

تشخیص کووید-۱۹: بیماری و ابزارهای شناسایی

سعید ذاکر* و هانیه باقری فرد

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

چکیده

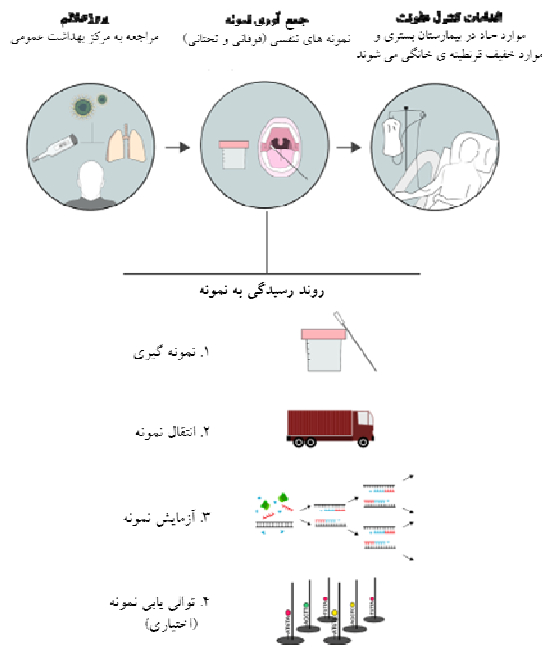
از زمان کشف کووید-۱۹ در استان هوپای کشور چین در دسامبر سال ۲۰۱۹، این بیماری در سرتاسر جهان انتشار یافته است. در ابتدا برای غربالگری و شناسایی SARS-CoV-2 و سبب شناسی ویروسی بیماری کووید-۱۹، ترکیبی از روش های تصویربرداری توموگرافی کامپیوتری، توالی یابی کامل ژنگان (genome) و میکروسکوپ الکترونی، مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این مقاله، معرفی تکنولوژی های مرتبط با تشخیص و نظارت بر SARS-CoV-2 و نیز ویژگی های کاربردی آنهاست. در این مقاله روش های جدید تشخیصی در محل مراقبت از بیمار توصیف شده و محققین را تشویق به پیشرفت ایده های خود در مورد تکنولوژی های جدید می کنیم. توسعه تجهیزات تشخیصی کامپیوتری با کاربرد سریع و آسان به منظور مدیریت شرایط در زمان شیوع ناگهانی SARS-CoV-2، می تواند در جلوگیری از اپیدمی های آینده سودمند باشد.

کلیدواژگان: SARS-CoV-2، روش های تشخیصی، کووید-۱۹، PCR، نظارت، پاندمی

* مترجم مسئول، پست الکترونیکی: saeedzaker20@yahoo.com

ماندگاری SARS-CoV-2 در آنروسل و بر روی سطوح نشان داد که این ویروس می‌تواند در آنروسل (کمتر از ۵ میکرومتر) به مدت حداقل ۳ ساعت باقی مانده و احتمالاً بر روی پلاستیک و استیل ضدزنگ بیش از مس و مقوا پایدار است (۱۰). ساخت دارو و واکسن در حال انجام است ولی در حال حاضر هیچ گونه دارو یا واکسنی توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA)^۴ برای درمان بیماران کووید-۱۹ تأیید نشده است (۱۱ و ۱۲).

ویژگی های زیست شناختی SARS-CoV-2. این ویروس نخستین بار از نمونه‌های بیماران در ووهان چین شناسایی شد. سلول های اپیتلیال مجرای تنفسی انسان به همراه ویروس جداسازی شده از مایع برونش (BAL) بیماران کشت داده شد. مایع شناور بر روی سلول هایی که آسیب دیده یا کشته شده بودند، جمع آوری و از طریق رنگ آمیزی منفی و توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی^۵ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲) (۱۳).



شکل ۱- مثالی از مسیر نمونه و بیمار طی شیوع کووید-۱۹. بیماران در یک مرکز پزشکی به منظور رده بندی درمانی حاضر می‌شود نمونه های جمع آوری شده در صورت امکان در همان محل مورد آزمایش قرار گرفته و در غیر اینصورت نمونه برای آزمایشات مولکولی و توالی یابی انتقال می‌یابد سپس بیماران به صورت مقتضی رسیدگی می‌شوند.

بیماری کورونا ویروس ۲۰۱۹ (کووید-۱۹)، در دسامبر ۲۰۱۹ در استان هوبای واقع در کشور چین کشف شد (۱). گروهی از بیماران با تب، سرفه، تنگی نفس و برخی علائم دیگر پذیرش شدند (۲). بیماران توسط توموگرافی کامپیوتری (CT)^۱ مورد بررسی قرار گرفته و انواع مختلفی از نقاط کدر (متراکم تر، فراوانی بیشتر و تلاقی کننده) در آنها در مقایسه با تصاویر پرتونگاری ریه ی افراد سالم مشاهده شد (۳). این یافته ها به تشخیص ابتدایی پنومونی منجر شد. بررسی‌های تکمیلی بر روی نوکلئیک اسید با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز real-time چندگانه و پانل هایی از پاتوژن های شناخته شده، نتایج منفی در پی داشتند که خبر از پنومونی با منشأ نامشخص می‌دادند (۱). در تاریخ ۱۰ ژانویه ۲۰۲۰، نمونه های از مایع شستشوی شش (BAL)^۲ بیماران مورد بررسی قرار گرفته و یک پاتوژن با توالی ژنتیکی مشابه با یک بتا کورونا ویروس از دودمان B مشخص شد. بر اساس یافته‌ها این پاتوژن جدید حدود ۸۰٪، ۵۰٪ و ۹۶٪ تشابه به ترتیب با ویروس سندروم تنفسی حاد (SARS-CoV)، ویروس سندروم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) و کوروناویروس خفاشی RaTG13 دارا بود (۴ و ۱). کوروناویروس جدید به عنوان SARS-CoV-2، پاتوژن عامل کووید-۱۹ نام گذاری شد. تا تاریخ ۲ آوریل ۲۰۲۰، این بیماری به حداقل ۲۰۲ کشور انتشار یافته، بیش از یک میلیون نفر را آلوده و باعث مرگ حداقل ۵۲،۶۴۵ نفر در سرتاسر جهان شده است. احتمال می‌رود که موارد کلی گزارش شده از عفونت کووید-۱۹ کمتر از میزان واقعی آن باشد چرا که موارد با علائم خفیف و یا فاقد علائم، تشخیص داده نمی‌شوند (۵). براساس تحقیق صورت گرفته بر روی پرونده ی کشتی تفریحی دایموند پرنسس^۳، تنها حدود ۱۷/۹٪ از موارد فاقد علائم شناسایی و گزارش شده بودند. افراد فاقد علائم نیز به اندازه ی افراد دارای علائم عفونی محسوب شده و در نتیجه توانایی انتشار بیماری را دارا هستند (۶).

ویروس SARS-CoV-2 می‌تواند از طریق تماس انسان با انسان انتقال یابد. فرضیه ی کنونی حاکی از انتقال ابتدایی آن از خفاش به یک حیوان واسطه ناشناخته است (۱). تخمین زده شده است که یک فرد آلوده به SARS-CoV-2 تقریباً سه نفر دیگر را آلوده می‌نماید (میانگین تعداد تکثیر ۳٫۲۸ تعیین شده است) (۷). علائم می‌توانند متنوع بوده و در حالی که برخی افراد فاقد علائم هستند برخی دیگر تب، سرفه، خستگی و سایر علائم را بروز می‌دهند. علائم این بیماری ممکن است مشابه با بیماران مبتلا به انفلوانزا یا سرما خوردگی باشد. در این مرحله محتمل ترین روش انتقال از طریق تماس مستقیم و انتشار قطرات تنفسی در نظر گرفته شده است (۸ و ۹) یک مطالعه ی جدید با بررسی

⁴ Food and Drug Administration
⁵ transmission electron microscope

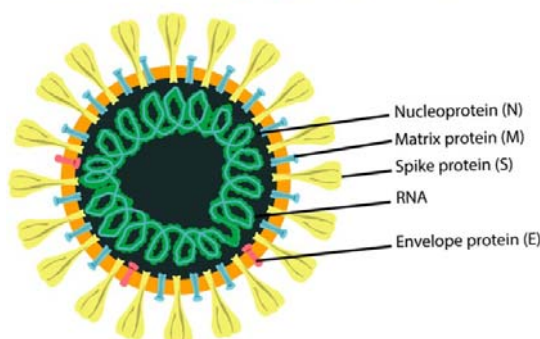
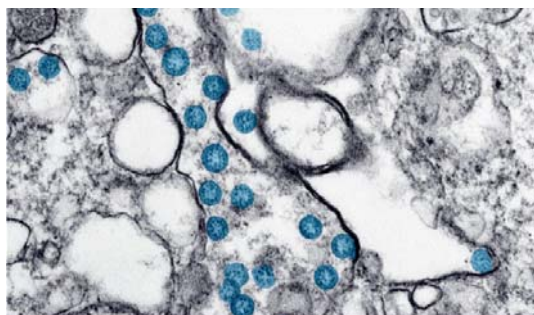
¹ computed tomography
² bronchoalveolar lavage
³ Diamond Princess cruise ship case

در مقایسه با حلق و با حجم برابر در بیماران دارای علائم و فاقد علائم گزارش شده است (۲۴). درک ویژگی های زیست شناختی SARS-CoV-2، محققین را قادر به طراحی روش های تشخیصی به منظور شناسایی ویروس کرده است.

