آماده سازی فضای فیزیکی آزمایشگاهی مولکولی برای تشخیص کرونا۱۹

از آنجاییکه در بدو شروع اپیدمی کرونا ۱۹، بسیاری از فضاها و مکانهایی که قبلا برای اهداف دیگری آزمایشات را انجام میداده و یا اصولا کاربری غیر آزمایشگاهی داشته و در شرایط اضطرار برای انجام تست تشخیصی کرونا ۱۹ هدف گذاری شده اند، لذا جهت رعایت اصول فنی و احتراز از بروز آلودگی و خصوصا پاسخهای مثبت کاذب، رعایت مراتب زیر قویا توصیه میگردد:

۱. **فضای فیزیکی**: مهمترین مسئله جدا بودن فضاهای فیزیکی به میزان حداقل ۴ فضا برای اتاقهای: جداسازی نمونه، اتاق استخراج، اتاق Amplification و Clean Room میباشد. وجود یک راهرو برای جداسازی این فضا ها توصیه میگردد (شکل۱). لازم به ذکر است برای هر اتاق گان و دمپایی جداگانه باید در نظر گرفته شود.

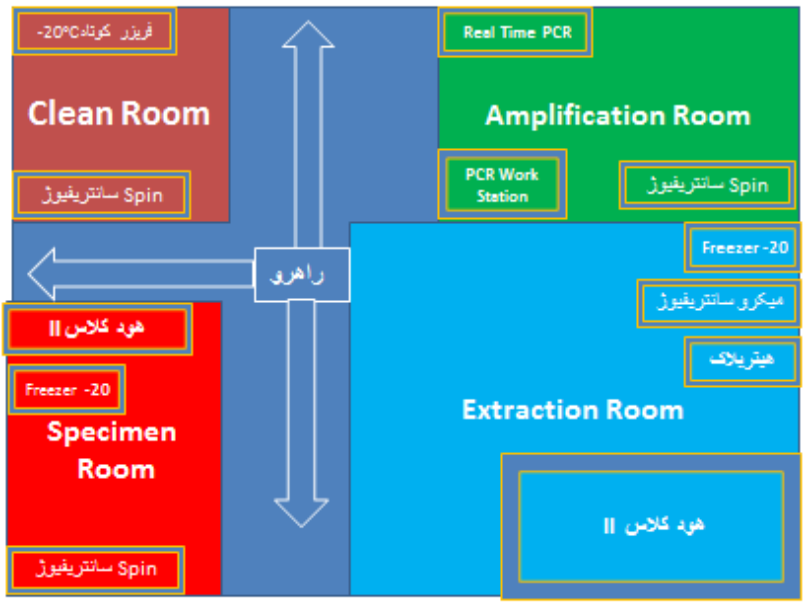
الف- اتاق جدا سازی نمونه: نمونه های مشکوک در اتاق جداسازی نمونه از Box ها جدا شده و در زیر هود کلاس II به ۲ روش آماده میگردند. اگر امکانات استخراج به صورت اتوماتیک مهیا میباشد، انتقال نمونه مشکوک از لوله جمع آوری نمونه، به تیوبهای واکنش در زیر هود صورت گیرد. در غیر اینصورت، و برای انجام استخراج بصورت دستی، در این اتاق نمونه ها به رکهای استریل انتقال میابند. تنها وسایل مورد نیاز در این اتاق، یک عدد هود کلاس II ، یک یخچال (برای نگهداری موقت نمونه ها برای چند روز) و یک سانتریفوژ (برای جدا نمودن احتمالی سرم، بدست آموردن پارتیکل ویروسی و غیره) (شکل ۱) میباشد. این اتاق آلوده ترین اتاق در مجموعه فضای فیزیکی آزمایشگاه مولکولی میباشد.

