگی آزمایش سرولوژیک در هنگام استفاده از آن ها در بررسی های سرواپیدمیولوژیک کمتر از مقدار ادعا شده باشد، زیرا این آزمایش ها بیشتر در بیماران بستری ارزیابی شده و معلوم نیست که آیا آن ها می توانند سطوح پایین آنتی بادی را در سرم بیماران خفیف و بدون علامت تشخیص دهند یا خیر؟



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

ارزش پیشگویی کنندگی مثبت و منفی به ویژگی های عملکردی آزمایش (ویژگی و حساسیت) و همچنین شیوع بیماری بستگی دارد. در مناطقی که شیوع بیماری کووید-۱۹ کم است، خطر بروز نتایج مثبت کاذب آزمایش سرولوژی، حتی اگر ویژگی بالایی داشته باشد بسیار بیشتر است. بنابراین، میزان آلودگی باید در نظر گرفته شود و برای تأیید نتایج در جمعیت هایی که شیوع بیماری کم دارند، آزمایش های مکرر ممکن است مفید واقع گردد.

خصوصیات عملکردی آزمایش های سرولوژی (حساسیت و ویژگی) با استفاده از مجموعه مشخصی از نمونه های منفی و مثبت تعیین می شود. علاوه بر این، ارزش پیشگویی کنندگی آزمون نیز باید در نظر گرفته شود زیرا مقادیر آن بر نتایج کلی آزمایش تأثیر می گذارد. ارزش پیشگویی کننده مثبت (PPV)^{۱۸} بدین معنی است که بیمار با نتیجه آزمایش مثبت، آنتی بادی داشته باشند. ارزش پیشگویی کننده منفی (NPV)^{۱۹} این احتمال را نشان می دهد که افراد با نتیجه آزمایش منفی واقعا آنتی بادی منفی باشند. مقادیر پیشگویی کننده مثبت و منفی با درصد واقعی افراد آنتی بادی مثبت در جمعیت مورد آزمایش (شیوع، احتمال پیش آزمون) و حساسیت و ویژگی آزمایش تعیین می شود. مثلاً در یک جامعه با شیوع بالای بیماری، ارزش پیشگویی کننده مثبت افزایش می یابد - بدین معنی که احتمالاً افرادی که آزمایش مثبت آنتی بادی دارند، واقعا آنتی بادی مثبت هستند - از این رو وقتی از یک آزمایش در جمعیتی استفاده می شود که شیوع بیماری در آنجا پایین است، ارزش پیشگویی کننده مثبت کاهش می یابد زیرا نتایج مثبت کاذب بیشتر است چون احتمال پیش از آزمون کم است. به همین ترتیب، ارزش پیشگویی منفی نیز تحت تأثیر شیوع قرار دارد. در یک محیط شیوع بالا، ارزش پیشگویی کننده منفی کاهش می یابد در حالی که در یک محیط با شیوع پایین، افزایش می یابد. در بیشتر کشورها شیوع آنتی بادی SARS-CoV-2 از ۵٪ تا ۲۵٪ متغیر است، به طوری که آزمایش در این مرحله ممکن است منجر به نتایج نادرست شود یعنی نتایج مثبت کاذب بیشتر و نتایج منفی کاذب کمتر است.

در همه گیری فعلی، به حداکثر رساندن ویژگی و در نتیجه ارزش پیشگویی کننده مثبت در یک بررسی سرولوژیک ارجح است، زیرا که شیوع آنتی بادی ها در برخی جوامع ممکن است پایین باشد. به عنوان مثال، در جمعیتی که شیوع بیماری در آن ۵٪ است، آزمایشی با حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۹۵٪ ارزش پیشگویی کننده مثبت ۴۹٪ را به همراه خواهد داشت. به عبارت دیگر، کمتر از نیمی از آزمایش های مثبت واقعا آنتی بادی دارند. از طرف دیگر، اگر همین آزمایش در یک جمعیت با شیوع بیماری بیشتر از ۵۰٪ انجام شود، ارزش پیش بینی کنندگی مثبت بیشتر از ۹۵٪ خواهد بود،

¹⁸ Positive Predictive Value

¹⁹ Negative Predictive Value



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

بدین معنی که کمتر از ۵٪ افراد (یک در هر ۲۰ نفر که آزمایش آنتی بادی مثبت دارند)، نتیجه آزمایش آن‌ها مثبت کاذب خواهد بود.