آزمایشات تشخیصی موجود برای کووید-۱۹. علائم در بیماران کووید-۱۹ غیر اختصاصی بوده و نمی توانند برای یک تشخیص دقیق مورد استفاده قرار گیرند. طبق گزارش Guan و همکارانش ۴۴٪ از ۱۰۹۹ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ از چین هنگام ورود به بیمارستان دارای تب بوده و ۸۹٪ بیماران در زمان حضور در بیمارستان علامت تب را بروز دادند (۲۵). آنها در ادامه دریافتند که ۶۸٪ بیماران علائم سرفه، ۳۸٪ خستگی، ۳۴٪ سرفه ی همراه خلط و ۱۹٪ تنگی نفس نشان دادند.

روش های مولکولی در مقایسه با آزمایشات بر پایه ی علائم (سندرومیک) و سی تی اسکن برای تشخیص دقیق مناسب ترند زیرا می توانند پاتوژن ها را به طور اختصاصی مورد هدف قرار دهند. طراحی روش های مولکولی به میزان درک از (۱) محتویات پروتئینی و ژنتیکی پاتوژن یا (۲) القای تغییرات در بیان پروتئین ها / ژن ها در میزبان طی عفونت و پس از آن بستگی دارد. از تاریخ ۲۴ مارس ۲۰۲۰ ترکیب پروتئینی و ژنتیکی SARS-CoV-2 مشخص شده است ولی نحوه ی پاسخ میزبان به ویروس همچنان در دست بررسی است. نخستین توالی ژنگانی از SARS-CoV-2، از طریق توالی یابی متاژنگانی RNA که روش تصادفی با توان عملیاتی بالا برای توالی یابی چندین ژنگان است، به دست آمد (۲۸-۲۶). این یافته ها به طور عمومی انتشار یافته و توالی کشف شده در تاریخ ۱۰ ژانویه ۲۰۲۰، به توالی های ذخیره شده در ژن بانک^۲ اضافه شد (۲۶،۲۷). از آن زمان، بیش از ۱۰۰۰ توالی توسط محققین از سرتاسر جهان بر روی پایگاه های اطلاعاتی ژن بانک و مرکز پیشگام اشتراک گذاری تمام داده های آنفلوآنزا (GISAID)^۳ قرار داده شده است (۲۹،۳۰). بر اساس گزارش مشترک سازمان جهانی بهداشت و کشور چین، ۱۰۴ سویه از SARS-CoV-2 جداسازی و از طریق روش های آکسفورد نانو پور^۴ و ایلومینا^۵ از اواخر ماه دسامبر ۲۰۱۹ تا اواسط فوریه ۲۰۲۰، توالی یابی شدند (۲،۴). توالی یابی ایلومینا یک روش از انواع توالی- بر اساس- سنتز^۶ در حالی که توالی یابی نانو پور شامل جابجایی یک مولکول DNA از میان یک منفذ پروتئینی و اندازه گیری تغییرات به وجود آمده در ولتاژ در نتیجه ی این جابجایی به منظور تعیین توالی DNA است (۳۱).

از این تصاویر مشخص شد که ویروس قطری بین ۶۰ تا ۱۴۰ نانومتر، یک پوشش دارای پروتئین های اسپایک (spike) حاوی ماده ی ژنتیکی است (۱۴).



شکل ۲- مورفولوژی SARS-CoV-2. تصویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی از ذرات ویروسی کروی SARS-CoV-2 در یک سلول (۱۳). ویروس به رنگ آبی مشاهده می شود. شمایی از ساختار ویروس به همراه پروتئین های ساختاری آن ترسیم شده است.

SARS-CoV-2 یک ژنگان RNA تک رشته ای مثبت با حدود ۳۰،۰۰۰ نوکلئوتید دارد (۱۵،۱۷). ژنگان این ویروس ۲۷ پروتئین، شامل یک RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRP) و چهار پروتئین ساختاری را رمزگذاری می کند (۱۵ و ۱۶). چهار پروتئین ساختاری SARS-CoV-2 شامل گلیکوپروتئین سطحی نیزه ای اسپایک^۱ (S)، پروتئین کوچک پوشش (E)، پروتئین ماتریکس (M)، و پروتئین نوکلئوکسپید (N) هستند. در کوروناویروس، ژن S رمزگذار پروتئین اسپایک با قابلیت اتصال به گیرنده سلول و آلوده کردن سلول هاست (۴ و ۱۸). سه پروتئین ساختاری دیگر در مقایسه با پروتئین اسپایک، محافظت شده ترند و برای عملکرد کلی کوروناویروس ضروری اند (۱۵). این پروتئین ها در بسته بندی RNA و یا تجمع پروتئین، جوانه زنی، شکل گیری پوشش و بیماریزایی ویروس دخالت دارند (۲۱-۱۹).

SARS-CoV-2 از سوآب های دهانی، مایع برونش و مدفوع جداسازی شده است (۱،۲،۳). بیشترین مقدار ویروس در بینی

² GenBank sequence repository
³ Global Initiative on Sharing All Influenza Data
⁴ Oxford nanopore sequencing
⁵ Illumina sequencing
⁶ sequence-by-synthesis

¹ Spike surface glycoprotein

آزمایش نوکلئیک اسید. طراحی یک آزمایش براساس نوکلئیک اسید برای SARS-CoV-2.

انجام آزمایش بر روی نوکلئیک اسید، روش اصلی تشخیص کووید-۱۹ است. تعدادی کیت واکنش زنجیره ای پلیمرز رونوشت معکوس (RT-PCR)، به منظور شناسایی ژنتیکی SARS-CoV-2 طراحی شده اند (جدول ۱). روش RT-PCR شامل رونویسی معکوس RNA ویروسی SARS-CoV-2 به DNA مکمل (cDNA) می باشد (۳۳،۳۴). روند طراحی آزمایش به طور کلی شامل دو مرحله ی اصلی است: (۱) هم تراز ی توالی ها و طراحی پرایمر، (۲) بهینه سازی روش و انجام آزمایش. Korman و همکارانش تعدادی از توالی های ژنگان ویروسی مرتبط با سارس را به منظور طراحی یک گروه از پرایمر ها و پروب ها هم تراز و مورد بررسی قرار دادند (۳۵).

در میان ژنگان های وابسته به سارس آنها سه ناحیه با توالی های حفاظت شده کشف کردند: (۱) ژن *RdRP* (ژن RNA-پلیمرز-وابسته به RNA) درون قاب خوانش باز به نام ناحیه ی *ORF1ab*، (۲) ژن *E* (ژن پروتئین پوشش)، و (۳) ژن *N* (ژن پروتئین نوکلئوکسپید). هر دو ژن *RdRP* و *E* از حساسیت بالایی (محدوده ی فنی تشخیص به ترتیب ۳/۶ و ۳/۹ کپی در ازای هر واکنش) برای تشخیص برخوردار بودند، در حالیکه ژن *N* حساسیت ضعیف تری (۸/۳ کپی در ازای هر واکنش) از خود نشان داد. این روش را می توان به عنوان یک سیستم با دو هدف طراحی کرد به نحوی که یک پرایمر به طور عمومی تعداد بسیار زیادی از کوروناویروس های مختلف از جمله SARS-CoV-2 را شناسایی نموده و یک پرایمر دوم منحصراً برای شناسایی SARS-CoV-2 تعیین شود.