ب- اتاق استخراج: صرف نظر از مبادرت به انجام استخراج بطور اتوماتیک، هود کلاس II و یا دستگاه اتوماتیک استخراج در این مکان قرار خواهد گرفت. شکل ۱ تجهیزات و وسایلی که باید در این اتاق قرار بگیرند را نشان داده است. لازم به ذکر است اگر میزان الودگی در این اتاق بیشتر از اتاق جداسازی نمونه نباشد، از آن کمتر نخواهد بود. بهینه آن است که در صورت وجود امکانات، از امکانات "فشار منفی" برای تهویه فضا و پارتیکل های موجود در این اتاق استفاده نمود. نکات قابل توجه برای بازکردن لوله های محتوی نمونه و انجام دقیق مراحل مختلف ازمایش مولکولی و مواجهه با خطرات ناشی از آلودگی با نمونه برای کاربر به ترتیب در دستور العملهای: **BS-III BS-IV BS-V** فراهم گردیده. لطفا آنها را مطالعه نمایید.

ج- *Clean Room* : در این اتاق صرفا محلولها، پرایمر و پروبها در فریزرهای -۲۰ نگداری شده و عملا تهیه Master Mix در این اتاق صورت میگیرد. به هیچ وجه نباید در این اتاق DNA/RNA وارد و یا ذخیره و نگهداری گردد. همچنین نمونه های مشکوک و یا حتی نمونه های منفی نباید در این اتاق وارد و یا نگهداری گردند.

د- *اتاق Amplification*: دستگاه های PCR و یک عدد PCR Work Station در این اتاق قرار گرفته و عملا مخلوط نمودن Master Mx (که در Clean Roomتهیه گردیده) با اسید نوکلئیک ویروس (که در اتاق استخراج تهیه گردیده) در زیر PCR Work Station صورت پذیرفته و Loading دستگاه PCR توسط نمونه هم در این اتاق انجام میگیرد. چون آنالیز اطلاعات و نتایج عموما در این فضا انجام میشود

۲- رعایت Work-flow Direction: باید رفت و آمد و تردد بین اتاقها بر اساس رعایت اصول Biosafety برای احتراز از آلودگی "نمونه به نمونه" و "نمون به کاربر" باشد. بطور مثال: انتقال هر گونه وسایل و مواد آزمایشگاهی و یا گان و دستکش و غیره بصورت یکطرفه از Clean Room به سایر اتاقها مجاز میباشد. لیکن عکس این رویه ممنوع میباشد. به هیچ وجه با گان و دستکش پوشیده از یک اتاق به اتاق دیگر تردد ننمایید (به استثنا تردد از Clean Room به سایر اتاقها، آنهم طبیعتا فقط یک بار امکان پذیر است). فرد کاربر هنگام خروج از اتاق جمع آوری نمونه و نیز اتاق استخراج که آلوده ترین فضاها هستند، باید با وسواس از عدم انتقال آلودگی توسط خودش و یا نمونه های همراهش هنگام تردد به سایر اتاقها اطمینان حاصل نماید. متاسفانه رعایت این اصول در کشور ما چندان جدی تلقی نمیگردد و این عامل مهمی در انتقال آلودگی به دیگران و یا آلوده کردن نمونه با یکدیگر است. همچنین بروز پاسخها با نتایج فاحش و غیر قابل قبول عمدتا از این عدم رعایتها ناشی میگردد.



۳- رعایت نکات فنی هنگام انجام تست: متاسفانه از علل شایع Inter-assay Variation بین نتایج ازمایشات در ازمایشگاه های مختلف (و بطور طنز آمیزی حتی در یک آزمایشگاه واحد)، عدم رعایت اصول بسیار پیش پا افتاده میباشد. رعایت این نکات به کاربران توصیه میگردد:

الف- استفاده از پیپت های مناسب. بر طبق دستور العملهای صادره از CDC و سایر مجامع جهانی، شایعترین علت اختلافات در موارد Intra-assay و Inter-assay عبارت است از Pipetting Errors توسط کاربران. برای احتراز از این خطا، هر آزمایشگاهی باید دقت لازم را در انتخاب پیپتها به کار برده و یا در صورت عدم امکان تهیه پیپت نو، از کالیبره بودن آنها اطمینان حاصل نماید. همچنین، هر اتاقی برای خود باید ست کاملی از پیپتها را داشته و از انتقال پیپتها از اتاقی به اتاقی دیگر جدا پرهیز گردد. بر اساس تجربه، دقیقترین و بهترین ست پیپت در آزمایشگاه تشخیص مولکولی باید برای Clean Room اختصاص یابد.

