

A Review on Rapid Detection Methods of COVID-19

Mahtab Moshref¹, Mozhgan Taghdisi¹, Seyed Mohammad Jazayeri², Neda Soleimani¹, Seyed Mohammad Jalil Zorriehzahra^{3*}, Mina Ziarati⁴, Laleh Yazdanpanah Goharrizi⁵, Maedeh Talebi⁶, Seyed Sajedeh Mousavi⁶

¹ Departments of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti, Tehran, Iran

² Clinical Virology Research Center, Department of Virology, Health Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Information and Scientific Communication, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

⁵ Department of Animal Science Research, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran

⁶ Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Received: 29 July 2021 Accepted: 31 August 2021

Abstract

In order to prevent the further spread of the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2, there is a need to develop rapid and reliable diagnostic tests. Given that there is currently no effective antiviral drug for COVID-19, the most important current strategy is to identify patients as soon as possible. Therefore, scientists and researchers are conducting experiments for rapid detection of asymptomatic carriers of COVID-19, to control and prevention of this epidemic.

Although some aspects of the structural and molecular characteristics of SARS-CoV-2 are unknown, various strategies for the correct diagnosis of COVID-19 have been proposed by research laboratories and medical companies, some of which are presented in the present study. According to studies, rapid antigen and antibody tests, immunoenzymatic serological tests, and RT-PCR-based molecular tests are the most widely used and valid diagnostic methods worldwide. In addition to these common methods, other methods include; techniques based on nucleic acid isothermal amplification, CRISPR/Cas based methods, new generation sequencing (NGS) techniques and biosensors are used in research fields to identify SARS-CoV-2.

In the present study, the recent technologies and techniques of various research institutes, as well as devices and commercial kits produced by companies for the diagnosis of COVID-19 are presented, so that familiarity with these efficient diagnostic methods is an important step in advancing scientific goals.

Keywords: COVID-19, Diagnostic methods, Molecular tests, Serological tests.

*Corresponding author: Seyed Mohammad Jalil Zorriehzahra, Email: zorrieh@yahoo.com
Address: Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

مروری بر انواع تکنیک‌های تشخیص سریع کووید-۱۹

مهتاب مشرف^۱، مژگان تقدیسی^۱، سید محمد جزایری^۲، ندا سلیمانی^۱، سید محمد جلیل ذریه زهرا^{۳*}، مینا زیارتی^۴، لاله یزدانپناه گوهر ریزی^۵، مائده طالبی^۶، سیده ساجده موسوی^۶

^۱ گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات ویروس شناسی بالینی، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ مدیریت اطلاعات و ارتباطات علمی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۴ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، چهرم، ایران

^۵ گروه تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

^۶ گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۵/۰۷ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

چکیده

به منظور پیشگیری از گسترش هر چه بیشتر پاندمی کووید-۱۹ ناشی از سندرم تنفسی حاد کروناویروس ۲ (SARS-CoV-2)، ضرورت توسعه روش‌های تشخیصی سریع و قابل اعتماد در جوامع علمی مطرح است. با توجه به اینکه در حال حاضر هیچ داروی ضد ویروسی مؤثری برای کووید-۱۹ وجود ندارد، مهم ترین استراتژی فعلی، شناسایی مبتلایان در اسرع وقت است. لذا، دانشمندان و محققان در حال انجام آزمایشاتی برای تشخیص سریع ناقلین بدون علامت کووید-۱۹ هستند که با تشخیص سریع و دقیق آن، نقش مهمی در کنترل و پیشگیری بیشتر این همه گیری ایفا نمایند.

با وجود ناشناخته بودن برخی از جنبه های مشخصات ساختاری و مولکولی SARS-CoV-2، استراتژی‌های مختلفی در تشخیص صحیح کووید-۱۹ توسط آزمایشگاه های تحقیقاتی و شرکت های پزشکی ارائه شده که در مطالعه حاضر برخی از آنها ارائه شده اند. طبق مطالعات انجام شده، تاکنون تست های سریع آنتی ژن و آنتی بادی، آزمایشات سرولوژی ایمونوآنزیمی و آزمایش های مولکولی مبتنی بر RT-PCR پرکاربردترین و معتبرترین روش های تشخیصی سراسر جهان هستند. علاوه بر روش های متداول ذکر شده، سایر روش ها از جمله: تکنیک های مبتنی بر تکثیر ایزوترمال اسید نوکلئیک، روش های مبتنی بر کریسپر (CRISPR/Cas)، تکنیک نسل جدید توالی یابی (NGS) و حسگرهای زیستی در زمینه های تحقیقاتی شناسایی این ویروس استفاده می شوند.

در مطالعه حاضر فناوری ها و تکنیک های اخیر مؤسسات تحقیقاتی مختلف و همچنین دستگاه ها و کیت های تجاری تولید شده شرکت ها برای تشخیص کووید-۱۹ ارائه شده است تا با آشنایی این روش های تشخیصی کارآمد، گامی مهم در پیشبرد اهداف علمی پژوهشی برداشته شود.

کلیدواژه ها: کووید-۱۹، روش های تشخیصی، آزمایش های مولکولی، آزمایش های سرولوژیک.

*نویسنده مسئول: سید محمد جلیل ذریه زهرا. پست الکترونیک: zorrieh@yahoo.com

آدرس: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مقدمه

چندین ویروس از خانواده کروناویروس‌ها، مسئول بیماری‌های عفونی در میان انسان‌ها و حیوانات هستند (۱). کروناویروس‌ها، ویروس‌هایی با اندازه متوسط، پوشش‌دار و RNA دار تک رشته (رشته مثبت) هستند که در بین انسان‌ها گسترش می‌یابند و معمولاً باعث بیماری‌های تنفسی می‌شوند (۲). در حال حاضر، بسیاری از کروناویروس‌های انسانی (HCoV)، مانند HCoV-229E، HCoV-NL63، HCoV-HKU1 و HCoV-OC43، منشا بیماری‌های تنفسی خفیف هستند (۳). اعضای دیگر خانواده کروناویروس مانند جنس بتاکروناویروس از حیوان به انسان منتقل شده و با شیوع بیماری‌های شدید تنفسی مانند سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) و سندرم حاد تنفسی شدید (SARS) سلامت انسان را تهدید می‌کنند (۴). در دسامبر ۲۰۱۹، شیوع یک کروناویروس جدید به نام SARS-CoV-2 برای اولین بار در شهر ووهان چین گزارش شد و بیماری عفونی تنفسی ناشی از آن کووید-۱۹ نام گرفت. کووید-۱۹ یک بیماری تنفسی است با علائمی شبیه به آنفلوآنزا که به صورت سرفه خشک، تب، سردرد شدید و خستگی بروز می‌کند. افراد مبتلا به کووید-۱۹ طیف گسترده‌ای از علائم بیماری تنفسی خفیف تا بیماری تنفسی شدید را نشان می‌دهند و در مواردی با آسیب عملکرد عضو، از جمله آسیب قلبی، آسیب حاد کلیوی، اختلال عملکرد کبد و سندرم زجر تنفسی حاد، بروز کرده که می‌تواند منجر به کاهش طولانی مدت عملکرد ریه و آریتمی شود. این کروناویروس به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته و از زمان شروع بیماری، تعداد مبتلایان و میزان مرگ و میر به طور مداوم رو به افزایش بوده است (۵). به همین جهت، شناسایی ناقلین بدون علامت و مبتلایان در استراتژی‌های مبارزه با شیوع همه‌گیری حائز اهمیت هستند.

در حال حاضر، روش‌های تشخیصی متعددی توسط مؤسسات تحقیقاتی در سراسر جهان تأیید شده است. بنابراین، بدیهی است که انتخاب آزمایش تشخیصی بهینه می‌تواند دشوار باشد (۶). برای انتخاب کارآمدترین آزمایش تشخیصی چندین پارامتر باید در نظر گرفته شود؛ بر این مبنا که یک تست تشخیصی مؤثر و دقیق از حساسیت و اختصاصیت خوبی برخوردار باشد، سریع، قابل تکرار و مبتنی بر فناوری‌های موجود در مراکز متعدد و همچنین مقرون به صرفه باشد تا بتواند برای بخش عمده‌ای از مردم انجام شود. هدف اصلی مطالعه حاضر، ارائه یک مرور جامع در مورد روش‌های جدید توسعه یافته و همچنین تکنیک‌های بالقوه تشخیص بیماری‌های ویروسی به ویژه کووید-۱۹ است بدین صورت که با ارزیابی مزایا و معایب هر روش و انتخاب روش مناسب برای کنترل مؤثر چنین بیماری‌هایی، به محققان کمک شود (۷).

اهمیت تشخیص سریع کروناویروس

بیماری همه گیر کووید-۱۹ اهمیت تشخیص آزمایشگاهی را

در مدیریت شرایط اضطراری بهداشتی که به طور گسترده‌ای بر ساختار اجتماعی، اقتصادی و بهداشتی کل جهان تأثیر گذاشته، برجسته کرده است. تشخیص سریع و مؤثر برای شناسایی افراد آلوده و مشکوک به این سندرم حاد تنفسی، نظارت بر عفونت، ردیابی تماس، یافتن روش درمانی مناسب برای افراد آلوده و تولید واکسن که منجر به کاهش خطر شیوع عفونت می‌شود، همچنین، کاهش فشار بر سیستم مراقبت‌های بهداشتی و کاهش هزینه‌های مراقبت برای افراد و دولت از ضروریات است. اگرچه علائم بالینی کووید-۱۹، مانند تب، سرفه، تنگی نفس، آسیب حاد کلیوی و آسیب کبدی ممکن است به کادر درمان در تشخیص اولیه بیماری کمک کند، اما تشخیص نهایی کووید-۱۹ در بیماران توسط تست‌های تأیید شده شامل؛ سی تی اسکن ریه، آزمایشات مولکولی و آزمایشات سرولوژیک مشخص می‌گردد. از زمان آغاز شیوع کرونا، چندین روش تشخیصی از جمله سنجش‌های مولکولی، سرولوژیک و اخیراً حسگرهای زیستی ایجاد شده است (شکل-۱) (۸).