جدول ۱- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) - پرایمرهای SARS-CoV-2

Institution	Gene target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Probe (5'-3')
U.S. CDC ^a	N gene	N1: GACCCCAAAATCAGCGAAAT	N1: TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG	N1: FAM-ACCCCGCATTACGTTTG GTGGACC-BHQ1
		N2: TTACAAACATTGGCCGCAAA	N2: GCGCGACATTCGGAAGAA	N2: FAM-ACAATTTGCCCCGAGC GCTTCAG-BHQ1
		N3: GGGAGCCTTGAATACACAAAA	N3: TGTCAGCAGATTGCAGCATTG	N3: FAM-AYCACATTGGCACCCGC AATCCTG-BHQ1
		RP-F RNase: AGATTGGACCTGCGAGCG	RP-RRNase: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	RP-P RNase: FAM-TTCTGACCTGAAGGCTC TGCGCG- BHQ-1
China CDC ^a	ORF1ab and N gene	ORF1ab: CCCTGTGGGTTTACACTTAA	ORF1ab: ACGATTGTGCATCAGCTGA	ORF1ab: FAM- CCGTCTGCGGTATGTGGAAG GTTATGG-BHQ1
		N: GGGGAACCTTCTCTGTAGTAAT	N: CAGACATTTTGTCTCAAGCTG	N: FAM-TTGCTGCTGCTTGA CAGATT-TAMRA
Charité, Germany ^a	RdRp, E, N gene	RdRp: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	RdRp: CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	RdRp 1: FAM-CAGGTGGAACCTCATC AGGAGATGC-BBQ
		E: ACAGGTACGTAAATAGTTAATAGCGT	E: ATATTGCAGCAGTACGCACACA	RdRp 2: FAM-CCAGGTGGWACRTCATC MGGTGATGC-BBQ
Hong Kong University ^a	ORF1b- nsp14, N gene	ORF1b-nsp14: TGGGGYTTTACRGTTAACCT	ORF1b-nsp14: AACRCGCTTAACAAAGCACTC	ORF1b-nsp14: FAM-TAGTTGTATGCWATC ATGACTAG-TAMRA
		N: TAATCAGACAAGGAAGTATTA	N: CGAAGGTGTGACTTCCATG	N: FAM-GCAAATGTGCA ATTTCGG-TAMRA
National Institute of Infectious Diseases, Japan ^a	N gene	N: AAATTTTGGGGACCAGGAAC	N: TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	N: FAM-ATGTCGCGCAT TGGCATGGA-BHQ
National Institute of Health, Thailand ^a	N gene	N: CGTTTGGTGGACCCTCAGAT	N: CCCCACTGCGTTCTCCATT	N: FAM- CAACTGGCAGTAACCBQHI

ویروس در ناحیه ای که نمونه گرفته شده و یا جهش در ژنگان ویروسی حاصل شده باشند (۳،۴۳). Winichakoon و همکارانش شواهد مختلفی از بیماران مرتبط از لحاظ اپیدمیولوژیک حتی هنگامیکه نمونه های سواب نازوفارنژ و یا اوروفارنژ آنها منفی است، ارائه کردند (۴۳).

مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری ایالات متحده (CDC)^۶، از یک روش RT-PCR (rRT-PCR)، یک مرحله ای استفاده می کند که به منظور شناسایی حضور SARS-CoV-2، داده های عددی در مورد حجم ویروسی ارائه می دهد (۴۴). برای انجام این روش، RNA ویروسی استخراج شده و به مخلوط اصلی واکنش (مستر میکس) اضافه می شود. مخلوط اصلی واکنش حاوی آب عاری از نوکلئاز، پرایمرهای پیشرونده و پسرونده، یک پروب کوئنچر-فلوروفور^۷ و ترکیب واکنش (شامل آنزیم رونوشت بردار معکوس، پلیمراز، منیزیم، نوکلئیدها و افزودنی ها) است (۳۲). مخلوط اصلی واکنش همراه با RNA استخراج شده، درون یک دستگاه ترموسایکلر PCR بارگذاری شده و دماهای انکوباسیون برای انجام واکنش تنظیم می شود. مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری، یک سری شرایط برای چرخه های rRT-PCR توصیه نموده است (۴۴). طی واکنش rRT-PCR، پروب کوئنچر-فلوروفور شکسته شده و یک سیگنال فلورسنت تولید می کند. این سیگنال فلورسنت توسط دستگاه ترموسایکلر شناسایی شده و پیشروی تکثیر در زمان حقیقی ثبت می شود. توالی پروب به کار رفته توسط Guan و همکارانش از نوع بلک هول کوئنچر-۱ (BHQ1, quencher)^۸ و فلورسین آمیدیت (FAM, fluorophore)^۹ بود. این واکنش حدود ۴۵ دقیقه زمان برده و می تواند در یک پلیت با ۹۶ چاهک انجام پذیرد که هر چاهک حاوی یک نمونه ی متفاوت یا یک کنترل است. هنگام انجام rRT-PCR هم کنترل مثبت و هم منفی، به منظور تفسیر مناسب نتایج نهایی باید وجود داشته باشند. برای SARS-CoV-2 توسط مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری، یک توالی به عنوان کنترل مثبت با نام nCoVPC ارائه شده است (۴۴). تعدادی از پرایمرها و پروب های RT-PCR برای SARS-CoV-2 از گروه ها و سازمان های تحقیقاتی مختلف، در جدول ۱ آورده شده اند.

همگام کردن روند انجام آزمایش تشخیصی نوکلئیک اسیدها با مدیریت بالینی. روشهای مختلفی برای اجرای روند RT-PCR در مراکز بالینی وجود دارد. Coman و همکارانش یک روند سه مرحله ای برای تشخیص SARS-CoV-2 پیشنهاد داده اند (۴۵). آنها این سه مرحله را به صورت بررسی اولیه، تأییدی و روش های گزینشی تعریف می کنند. برای به حداقل رساندن تعداد

پس از طراحی پرایمرها و پروب ها، مرحله بعدی شامل بهینه سازی شرایط آزمایش (مانند شرایط معرف ها، دفعات انکوباسیون و دماهای واکنش) بوده و پس از آن آزمون توسط PCR است. روش RT-PCR می تواند طی یک یا دو مرحله اجرا شود. در روش یک مرحله ای، رونویسی معکوس و تکثیر PCR در یک واکنش ادغام شده اند. این نوع روش نتایج سریع و قابل تکرار به منظور یک آنالیز با ظرفیت پذیرش بالا فراهم می کند. چالش این روش، مشکل بودن بهینه سازی مراحل رونویسی معکوس و تکثیر است زیرا به خاطر وقوع همزمان به میزان پایین از تکثیر ناحیه ی هدف منجر می شود. در روش دو مرحله ای، واکنش ها به صورت متوالی در لوله های جداگانه انجام می شوند (۳۶). این روش در مقایسه با روش یک مرحله ای حساسیت بیشتر، ولی به زمان بیشتر و بهینه سازی پارامترهای مضاعفی نیاز دارد (۳۶،۳۷).

در پایان، کنترل های واکنش باید با دقت انتخاب شوند تا از اعتبار روش برای شناسایی خطاهای آزمایش اطمینان حاصل شود.