ب- استفاده از "سر سمپلر"های فیلتر دار. متاسفانه پاره ای از آزمایشگاه های تشخیص مولکولی برای صرفه جویی از سر سمپلرهای بدون فیلتر استفاده مینمایند. این امر تحقیقا بر روی دقت در Pipetting تاثیر گذارده و نتیجتا بر روی پاسخها نیز

تاثیر خود را خواهد گذاشت. از بزرگترین خطرات ناشی از عدم استفاده از نوع فیلتر دار میتوان به آلودگی نوک سمپلر و نیز Cross-Contamination بین نمونه ها نام برد.

ج_ تمرکز بر انجام تست: لطفا کاربران توجه داشته باشند که هنگام انجام تست ضمن تمرکز بر انجام عملیات، اصول GLP را دقیقا رعایت نمایند تا انجام خطا به حد اقل برسد. استفاده از تلفن همراه حتی به هدف یاری رساندن به بیماران کووید -۱۹ و یا پرسنل و غیره اکیدا ممنوع میباشد. از خوردن و آشامیدن در فضاهای فیزیکی انجام تست قویا خودداری نمایید. رعایت اصول آسپتیک در سرتاسر فضاهای فیزیکی و در طول انجام ازمایش توصیه میگردد. به یاد داشته باشید "خطای انسانی" علت العلل آلودگی کاربر و نمونه و نیز بروز پاسخهای غیر قابل اعتماد در آزمایشگاه های تشخیص مولکولی است.

انجام مرحله اعتبار سنجی و یا Verification برای کیتهای تشخیص مولکولی کرونا در آزمایشگاه های تشخیصی

چون آزمایشگاه ها کیتهای متعدد ساخت خارج و یا داخل کشور را دریافت می نمایند. لازم است یک مرحله اعتبار سنجی و یا Verification در راستای روند "کنترل کیفی "انجام دهند. قبل از هر نکته، توجه به مراتب ذیل اکیدا توصیه میگردد:

جهت این اعتبار سنجی، روش ذیل توصیه می گردد؛

۳ نمونه مثبتی که از قبل تست گردیده و CT آن مشخص گردیده است را بدینگونه انتخاب نموده: نمونه ها (ترجیحا یک نمونه با CT=۲۰ یک نمونه با CT=۲۵ و یک نمونه با CT=۳۰ هر کدام ۳ عدد Triple، جمعا ۹نمونه) برای تست استفاده نمایید. تعیین مقدار CT برای نمونه ها بدلیل Variation در دستگاه ها و پلت فرم های مختلف در آزمایشگاه های متفاوت کشور امری مشکل بوده و هر آزمایشگاهی باید در SOP خود این مقادیر را از قبل تعریف نموده باشد. لیکن از بعد کلی می توان CT را برای ۳ مورد فوق این گونه توصیف نمود. برای توصیف موارد زیر باید رعایت گردد.

ابتدا مشخص شود دستگاه مورد استفاده در آزمایشگاه در حالت default و Auto با وضعیت ترسیم گراف با اپشن Log و Linear با در نظر گرفتن Nosie چگونه است. Melting Curve حتما بررسی شود. لازم به ذکر است تفسیر گرافها برای کنترل کیفی و Set up دستگاه، پروتوکل دمایی و تعیین ترکیبات محلولها (Master Mix) و مقدار extract توسط متخصص ویروس شناسی صورت گرفته و تصمیم نهایی در مورد وضعیت کارکرد دستگاه و تفسیر گرافها بعداز استاندارد سازی توسط وی مشخص گردد و اجازه استفاده از دستگاه با پروتوکل مشخص توسط متخصص ویروس شناسی داده شود. بعداز آن آزمایشگاه اجازه خواهد

داشت طبق پروتوکل مشخص شده کار تشخیص را شروع نماید. رعایت نکات مذکور برای کار آزمایشگاه در مورد استاندارد بود کار تشخیصی حیاتی میباشد. همچنین یک کنترل منفی برای استخراج (NC) ، یک کنترل منفی برای PCR (NTC) و یک کنترل مثبت مربوط به واکنش PCR طبق روال عادی باید در نظر گرفته شوند. استفاده از Internal control نیز قویا توصیه می گردد.