برای بهبود ارزش پیش بینی کننده مثبت می توان از سه استراتژی زیر استفاده نمود:

۱- انتخاب آزمایشی با ویژگی بسیار بالا، شاید ۹۹/۵٪ یا بیشتر، در جمعیت های آزمایش شده با شیوع ۵٪ ارزش پیشگویی کننده مثبت بالایی خواهد داشت.

۲- راهکار دیگر تمرکز بر روی افرادی است که احتمال پیش از آزمون بالایی برای آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 را دارند، مانند افرادی که سابقه بیماری COVID-19 داشته و یا علائم آن را ذکر می کنند.

۳- رویکرد سوم استفاده از یک الگوریتم آزمایش متعامد (ارتوگونال) است که در آن افرادی که در ابتدا آزمایش مثبت دارند، با یک آزمایش دوم مجدداً آزمایش شوند. الگوریتم های متعامد عموماً مبتنی بر آزمایش یک نمونه بیمار با دو آزمایش هستند که هر کدام دارای خصوصیات ویژه ای در طراحی هستند (به عنوان مثال، آنتی ژن های هدف یا فرمت انجام آزمایش) مثلاً:

- استفاده از دو روش الایزای یکسان (مثلاً الایزای غیر مستقیم) که یکی دارای آنتی ژن N و دیگری دارای آنتی ژن S است.

- استفاده از دو روش الایزای متفاوت (مثلاً الایزای کپچر و الایزای غیر مستقیم با آنتی ژن های یکسان یا متفاوت

- استفاده از دو آزمایش مختلف مانند الایزا و کمی لومینسانس با آنتی ژن های یکسان یا متفاوت

الگوریتم ها می توانند با حداکثر ویژگی در عین حفظ حداکثر حساسیت طراحی شوند. به عنوان مثال، در مورد بالا با شیوع جمعیت ۵٪، اگر نمونه هایی مثبت در مرحله اول با روش متفاوت دوم که دارای ۹۰٪ حساسیت و ۹۵٪ ویژگی است آزمایش شوند، می توان ارزش پیشگویی کننده مثبت ۹۵٪ را به دست آورد. عملکرد الگوریتم متعامد به طور سیستماتیک مورد ارزیابی قرار نگرفته است اما می توان با استفاده از یک نرم افزار محاسباتی آن را تخمین زد. (جدول) در همین راستا همکار محترم جناب آقای دکتر بیات نرم افزاری را طراحی نموده اند که همراه با توضیحات جهت استفاده همکاران در سایت انجمن دکترای علوم آزمایشگاهی قرار داده شده است.

جدول: بهبود ارزش پیشگویی کنندگی مثبت با استفاده از الگوریتم متعامد (ارتوگونال)

Prevalence	PPV for one test (SE=90%, SP=95%)	PPV for two orthogonal tests (SE=90%, SP=95%)
2%	26.9%	86.9%
5%	48.6%	94.5%
10%	66.7%	97.3%
30%	88.5%	99.3%

SE: Sensitivity

SP: Specificity

PPV: Positive Predictive Value

۴- همچنین آزمایش نمونه های دوتایی روی سرم های گرفته شده از بیمار یکی همزمان با PCR اولیه و یکی ۲ هفته بعد می تواند دقت تشخیصی را افزایش دهد. به طور معمول، اکثر آنتی بادی ها علیه فراوان ترین پروتئین ویروس که نوکلئوکسید ویروسی است، تولید می شوند. بنابراین، آزمایش هایی که آنتی بادی ها ضد NC را شناسایی می کنند، حساس تر هستند. با این حال، آنتی بادی های ضد RBD-S اختصاصیت بیشتری داشته و انتظار می رود خنثی کننده نیز باشند. بنابراین، استفاده از یک یا هر دو آنتی ژن برای تشخیص IgG و IgM منجر به حساسیت بالایی می شود.