نحوه ی انجام آزمایش نوکلئیک اسید برای SARS-CoV-2 حداقل ۱۱ روش بر پایه ی نوکلئیک اسید و ۸ کیت شناسایی آنتی بادی در چین توسط سازمان ملی محصولات پزشکی (NMPA)^۱ برای تشخیص SARS-CoV-2 تأیید شده اند (۳۸). با این وجود، روش RT-PCR با استفاده از نمونه های تنفسی رایج ترین و اصلی ترین روش برای تشخیص کووید-۱۹ است (۲،۳۹). به طور کلی، نمونه های مجرای تنفسی فوقانی برای این آزمایش ها توصیه می شوند البته نمونه های مجرای تنفسی تحتانی نیز برای بیمارانی که سرفه ی خلط دار بروز می دهند، پیشنهاد شده است (۴۰). نمونه های مجرای تنفسی فوقانی شامل سواب نازوفارنژ^۲، سواب اوروفارنژ^۳، مایعات شسته شده از نازوفارنژ^۴ و آسپیره ی بینی^۵ هستند. نمونه های مجرای تنفسی تحتانی شامل خلط، مایع برونش و آسپیره ی نای هستند. هر دو نمونه ی مایع برونش و آسپیره ی نای خطر بالای تولید آئروسول دارند. حجم ویروس قابل شناسایی به تعداد روزهای سپری شده از زمان شروع بیماری بستگی دارد. در ۱۴ روز آغازین بیماری معتبرترین نمونه برای شناسایی SARS-CoV-2 خلط و پس از آن سواب بینی است، در حالی که سواب های حلق پس از گذشت ۸ روز از شروع علائم نامعتبرند (۴۱،۴۲). با توجه به تفاوت در حجم ویروسی، یک نتیجه ی منفی از آزمایش نمونه ی تنفسی به طور کامل احتمال بیماری را رد نمی کند. این نتایج منفی می توانند از روش های نمونه گیری نامناسب، حجم پایین

¹ National Medical Products Administration

² nasopharyngeal swab

³ oropharyngeal swab

⁴ nasopharyngeal washes

⁵ nasal aspirates

⁶ Centers for Disease Control and Prevention

⁷ fluorophore-quencher probe

⁸ Black Hole Quencher-1

⁹ fluorescein amidite

(۳،۲۵،۵۳،۵۴). مهمترین هشدار در مورد استفاده از سی تی اسکن برای کووید-۱۹ است اختصاصیت پایین (۲۵٪) آن است زیرا ویژگی های قابل مشاهده در این تصاویر با سایر پنومونی های ویروسی مشترک اند (۳).

کووید-۱۹ در حال حاضر از طریق RT-PCR تشخیص داده شده و توسط سی تی اسکن نیز مورد بررسی قرار می گیرد چرا که هر روش معایب خود را داراست. سه مشکل در استفاده از روش RT-PCR وجود دارد. اول، میزان دسترسی به کیت های PCR که با میزان نیاز آن هماهنگ نیست. دوم، بیمارستان های عمومی در خارج از نواحی شهری فاقد زیرساخت لازم انجام PCR با توان اجرایی بالا هستند. در نهایت، روش RT-PCR بر حضور SARS-CoV-2 قابل شناسایی در نمونه ی جمع آوری شده متکی است. اگر یک بیمار فاقد علائم توسط SARS-CoV-2 آلوده شده ولی از آن بهبود یافته باشد، PCR قادر به شناسایی این عفونت پیشین نیست و در نتیجه اقدامات نظارتی لازم اعمال نخواهند شد. همچنین سیستم های مربوط به CT هزینه بر بوده، نیاز به تخصص فنی داشته و نمی توانند به صورت اختصاصی کووید-۱۹ را تشخیص دهند. برای رفع این نواقص فناوری های دیگر باید با SARS-CoV-2 سازگار شوند.

آزمایش های تشخیصی نوظهور برای کووید-۱۹. طبق اعلام سازمان جهانی بهداشت، اولویت فوری برای تحقیقات تشخیصی، طراحی آزمایشات بر پایه ی نوکلئیک اسید و پروتئین با کاربرد در محل مراقبت از بیمار^۲ است (۲). اولویت درازمدت، ادغام این آزمایش ها پانل های چندگانه است. به منظور بهبود اقدامات نظارتی، آزمون های سرولوژیک با استفاده از پروتئین ها علاوه بر آزمایش های نوکلئیک اسید ضروری اند. این آزمایش ها بر خلاف آزمایشات نوکلئیک اسید، مزیت تشخیص پس از بهبودی را دارا هستند. این امکان پزشکان را قادر می سازد که با پیگیری افراد بیمار و افراد بهبود یافته از بیماری، ارزیابی بهتری از عفونت کلی SARS-CoV-2 داشته باشند. آزمایشات قابل انجام در محل مراقبت از بیمار، تجهیزات قابل حمل و مقرون به صرفه ای بوده که به منظور تشخیص بیماران خارج از مراکز پزشکی اصلی ساخته می شوند. این آزمایشات می توانند در مکان هایی از قبیل مراکز اجتماعی، به منظور کاهش بار تحمیلی بر آزمایشگاه های تشخیص طبی به کار روند (۵۵).

آزمایشات نوکلئیک اسید. در حال حاضر آزمایشات نوکلئیک اسید که از تکثیر تک دما (ایزوترمال) استفاده می کنند، برای شناسایی SARS-CoV-2 در حال بررسی اند. روش های تکثیر ایزوترمال، در یک دما انجام گرفته و نیاز به تجهیزات تخصصی آزمایشگاهی مشابه با PCR برای فراهم نمودن حساسیت های تشخیصی ندارند (۵۶). این روش ها شامل تکثیر ریکامیناز

بیماران شناسایی شده، اولین مرحله تمام ویروس های مرتبط با سارس را از طریق هدف قرار دادن نواحی مختلف ژن *E* شناسایی می کند. در صورت مثبت بودن نتیجه ی این آزمایش، آنها تشخیص ژن *RdRP* را با استفاده از دو پرایمر و پروب مختلف پیشنهاد کرده اند. اگر این نتایج نیز مثبت باشند، آنها آزمایش گزینشی را با یکی از دو توالی پروب انجام می دهند (۴۵). جدول ۱ را ببینید. *Chu* و همکارانش این آزمایش را با کمی تفاوت پیشنهاد کرده اند (۴۶). آنها نمونه ها را با استفاده از پرایمر هایی برای ژن *N* بررسی نموده و از پرایمر های ژن *ORF1b* به عنوان تأیید استفاده کردند. نتایج آزمایش تشخیصی که در آن نمونه ی بیمار با پرایمر ژن *N* مثبت و با پرایمر ژن *ORF1b* منفی باشد، نامعتبر است. در چنین شرایطی آزمایشات پروتئینی (آزمایش آنتی بادی) یا توالی یابی به منظور تأیید تشخیص مورد نیازند (۴۶).

توموگرافی کامپیوتری (CT). به دلیل کمبود کیت تشخیصی و میزان نتایج منفی کاذب RT-PCR، در استان هوپای کشور چین به صورت موقت از سی تی اسکن به عنوان یک تشخیص بالینی برای کووید-۱۹ استفاده شد (۴۷). سی تی اسکن قفسه ی سینه روشی غیر تهاجمی بوده و شامل ارزیابی های متعدد توسط پرتو ایکس از زوایای مختلف قفسه ی سینه ی بیمار به منظور ایجاد تصاویر چند مقطعی است (۴۸ و ۴۹). این تصاویر سپس توسط رادیولوژیست ها در جستجوی ویژگی های غیر طبیعی منجر به یک تشخیص مورد بررسی قرار می گیرند (۴۸). خصوصیات تصاویر مرتبط با کووید-۱۹ متنوع بوده و به مرحله ی عفونت پس از بروز علائم بستگی دارد. به عنوان مثال *Bernheim* و همکارانش بیشترین نتایج طبیعی سی تی اسکن را (۵۶٪) طی مراحل ابتدایی بیماری (۰ تا ۲ روز) و حداکثر میزان درگیری ریه که پس از گذشت حدود ۱۰ روز از زمان بروز علائم به اوج می رسد، مشاهده کردند (۵۱). شایع ترین ویژگی نمایانگر کووید-۱۹، شامل نواحی کدر گراوند-گل^۱ (نواحی با کدورت خفیف) به صورت دو طرفه و پیرامونی به همراه سفت شدن ریه ها (ماده ی مایع یا جامد در بافت منعطف ریه) است (۵۰ و ۵۱). *Dewever* و همکارانش دریافتند که نواحی کدر گراوند-گل^۱، صفر تا ۴ روز پس از بروز علائم در آشکار ترین حالت خود هستند. همراه با پیشروی عفونت کووید-۱۹ علاوه بر این نواحی کدر، الگوهای *crazy-paving* (الگوی نامنظم سنگفرشی) نیز گسترش یافته و در ادامه میزان سفت شدن ریه افزایش می یابد (۵۰، ۵۱). بر اساس این ویژگی ها در تصاویر قفسه ی سینه، مطالعات مروری مختلفی نشان داده اند که سی تی اسکن حساسیت بیشتر (۸۶-۹۸٪) و میزان نتایج منفی کاذب قابل قبول تری را در مقایسه با روش RT-PCR داراست