تفسیر نتایج: برای تغییر تفاوت های احتمالی در CT های بدست آمده در اعتبار سنجی ، میزان تغییر ۳و یا کمتر CT (log ۰,۵ ۱۰ >) قابل چشم پوشی و تحت عنوان Intra/Inter Assay Variations قابل قبول می باشد. لیکن تفاوت های بیشتر از۳نشان دهنده ی عدم Co-efficient Variation بالا بوده و باید در انتخاب کیت تجدید نظر نمود.

لازم به ذکر است کیت رفرانس در آزمایشگاه خود باید قبلا با روش بالا کنترل کیفی گردیده و تکرار پذیری آن قبلا اثبات شده باشد.

مقادیر Positive Predictive Valueو Negative Predictive Value باید در تفسیر تستها (البته توسط پزشکان متخصص در تعامل با ویروس شناسان) بسته به شرایط اپیدمیولوژیک منطقه مد نظر قرار گیرند. مثلا موارد منفی کاذب در شرایط اپیدمی بالا در جامعه و مثبت کاذب در شرایط اپیدمیک به میزان پایین و یا متوسط بیشتر رخ میدهد.

درج Cycle of threshold (Ct) در برگه های جوابدهی تست مولکولی کرونا

به جهت ارزیابی و تفسیر نتایج حاصل از آزمایش Real time PCR بهتر است آزمایشگاه های تشخیصی کرونا، مقادیر Ct را در برگه جوابدهی درج نمایند. این روش به عنوان روش Semi-quantitative در موارد ویروس های تنفسی چون RSV، Metapeumovirus، و آنفولانزا در کشورهای غربی کاربرد داشته و پزشک متخصص را تا حدی در مورد مقایسه لود ویروس و علائم بالینی بیمار راهنمایی خواهد کرد. ضمنا در آندسته از بیمارانی که بعد از فاز حاد، مجددا تست گردیده اند، در مقام مقایسه تا حدی راهگشا میباشد (مشروط به اینکه انجام کار آزمایش در یک آزمایشگاه و یک کیت یکسان انجام شود) و نهایتا این مسئله سبب ایجاد ارتباط بین بالین و آزمایشگاه در آینده میگردد. تجربه ویروس شناسان دخیل در دیاگنوستیک در ایران نشاندهنده تاثیر این نوع روشها در این گونه فرهنگ سازی میباشد.

- مثبت (CT<??) : نشاندهنده وجود اسید نوکلئیک هدف در نمونه بالینی میباشد.

- مشکوک (CT:??-??) : بهتر است تست در چنین مواردی تکرار شود.
- منفی (CT>??) : نشاندهنده عدم وجود اسید نوکلئیک هدف در نمونه بالینی میباشد.
- در تمام موارد بالا در صورت ظن بالینی، پیشنهاد میگردد آزمایش تکرار گردد. تعیین اینکه نمونه جدید و یا همان نمونه قبلی مورد تست قرار گیرد بستگی به هماهنگی بین تیم پزشکی و ویروس شناسان میباشد.