از آنجایی که SARS-CoV-2 یک ویروس RNA دار است، بنابراین می‌توان به طور بالقوه از تمام تست‌های تشخیصی RNA موجود، برای شناسایی آن استفاده کرد. همچنین به منظور سازگاری با تست‌های تشخیصی DNA، می‌توان ژنوم ویروس را توسط ترانس کریپتاز معکوس به مکمل DNA رونویسی کرد. علاوه براین؛ طیف گسترده‌ای از آزمایش‌های سرولوژیک برای شناسایی آنتی بادی‌های تولید شده علیه این ویروس به منظور بررسی پاسخ ایمنی افراد و همچنین برای ارزیابی اثرگذاری واکسیناسیون در آینده، طراحی شده است (۹). طی ماه‌های گذشته، همه فناوری‌های در حال بهره‌برداری برای توسعه سریع سنجش شناسایی بسیار حساس و خاص این سندرم به کار رفته‌اند؛ زیرا تشخیص زودهنگام، این امکان را فراهم می‌کند که مداخلات درمانی برای افراد در معرض خطر بیشتر، سریعتر ارائه شود و همچنین در شناسایی ناقلین بدون علامت و ایزوله کردن هرچه سریعتر آنان کمک کننده باشد که این امر خود موجب جلوگیری از زنجیره انتقال بیماری می‌گردد (۱۰-۱۲).

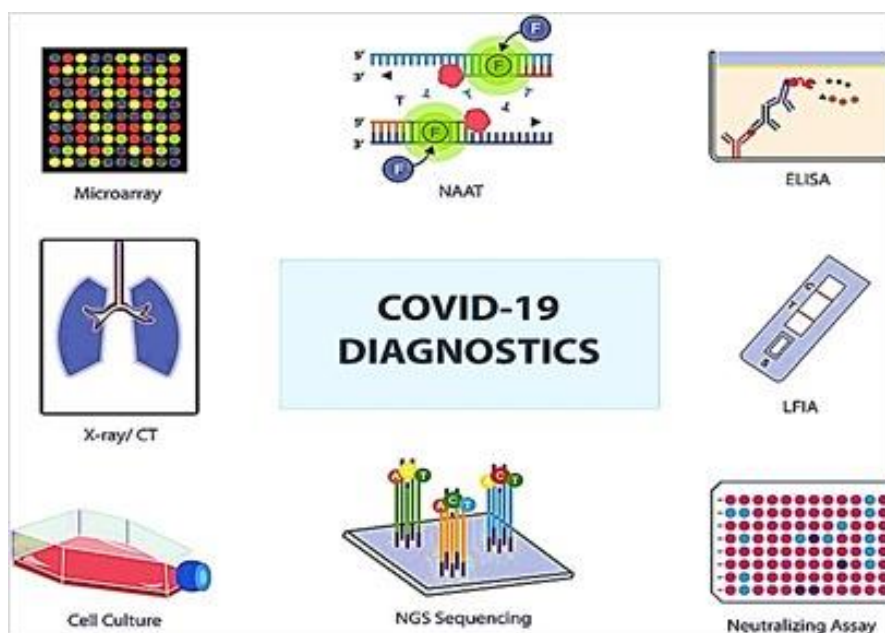
روش‌های توسعه یافته برای تشخیص کووید-۱۹

تشخیص کروناویروس با استفاده از کشت سلول و میکروسکوپ الکترونی

کشت سلول و به دنبال آن تکنیک‌های میکروسکوپ الکترونی، در شناسایی بیماری‌های نوظهور و عوامل بیماریزا و همچنین برای مشاهده خصوصیات اصلی کروناویروس نقش بسیار مهمی دارند. در بیماری همه‌گیر کووید-۱۹، این روش‌ها برای تشخیص و اهداف تحقیقاتی استفاده می‌شوند. در این روش، به دنبال شناسایی اولیه SARS-CoV-2 با تعیین توالی، هویت ویروس جدید از طریق میکروسکوپ ایمونوفلورسانس تأیید می‌شود. استفاده از میکروسکوپ و کشت سلول بینشی در مورد

که کشت این کروناویروس فقط در آزمایشگاه با ایمنی زیستی (BSL: Biological Safety Level) سطح ۳ باید انجام شود. از طرف دیگر، میکروسکوپ الکترونی کاربرد زیادی ندارد زیرا به ابزارهای پرهزینه و پرسنلی کاملاً آموزش دیده با مهارت‌های خاص در زمینه تهیه نمونه و تفسیر تصاویر میکروسکوپ الکترونی نیاز دارد. علاوه بر این، روش ذکر شده دارای حساسیت و اختصاصیت تشخیصی پایینی بوده و تنها در صورت وجود کشت ویروسی مناسب می‌توان نتایج بهینه‌ای را بدست آورد (۱۳، ۱۴).

ساختار، تروپیزم سلولی، پاتوژنز، قابلیت انتقال و تکثیر و تعامل ویروس با میزبان را فراهم می‌کند. به طور کلی، این تکنیک‌ها امکان شناسایی ویژگی‌های اصلی ویروس را فراهم کرده‌اند، که به محققان امکان توسعه سیستم‌های تشخیصی مورد استفاده و همچنین ارائه اولین روش‌های درمانی برای عفونت کووید-۱۹ را می‌دهد. علیرغم اهمیت کشت ویروسی و میکروسکوپ الکترونی، کشت ویروسی وقت‌گیر است و به تجهیزات خاص و سطح بالایی ایمنی زیستی نیاز دارد. به همین دلیل، WHO توصیه کرده است



شکل-۱. شماتیک از روش‌های مختلف تشخیصی کووید-۱۹ (۱۲)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس رونویسی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس رونویسی (RT-PCR) به دلیل توانایی در تکثیر مقدار کم ماده ژنتیکی کروناویروس به عنوان روش استاندارد طلایی برای شناسایی کووید-۱۹ در نظر گرفته می‌شود. در حال حاضر، آزمایشات RT-PCR برای SARS-CoV-2 معمولاً از نمونه‌های جمع‌آوری شده از سیستم تنفسی فوقانی با استفاده از سواب، انجام می‌گیرد. علاوه بر این، چند مطالعه با استفاده از سرم، مدفوع یا ترشحات چشم انجام شده است (۱۷-۱۹). اخیراً، آزمایشگاه ژنومیک بالینی Rutgers یک آزمایش RT-PCR (TaqPath COVID-19 Combo kit) طراحی کرده و از نمونه‌های بزاق جمع‌آوری شده توسط خود بیمار استفاده می‌کند. این روش سریع‌تر بوده و درد کمتری نسبت به سایر روش‌های جمع‌آوری نمونه دارد و همچنین سبب کاهش خطرات احتمالی کادر درمان و افزایش حجم نمونه می‌گردد (۲۰، ۲۱). همانطور که در شکل ۲- نشان داده شده است، RT-PCR با تبدیل RNA ژنومی ویروس به DNA توسط DNA پلیمرز وابسته به RNA (ترانس کریپتاز معکوس) شروع می‌شود. این واکنش

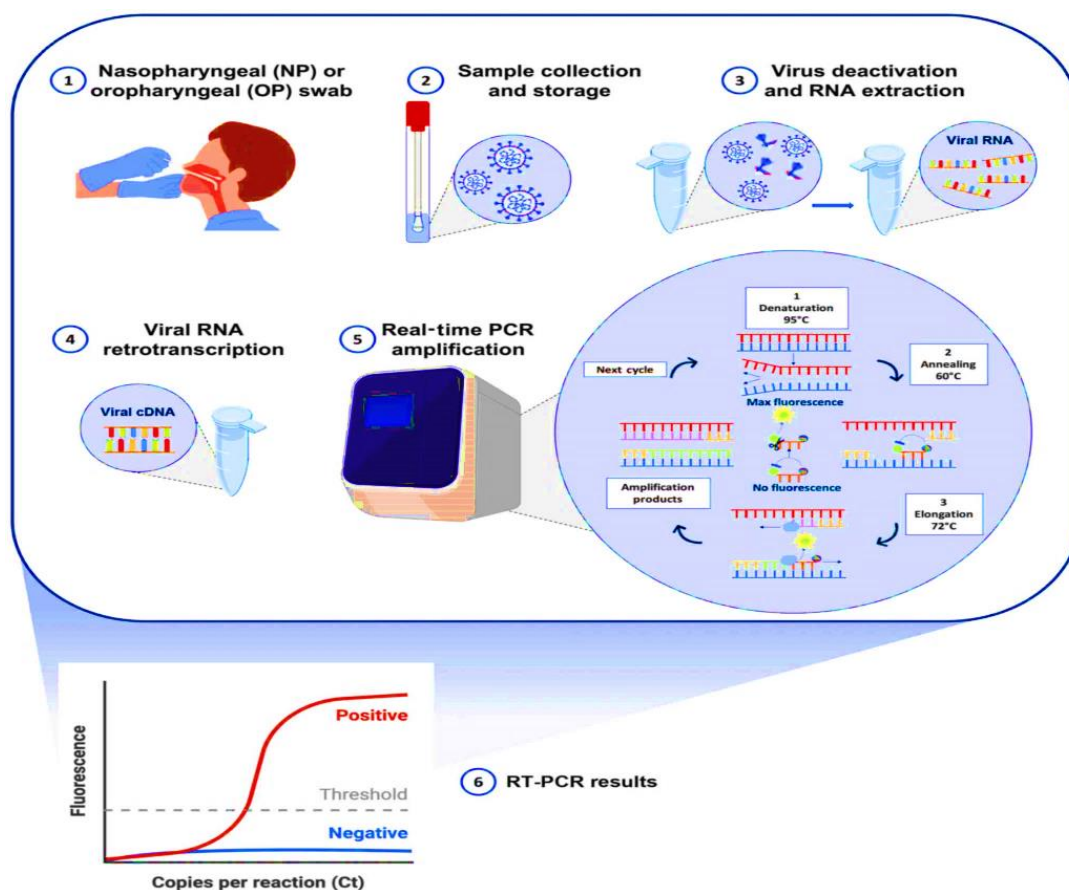
تشخیص کروناویروس با استفاده از روش رادیولوژی

یافته‌های تصویربرداری رادیولوژیک مانند رادیوگرافی قفسه‌سینه (CXR)، سونوگرافی قفسه‌سینه (US)، سونوگرافی ریه (LUS) و به ویژه توموگرافی کامپیوتری قفسه‌سینه (CT Scan) به عنوان روش تشخیصی مکمل و در برخی موارد به عنوان روش استاندارد تشخیص کووید-۱۹ بکار گرفته می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد CT قفسه‌سینه ابزاری مفید در تشخیص عفونت کووید-۱۹ است. تصویربرداری در ارزیابی شدت و پیشرفت عفونت کووید-۱۹ بسیار کمک‌کننده است و همچنین می‌تواند کروناویروس را در شرایطی که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس رونویسی منفی کاذب می‌باشد، تشخیص دهد. بسیاری از یافته‌های رادیولوژیک کووید-۱۹ غیراختصاصی بوده و در طیف وسیعی از سایر بیماری‌های ریوی نیز قابل مشاهده هستند؛ لذا میتوان گفت که اختصاصیت کمتری نسبت به روش RT-PCR دارد. اما در صورت وجود ضایعات رادیولوژیکی شاخص به همراه یافته‌های کلینیکی و یا سابقه مثبت تماس با فرد آلوده می‌تواند مطرح‌کننده عفونت کروناویروسی باشد (۱۵، ۱۶).