² Point-of-care¹ Ground-glass opacities

گذاری شده، برای تشخیص فیروزکیستی و بیماری‌های تنفسی موجود هستند (۶۵،۶۶). روش‌های متشکل از مهره‌های بارگذاری شده به منظور استفاده در آزمایشگاه طراحی شده‌اند ولی تلاش‌هایی برای تولید انواعی از آنها با کاربرد در محل مراقبت از بیمار در حال انجام هستند. با این حال مشکل این روش‌ها در طراحی دستگاه خوانش نتایج نهفته است. سیگنال پیچیده‌ی متشکل از بارکد که از مولکول‌های ارگانیک منشاء می‌گیرد، نیاز به طراحی یک دستگاه منحصربه‌فرد برای تشخیص این کدها دارد. محققین در حال بررسی به منظور غلبه بر این محدودیت با استفاده از نقاط کوانتومی غیر آلی برای بارکد گذاری بوده که امکان برانگیختگی توسط باتری و ثبت سیگنال انتشار یافته با استفاده از دوربین تلفن‌های هوشمند را فراهم می‌کند. Kim و همکارانش اختصاصیت و حساسیت بالینی را به ترتیب ۹۱ و ۹۵٪ با استفاده از بارکدهای متشکل از نقاط کوانتومی برای تشخیص بیماران مبتلا به هپاتیت B، پس از تکثیر ایزوترمال پلیمرز معکوس مشخص کرده‌اند (۶۳). پانل‌های حاوی بارکدها می‌توانند به منظور انتشار آسان معرف‌ها، در قالب یک صفحه طراحی شوند (۶۷). پانل‌های حاوی بارکد برای ویروس‌های تنفسی، کروناویروس‌ها، بیماری‌های مقاربتی و یا همچنین برای علائم (مانند تب، سرفه، اسهال) قابل طراحی‌اند.

علاوه بر تکثیر ایزوترمال، آزمایشات دیگری نیز بر اساس نوکلئیک اسید وجود دارند که می‌توانند برای تشخیص SARS-CoV-2 به کار گرفته شوند. روش شرلاک^۵، یک روش تشخیص است که از ریبونوکلاز Cas13a برای شناسایی RNA استفاده می‌کند (۶۸). هدف‌های مورد نظر در RNA ویروسی از طریق رونویسی معکوس به cDNA تبدیل شده و سپس با روش تکثیر پلیمرز معکوس به صورت ایزوترمال تکثیر می‌شوند. محصولات تکثیر یافته سپس مجدداً به RNA رونویسی می‌شوند. Cas13a با یک توالی RNA راهنما که به محصول RNA تکثیر یافته متصل می‌شود، تشکیل کمپلکس می‌دهد (۶۹). پس از اتصال به هدف، Cas13a فعال می‌شود؛ سپس پروب‌های کوئنچر-فلوئوروفور اطراف خود را شکسته و سیگنال فلوئورسنت تولید می‌کند. تمامی اجزای روش شرلاک قابل انجام خشک هستند. مطالعات پیشین با استفاده از روش شرلاک موفق به شناسایی زیکا ویروس^۶ در نمونه‌های ادرار و سرم بیماران، حتی در موارد با تعداد بسیار کم ویروس با ۲۰۰۰ کپی در میلی لیتر شده‌اند (۷۰). یک پروتکل از شرلاک برای شناسایی SARS-CoV-2 طراحی و انتشار یافته است و سیستم تشخیصی دیگری نیز بر اساس Cas13a با استفاده از جدایه‌های بالینی SARS-CoV-2 آزمایش شده‌اند (۷۲).

پلیمرز^۱، تکثیر وابسته به هلیکاز^۲، تکثیر ایزوترمال به واسطه‌ی حلقه (LAMP)^۳ هستند. آزمایشگاه‌های تحقیقاتی متعددی روش رونوشت بردار معکوس LAMP (RT-LAMP) را برای SARS-CoV-2 طراحی و به صورت بالینی مورد آزمون قرار داده‌اند (۵۷-۶۰). این روش از DNA پلیمرز و ۴ الی ۶ پرایمر برای اتصال به ۶ ناحیه‌ی مشخص بر روی ژنگان هدف استفاده می‌کند. در یک سیستم چهار-پرایمری، دو پرایمر داخلی (یک پرایمر داخلی پیشرو و یک پرایمر داخلی پسرو) و ۲ پرایمر خارجی وجود دارند؛ روش LAMP به شدت اختصاصی بوده زیرا از پرایمر‌های بیشتری استفاده می‌نماید (۶۱). در روش‌های تشخیصی LAMP، نمونه‌ی بیمار به لوله‌ی آزمایش اضافه گشته و DNA تکثیر شده از طریق کدورت (یک محصول جانبی واکنش)، رنگ (اضافه نمودن یک رنگ حساس به pH) و یا فلوئورسنس (اضافه نمودن یک رنگ فلوئورسنت که به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود)، شناسایی می‌شود (۶۲). واکنش مورد نظر در مدت کمتر از یک ساعت و دمای ۶۰ تا ۶۵ درجه‌ی سانتی گراد با محدودیت تشخیصی تقریبی ۷۵ کپی در میکرولیتر صورت می‌پذیرد. اجرای این روش ساده بوده، تشخیص به آسانی نمایان شده، سیگنال پس زمینه در آن کمتر بوده و نیازی به دستگاه ترموسایکلر ندارد (۶۱). معایب روش LAMP مربوط به چالش‌های بهینه سازی پرایمرها و شرایط واکنش است. سایر روش‌های تکثیر ایزوترمال برای تشخیص کووید-۱۹ در حال طراحی هستند (۶۲).

روش‌های تکثیر ایزوترمال می‌توانند در مرحله‌ی تکثیر و یا خوانش، به صورت مرکب^۴ طراحی شوند. روش‌های مرکب می‌توانند از مهره‌های پلیمری کد شده و نشانگرهای نوری (مانند مولکول‌های فلوئورسنت آلی) به منظور بارکدگذاری استفاده کنند. بارکدها ممکن است برای بیماری‌های مختلف در یک پانل به منظور شناسایی متغیرهای چندگانه از نمونه‌ی یک بیمار و در یک لوله‌ی واکنش به کار روند (۶۳). روش‌های مرکب میزان اطلاعات به دست آمده از یک آزمایش را افزایش داده و حساسیت و اختصاصیت بالینی را بهبود می‌بخشند (۶۴). یکی از راه‌های کد کردن نشانگرهای انحصاری از طریق عوامل منتشر کننده‌ی سیگنال‌های فلوئورسنت است. هر انتشار منحصراً نشانه‌ی DNA یا آنتی بادی به دام افتاده بر روی سطح مهره‌های پلیمری است. تشخیص مثبت هنگامی رخ می‌دهد که نمونه‌ی یک بیمار حاوی یک توالی یا آنتی‌ژن بوده که مولکول به دام افتاده بر روی مهره را به یک پروب ثانویه (نشانه گذاری شده توسط فلوئوروفور با سیگنال انتشار متفاوت از مهره‌ها) متصل کند. در حال حاضر پانل‌های مرکب حاوی مهره‌های بارکد

¹ recombinase polymerase amplification² helicase-dependent amplification³ loop-mediated isothermal amplification⁴ multiplexed⁵ SHERLOCK
⁶ Zika virus

جدول ۲- روش های نوظهور برای تشخیص SARS-CoV-2

platform	biomarker	POC (Y/N)	type of technology	how it works	types of clinical sample	clinical sample tested
CRISPR ¹⁰⁹	nucleic acid	Y	RPA	PCR, perform CRISPR/Ca9-mediated lateral flow nucleic assay (CASLFA)	serum	110
CRISPR ⁶⁸	nucleic acid	Y	RT-RPA	RPA, SHERLOCK multiplexed signal detection via fluorescence	nasopharyngeal swabs	384
LAMP ¹¹⁰	nucleic acid	N	LAMP	isothermal DNA synthesis using self-recurring strand displacement reactions; positive detection leads to increased sample turbidity	throat swabs	53
RPA ¹¹¹	nucleic acid	N	RPA	forward and reverse primers blind to DNA and amplify strands at 37 °C	fecal and nasal swabs	30
NASBA ¹¹²	nucleic acid	N	real-time NASBA	transcription-based amplification for RNA targets	nasal swabs	138
RCA ¹¹³	nucleic acid	N	rolling circle amplification	DNA polymerase used to extend a circular primer and repeatedly replicate the sequence	serum	7
RT-LAMP ¹¹⁴	nucleic 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 ⁸³	nucleic acid	Y	barcode	multiplexed quantum beads capture viral DNA for RPA detection	serum	72
magnetic bead ¹¹⁵	nucleic 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 isolation 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