با در نظر گرفتن مقادیر استاندارد عدد Ct=?? برای نتیجه هر تست، لازم به ذکر است تعیین حدود Ct برای هرنمونه، هنگام آنالیز نتایج، با مشاهده گراف آن تست در دستگاه، بسته به تنظیمات Ct روی default و یا Auto با در نظر گرفتن و مشاهده Noise ها در وضعیت Log و همچنین براساس تجربه کاربر و تفسیر گرافها و مقایسه آن با گراف کنترل مثبت، بررسی Melting Curve نتیجه هر تست گزارش میگردد. لذا، تعیین حدود Ct برای آزمایشگاه های تشخیص مولکولی در قالب یک دستورالعمل واحد برای کشور امکانپذیر نمیباشد. هنگام آنالیز نتایج با دستگاه، بسته به تنظیمات Ct روی default و یا Auto و همچنین براساس تجربه کاربر و تفسیر گرافها و مقایسه آن با گراف کنترل مثبت، و دیدن Melting Curve نتیجه تست گزارش میگردد. همچنین، بر اساس نوع کیت، نوع ژن مورد بررسی، کیفیت کیت استخراج، کیفیت مستر میکس و آنزیمها و ... هر آزمایشگاه می تواند محدوده و Ct را برای تفسیر معیار قرار دهد. لذا حضور یک ویروس شناس متخصص برای نظارت بر کلیه مراحل فوق و یا به عبارت صحیح علمی، "کنترل کیفی" برای تست و گزارش دهی الزامی است.

نکات مهم هنگام انجام تست مولکولی برای کوید ۱۹

نتیجه قطعی تست کرونا با انجام Real Time PCR در نمونه با استفاده از یکی یا بیشتر از ژن های E ، N, RdRP و S می باشد.

– استخراج RNA در BSLII و یا شرایط مشابه به آن باید انجام پذیرد.

– مهم ترین روش برای اطمینان تست کووید ۲۰۱۹انجام تست مولکولی برای حداقل دوژن ویروس می باشد.البته مناطقی که COVID-۱۹ شایع است بر روی یک ژن ویروس تمرکز کرد.

– درصورت بروز نتایج غیرهمگون (Discordant) بهتر است از بیماران نمونه دیگری تهیه گردیده و RTPCR با هدف گزاری بر ژن دیگری متفاوت از تست اولیه انجام پذیرد.

–در بیماران علامت دار ،یک یا دو پاسخ از نتایج منفی COVID-۱۹ ،احتمال عفونت را منتفی نمی سازد، عواملی که بر این گونه نتایج منفی در بیماران موثر هستند عبارتند از :

الف) کیفیت پایین نمونه به نحوی که اسید نوکلئیک انسانی موجود نمونه پایین باشد. در این موارد می توان با گذارندن یک ژن house-keeping انسانی مقایسه و به این مشکل احتمال پی برد.

ب) نمونه بسیار زودتر از موعد مقرر در اوایل بیماری یا بسیار دیرتر مثل دوره نقاهت بیماری که ریزش ویروس (Shedding) هنوز مختصر می باشد، از بیماری گرفته شده باشد.

ج) حفظ و نگهداری و یا انتقال نمونه در شرایط زنجیره سرد (۲ تا ۸ درجه سانتیگراد) تا زمان انجام تست به درستی رعایت نگردد.

د) احتمال ایجاد اشکالات تکنیکال در روند آزمایش مانند: بروز موتاسیون در ویروس، و یا دخالت عوامل مهار PCR، کیفیت کیتهای استخراج ژنوم ویروس و کیفیت کیت مستر میکس و آنزیم Taq مورد استفاده در تست PCR از علل این مشکل باشد.

توجه :جهت احتراز از بروز این گونه (به استثنا بند د) موارد رعایت دستورالعمل BSVII در کاهش موارد منفی کاذب در مورد کرونا ویروس COVID.۲۰۱۹ توصیه میگردد.

بطور خلاصه:

برای نتیجه گیری مطلوب و قابل اطمینان از تست هر نمونه، نمونه مناسب لازم است. در صورت مشاهده اشکال یا موارد مشکوک، استفاده از نمونه آلترناتیو (مثلا اگر برای نمونه اولیه از سواب گلو (بخش فوقانی دستگاه تنفس) استفاده شده، نمونه دوم از بخش تحتانی شامل خلط، آسپیراسیپون اندوتراکیال و یا BAL و یا بالعکس این روش استفاده گردد (اگر نمونه اول از بخش تحتانی دستگاه تنفس بوده، نمونه بعدی از بخش فوقانی باشد). البته در رابطه با نمونه گیری مجدد باید به مراحل مختلف بیماری (دوره کمون، دوره حاد و دوره نقاهت بیماری) نیز توجه نمود. همچنین استفاده از Internal Control قویا توصیه می گردد.