RT-PCR استفاده کرده‌اند که مناطق مختلفی از ژنوم کروناویروس را هدف قرار داده است، از جمله مناطق ORF1b یا ORF8 و ژن‌های نوکلئوکپسید (N)، پروتئین اسپایک (S)، RNA پلیمرز وابسته به DNA (RdRp) و پروتئین پوششی (E) (۲۷-۲۴). سنجش‌هایی که پروتئین پوششی E را هدف قرار داده‌اند، مشخص شده است که به سایر سویه‌های کروناویروس‌ها شباهت دارد. از طرف دیگر، همسانی کم ژن‌های RdRp، N و S در کروناویروس با آنهایی که در سایر ویروس‌های وابسته به خفاش هستند، این ژن‌ها را به اهداف خاصی برای شناسایی تبدیل کرده است. در آزمایشگاه‌ها برای افزایش حساسیت تشخیصی از روش‌های چندگانه استفاده شده است که چندین ژن را به طور همزمان هدف قرار می‌دهند یا مناطق مختلف را در همان ژن هدف شناسایی می‌کنند. به طور کلی، RT-PCR به دلیل حساسیت و اختصاصیت زیاد و همچنین توانایی پردازش تعداد زیادی نمونه، متداول‌ترین روش برای تشخیص کووید-۱۹ است. اما دارای معایبی نیز می‌باشد که می‌توان به ابزار آزمایشگاهی گران قیمت، پرسنل آزمایشگاهی ماهر و مدت زمان طولانی برای دریافت جواب اشاره نمود. در نتیجه، تعدادی از شرکت‌ها و آزمایشگاه‌ها در سراسر جهان در تلاشند تا کارایی فناوری RT-PCR را بهبود بخشند و تکنیک‌های مختلف دیگری را توسعه دهند.

براساس توالی‌های آغازگر کوچک DNA طراحی شده است، که به طور خاص توالی‌های مکمل را در RNA ژنوم ویروس شناسایی کند تا ترانس کریپتاز معکوس یک کپی DNA مکمل کوتاه (cDNA) از RNA ویروسی سنتز نماید. این کار با استفاده از یک رنگ فلورسنت یا یک پروب که با یک مولکول فلورسنت و یک مولکول خاموش کننده لیبیل دار شده است، مانند روش TaqMan انجام می‌شود. سپس یک سیستم خودکار فرایند تکثیر را برای حدود ۴۰ دوره تکرار می‌کند تا زمانی که cDNA ویروسی، معمولاً توسط یک سیگنال فلورسنت یا الکتریکی شناسایی شود (۲۲).

RT-PCR به طور معمول به روش یک مرحله‌ای یا دو مرحله‌ای انجام می‌شود. در RT-PCR یک مرحله‌ای کل واکنش، از سنتز cDNA تا تکثیر PCR، در یک میکروتیوب واحد انجام می‌گیرد. در حالیکه در روش دو مرحله‌ای سنتز cDNA و تکثیر، در لوله‌های جداگانه انجام می‌شود. اگرچه روش دو مرحله‌ای انعطاف‌پذیری و حساسیت بیشتری نسبت به روش یک مرحله‌ای دارد و همچنین مواد اولیه کمتری جهت آغاز واکنش نیاز دارد، اما روش یک مرحله‌ای روش ترجیحی برای تشخیص کووید-۱۹ است زیرا سریع راه اندازی می‌شود و نیاز چندانی به مدیریت نمونه نداشته و در نتیجه خطرات مربوط به پیت کردن و آلودگی طی مراحل رونویسی معکوس و تکثیر کاهش می‌یابد (۲۳). تا به امروز، اکثر آزمایش‌های تشخیصی مولکولی از فناوری



شکل-۲. واکنش زنجیره ای پلیمرز معکوس رونویسی (RT-PCR) (۱۲)

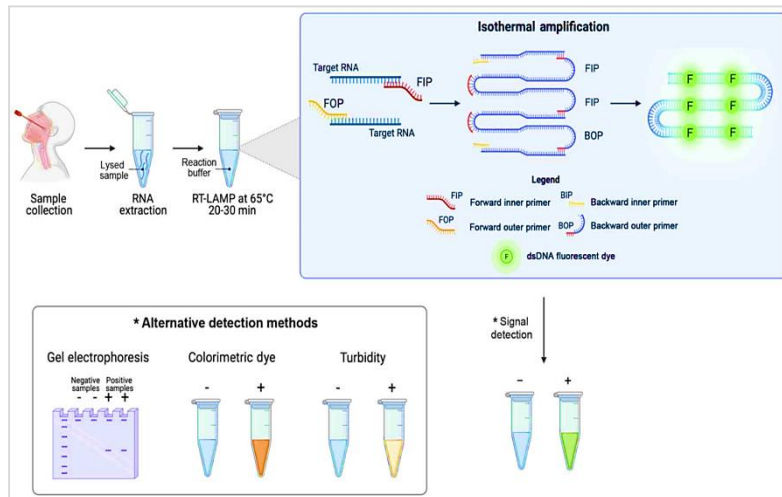
می‌تواند از طریق فوتومتري شناسایی شود و میزان کدورت ناشی از پیرو فسفات منیزیم را می‌توان اندازه‌گیری نمود. محصولات تکثیر شده نهایی این واکنش را می‌توان با کمک الکتروفورز ژل آگارز، لیبل فلورسانس، کدورت یا رنگ سنجی برای بازخوانی فوری داده‌های به دست آمده و تشخیص سریع عفونت کووید-۱۹ مشاهده کرد. به طور کلی، آزمایش‌های RT-SARS-CoV-2 RT-LAMP از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار هستند و برخی از آنها برای اهداف تشخیصی توسط آژانس‌های مختلف ملی در سراسر دنیا و بین‌المللی تأیید شده‌اند. برخی مطالعات حساسیت ۱۰۰ درصد را برای تشخیص ژن ORF1ab کروناویروس گزارش کرده‌اند (۲۹). در میان روش‌های RT-LAMP، روش ID NOW COVID-19™ توسط FDA با مجوز استفاده اضطراری تأیید شده است. این سیستم مبتنی بر RT-LAMP با شناسایی ژن RdRp کروناویروس در ۵ دقیقه مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجا که آزمایش تشخیصی RT-LAMP فقط به گرمایش و بازرسی بصری نیاز دارد، سادگی و حساسیتش آن را به عنوان یک کاندید امیدوارکننده برای شناسایی ویروس معرفی می‌کند. این تست سریع است (۱۳ دقیقه یا کمتر) و برای تشخیص RNA ویروسی در سواب‌های تنفسی فوقانی استفاده شده، اما هر بار انجام واکنش به یک نمونه محدود می‌شود (۲۹، ۳۰).

تکثیر ایزوترمال اسید نوکلئیک

RT-PCR برای هر چرخه به تغییرات چندگانه دما نیاز دارد که مستلزم تجهیزات چرخه حرارتی پیچیده است. تکثیر ایزوترمال اسید نوکلئیک توالی هدف را در دمای ثابت تکثیر می‌کند و نیاز به چرخه حرارتی را برطرف می‌کند. بنابراین، چندین روش مبتنی بر این تکنیک توسعه یافته است که در ادامه به اختصار توضیح داده شده است (۲۸).

• تکثیر ایزوترمال مبتنی بر لوپ

RT-LAMP به عنوان یک آزمایش سریع و مقرون به صرفه برای کووید-۱۹ است. سیستم‌های LAMP از جمله متداولترین روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک برای تشخیص بیماری‌های عفونی هستند. در رابطه با این سندرم توسعه یافته، چندین سیستم RT-LAMP برای شناسایی دقیق RNA ویروسی ایجاد شده است و نشان می‌دهد که چگونه این روش‌ها می‌توانند با سایر روش‌های تشخیصی از جمله NGS، سیستم‌های تشخیص دیجیتال، حسگرهای زیستی و غیره همراه شوند. همانطور که در شکل ۳- نشان داده شده است، RT-LAMP به ۴ آغازگر خاص برای ژن یا منطقه هدف نیاز دارد و LAMP را با یک مرحله رونویسی معکوس به منظور شناسایی RNA ترکیب می‌کند. سپس محصول این تکثیر



شکل ۳- تکثیر ایزوترمال مبتنی بر لوپ (RT-LAMP) (۱۲)

هزار آزمایش در ۲۴ ساعت) می‌تواند همزمان سایر ویروس‌های تنفسی رایج با علائم مشابه کووید-۱۹ را با همان نمونه بیمار غربالگری کند. مرحله اولیه شامل هیبریدزاسیون RNA ویروسی به یک پروب خاص و یک الیگونوکلوئید حاوی یک آغازگر پرموتر T7 است که روی ذرات میکرو مغناطیسی قرار گرفته می‌شود. سپس، RNA هدف که با آغازگر پرموتر T7 هیبرید شده است، به صورت cDNA رونویسی می‌شود. در مرحله بعد، RNaseH ترانس کریپتاز معکوس رشته RNA هدف را از دابلکس ترکیبی RNA-cDNA جدا می‌کند و cDNA تک رشته

• تکثیر مبتنی بر رونویسی

تکثیر به واسطه رونویسی (-Transcription Mediated Amplification) یک تک لوله است که می‌تواند برای تکثیر مناطق خاصی از RNA یا DNA بسیار کارآمدتر از RT-PCR باشد (۳۰). این روش از ترانس کریپتاز معکوس رترو ویروسی و RNA پلیمرز T7 برای تشخیص اسیدهای نوکلئیک چندین عامل بیماری‌زا استفاده می‌کند. بر اساس این اصل، پلتفرم Panther Hologic's fusion توانایی انجام PCR-RT و TMA را دارد. این روش، به دلیل توان عملیاتی بالای آزمایش (حداکثر