Zhang و همکارانش با استفاده از روش الایزا^۱، ایمونوگلوبولین G و M (IgG و IgM) را در سرم بیماران کووید-۱۹ شناسایی کردند (۷۵). آنها از پروتئین نوکلئوکسپید Rp3 متعلق به SARS-CoV-2 که در توالی آمینواسیدی دارای ۹۰٪ تشابه با سایر ویروس های مرتبط با سارس است، استفاده کردند. پروتئین های نو ترکیب بر روی سطح پلیت های ۹۶ چاهکی جذب شده و پروتئین اضافه شسته می شود. سرم رقیق شده ی انسان اضافه شده و به مدت ۱ ساعت باقی می ماند. سپس پلیت مجدداً شسته می شود. ایمونوگلوبولین G بر علیه نوع انسانی که با آنزیم پراکسیداز مشتق شده از ترب کوهی^۲ فعال شده است، به پلیت اضافه شده تا امکان اتصال به هدف را دارا باشد. پلیت شسته شده و پس از آن سوسترای ۳' و ۵' و ۵' -تترامتیل بنزیدین^۳ اضافه می شود. آنزیم پراکسیداز با سوستر و اکشن داده و منجر به تغییر می شود که توسط دستگاه خوانش پلیت قابل تشخیص خواهد بود. اگر IgG بر علیه SARS-CoV-2 در نمونه وجود داشته باشد، در میان نوکلئوپروتئین جذب شده به سطح پلیت و پروب ضد IgG انسانی به دام افتاده و منجر به ایجاد یک سیگنال مثبت می شود. آزمایش IgM که توسط Zhang و همکارانش طراحی شده ساختار مشابهی داشته ولی از

آزمایش پروتئین. آنتی ژن های پروتئینی ویروس و آنتی بادی هایی که در پاسخ به عفونت SARS-CoV-2 تولید می شوند، می توانند برای تشخیص کووید-۱۹ به کار روند. تغییر در حجم ویروسی طی دوران عفونت ممکن است شناسایی پروتئین ها را با مشکل روبرو سازد. به عنوان مثال، Lung و همکارانش حجم ویروسی بالا در بزاق را طی هفته ی نخست پس از بروز علائم نشان دادند البته این میزان با گذشت زمان کاهش یافت (۷۳). در مقابل، آنتی بادی های تولید شده در پاسخ به پروتئین های ویروسی ممکن است یک پنجره ی زمانی وسیع تر برای تشخیص غیر مستقیم SARS-CoV-2 فراهم نمایند. آزمایش های بر اساس آنتی بادی به ویژه می توانند در نظارت بر کووید-۱۹ کارآمد باشند. یکی از چالش های بالقوه در مسیر طراحی آزمایش های سرولولژیک دقیق، شامل واکنش متقاطع احتمالی آنتی بادی های SARS-CoV-2 با آنتی بادی های تولید شده بر علیه سایر کرونا ویروس ها است. Lv و همکارانش نمونه ی پلاسما از ۱۵ بیمار کووید-۱۹ را در مقابل پروتئین SARS-CoV-2 و SARS-CoV مورد بررسی قرار داده و میزان بالایی از واکنش متقاطع را مشاهده کردند (۷۴).

در حال حاضر آزمایشات سرولولژی (آزمایش خون برای آنتی بادی های خاص) در حال آماده سازی هستند (۷۷-۷۵).

¹ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

² horseradish peroxidase

³ 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

IgM ضد نوع انسانی به صورت چسبیده به پلیت و یک پروب ضد نوکلئوکسپید Rp3 استفاده می کند. آنها نمونه ی ۱۶ بیمار با نتایج RT-PCR مثبت را بررسی کرده و دریافتند که سطح این آنتی بادی ها طی ۵ روز پس از بروز علائم افزایش می یابد. در روز صفر، به ترتیب ۵۰٪ و ۸۱٪ از بیماران برای IgM و IgG مثبت بوده ولی این مقادیر به ۸۱٪ و ۱۰۰٪ در روز پنجم افزایش یافت (۷۵). آنتی بادی ها در نمونه های تنفسی، خون یا مدفوع مورد شناسایی قرار گرفتند. Xiang و همکارانش همچنین آنتی بادی های IgG و IgM مرتبط با SARS-CoV-2 را در موارد مشکوک نیز شناسایی کردند (۷۶). براساس مطالعات اخیر، ممکن است نشانگرهای پروتئینی یا سلولی دیگری نیز وجود داشته باشند که بتوانند در تشخیص به کار روند. Guan و همکارانش نشان دادند که بیماران عفونی مقادیر افزایش یافته از پروتئین واکشگر-C^۱ و دی-دایمر^۲ و نیز مقادیر پایین از لئوسیت، لوکوسیت ها و پلاکت خون را دارا هستند (۲۵). چالش استفاده از این بیومارکرها، غیرطبیعی بودن آنها در سایر بیماری ها علاوه بر این بیماری است. یک آزمایش ترکیبی با استفاده از آنتی بادی و مارکرهای کوچک مولکولی می تواند اختصاصیت روش را بهبود ببخشد.

آزمایش در محل مراقبت از بیمار. این نوع آزمایشات به منظور شناسایی بیماران بدون نیاز به ارسال نمونه به مراکز پزشکی به کار رفته و بدین ترتیب جوامع فاقد زیربنای آزمایشگاهی را قادر به تشخیص بیماران عفونی می کنند. یکی از انواع آزمایش های قابل انجام در محل، شامل شناسایی آنتی ژن به روش جریان افقی^۳ برای SARS-CoV-2 در دست بررسی است (۷۶). در انواع تجاری روش های جریان افقی، یک غشای نواری کاغذ مانند با دو نوع خط روکش می شود: جفت های نانوپارتیکل طلا-آنتی بادی^۴ در یک خط حضور داشته و آنتی بادی ها را در خط دیگر به دام می اندازند. نمونه ی بیمار مانند (خون و ادرار) بر روی غشا ته نشین شده و پروتئین ها از طریق اثر موینگی در طول نوار کشیده می شوند. در هنگام عبور از نخستین خط، آنتی ژن ها به جفت های نانوپارتیکل طلا-آنتی بادی متصل شده و این کمپلکس در طول غشا جریان می یابد. با رسیدن به خط دوم، کمپلکس شکل گرفته توسط آنتی بادی های به دام اندازنده متوقف شده و یک خط قرمز یا آبی رنگ نمایان می شود. نانوپارتیکل های طلا به صورت مجزا قرمز رنگ هستند ولی یک محلول حاوی نانوپارتیکل های طلا به صورت گروهی در نتیجه ی جفت شدن پیوند پلاسمون^۵ به رنگ آبی است. روش جریان افقی حساسیت، اختصاصیت و دقت بالینی به

ترتیب برابر با ۵۷٪، ۱۰۰٪ و ۶۹٪ برای IgM و ۸۱٪، ۱۰۰٪ و ۸۶٪ برای IgG نشان داده است. آزمایشی که IgG و IgM را توأمان شناسایی می کند، حساسیت بالینی برابر با ۸۲٪ دارا است (۷۶). روش های نوکلئیک اسید نیز می توانند با روش جریان افقی ترکیب شوند. پیش از این، یک آزمون RT-LAMP با روش جریان افقی برای شناسایی MERS-COV ادغام شده است (۷۸). این آزمایشات برای یک بار استفاده طراحی شده و در مقایسه با RT-PCR حساسیت ضعیفی دارا هستند. به منظور بهبود سیگنال شناسایی این روش، محققین انواعی از تکنیک های تقویت سیگنال (از قبیل تصویربرداری حرارتی و تجمع چندین نانوپارتیکل طلا) را طراحی کرده اند (۷۹).

یک روش دیگر به منظور استفاده در مراقبت گاه بیمار، ابزارهای میکروفلوئیدی^۶ هستند. این ابزارها از یک تراشه در اندازه ی یک کف دست که کانال هایی در اندازه ی میکرومتر و حفره های واکنش در آن طراحی شده است، تشکیل می شوند. این تراشه به کمک نیروهای الکتروکیتیک، موینگی، کششی و یا سایر نیروها نمونه های مایع را ترکیب و جدا سازی می کنند. این تراشه ها می توانند از جنس پلی دی متیل سولفوکسید، شیشه یا کاغذ ساخته شوند. مزایای اصلی استفاده از میکروفلوئیدها شامل کوچک سازی، حجم پایین نمونه، تشخیص سریع و قابلیت حمل است (۸۰). Laksanasopin و همکارانش یک ضمیمه برای تلفن هوشمند با استفاده از میکروفلوئیدها به منظور شناسایی آنتی بادی ها بر علیه عفونت های مقاربتی از طریق معرف های با تحرک پیوسته که بر روی یک کاست از پیش ذخیره شده اند، طراحی نمودند. این سیستم با آزمایش بر روی ۹۶ بیمار در رواندا^۷ برای HIV، حساسیت و اختصاصیت بالینی به ترتیب برابر با ۱۰۰٪ و ۸۷٪ نشان داد (۸۱). فناوری هایی از این قبیل می توانند برای تشخیص RNA یا پروتئین های SARS-CoV-2 سازگار شوند.