محدودیت های آزمایش سرولوژیک

در حال حاضر، ایمنی و مصونیت ناشی از عفونت SARS-CoV-2 به خوبی مشخص نشده است. افراد جامعه می خواهند بدانند آیا آزمایش های مثبت سرولوژیک نشان دهنده ایمنی و محافظت در برابر SARS-CoV-2 است یا خیر؟ این کار شامل ارزیابی سطح آنتی بادی های مورد نیاز جهت محافظت از ابتلا مجدد، مدت زمان آن و همچنین



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

عوامل مرتبط با توسعه پاسخ آنتی بادی محافظت کننده است. کیتیک پاسخ آنتی بادی، طول عمر آنتی بادی ها، توانایی آنتی بادی ها در محافظت در برابر عفونت مجدد و ارتباط بین تیتراژ آنتی بادی با توانایی خنثی کننده آن هنوز مشخص نشده است. اگر چه مطالعات مربوط به چالش حیوانات در کوتاه مدت از این موضوع حمایت می کند، اما نشان دادن ایمنی طولانی مدت در انسان نیاز به مطالعات بیشتری دارد. از این رو، حضور آنتی بادی ها با ایمنی فرد از عفونت SARS-CoV-2 نمی تواند یکسان در نظر گرفته شود.

بحث و نتیجه گیری

هنگام مقابله با شیوع بیماری های عفونی مانند COVID-19، توسعه سریع سنجش های تشخیصی بخش مهمی از پاسخ سیستم های بهداشتی است. آزمایش های مولکولی، عمدتاً PCR، بسیار سریع تر توسعه می یابند، اما قادر به پاسخگویی به تمام نیازهای شیوع نیستند. سرولوژی می تواند با پاسخ آنتی بادی در مرحله اولیه عفونت، تشخیص مبتنی بر PCR را تکمیل کند، که به ویژه در مورد آنتی بادی های Igm صادق است.

مهم تر از همه، سرولوژی نقش مهمی را در ردیابی تماس، اپیدمیولوژی و ارزیابی میزان شیوع سرولوژی و طول عمر ایمنی ایجاد شده (در صورت وجود)، دارد. این امر به ویژه در زمینه ایمنی جمعی در COVID-19 بسیار حائز اهمیت است.

یک روش آزمایش شناسایی آنتی بادی باید بسیاری از ویژگی های زیر را داشته باشد: سریع (هم برای توسعه و هم برای کاربرد)، دارای حساسیت و ویژگی بالا، انجام آسان و بی خطر برای کاربر، ارزان و قابل حمل. متأسفانه، چنین آزمایش "کاملی" هنوز وجود ندارد. بنابراین، هدف عملی این است که آزمایشی را انتخاب کرده و به کار ببریم که با هدف ما متناسب باشد.

به نظر می رسد با شیوع هر چه بیشتر بیماری کووید-19 و از طرفی تولید واکسن در آینده روش های مولکولی قادر به پاسخگویی به نیازهای تشخیصی کشور نبوده و استفاده از روش های سرولوژیک جدید اجتناب ناپذیر است. در این حالت به نظر می رسد روش مناسب برای شناسایی آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 روش الایزای کپچر با آنتی ژن N و S و یا هر دو باشد که می تواند ایزوتایپ ها و ساب تایپ های ایمونوگلوبولین ها را نیز شناسایی نماید.

همچنین با استفاده از بررسی های شیوع یابی، می توان در مورد کل افراد آلوده، از جمله عفونت هایی که احتمالاً شناسایی نشده اند، اطلاعات مناسبی کسب نمود و تخمینی از میزان جمعیتی که هنوز آلوده نشده اند به دست آورد.



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

همچنین به متولیان بهداشت کمک می کند تا برای نیازها و مداخلات مراقبت های بهداشتی آینده، برنامه ریزی کنند و با تعیین ریسک بیماری در زمان ها و مکان های مختلف و بین جمعیت های مختلف، مداخلات لازم در تعیین وضعیت شهرها از نظر احتمال ابتلا به بیماری و روند آن و در نتیجه اتخاذ اقدامات کنترلی بیشتر یا کمتر، مانند فاصله گذاری اجتماعی را فراهم نماید. این ارزیابی ها همچنین می تواند چگونگی گسترش عفونت در طول زمان در بین جمعیت را پیش نماید و با ارزیابی ایمنی جمعی (Herd Immunity)، تخمینی از میزان واکسن مورد نیاز و دارو را در اختیار تصمیم گیران نظام سلامت قرار دهد.