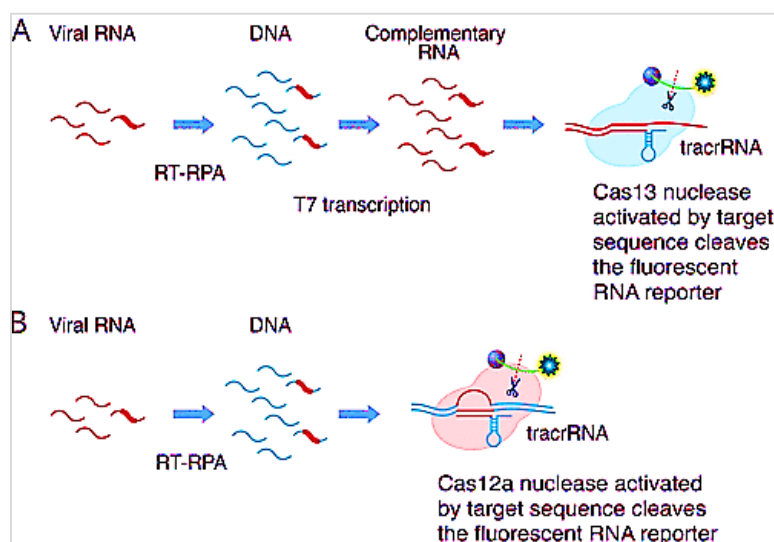
Cas12 و Cas13 می توانند برای هدف قرار دادن و بریدن توالی RNA ویروسی برنامه ریزی شوند. دو شرکت Mammoth Biosciences و Sherlock Biosciences که توسط دانشمندان پیشگام CRISPR تأسیس شده اند، به طور مستقل امکان استفاده از روش CRISPR را برای تشخیص کووید-۱۹ بررسی می کنند (۳۳). این روش های مبتنی بر CRISPR، همان طور که در شکل-۴ نشان داده شده است، به ابزار دقیق و پیچیده ای نیاز ندارند و می توان آنها را با استفاده از نوارهای کاغذی برای تشخیص کووید-۱۹ بدون از دست دادن حساسیت یا اختصاصیت خواند. این آزمایشات هر دو کم هزینه هستند و در کمتر از ۱ ساعت قابل انجام هستند (۳۴،۳۵).

در میان سیستم های متداول، روش SherlockTM CRISPR SARS-CoV-2 توسط FDA آمریکا برای استفاده اضطراری تأیید شده است. این سیستم بر اساس فعالیت نوکلئاز Cas13a از دو مرحله مختلف تشکیل شده است. مرحله اول-RT-LAMP است، جایی که RNA ویروسی به صورت معکوس به cDNA رونویسی می شود و سپس از طریق LAMP تکثیر می گردد. مرحله دوم شامل رونویسی RNA و شکاف است که توسط مجموعه Cas13a / CRISPR انجام می گیرد و می تواند یک توالی خاص در SARS-CoV-2 را هدف قرار دهد. شکاف RNA در SARS-CoV-2 منجر به سیگنال فلورسنت می شود که به راحتی قابل تشخیص است. این سیستم در مقایسه با-RT-PCR، با ۱۰۰ درصد حساسیت منجر به تشخیص صحیح کووید-۱۹ در نمونه های بالینی می گردد.

که شامل پروموتور T7 است باقی می ماند. از یک پرایمر اضافی برای تولید DNA دو رشته ای استفاده می شود که متعاقباً توسط RNA پلیمراز T7 به آمپلیکون های RNA رونویسی می شود. سپس این آمپلیکون های RNA وارد فرآیند TMA می شوند که میلیاردها آمپلیکون RNA در کمتر از یک ساعت تولید می شود. فرآیند شناسایی با استفاده از اسید نوکلئیک تک رشته ای است که به طور خاص به آمپلیکون RNA هیبرید می شوند. هر نوکلئیک اسید به یک فلوروفور و یک خاموش کننده متصل می گردد. هنگامی که نوکلئیک اسید به آمپلیکون RNA هیبرید می شود، فلوروفور قادر است هنگام برانگیخته شدن سیگنالی منتشر کند (۳۱).

• سنجش های مبتنی بر کریسپر CRISPR

سیستم CRISPR/Cas انقلابی در زمینه زیست شناسی مولکولی ایجاد کرده است که امکان ویرایش ژنوم را فراهم می کند. این فناوری که جایزه نوبل شیمی را در سال ۲۰۲۰ دریافت کرد؛ کاربردها و پتانسیل های تقریباً نامحدودی از جمله ویرایش ژنوم، تشخیص، درمان و تنظیم ژن دارد. به طور کلی، CRISPR، تکرار کوتاه پالیندرومیک خوشه ای و منظم هستند که نمایانگر خانواده ای از توالی های اسید نوکلئیک می باشند و در موجودات پروکاریوتی، مانند باکتری ها یافت می شوند. این توالی ها را می توان با مجموعه ای از آنزیم های باکتریایی، آنزیم های مرتبط با CRISPR، شناسایی کرد و برش داد که نمونه های آن Cas9، Cas12 و Cas13 است (۳۲). آنزیم های خاصی در خانواده های



شکل-۴. دو روش مبتنی بر کریسپر به منظور شناسایی RNA ویروس (A. روش SHERLOCK، B. روش DETECTOR) (۳۶)

جلب کرده است. این روش بسیار حساس بوده و قادر به تولید ۱۰۹ سیگنال تکثیر در هر دور در عرض ۹۰ دقیقه می باشد. RCA از این جهت سودمند است که می تواند تحت شرایط ایزوترمال با حداقل مواد انجام شود و از ایجاد نتایج مثبت کاذب که اغلب در

• تکثیر مبتنی بر دایره غلطان

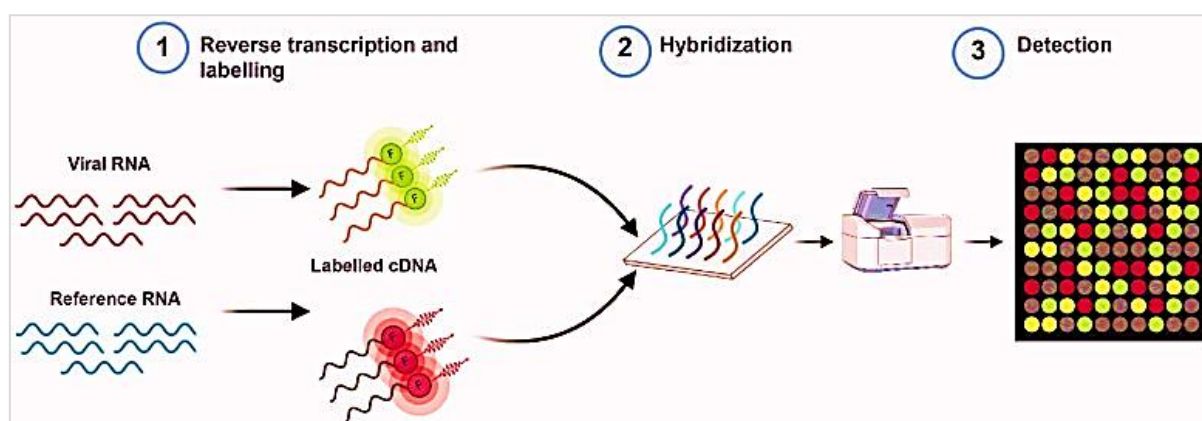
تکثیر به روش دایره غلطان (RCA: Rolling Circle Amplification) یکی دیگر از روش های تشخیصی تکثیر ایزوترمال است که توجه زیادی را برای تشخیص اسید نوکلئیک

با پروب‌های خاص هستند. سپس cDNA های نشاندار شده در داخل چاهک‌های میکرو آرایه که دارای اولیگونوکئوتیدهای تثبیت شده در سطحشان هستند قرار می‌گیرند. در صورت هیبرید شدن نوکلئوتیدها با یکدیگر، سیگنالی منوط بر حضور نوکلئیک اسید ویروسی تولید می‌گردد (۳۸). روش ریزآرایه در شناسایی جهش‌های مرتبط با کروناویروس نوظهور مفید شناخته شده است و برای شناسایی حداکثر ۲۴ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) مرتبط با جهش در ژن اسپایک (S) با دقت ۱۰۰ درصد استفاده شده است (۳۹). با همه‌گیری کووید-۱۹، شناسایی گونه‌های نوظهور کروناویروس اهمیت بسیار زیادی دارد به همین جهت روش‌های تشخیصی مبتنی بر ریزآرایه یک پلتفرم برای تشخیص سریع این گونه‌های جدید فراهم می‌کند. اگر چه یکی از مشکلات آزمایش ریزآرایه، هزینه بالای مرتبط با آن می‌باشد اما به طور کلی یک آزمایش الیگونوکئوتیدی غیرفلورسنت و کم هزینه جهت شناسایی چندین سویه کروناویروس با حساسیت برابر با RT-PCR می‌باشد (۴۰).

سنجش‌های مبتنی بر PCR مشاهده می‌شود، جلوگیری کند. یک روش کارآمد RCA برای تشخیص کووید-۱۹ قبلاً در دو مرحله مایع و جامد برای آزمایش نمونه‌های تنفسی بالینی استفاده شده است. اما در حال حاضر این روش برای شناسایی کووید-۱۹ توسعه نیافته است (۳۷).

هیبریداسیون نوکلئیک اسید توسط تکنیک میکروآرایه

ریزآرایه ابزاری چند منظوره است که در مطالعات تشخیصی، تحقیقاتی و اپیدمیولوژیک استفاده می‌شود. این روش اجازه می‌دهد تا رفتار ژنومی پاتوژن، پاسخ ایمنوژنیک به مراحل مختلف بیماری، فعل و انفعالات آنتی ژن - آنتی بادی، واکنش متقابل بین گونه‌ها و پروتئین‌های هدف مورد استفاده به عنوان نشانگرهای زیستی در یک سیستم واحد مورد بررسی قرار گیرد. از روش‌های ریزآرایه برای تشخیص سریع و با کارایی بالای اسیدهای نوکلئیک سندرم حاد تنفسی استفاده شده است. همانطور که در شکل ۵- نشان داده شده است؛ این روش‌ها مبتنی بر تولید cDNA از RNA ویروسی با استفاده از رونویسی معکوس و به دنبال آن نشاندار کردن cDNA



شکل ۵. هیبریداسیون نوکلئیک اسید با استفاده از میکرو آرایه. cDNA ویروسی و cDNA مرجع با لیبل‌های مختلف فلورسنت ترکیب شده و در چاهک‌های ریزآرایه پوشانده شده با پروب‌های اختصاصی DNA قرار می‌گیرد (۴۱).

استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، از ۱۶ پرایمر که به مناطق حفاظت شده در ژنوم ویروس متصل می‌شوند به منظور تکثیر قطعات ۱۰۰۰ bp با نواحی همپوشان ۲۰۰bp مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس این پرایمرها برای تولید ۳۰ آمپلیکون از cDNA مورد استفاده قرار گرفته و متعاقباً با استفاده از MinION توالی‌یابی می‌شوند (۴۲، ۴۳).

بیوسنسور

حسگرهای زیستی (بیوسنسور) دستگاه‌های مهمی در تشخیص بالینی، فرآوری مواد غذایی و نظارت بر محیط برای تشخیص انواع آنالیت‌ها، به ویژه ویروس‌ها هستند. حسگرهای زیستی روش‌های تحلیلی هستند که پاسخ‌های بیولوژیکی را به سیگنال‌های کمی قابل مقایسه در ارتباط با یک هدف خاص تبدیل

توالی متاژنومیک مبتنی بر آمپلیکون

این روش تشخیصی برای شناسایی کووید-۱۹ مبنی بر یک رویکرد دوگانه شامل استفاده از توالی مبتنی بر آمپلیکون به همراه تعیین توالی متاژنومیک است. توالی متاژنومیک در درجه اول برای بررسی میکروبیوم افراد آلوده استفاده می‌شود. این تکنیک این امکان را فراهم می‌کند تا بتوان سریعاً کروناویروس و سایر عوامل بیماری‌زای ایجاد کننده عفونت‌های ثانویه مؤثر بر تشدید علائم کووید-۱۹ را شناسایی کرد. تعیین توالی ویروس بر پایه آمپلیکون امکان بررسی اپیدمیولوژی مولکولی و مطالعات تکامل ویروسی را فراهم می‌کند. توالی‌یابی مبتنی بر آمپلیکون و متاژنومیک MinION توسط Moore و همکاران برای تعیین توالی سریع (۸ ساعت) ژنوم کروناویروس و دیگر میکروبیوم‌ها در سواب‌های نازوفارنگس که از بیماران کووید-۱۹ به دست آمده است، مورد

می‌کنند. حسگرهای زیستی مبتنی بر آپتامرها که به عنوان Aptasensors شناخته می‌شوند حاوی الیگونوکلوئوتیدهای ریبونوکلیک اسید تک رشته‌ای یا دئوکسی ریبونوکلیک اسید هستند که میل و ویژگی بالا برای اتصال دارند و برای تشخیص انواع بیماری‌های عفونی استفاده می‌شوند. حوزه تحقیقاتی بیوسنسورها در سال ۱۹۶۲ با طراحی بیوسنسور گلوکز اکسیداز که توسط کلارک و لیونز معرفی گردید، آغاز شده است. پس از آن، کاربردهای زیادی از حسگرها و حسگرهای زیستی شرح داده شد. بیوسنسورها از دهه های قبل توسط متخصصان بیوتکنولوژی اختراع شده است تا با شناسایی نشانگرهای زیستی، باکتری ها و ویروس ها را تشخیص دهند. حسگرهای زیستی شامل ۳ عنصر اصلی هستند: گیرنده زیستی، مبدل و سیستم پردازش سیگنال. مؤلفه گیرنده‌های زیستی حسگرها، ممکن است آنتی‌بادی مونوکلونال، اسیدهای نوکلئیک، گلیکان، لکترین، آنزیم، بافت یا سلول کامل با یک نشانگر زیستی باشند. مبدل، فعل و انفعالات را به یک سیگنال قابل اندازه گیری تبدیل می کند، سپس شناسایی کیفی و کمی پاتوژن با نمایش سیگنال‌ها گزارش داده می‌شود (۴۴).

در چند دهه گذشته، نوآوری در تحقیقات مربوط به بیوسنسور منجر به افزایش استثنایی در توسعه و عملکرد آنان شده است. بر اساس فناوری انجام شده، ۴ نوع حسگر زیستی وجود دارد؛ حسگرهای زیستی نوری، حسگرهای زیستی الکتروشیمیایی، حسگرهای زیستی پیزوالکتریک و حسگرهای زیستی حرارتی. حسگرهای زیستی نوری به دلیل استفاده ایمن، مستقیم و استفاده از فناوری مقرون به صرفه، از جمله عدم نیاز به تکثیر اسید نوکلئیک، یک روش مناسب برای تشخیص ویروس می‌باشند. از فلورسانس، پلاسماهای سطحی و تکنیک های رنگ سنجی قبلاً برای تشخیص HIV، ابولا، نورو ویروس و ویروس آنفلوانزا و سایر موارد استفاده شده است. در حال حاضر تحقیقات بسیار زیادی برای استفاده از این روش های تصویربرداری برای شناسایی کووید-۱۹ آغاز شده است (۴۵،۴۶).

تکنیک نسل جدید توالی یابی (NGS)

نسل جدید توالی یابی (NGS) را توالی پر بار (HTS) نیز می نامند. با استفاده از این روش می‌توان توالی ژنومی، حتی بیش از ۱ میلیون جفت باز، را در یک آزمایش تعیین کرد. با استفاده از این روش می‌توان بیماری‌های ارثی، سرطان و بیماری‌های عفونی را تشخیص داد. پیش از این، در انگلستان نیز از همین فناوری برای ردیابی شیوع ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در برابر متی سیلین (MRSA)، با دقت و ردیابی بالا حتی در یک بیمار استفاده شده بود، در حالی که سایر روش‌های نظارتی معمول نمی‌توانند این کار را با همین دقت انجام دهند. NGS نه تنها به کشف سویه های ویروسی جدید در مقیاس وسیع کمک می کند بلکه تشخیص بسیار

سریع این ویروس ها را که با بیماری های انسان ارتباط دارند نیز فراهم می نماید. فناوری NGS همراه با ابزارهای بیوانفورماتیک تا حد زیادی بر مطالعات بیماری‌زایی و تشخیص ویروس تأثیر گذاشته است. این فناوری همچنین در شیوع کووید-۱۹ کاربرد بسیار خوبی دارد. با استفاده از فناوری NGS می‌توان برای اولین بار اطلاعات توالی ژنوم ویروس‌های ناشناخته را بدست آورد. این اطلاعات امکان ردیابی سریع منشأ کووید-۱۹ را فراهم می کند، که برای جلوگیری از انتقال ویروس بین گونه ها، حیاتی است. در حال حاضر، دانشمندان و محققان توالی ژنوم کامل کروناویروس را در GISAID EpiFlu upload بارگذاری کرده‌اند و تعداد ژنوم ها هنوز در حال افزایش است. استفاده از فناوری NGS به یک روش کاملاً پذیرفته شده برای ردیابی شیوع و اپیدمیولوژی ژنومی در تایپ مولکولی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی تبدیل شده است. کشف جهش های جدید به محققان این امکان را می‌دهد تا مسیرهای ناشناخته عفونت را بررسی کرده و یک پایه مولکولی مناسب برای واکسن علیه کووید-۱۹، طراحی کنند، که یک فناوری کلیدی در اپیدمیولوژی ژنومی است. علیرغم مزایای زیاد این تکنیک، از جمله شناسایی به موقع ویروس های جدید به منظور کنترل بیماری استفاده از آن به دلیل اینکه در مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی مولکولی بسیار گران است و شامل آماده سازی پیچیده نمونه هاست را محدود می کند (۴۷،۴۸).

بررسی های سرولوژی و ایمونولوژی

در حالی که تشخیص RNA ویروسی مبتنی بر RT-PCR به طور گسترده ای در تشخیص کووید-۱۹ مورد استفاده قرار گرفته است، ولی نمی‌توان از آن برای بررسی پیشرفت مراحل بیماری، شناسایی گسترش عفونت و ایمنی زایی استفاده کرد. سنجش های سرولوژیک با استفاده از پروتئین های ساختاری بسیار آنتی ژنیک مانند پروتئین اسپایک (S) و نوکلئوکسپید (N)، SARS-CoV-2 انجام می‌شود. سنجش های سرولوژیک، برای شناسایی موارد مشکوک که نتیجه PCR آنان منفی می‌باشد اما یافته های رادیولوژیک نشان دهنده ابتلا به کووید-۱۹ است، شناسایی ناقل های بدون علامت و تعیین میزان آنتی بادی های خنثی کننده در پاسخ به واکسیناسیون، بسیار مهم است (۴۹،۵۰). بیشتر سنجش های سرولوژیکی موجود، آنتی بادی های IgM و IgG را تشخیص می‌دهند اگرچه آنتی بادی های IgA نیز نقش مهمی در ایمنی مخاط دارند. IgA زودتر از IgG قابل تشخیص است و در موارد غیرمعمول یا در بیمارانی که RT-PCR منفی دارند، IgA همراه با IgG ممکن است در تشخیص عفونت کووید-۱۹ نقش بسزایی داشته باشد. در بیشتر افراد، آنتی بادی های قابل اندازه گیری در طی چند روز یا چند هفته از شروع علائم ایجاد می شود. به طور معمول IgM پس از چند روز در سرم قابل تشخیص است و به دنبال آن تغییر IgG اتفاق می‌افتد. بنابراین، IgM می‌تواند شاخصی

استفاده قرار می‌گیرند، شامل آلکالین فسفاتاز، اسید رادیک پراکسیداز و بتاگالاکتوزیداز هستند. ترکیبات مختلفی به عنوان سوپسترا برای این روش به کار گرفته می‌شوند که از جمله این ترکیبات می‌توان به مواردی چون اوره فیلدایمین دی هیدروکلراید (برای پراکسیداز)، پارانیتروفیل فسفات (برای آلکالین فسفاتاز) اشاره کرد که توسط آنزیم‌های نام برده هیدرولیز می‌شوند تا محصول نهایی و رنگ تولید شود (شکل ۶- (۵۸-۶۰).