در اینجا برخی از فناوری های تشخیصی را که امکان استفاده به صورت بالینی را نشان داده اند، شرح دادیم. در جدول ۲، فهرستی جامع از فناوری های نوظهور که می توانند برای تشخیص SARS-CoV-2 تنظیم شوند، آورده شده است. سیستم های مختلف از قبیل حسگرهای الکتروشیمیایی، سیستم های بر پایه ی کاغذ و سیستم های بر پایه ی پراکنش رامان تقویت شده-سطحی در آزمایشگاه های تحقیقاتی در حال طراحی اند. روش هایی از این قبیل در مراحل ابتدایی ساخت بوده و نمی توانند به زودی برای تشخیص کووید-۱۹ مورد استفاده قرار گیرند. خطوط کلی برای طراحی فناوری تشخیصی را می توان در چهار مرحله ترسیم کرد (شکل ۳).

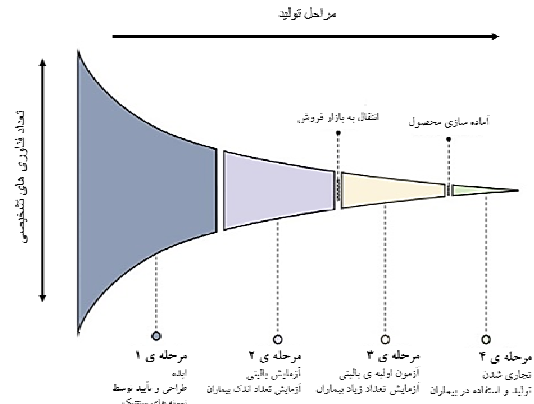
^۱ C-reactive protein^۲ D-dimer^۳ lateral-flow^۴ gold nanoparticle-antibody conjugates^۵ plasmon band^۶ microfluidic devices^۷ Rwanda

تشخیص در مواقع شیوع گسترده و ناگهانی یک بیماری در آینده ایفا کنند.

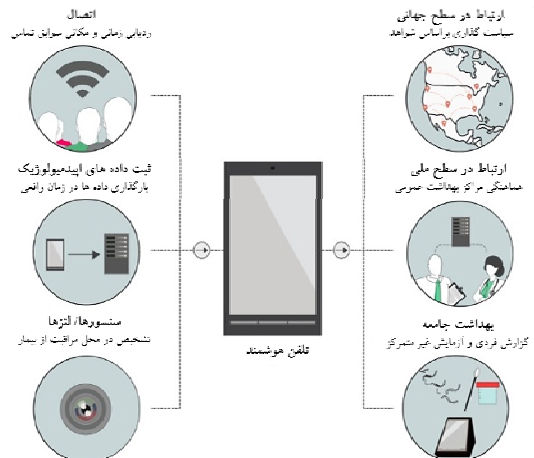
نظارت بر بیماری های عفونی از طریق تلفن هوشمند. مهارت اپیدمی ها نیاز به نظارت گسترده، اشتراک گذاری داده های اپیدمیولوژی و کنترل بیماران دارد (۸۲،۸۳). نهادهای بهداشتی، از بیمارستان های بومی تا سازمان جهانی بهداشت، نیاز به ابزارهایی برای بهبود سرعت و سهولت ارتباط به منظور مدیریت انتشار بیماری دارند. تلفن های هوشمند با توجه به دارا بودن ویژگی هایی از قبیل ارتباط، قدرت رایانه ای و سخت افزاری، می توانند به عنوان اهرمی برای تسهیل گزارش الکترونیکی، ثبت داده های اپیدمیولوژی و آزمایش در محل، به کار گرفته شوند (شکل ۳) (۸۴،۸۵). افزایش تصاعدی در میزان مقبولیت تلفن های هوشمند در سرتاسر جهان، از جمله مناطق جنوبی آفریقا^۲، آنها را به یک فناوری با دسترسی گسترده با هدف پاسخ دهی مناسب طی مواقع شیوع وسیع بیماری ها مانند کووید-۱۹ مبدل می سازد (۸۴).

انتشار جهانی کووید-۱۹ به دلیل ارتباطات ضعیف و گزارش های اولیه کمتر از میزان واقعی سرعت بیشتری گرفت (۸۶،۸۷). یک مثال قابل توجه در این مورد، کشور ایران است که ۴۳ مورد ابتدایی خود را تا تاریخ ۲۳ فوریه ۲۰۲۰ با آمار ۱۹٪ مرگ و میر (۸ مورد) و ۳ مورد خارج شده از کشور تأیید کرد. بر اساس این گزارش، الگوی انتقالی تعداد افراد آلوده در ایران را هزاران نفر نشان می داد (۸۳). تلفن های هوشمند می توانند با آزمایش های تشخیصی همراه شده و اطلاعات منطقه ای در زمان واقعی را به منظور قادر ساختن سازمان های ملی و جهانی بهداشت به منظور اجرای استراتژی های مهارتی هماهنگ فراهم کنند. گروه های تحقیقاتی مختلفی تاکنون از تلفن های هوشمند با هدف ردیابی منطقه ای بیماری های عفونی از قبیل HIV، ابولا^۳ و سل^۴ استفاده کرده اند (۸۹-۹۱). در مورد ابولا، تلفن های هوشمند به منظور ردیابی سوابق تماس یعنی پیگیری و شناسایی کسانی که با افراد آلوده تماس داشته و ممکن است آلوده شده باشند، مورد استفاده قرار گرفت (۸۹). تلفن های هوشمند قادر هستند که روند ردیابی سوابق تماس را به فرم دیجیتال تبدیل نموده و بدین ترتیب گزارش هایی جامع تر و با قابلیت اشتراک گذاری بیشتر فراهم کنند.

در فقدان ارتباط میان سازمان های منطقه ای بهداشت، آمار انتشار بیماری ممکن است در نقاط مختلف یک کشور متفاوت باشد؛ مانند موردی که در کانادا طی شیوع ناگهانی سارس در سال ۲۰۰۳ رخ داد. تورنتو در اونتاریو^۵ دارای ۲۴۷ مورد بود که ۳



شکل ۳



شکل ۴- نقش تلفن های هوشمند در تشخیص. قابلیت های تلفن هوشمند از قبیل اتصال، ذخیره ی اطلاعات و سخت افزارهای متصل به آن، امکان بهبود شرایط سیاست گذاری براساس شواهد، هماهنگی در سطح ملی برای پاسخ به بیماری، و بهداشت جامعه را فراهم می کند.

مرحله ۱ به فناوری های اشاره دارد که در مرحله ی اثبات ایده^۱ هستند یعنی جایی که محققین از اهداف سنتتیک به منظور تأیید اعتبار طرح استفاده می کنند. مرحله ۲ به بخشی اطلاق می شود که فناوری های مورد نظر تعداد کمی از نمونه های بیمار را آنالیز نموده اند (کمتر از ۱۰۰ نمونه). مرحله ۳، اصولاً به فناوری های مربوط می شود که به آزمایش بالینی با یک گروه بزرگ از بیماران رسیده اند. مرحله ۴، زمانی است که فناوری مورد نظر به صورت تجاری تولید شده و در بیماران استفاده شده است. این فناوری های مظهر می توانند نقشی کلیدی در

² Sub-Saharan Africa

³ Ebola

⁴ Tuberculosis

⁵ Toronto, Ontario

¹ proof-of-concept

مورد آن منشأ خارجی داشتند. در حالی که ونگوور واقع در ناحیه ی بریتیش کلمبیا^۱، تنها ۵ مورد دارا بود که ۴ مورد آن نیز منشأ خارجی داشت (۹۲،۹۳). در آن زمان اونتاریو فاقد یک سازمان بهداشت استانی بود، ولی سازمان بهداشت بریتیش کلمبیا از قبل تشخیص داده بود که این استان در خطر ورود بیماری های عفونی نوظهور قرار دارد. پیش از شیوع ناگهانی سارس، سازمان بهداشت بریتیش کلمبیا یک شبکه ی ارتباطی دیجیتال را با هدف تسهیل ارتباط یکپارچه در سرتاسر استان راه اندازی کرده بود (۹۲). این شبکه های ارتباطی می توانند با به کارگیری تلفن های هوشمند گسترش یابند. تلفن های هوشمند قادر هستند که به صورت میدانی، به منظور بارگذاری و اشتراک داده های اپیدمیولوژیک بر روی پایگاه های اطلاعاتی بهداشت عمومی و نیز پاسخ دهی هماهنگ در مواقع شیوع ناگهانی بیماری به کار روند.