پرایمر ها و پروبها:

هنگام تحویل پرایمر ها و پروبها به صورت خشک (Lyophialized)، آنها را در یخچال و یا دمای ۲ تا ۸ درجه تا زمان مخلوط کردن با آب و Aliquot کردن آنها قرار دهید. از یخ زده گی و ذوب کردن های متعدد خودداری نمایید. بهترین روش عبارت است

از: تهیه ۵ میکروتیوب که هرکدام حاوی ۳۰۰ میکرولیتر از مخلوط پرایمر/ پروب باشند. البته در صورت بالا بودن میزان تست در هر مرکز، تعداد تیوبهای ذخیره شده در فریزر میتواند کمتر و یا بیشتر باشند. یک تیوب را برای استفاده در یخچال و ۴ عدد بعدی را در فریزر -۲۰ در Clean Room نگهداری نمایید. حداکثر زمان نگهداری در این دما ۴ ماه میباشد.

کنترل مثبت:

برای احتراز از واریاسیون ها در Ct کنترل های مثبت، توصیه میگردد برای این کنترلها Single Aliquot تهیه گردد تا از Freeze/De-freeze شدن مکرر خودداری گردد. همچنین اگر از یک سری کنترل مثبت بصورت "رقت" های ایجاد شده و به تناوب استفاده میگردد، در صورت امکان، هر ۲ هفته یکبار، یک مرحله Real Time PCR صرفا کنترلها چک گردند. این یک روش دقیق برای کنترل کیفیت نمونه های مثبت میباشد. در طول انجام تست، گذاردن کنترل های مثبت بر روی یخ و یا Cold Block توصیه میگردد.

توجه: هنگام تهیه Master Mix و اضافه نمودن DNA/cDNA، رعایت نکات ذیل برای افزایش کیفیت آمپلیفیکاسیون الزامی است:

- تمامی تیوبهای حاوی بافر، آنزیم، پرایمر/پروب در طول زمان انجام تست باید بر روی بلاک سرد و یا روی یخ نگهداری شوند.
- اجازه دهید لوله های حاوی مواد مصرفی به تدریج در دمای اتاق ذوب شده، سپس ۵ بار آنها را وارانه و به حالت عادی برگردانید.
- به مدت ۵ ثانیه، تیوبهای بافر و پرایمر/پروب را سانتریفوژ داده تا محتویات همگون گردند. تیوب حاوی آنزیم را صرفا با نوک انگشت به ارامی تکان داده از سانتریفوژ کردن آن خودداری نمایید.
- بعد از اضافه نمودن محلولها به یکدیگر، انها را Up & Down نموده و سپس ۵ ثانیه سانترفوژ نمایید. از ورتکس نمودن جدا خودداری نمایید.
- تیوب محتوی NTC (کنترل منفی واکنش PCR)، را در اتاق تمیز (Clean Room) تهیه نموده، آب مقطر را اضافه کرده و درب لوله را ببندید. این عمل باید قبل از ترک اتاق تمیز صورت پذیرد.

- در Clean Room تیوبهای حاوی پروب Fluorogenic را در معرض نور قرار ندهید. حتی الامکان تیوبهای حاوی پروب را مجددا فریز ننموده و در فواصل تهیه Master Mix های متعدد، آنها را در شرایط ۲ تا ۸ درجه در اتاق نگهداری نمایید.
- تیوبهای حاوی اسید نوکلئیک را بعد از ذوب شدن در دمای اتاق، ۵ ثانیه ورتکس و سپس ۵ ثانیه ورتکس داده، بر روی بلوک سرد و یا یخ قرار دهید.
- در صورت استفاده از استریپ، بعد از اضافه کردن اسید نوکلئیک به Master Mix استریپ را به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه سانترفوژ دهید. در صورت استفاده از استریپ ۹۶ عددی، آن را در دمای ۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه X۵۰۰ سانتریفوژ نمایید.