• آزمایش ایمنی سنجی جریان جانبی

روش ایمنی سنجی جریان جانبی (LFT: Lateral flow immunoassays) در سال‌های اخیر به دلیل قابلیت‌های تشخیصی کم هزینه، سریع، حساس و ویژه، بعنوان یک ابزار تشخیصی محبوب تلقی می‌شود. آزمایش ایمنی سنجی جریان جانبی که به عنوان روش‌های ایمونوکروماتوگرافی جریان جانبی یا آزمایشات سریع نیز شناخته می‌شوند، دستگاه‌های ساده‌ای هستند که برای تشخیص وجود ماده هدف در یک نمونه مایع بدون نیاز به تجهیزات تخصصی و پرهزینه طراحی شده‌اند. به عنوان مثال، تست بارداری خانگی یک LFT است که هورمون خاصی را تشخیص می‌دهد. این تست‌ها ساده و اقتصادی هستند و به طور کلی در حدود ۵-۳۰ دقیقه نتیجه می‌دهند. بسیاری از برنامه‌های آزمایشگاهی با استفاده از تجهیزات اختصاصی اضافی، حساسیت LFT های ساده را افزایش می‌دهند (۶۱).

• روش سنجش ایمنی لومینسانس

روش سنجش ایمنی لومینسانس (Chemiluminescent Immunoassay) یک روش سنجش ایمنی است که مزایای قابل توجهی نسبت به روش‌های معمول تشخیصی، به ویژه در تعیین کمی آنتی بادی‌ها، ارائه می‌دهد. درحالی‌که کووید-۱۹ به سرعت در حال گسترش است، تکنیک جریان جانبی می‌تواند نقش مهمی در تشخیص سریعتر بیماران مشکوک داشته باشد. از زمان ظهور کووید-۱۹ هزاران کیت سنجش جریان جانبی تولید شده است. نیاز به مقادیر کم نمونه (۱۰-۲۰ میکرولیتر) و نتیجه سریع (۱۵ دقیقه) این روش را منحصر به فرد کرده است. در این روش، شاخص تحلیل واکنش، یک مولکول لومینسانس است. به طور کلی، لومینسانس انتشار تابش مرئی یا تقریباً مرئی است؛ که هنگام انتقال الکترون از حالت برانگیخته به حالت پایه تولید می‌شود و انرژی بالقوه حاصل از اتم به صورت نور آزاد می‌شود. روش‌های سنجش ایمنی لومینسانس روش‌هایی را تشکیل می‌دهند که محدودیت‌های تشخیصی واکنش‌های مبتنی بر آنتی بادی را کاهش می‌دهد. این تکنیک با بهره‌گیری از اتصال بین آنتی ژن و پروسی و آنتی‌بادی‌های میزبان، مفهومی مشابه با الایزا را دنبال می‌کند اما در این روش از پروب‌های شیمیایی استفاده می‌شود که در نهایت منجر به تابش نور طی یک واکنش شیمیایی می‌گردد. ابزارهای CLIA

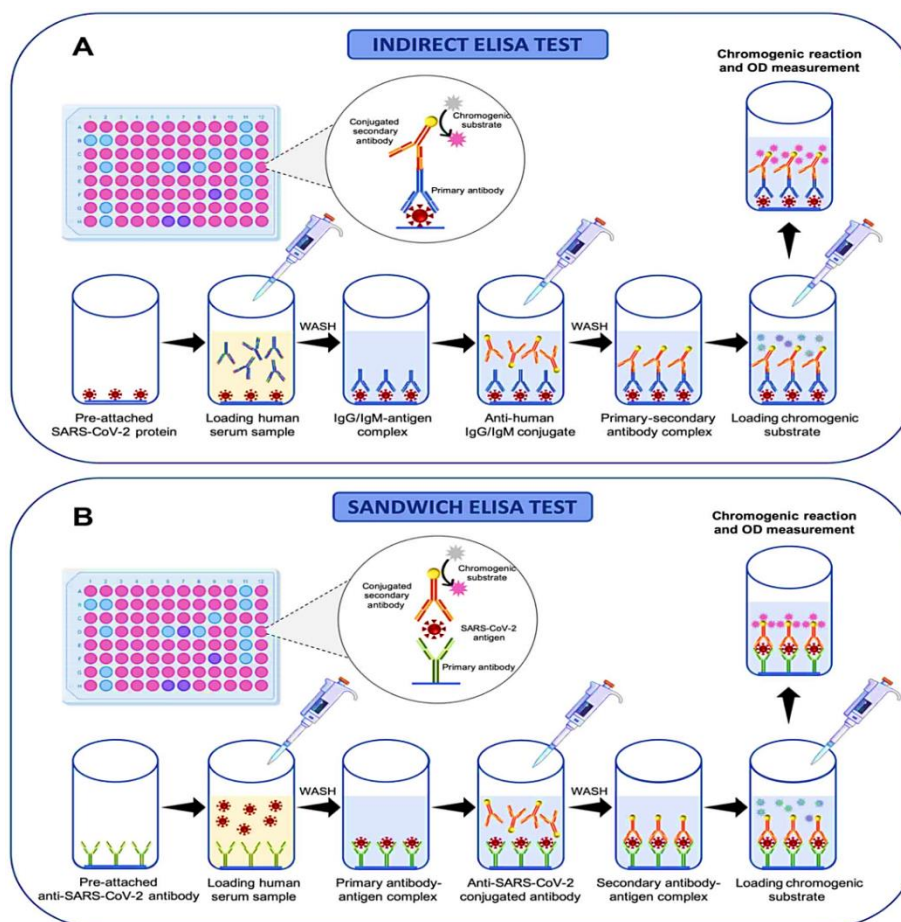
از عفونت در مراحل اولیه بیماری باشد و IgG می‌تواند شاخصی از عفونت فعلی یا قبلی باشد. IgG همچنین ممکن است برای نشان دادن وجود ایمنی پس از عفونت نیز استفاده شود. سنجش‌های سرولوژیکی می‌توانند کیفی یا نیمه کمی باشند و حساسیت و اختصاصیت‌های مختلفی را نسبت به آنتی بادی‌های شناسایی شده نشان دهند (۵۱، ۵۲). اخیراً در یک مطالعه، عملکرد روش‌های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و CLIA (Chemiluminescence immunoassay) و ECLIA (Electro-chemiluminescence immunoassay) با هم مقایسه شدند، و به طور کلی مشخص گردید که، آزمایش ECLIA در اولین روزهای ابتلا حساسیت و اختصاصیت دقیقی را نشان می‌دهد که می‌تواند یک روش سنجش معتبر در نظر گرفته شود. IgA زودتر از IgM توسط روش ELISA تشخیص داده می‌شود که نشان می‌دهد تشخیص IgA می‌تواند در تشخیص زود هنگام عفونت کووید-۱۹ از IgM مفیدتر باشد. چنان‌که، سطح IgA در طی ۲۰ روز از IgM نیز بالاتر بود (۵۳، ۵۴).

• سنجش ایمنی متصل به آنزیم

الایزا (ELISA) یک روش بیوشیمی تحلیلی است که به عنوان استاندارد طلایی سنجش ایمنی در نظر گرفته می‌شود. این آزمایش ایمونولوژیک بسیار حساس است و برای شناسایی و کمی‌سازی موادی از جمله آنتی بادی‌ها، آنتی ژن‌ها، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و هورمون‌ها استفاده می‌شود. تشخیص این محصولات با کمپلکس شدن آنتی بادی‌ها و آنتی ژن‌ها انجام می‌شود تا نتیجه قابل اندازه‌گیری ایجاد شود. آنتی بادی نوعی پروتئین است که توسط سیستم ایمنی بدن فرد تولید می‌شود. این نوع پروتئین مناطق خاصی دارد که به آنتی ژن‌ها متصل می‌شوند. آنتی ژن پروتئینی است که می‌تواند از برخی منابع خارجی تأمین شود و هنگامی که به آنتی بادی متصل شود، از طریق سیستم ایمنی بدن باعث ایجاد حوادث ناگهانی می‌شود. این تعامل در آزمایش ELISA مورد استفاده قرار می‌گیرد و امکان شناسایی آنتی بادی‌ها و آنتی ژن‌های پروتئینی خاص، فقط با مقدار کمی از نمونه آزمایش را فراهم می‌کند. آزمایش ELISA در تشخیص عفونت HIV، آزمایش‌های بارداری و خونریزی و سایر موارد استفاده می‌شود (۵۷-۵۵). تست الایزا را در حالت معمول برای ردیابی آنتی ژن یا آنتی بادی بکار می‌برند بدین ترتیب که یکی از این دو ماده در بستر جامد ثابت می‌شود و برای ردیابی دومی بکار گرفته می‌شود. این تکنیک بر روی یک صفحه (Plate) انجام می‌گیرد که برای تشخیص و اندازه‌گیری موادی مانند پپتیدها، پروتئین‌ها، آنتی بادی‌ها و هورمون‌ها استفاده می‌شود. در این تکنیک یک آنزیم به آنتی بادی به منظور تولید یک محصول رنگی، متصل می‌شود؛ چنین بستری، بستر کروموجنیک (Chromogenic) نامیده می‌شود. آنزیم‌هایی که معمولاً در واکنش‌های الایزا مورد

کیت تشخیص سریع آنتی ژن SARS-CoV-2 مانند (FIA) Sofia SARS Antigen Fluorescent Immunoassay را تأیید کرده است که از روش ایمنی سنجی جریان جانبی همراه با تکنیک پیشرفته ایمونوفلورسانس برای تشخیص کووید-۱۹ در سواب های بینی و حلق استفاده می کند و در عرض ۱۵ دقیقه، نتیجه را گزارش می دهد (شکل-۶).

به طور پیوسته برای اندازه گیری غلظت سرمی هورمون ها، داروها، ویتامین ها، نشانگرهای توموری، نشانگرهای بیماری های عفونی، نشانگرهای آسیب میوکارد و در نهایت، آنتی بادی ها مورد استفاده قرار می گیرند. میانگین زمانی این روش ۱ تا ۲ ساعت می باشد. CLIA و ELISA هر دو روش آزمایشگاهی با بازده بالا هستند (۶۳،۶۴). اخیراً، FDA برای تشخیص سریعتر کووید-۱۹، چند



شکل-۶. سنجش الایزا. A. تشخیص آنتی بادی SARS-CoV-2 به روش الایزا غیرمستقیم، B. آنتی ژن SARS-CoV-2 به روش الایزا ساندویچ (۱۲)

آزمایشگاه هایی که دارای گواهینامه های ایمنی زیستی تعیین شده برای کشت سلول های آلوده به SARS-CoV-2 است انجام شود. با وجود این محدودیت ها، تعیین آنتی بادی های خنثی کننده در کوتاه مدت برای کاربرد پلاسما درمانی و در دراز مدت برای تولید واکسن مهم است (۶۵،۶۴).