افراد مشکوک به کووید-۱۹، ممکن است با موانع ارتباطی برای تماس با مراکز بهداشتی مواجه شوند. هر فرد با علائم خفیف تنفسی ممکن است برای مراجعه به بیمارستان های شلوغ به دلیل افزایش احتمال خطر آلوده شدن به کووید-۱۹ تردید کند. تلفن های هوشمند می توانند به عنوان ابزاری برای فراهم آوردن یک خط ارتباطی مستقیم میان بیماران و پزشکان بدون ایجاد خطر آلودگی برای طرفین به کار گرفته شوند. طی پاندمی انفلوآنزا در سال ۲۰۰۹، سوئیس علاوه بر سیستم گزارش موجود از مشاوره ی پزشکی تلفنی نیز برای مدیریت موارد مشکوک استفاده کرد (۹۴). مشاوره های تلفنی به دلیل ایجاد امکان دسترسی با موانع کمتر، منجر به میزان بالاتری از گزارش موارد انفلوآنزا در مقایسه با مشاوره های حضوری شد. اگر افراد آلوده به کووید-۱۹ به بیمارستان مراجعه و آزمایش آنها مثبت شود، بیماران با علائم خفیف نیز برای قرنطینه به خانه فرستاده می شوند (۹۵). قرنطینه به صورت فردی، طبیعتاً از ارتباط میان بیماران و پزشکان جلوگیری کرده و منجر به اثرات نامطلوب بر سلامت روحی برای بیمار و همچنین کاهش کنترل بیمار توسط پزشک می شود. برنامه های نرم افزاری مربوط به تلفن های هوشمند، قادر به برقراری ارتباط میان بیماران با مشاوران روانشناسی به منظور فائق آمدن بر تنهایی و ترس های دوران شیوع بیماری و قرنطینه فردی هستند (۹۶،۹۷). علاوه بر این بیماران می توانند شخصاً علائم و رفتارهای خود را گزارش کرده که موجب سهولت کنترل از راه دور توسط پزشکان می شود (۹۸). برنامه های مشابه را می توان به منظور مطلع نگاه داشتن سازمان های بهداشتی به طور فعال و نیز بهبود پاسخگویی به شیوع ناگهانی بیماری ها مورد استفاده قرار داد.

در سال های اخیر، پیشرفت های قابل توجهی در زمینه ی ادغام فناوری های تشخیصی و تلفن های هوشمند صورت پذیرفته است. اجزای تلفن های هوشمند (مانند دوربین، چراغ قوه و جایگاه اتصال صوتی) پیش از این نیز برای خواندن نتایج آزمون های تشخیصی به عنوان جایگزین تجهیزات رایج آزمایشگاهی به کار رفته اند (۱۰۰). این دستگاه ها می توانند روند تشخیص را از طریق خودکار کردن خواندن نتایج و ثبت داده ها سهولت بخشند. به عنوان مثال، یک میکروسکوپ مربوط به تلفن هوشمند در کامرون^۲ به صورت میدانی مورد آزمایش قرار گرفته و زمان بررسی سریع تری را در مقایسه با روش های استاندارد نشان داد (۱۰۱). Kanazawa و همکارانش استفاده از تلفن های هوشمند را به همراه رادار بررسی مستقیم مادون قرمز (FLIR)^۳ برای تشخیص حرارتی تغییرات دمای بدن در نتیجه ی التهاب، معتبر دانسته اند. این فناوری همچنین ممکن است با هدف تشخیص تب که یکی از علائم رایج بسیاری از کروناویروس ها از جمله کووید-۱۹ می باشد، سازگار شود (۱۰۲). Madanyali و همکارانش نیز یک میکروسکوپ بر اساس تلفن های هوشمند طراحی کردند که نتایج تشخیص را به یک پایگاه اطلاعاتی برای آنالیز و ترسیم نقشه ی مکانی و زمانی انتقال می دهد (۱۰۳). این دستگاه ها می توانند برای رفع نیاز مربوط به روش های آزمایش در محل، در سطح جامعه ای که گزارش ها کمتر از میزان واقعی هستند، کمک کنند.

بحث و نگرش کلی

دسترسی به فناوری های تشخیصی تأیید شده (مرحله ی ۳، شکل ۳)، محققین را قادر به استفاده ی ساده و سریع از آنها به منظور طراحی روش های تشخیصی برای کووید-۱۹ کرده است. چنین فناوری هایی دهه ها زمان برای بهینه سازی نیاز داشته، ولی اکنون نقش کلیدی در شناسایی و مدیریت انتقال کووید-۱۹ ایفا می کنند. آموزه های فراهم شده از شیوع وسیع سارس در سال ۲۰۰۲، راهنمای شناسایی و تشخیص کووید-۱۹ شد. میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) برای بررسی مورفولوژی ویروس، توالی یابی ژنگان به منظور تأیید هویت ویروس، اطلاعات توالی برای کمک به طراحی پرایمر ها و پروب های PCR، مورد استفاده قرار گرفته اند. شناسایی SARS-CoV-2 تنها ۳ هفته زمان برد (۱۰۴). شناسایی و توالی یابی سریع SARS-CoV-2، منجر به طراحی و ساخت فوری آزمایشات بر اساس نوکلئیک اسید برای این ویروس شد. این اقدامات نخستین خط دفاعی را در برابر شیوع ناگهانی بیماری فراهم کرد. قدم بعدی کار بر روی ساخت آزمون های

² Cameroon

³ Forward Looking Infrared Radar

¹ Vancouver, British Columbia

میزان مرگ و میر را کاهش دهد. باید توجه داشت که اطلاعات در مورد کووید-۱۹ به سرعت در حال تغییر و تحول است. برخی از موارد خاص ذکر شده در این بررسی ممکن است همگام با دسترسی به تحقیقات بیشتر، دستخوش تغییر شوند. همچنین بسیاری از مطالعات ذکر شده در اینجا، ضعف‌هایی در تحقیقات تجربی و نیز طراحی خود شناسایی کردند. برخی از مقالات فهرست شده در بخش منابع، در مرحله ی پیش از چاپ بوده و هنوز مراحل داوری آنها تکمیل نشده است.

این مقاله ترجمه ای است از:

Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. Buddhisha Udugama, Pranav Kadhiresan, Hannah N. Kozlowski, Ayden Malekjahani, Matthew Osborne, Vanessa Y. C. Li, Hongmin Chen, Samira Mubareka, Jonathan B. Gubbay, and Warren C. W. Chan. ACS Nano, 14(4), 3822-3835

سرولوژیک بود زیرا استفاده از آنها آسان تر بوده و می‌توانستند مکمل آزمون‌های نوکلئیک اسید برای تشخیص عفونت کووید-۱۹ باشند. اکنون نیاز به طراحی و ساخت آزمایش در محل مراقبت از بیمار و نیز روش‌های ترکیبی است. فناوری‌هایی که میان مراحل ۲ و ۳ (شکل ۳) هستند، مانند تکثیر حرارتی، بارکد گذاری و فناوری‌های میکروفلوئیدی، بایستی توسعه ی بیشتری یافته تا به سیستم‌هایی با کارایی آسان و سریع مبدل گشته و بتوانند به سرعت در مواقع شیوع گسترده ی یک بیماری به کار گرفته شوند. ادغام تلفن‌های هوشمند و ابزارهای تشخیصی باید ارتباط و نظارت گسترده‌تری را فراهم کند. در پایان، روش‌های تشخیصی به دلیل مهیا نمودن منابع مستقیم و شرایط کمک به بیماران کووید-۱۹ برای کارکنان حوزه بهداشت، بخشی مهم از ابزارهای مقابله با شیوع بیماری‌ها هستند. این روند می‌تواند انتشار پاتوژن‌های عفونی را مهار و