توجه ۴:در بیماران علامت دار ،یک یا دو پاسخ از نتایج منفی COVID-۱۹ ،احتمال عفونت را منتفی نمی سازد، عواملی که بر این گونه نتایج منفی در بیماران موثر هستند عبارتند از :

الف) کیفیت پایین نمونه به نحوی که اسید نوکلئیک انسانی موجود نمونه پایین باشد. در این موارد می توان با گذارندن یک ژن house-keeping انسانی مقایسه و به این مشکل احتمال پی برد.

ب) نمونه بسیار زودتر از موعد مقرر در اوایل بیماری یا بسیار دیرتر مثل دوره نقاهت بیماری که ریزش ویروس (Shedding) کم می باشد، از بیماری گرفته شده باشد.

ج) حفظ و نگهداری و یا انتقال نمونه در شرایط زنجیره سرد (۲ تا ۸ درجه سانتیگراد) تا زمان انجام تست به درستی رعایت نگردد. حد اکثر زمان لازم برای نگهداری نمونه ها ۷۲ ساعت در شرایط ذکر شده است. اگر به هر دلیل در انجام استخراج تاخیری متصور میباشد، نمونه ها باید در فریزر -۷۰ نگهداری گردند.

د) احتمال ایجاد اشکالات تکنیکال در روند آزمایش مانند: بروز موتاسیون در ویروس، و یا دخالت عوامل مهار PCR، کیفیت کیتهای استخراج ژنوم ویروس و کیفیت کیت مستر میکس و آنزیم Taq مورد استفاده در تست PCR

توجه ۱:جهت احتراز از بروز این گونه (به استثنا بند د) موارد رعایت دستورالعمل BSVII در کاهش موارد منفی کاذب در مورد کرونا ویروس COVID.۲۰۱۹ توصیه میگردد. بطور خلاصه؛

برای نمونه مناسب، استفاده از نمونه آلترناتیو (مثلا اگر برای نمونه اولیه از سواب گلو (بخش فوقانی دستگاه تنفس) استفاده شده، نمونه دوم از بخش تحتانی شامل خلط ،آسپیراسیپون اندوتراکیال ویا BAL و یا بالعکس این روش استفاده گردد (اگر نمونه اول از بخش تحتانی دستگاه تنفس بوده، نمونه بعدی از بخش فوقانی باشد).البته در رابطه با نمونه گیری مجدد باید به به مراحل مختلف بیماری (دوره کمون، دوره حاد و دوره نقاهت بیماری) نیز توجه نمود. همچنین استفاده از Internal Control قویا توصیه می گردد.

توجه: بر طبق دستورالعملهای جدید آمریکا، انجام تست کرونا بر روی نمونه های غیر تنفسی اندیکاسیون ندارد، مگر اینکه مقصود از انجام تست، موارد بسیار استثنایی برای تصمیم گیری برای بیمار و یا برای اهداف تحقیقاتی باشد.

توجه: پاسخ منفی در نتیجه تست COVID-۱۹ در بیمار مبتلا به این ویروس بدلایل متعدد محتمل میباشد. لذا بر طبق دستورالعملهای CDC آمریکا، اینگونه پاسخهای منفی نباید ملاک Management ابن دسته از بیماران باشد.

نکاتی که برای انجام تحقیقات بر ویروس SARS-Cov-۲ و یا بیماران COVID-۱۹ باید مد نظر قرار گیرند

با توجه به اپیدمی ویروس COVID.۲۰۱۹ و نقاط ابهام علامت سئوال فراوانی که در مورد این عفونت و بیماری و سیر آن وجود دارد، پیشنهاد می گردد در ارائه پروپوزال ها عوامل ذیل مد نظر قرار گیرند :

۱- **سرولوژی:** برای انجام تحقیقات بر دینامیک پاسخ ایمنی میزبان، اگرچه در حال حاضر کیت تجاری برای تعیین روند سرولوژیک بیماری CoVID۲۰۱۹ در دسترس نمی باشد. لیکن اگر آزمایشگاه ها مایل به انجام آن در آینده باشند، لازم است نمونه های سرم دو نمونه اولی در فاز حاد و دیگری در فاز نقاهت (به فاصله ۲ تا ۳ هفته) از بیمار اخذ گردد و ترجیحا در شرایط منفی ۷۰ درجه سانتیگراد تا زمان در دسترس قرار گرفتن کیتها و انجام تست بر روی نمونه ها نگهداری گردد.