بحث و نتیجه گیری

کووید-۱۹ یک بیماری همه گیر بوده و از آنجا که پیشرفت عفونت ناشی از کروناویروس می تواند منجر به مشکلات شدید تنفسی و مرگ احتمالی شود، نیاز فوری به ارائه راهکارهای مختلف تشخیصی برای شناسایی زودرس این بیماری به شدت احساس می شود. با توجه به آنکه تکنیک کشت میکروارگانیسم و استفاده از

• روش خنثی سازی

در روش خنثی سازی (Neutralization assays) از ویروس زنده و کشت سلول برای تعیین اینکه آیا آنتی بادی های موجود در نمونه بیمار می توانند از عفونت ویروسی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کنند، استفاده می شود. به منظور انجام این روش، نمونه های بیمار شامل خون، سرم یا پلاسما را رقیق کرده و با غلظت کم به کشت سلول اضافه می شود. اگر آنتی بادی های خنثی کننده در نمونه بیمار وجود داشته باشد، می توان سطح آنها را با تعیین آستانه ای که قادر به جلوگیری از تکثیر ویروس در کشت سلولهای آلوده هستند اندازه گیری کرد. زمان مورد نیاز برای سنجشهای خنثی سازی معمولاً ۳ تا ۵ روز است، اما پیشرفت های اخیر منجر به کاهش این میزان به ساعت شده است. این آزمایش باید در

ایمنی سنجی از دیگر ابزارهای تشخیصی است که پس از استاندارد طلایی RT-PCR در تشخیص کووید-۱۹ مفید می‌باشد. از روش‌های سرولوژیک ممکن است در ترکیب با آزمایشات مولکولی برای ردیابی تماس، شناسایی افراد بدون علامت که آزمایش PCR آنان منفی بوده اما IgG یا IgM مثبت هستند و کنترل شیوع بیماری با تشخیص عفونت در مراحل اولیه استفاده شود که در نتیجه سبب کاهش میزان انتقال بیماری و مرگ و میر می‌گردد. در این میان، تست‌های سریع آنتی ژن و آنتی بادی و آزمایش‌های سرولوژیک ایمونوآنزیمی نشان‌دهنده بیشترین تکنیک‌ها برای نظارت بر گسترش عفونت کووید-۱۹ است. علاوه بر روش‌های تشخیص مولکولی، با طراحی واکسن‌هایی علیه کووید-۱۹، تشخیص و تعیین کمیت آنتی بادی‌های خنثی‌کننده، بررسی اثرگذاری واکسن از طریق تعیین پاسخ آنتی بادی علیه ویروس و کنترل تیتراژ آنتی بادی برای تعیین زمان مناسب به دوز جدید واکسن، با استفاده از روش‌های سرولوژیک امکان پذیر است. توسعه سنجش‌های تشخیصی مطمئن برای تشخیص صحیح و مهار بیماری همه‌گیر کووید-۱۹، بسیار مهم است و در نهایت به بهبود مدیریت بیماری کمک می‌کند. علاوه بر این، با ظهور واکسن و آنتی بادی‌های مونوکلونال درمانی علیه کووید-۱۹، سنجش‌های سرولوژی برای تعیین ارزیابی این گزینه‌های درمانی جدید نقش بسیار مهمی دارند (۶۷۶۶، ۱۲). در نتیجه، درک مزایا و معایب تکنیک‌های مختلف تشخیص ویروس و انجام صحیح آنها می‌تواند از شیوع بیشتر SARS-CoV-2 و خستگی کارکنان پزشکی جلوگیری کرده و سبب کنترل مؤثر وضعیت همه‌گیر فعلی شود، که در نهایت به ارتقا بهداشت و ایمنی عمومی می‌انجامد و از پیامدهای مخرب بیماری نیز جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات همه عزیزانی که در ارسال و تدارک اطلاعات و تدوین و نگارش این مقاله کمک‌های شایانی نموده‌اند تقدیر و تشکر نمایند.

نقش نویسندگان: همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تایید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

میکروسکوپ برای درک عمیق کرونا ویروس جدید و ارتباط آن با سلول‌های میزبان اساسی است و روشی برای تشخیص ویروس در نظر گرفته می‌شود، اما در مورد پاندمی کووید-۱۹، این روش بسیار وقت گیر و هزینه بر می‌باشد. از این رو در صورت نیاز به تشخیص سریع، به ندرت روش کشت سلولی در نظر گرفته می‌شود، بنابراین اهمیت سایر روش‌ها برای تشخیص سریع حائز اهمیت است. در حال حاضر، آزمایش‌های مولکولی، به عنوان مرجع استاندارد تشخیص بیماری کووید-۱۹ در نظر گرفته می‌شود که تکنیک‌های بسیار حساس و خاصی هستند و می‌توانند به عنوان اولین تست در تشخیص بیماران مبتلا به کووید-۱۹ استفاده شوند. روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک با چندین آزمایش مبتنی بر RT-PCR که توسط آژانس‌های نظارتی مختلف ملی و بین‌المللی تأیید شده‌اند، روش استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت کووید-۱۹ می‌باشند. این آزمایش‌ها، همراه با تحقیقات بالینی و رادیولوژیکی، تشخیص صحیح و سریع عفونت کووید-۱۹ را در مقایسه با اولین روش‌های تشخیصی که عمدتاً توسط تجزیه و تحلیل کشت ویروسی و تعیین توالی ژنوم SARS-CoV-2 صورت می‌گرفت، به طور قابل توجهی بهبود بخشیده است.

با این حال، با وجود حساسیت و دقت بالای RT-PCR، بیماران با بار ویروسی کم اغلب به درستی تشخیص داده نمی‌شوند. علاوه بر این، روش اخیر نیاز به تجزیه و تحلیل‌های تأییدی، پرسنل آموزش دیده و ابزارهای گران قیمت و معرف‌هایی دارد که کاربرد آن را، به ویژه در کشورهای کم درآمد، محدود می‌کند. برای این اهداف، روش‌های دیگری برای غلبه بر محدودیت‌های RT-PCR توسعه یافته‌اند. در میان این روش‌ها، روش‌های مبتنی بر CRISPR/Cas و روش‌های تکثیر ایزوترمال نشان‌دهنده راهکارهای تشخیصی کم هزینه‌ای هستند که می‌تواند برای تشخیص مؤثر عفونت کووید-۱۹ در کشورهای کم درآمد و متوسط استفاده شوند. علاوه بر این، روش‌های حساس‌تر مولکولی، از جمله ddPCR و حسگرهای زیستی، توسط سازمان‌های بین‌المللی تأیید شده‌اند و برای تشخیص عفونت کووید-۱۹ و همچنین برای نظارت بر بار ویروسی در بیماران بستری در بیمارستان یا افراد قرنطینه شده استفاده می‌شوند.

علاوه بر موارد ذکر شده؛ پیشرفت روش‌های الکتروشیمیایی در تشخیص عفونت‌های ویروسی مورد ارزیابی قرار گرفته است. روش‌های بر پایه الکتروشیمی می‌توانند برای ویروس‌های مختلف طراحی شوند. این روش‌ها کم هزینه و با تشخیص سریع هستند. با این وجود، برای استفاده در سطح آزمایشگاه‌های تشخیص طبی نیازمند تغییراتی هستند، به طوری که بتواند در حد روش‌های روتین همانند RT-PCR دارای دقت بالا و از لحاظ حساسیت با روش‌های مولکولی مانند RT-PCR قابل رقابت باشند.

منابع

1. Perlman S. Another Decade, another Coronavirus. *N Engl J Med.* 2020; 382(8): 760-762. doi:10.1056/NEJMe2001126
2. Kumar S. COVID-19: A Drug Repurposing and Biomarker Identification by Using Comprehensive Gene-Disease Associations through Protein-Protein Interaction Network Analysis. Preprints. 2020; 2020030440. doi:10.20944/preprints202003.0440.v1
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
4. Fadaka AO, Sibuyi NRS, Adewale OB, Bakare OO, Akanbi MO, Klein A, et al. Understanding the epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management of SARS-CoV-2. *J Int Med Res.* 2020; 48(8): 300060520949077. doi:10.1177/0300060520949077
5. Campos CO, Bernuci MP, Vireque AA, Campos JR, Silva-de-Sá MF, Jamur MC, et al. Preventing Microbial Contamination during Long-Term in Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012; 152781. doi:10.5402/2012/152781
6. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Ayodele O, Abbasi AF, Prakash S, et al. Navigating the diagnostics of COVID 19. *SN Compr Clin Med.* 2020; 25. doi:10.1007/s42399-020-00408-8
7. Vandenberg O, Martiny D, Rochas O, van Belkum A, Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID 19 tests. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19(3): 171-183. doi:10.1038/s41579-020-00461-z
8. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci.* 2020; 6(5): 591-605. doi:10.1021/acscentsci.0c00501
9. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR Testing and Clinical Features for Diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 Outbreak. *J Med Virol.* 2020; 92(6): 538-539. doi:10.1002/jmv.25721
10. Mathuria JP, Yadav R, Rajkumar. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2. A review of current methods. *J Infect Public Health.* 2020; 13(7): 901-905. doi:10.1016/j.jiph.2020.06.005
11. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19. a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online.* 2020; 41(3): 483-499. doi:10.1016/j.rbmo.2020.06.001
12. Oishee MJ, Ali T, Jahan N, Khandker SS, Haq MA, Khondoker MU. COVID-19 Pandemic: Review of Contemporary and Forthcoming Detection Tools. *Infect Drug Resist.* 2021; 14: 1049-1082. doi:10.2147/IDR.S289629
13. Calderaro A, Arcangeletti MC, De Conto F, Buttrini M, Montagna P, Montecchini S, et al. SARS-CoV-2 infection diagnosed only by cell culture isolation before the local outbreak in an Italian seven-week-old suckling baby. *International Journal of Infectious Diseases.* 2020; 96:387-9. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.035
14. Zhu N, Wang W, Liu Z, Liang C, Wang W, Ye F, et al. Morphogenesis and cytopathic effect of SARS CoV 2 infection in human airway epithelial cells. *Nat Commun.* 2020; 11: 3910. doi:10.1038/s41467-020-17796-z
15. Li B, Li X, Wang Y, Han Y, Wang Y, Wang C, et al. Diagnostic value and key features of computed tomography in Coronavirus Disease 2019. *Emerging microbes & infections.* 2020; 9(1):787-93. doi:10.1080/22221751.2020.1750307
16. Vancheri SG, Saviotto G, Ballati F, et al. Radiographic findings in 240 patients with COVID-19 pneumonia: time-dependence after the onset of symptoms. *Eur Radiol.* 2020; 30(11): 6161-6169. doi:10.1007/s00330-020-06967-7
16. Vancheri SG, Saviotto G, Ballati F, Maggi A, Canino C, Bortolotto C, et al. Radiographic findings in 240 patients with COVID-19 pneumonia: time-dependence after the onset of symptoms. *European radiology.* 2020; 30:6161-9.
17. Xia J, Tong J, Liu M, Shen Y, Guo D. Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *J Med Virol.* 2020; 92(6): 589-594. doi:10.1002/jmv.25725
18. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci.* 2020; 6(5): 591-605. doi:10.1021/acscentsci.0c00501
19. Hadjinicolaou AV, Farcas GA, Demetriou VL, Mazzulli T, Poutanen SM, Willey BM, et al. Development of a molecular beacon- based multi-allelic real-time RT-PCR assay for the detection of human coronavirus causing severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV): a general methodology for detecting rapidly mutating viruses. *Arch Virol.* 2011; 156(4):671-80. doi:10.1007/s00705-010-0906-7
20. Rutgers University; New Rutgers Saliva Test for Coronavirus Gets FDA Approval: Emergency Use Authorization Granted for New Biomaterial Collection Approach. *Rutgers Today.* 2020.
21. U.S. Food & Drug Administration. Accelerated emergency use authorization (EUA) summary SARS-CoV-2 ASSAY (Rutgers Clinical Genomics Laboratory). 2020.
22. Van Guilder HD, Vrana, KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques.* 2008; 44 (5), 619-626. doi:10.2144/000112776
23. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 2005; 39(1), 75-85. doi:10.2144/05391RV01
24. Chu DK, Pan Y, Cheng SM, Hui KP, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clinical chemistry.* 2020;66(4):549-55. doi:10.1093/clinchem/hvaa029
25. COVID-19 test kits included on the ARTG for legal supply in Australia. Australian Government, Department of Health, Therapeutic Goods Administration, Newsroom. 2020.