بررسی های شیوع می تواند عوامل خطر برای ابتلا به بیماری، مانند سن، محل زندگی یا شرایط بهداشتی فرد را ارزیابی نموده و مدت پایداری آنتی بادی در بدن افراد به دنبال عفونت را تعیین نماید. همچنین در شرایط کنونی که فشارها برای بازگشایی دوباره فعالیت ها و گردش اقتصاد در کشور در حال افزایش است می توان از آن به عنوان ابزار کمک تشخیصی و در کنار آزمایش های تشخیص مولکولی، در زمینه ایده "گذرنامه ایمنی" یا "گواهی ایمنی" برای شناسایی افرادی که قبلا به ویروس مبتلا شده اند، استفاده نمود.

از طرف دیگر با توجه به توزیع جغرافیایی مناسب آزمایشگاه های خصوصی و دولتی در سطح کشور، هم اکنون امکان دسترسی به آزمایش های سرولوژی در اقصی نقاط کشور به صورت مناسبی وجود دارد و می توان با طراحی یک فرآیند تعریف شده و مشخص و استفاده از بستر الکترونیک سامانه های موجود در نظام سلامت و به صورت متمرکز، به نحو مناسبی و با کمترین هزینه به جمع آوری اطلاعات مورد نیاز پرداخت. از این نظر با توجه به طیف وسیع کاربردهای ارزیابی های سرولوژیک در مدیریت بیماری کرونا در کشور، استفاده از ظرفیت آزمایشگاه پزشکی خصوصی می تواند به عنوان یک راهبرد موثر، در این زمینه ها راهگشا باشد.

همچنین لازم است که مسئولین سیاست گذاران و مسئولین در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و سایر سازمان ها و نهاد های مربوطه با تشویق و راهنمایی شرکت های دانش بنیان و ارائه تسهیلات لازم به آن ها زمینه ساز حرکت به سمت توسعه روش های سرولوژیک با حساسیت و ویژگی بالا شده تا بتوان با افزایش کارایی این روش ها، به نحو موثرتری در شیوع یابی و بررسی های سرواپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص بیماران، استفاده نمود.

ره یافت ها

- ۱- استفاده از آنتی ژن های اسپایک خصوصا آنتی ژن RBD در آزمایش های سرولوژی موجب افزایش ویژگی و حساسیت آزمایش می گردد.
- ۲- روش الایزای کپچر با آنتی ژن های اسپایک (RBD,S2,S1) دارای حساسیت و ویژگی بالایی است.
- ۳- استفاده از آنتی ژن N موجب افزایش حساسیت روش و استفاده از آنتی ژن های S موجب افزایش ویژگی روش می گردد.
- ۴- استفاده ترکیبی از آنتی ژن های S و N به همراه ایمونوگلوبولین های IgM و IgG موجب افزایش حساسیت تشخیصی آزمایش های سرولوژیک در شناسایی بیماران در هفته اول پس از شروع علائم بیماری می گردد.
- ۵- استفاده از الگوریتم متعامد (ارتوگونال) موجب افزایش ارزش پیشگویی کننده مثبت آزمایش های سرولوژیک در بررسی های اپیدمیولوژیک و تشخیصی می گردد.
- ۶- آنتی بادی های ضد آنتی ژن N چند ماه پس از بیماری در سرم شروع به کاهش نموده در صورتی که آنتی بادی های ضد آنتی ژن RBD همچنان در سرم بیمار قابل شناسایی هستند، بنابراین عدم شناسایی آنتی بادی های ضد N دلیلی بر نبود ایمنی و یا کاهش پاسخ ایمنی نیست و باید در این گونه موارد برای شناسایی آنتی بادی ها از روش هایی که در آن ها آنتی ژن های RBD به کار رفته است استفاده نمود.
- ۷- در هنگام درخواست آزمایش های سرولوژیک باید به حساسیت تشخیصی آزمایش های سرولوژیک در هفته های مختلف بیماری توجه نمود.
- ۸- در حدود ۹۸٪ افراد بیمار قادر به تولید آنتی بادی بر علیه ویروس SARS-COV-2 هستند بنابراین در تفسیر مواردی که آزمایش های سرولوژیک منفی می شوند باید افراد Nonresponder و Late responder را نیز در نظر گرفت و در صورتی که هنوز شک بالینی به بیماری کووید-۱۹ وجود دارد باید از یک آزمایش دوم با ساختار متفاوت استفاده نمود.
- ۹- در اندازه گیری آنتی بادی های ضد SARS-COV-2 روش الایزای کپچر نسبت به الایزای غیر مستقیم واکنش مثبت کاذب کمتری دیده شده است.



انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

۱۰- در بیماران مبتلا به کووید-۱۹ سروکانورژن IgM به IgG و یا افزایش ۴ برابری تیتراژ آنتی بادی نشانه ابتلا و شاخص تشخیصی است.

۱۱- توسعه روش های سرولوژیک با حساسیت و ویژگی بالا شده می تواند با افزایش کارایی این روش ها، در شیوع یابی و بررسی های سرواپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص بیماران، بهبود دهد.

۱۲- استفاده از ظرفیت آزمایشگاه های پزشکی بخش خصوصی می تواند به عنوان یک راهبرد موثر، در جمع آوری اطلاعات مورد نیاز در بررسی های سرو اپیدمیولوژیک و مدیریت بیماری کرونا در کشور، راهگشا باشد.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از راهنمایی های همکاران ارجمند جناب آقای دکتر حمید رضا امیر مقدمی، سرکار خانم دکتر نرگس سلاجقه و جناب آقای دکتر غلامرضا حمزه لو تشکر و قدردانی نمایم.

تهیه و تنظیم:

دکتر شهروز همتی و دکتر مهناز آل یاسین

دکترای علوم آزمایشگاهی

مرداد ۱۳۹۹

References:

1-Yu-Lin Lee. *Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients.* *Journal of Infection* · April 2020

2-F J Ibarra Ndo. *Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19.* *NEJM.* July 21, 2020

3-Ria Lassaunière, Anders Frische, Zitta B. Harboe, Alex C.Y. Nielsen, Anders Fomsgaard, Karen A. Kroghelt, Charlotte S. Jørgensen. *Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays.* *medRxiv preprint* doi: <https://doi.org/2020.04.09>

4-Nuccetelli et al. *SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown?* *Cell Death Discovery* (2020)6:38 <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>

5-*Interpreting a covid-19 test result.* *BMJ* 2020; 369 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.m1808> (Published 12 May 2020).

6-*COVID-19 Serology Testing Explained.* www.asm.org. May 19, 2020

7-Brandi Freeman et al. *Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and sero-surveillance.* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.057323>

8-Fan Wu et al. *Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications.* <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>

9-Nandini Sethuraman, *Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2.* <https://jamanetwork.com/> on 07/04/2020.



10-Lakshmanane Premkumar et al. **The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients.** *Sci. Immunol.* 5, eabc8413 (2020) 11 June 2020.

11-Baoqing Sun et al. **Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients.** *Emerging Microbes & Infections* 2020, VOL. 9 <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>

12-Nisreen M.A et al. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients.** *Emerg Infect Dis.* 2020 Jul.

13-Marzia Nuccetelli et al, **SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown?** *Cell Death Discovery* (2020)6:38 <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>

14-Stephen A Lauer et al. **The incubation period of 2019-nCoV from publicly reported confirmed cases: estimation and application.** doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.02.20020016>.

15-Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings. <https://www.cdc.gov>.

16-Wan Ni Chia et al. **Serological differentiation between COVID-19 and SARS infections.** *Emerging Microbes & Infections* 2020, VOL. 9 <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1780951>.

17-AntonioLa Marca et al. **Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays.** <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.001>

18-JJ Deeks et al. **Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2.** *Cochrane Systematic Review - Diagnostic Version* published: 25 June 2020 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>