۲-**تعیین شدت بیماری در فازهای مختلف**: برای تعیین این ارتباط، یکی از بهترین روشها تعیین میزان کمی و یا لود ویروس (Viral load) در ارتباط با شدت بیماری میباشد. لیکن در حال حاضر کیتهای مولکولی کمی در بازار موجود می باشد. لیکن با استفاده از CT نتایج تست های Real Time PCR رایج در کشور می توان به صورت Semi-quantitative از پرونده بیمار استخراج نموده و با استفاده از این روش بصورت استاندارد شده در هر مرکز بعنوان روش جایگزین (اگر چه نه چندان دقیق) استفاده نمود (مشروط به اینکه در یک آزمایشگاه، یک روش و یک کیت یکسان کار انجام شده باشد). درکشور های غربی در مورد ارتباط

بین شدت علائم بیماری و کینتیک ویروس های تنفسی (مانند آنفولانزا،RSV، متوپنوموویوس و پاراآنفولانزا) از این روش استفاده میگردد.

۳- **مدت زمان ریزش ویروس(Shedding) در ارتباط با علائم بالینی**: طبق گزارشات واصله در قالب مقالات مربوط به COVID.۲۰۱۹ علائم بالینی بعضا در غیاب ویروس وجود داشته و یا بالعکس بعد از بهبودی بیمار ، پاسخ تست کرونا کماکان مثبت بوده است. پیشنهاد می گردد این موارد از بیماران در طرح های تحقیقاتی مورد بررسی قرار گیرد.

۴- **تعیین توالی**: موارد فراوانی از نمونه های COVID.۲۰۱۹ نیاز به انجام تعیین توالی به روش Sanger دارند. موارد استفاده از آن عبارت است از: انجام اپیدمیولوژی مولکولار ، بررسی وقوع موتاسیون در بیماران به نحوی که نشان دهنده ی کنتیک ویروس - میزبان باشد و غیره. بهترین نقطه ژنوم برای بررسی عبارتند از ژن های S (واکنش بین پروتئین S وگیرنده ی سلولی AEC۲)، انجام تحقیقات بر روی اپی توپهای ایمنی و غیره)، ژن ORF۱a (جهت احتراز از وقوع bias در آنالیز اطلاعاتی بدلیل احتمال بالای ریکا مبیناسیون، انجام تحقیقات در نقاط تعیین کننده تیپ ویروسی، نقاط اپی توپیک و سایر نقاط حفاظت شده میباشد.

توجه: به طور کلی، بدلیل روند بالای ریکامبیناسیون(Recombination) در این ویروس، انجام تحقیقات بر روی یک ژن توصیه نمی گردد. اگر چه آزمایشات مبتنی بر صرف یک ژن ارزش علمی خود را دارا می باشد.

لطفا برای حفظ، ذخیره، نگهداری و محل نمونه ها جهت مصارف تحقیقاتی،SOP شماره BSVII جمع آوری و ذخیره نمونه ها ی تحقیقاتی کرونا ویروس۲۰۱۹ جهت ارسال به آزمایشگاه های تحقیقاتی را ملاحظه فرمایید.

تهیه و تدوین:

شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران **مرکزتحقیقات ویروس شناسی بالینی**

شبکه تحقیقات بیماری‌های ویروسی ایران آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن:۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱	مرکزتحقیقات ویروس شناسی بالینی آدرس: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، ساختمان نفیسی، طبقه سوم، تلفن:۸۸۹۹۲۶۶۰-۰۲۱