26. Park M, Won J, Choi BY, Lee CJ. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Exp Mol Med*. 2020; 52(6): 963977. doi:10.1038/s12276-020-0452-7
27. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020; 25(3): 2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
27. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*; 25(3):2000045.
28. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12): E63-7. doi:10.1093/nar/28.12.e63
29. Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, et al. Development and Evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5): 1956-1961. doi:10.1128/JCM.42.5.1956-1961.2004
30. Yu L, Wu S, Hao X, Li X, Liu X, Ye S, et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic plat-form: iLACO. *Clin Chem*. 2020; 66(7): 975-977. doi:10.1093/clinchem/hvaa102
31. Hologic's Molecular Test for the Novel Coronavirus, SARSCoV-2, Receives FDA Emergency Use Authorization. *CoronavirusUpdate*. Hologic, Inc. 2020.
32. Hou T, Zeng W, Yang M, Chen W, Ren L, Ai J, et al. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic for 2019-novel Coronavirus. *PLoS Pathog*. 2020; 16(8): e1008705. doi:10.1371/journal.ppat.1008705
33. Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *Broad Institute of MIT and Harvard*. 2020.
34. West R. Serology-based tests for COVID-19. *Johns Hopkins Center for Health Security*. 2020.
35. Pryor J. 3 Questions: How COVID-19 tests work and why they're in short supply. *MIT News: On Campus and around the World*, Massachusetts Institute of Technology. 2020.
36. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*. 2020; 6(5): 591-605. doi:10.1021/acscentsci.0c00501
37. Wang B, Potter S.J, Lin Y, Cunningham A.L, Dwyer D.E, Su Y, et al. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(5): 2339-2344. doi:10.1128/JCM.43.5.2339-2344.2005
38. Chen Q, Li J, Deng Z, Xiong W, Wang Q, Hu Y.Q. Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. *Intervirology*. 2010; 53(2): 95-104. doi:10.1159/000264199
39. Guo X, Geng P, Wang Q, Cao B, Liu B. Development of a single nucleotide polymorphism DNA microarray for the detection and genotyping of the SARS coronavirus. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2014; 24(10): 1445-1454. doi:10.4014/jmb.1404.04024
40. De Souza Luna LK, Heiser V, Regamey N, Panning M, Drexler JF, Mulangu S, et al. Generic detection of coronaviruses and differentiation at the prototype strain level by reverse-transcription-PCR and nonfluorescent low-density microarray. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(3): 1049-1052. doi:10.1128/JCM.02426-06
41. Habibzadeh P, Mofatteh M, Silawi M, Ghavami S. Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2021: 1-20. doi:10.1080/10408363.2021.1884640
42. Moore SC, Penrice-Randal R, Alruwaili M, Dong X, Pullan ST, Carter DP, et al. Amplicon based MinION sequencing of SARS-CoV-2 and metagenomics characterisation of nasopharyngeal swabs from patients with COVID-19. *medRxiv*. 2020; 03.05.20032011.
43. Comprehensive Workflow for Detecting Coronavirus Using Illumina Benchtop Systems. A Shotgun Metagenomics Sequencing Workflow for Effective Detection and Characterization of Coronavirus Strains. *Infectious Disease Surveillance*. 1270-2020-002-A4.
44. Saylan Y, Erdem Ö, Ünal S, Denizli A. An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. *Biosensors (Basel)*. 2019; 9(2): 65. doi:10.3390/bios9020065
45. Zhuang J, Yin J, Lv S, Wang B, Mu Y. Advanced "lab-on-a-chip" to detect viruses - Current challenges and future perspectives. *Bioelectron*. 2020; 163:112291. doi:10.1016/j.bios.2020.112291
46. Maddali H, Miles CE, Kohn J, O'Carroll DM. Optical Biosensors for Virus Detection: Prospects for SARS-CoV-2/COVID-19. *Chembiochem: An European Journal of Chemical Biology*. 2021; 22(7): 1176-1189. doi:10.1002/cbic.202000744
47. Xiaomin C, Yutong K, Jing L, Kun P, Xin X, Jinyu W, et al. Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11: 632490. doi:10.3389/fcimb.2021.632490
48. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform*. 2021; 22(2): 616-630. doi:10.1093/bib/bbaa297
49. 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. doi:10.1093/cid/ciaa461
50. Wolfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange s, Muller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID- 2019. *Nature*.

- 2020; 581(7809): 465-9. doi:10.1038/s41586-020-2196-x
51. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 6(6): CD013652. doi:10.1002/14651858.CD013652
52. Jääskeläinen AJ, Kekäläinen E, Kallio-Kokko H, Mannonen L, Kortela E, Vapalahti O, et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Euro Surveill*. 2020; 25(18): 2000603. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603
53. Pieri M, Ciotti M, Carlozzi N, Frassanito ML, Meloni A, Cistera A, et al. SARS-CoV-2 infection serology validation of different methods: usefulness of IgA in the early phase of infection. *Clin Chim Acta*. 2020; 511: 28-32. doi:10.1016/j.cca.2020.09.033
54. Padoan A, Cosma C, Sciacovelli L, Faggian D, Plebani M. Analytical performances of a chemiluminescence immunoassay for SARS-CoV-2 IgM/IgG and antibody kinetics. *Clin Chem Lab Med*. 2020; 58(7): 1081-8. doi:10.1515/cclm-2020-0443
55. Engvall E. The ELISA enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*. 2010; 56: 319-20. doi:10.1373/clinchem.2009.127803
56. Alandijany TA, El-Kafrawy SA, Tolah AM, Sohrab SS, Faizo AA, Hassan AM, et al. Development and Optimization of In-house ELISA for Detection of Human IgG Antibody to SARS-CoV-2 Full Length Spike Protein. *Pathogens*. 2020; 9(10): 803. doi:10.3390/pathogens9100803
57. Larsen SE, Berube BJ, Pecor T, Cross E, Brown BP, Williams B, et al. Qualification of ELISA and neutralization methodologies to measure SARS-CoV-2 humoral immunity using human clinical samples. *bioRxiv*. 2021; 07.02.450915. doi:10.1101/2021.07.02.450915
58. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*. 1960; 39: 1157-75. doi:10.1172/JCI104130
59. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an anti-body containing of fluorescent group. *Pros Soc Exp Biol Med*. 1941; 47:200-2. doi:10.3181/00379727-47-13084P
60. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
61. Scohy A, Anantharajah A, Bodeus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol*. 2020; 129: 104455. doi:10.1016/j.jcv.2020.104455
62. Cai X, Chen J, Hu J, Long Q, Deng H, Fan K, et al. A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) medRxiv. 2020; 2020.02.22.20026617. doi:10.1101/2020.02.22.20026617
63. Infantino M, Grossi V, Lari B, Bambi R, Perri A, Manneschi M, et al. Diagnostic accuracy of an automated chemiluminescent immunoassay for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies: An Italian experience. *J Med Virol*. 2020; 92(9): 1671-1675. doi:10.1002/jmv.25932
64. Postnikova EN, Pettitt J, Van Ryn CJ, Holbrook MR, Bollinger L, Yu S, et al. Scalable, semi-automated fluorescence reduction neutralization assay for qualitative assessment of Ebola virus-neutralizing antibodies in human clinical samples. *PLoS One*. 2019; 14(8): e0221407. doi:10.1371/journal.pone.0221407
65. Whiteman MC, Bogardus L, Giaccone DG, Rubinstein LJ, Antonello JM, Sun D, et al. Virus Reduction Neutralization Test: A Single-Cell Imaging High-Throughput Virus Neutralization Assay for Dengue. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 99(6): 1430-1439. doi:10.4269/ajtmh.17-0948
66. Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID 19 infection (Review). *Int J Mol Med*. 2021; 47(6): 100. doi:10.3892/ijmm.2021.4933
67. Zorriehzahra M J, Dadar M, Ziarati M, Seidgar M, Hassantabar F, Rashidi monfared S, et al. A Perspective on the Origin of COVID-19 and Its Epidemic Situation in Iran and the World. *J Mar Med*. 2020; 2(1): 41-52. doi:10.30491/2.1.2