

# آزمایش‌های سرولوژیک کووید-۱۹ از انکار تا واقعیت

● دکتر مهناز آل یاسین  
دکترای علوم آزمایشگاهی



● دکتر شهرز همتی  
دکترای علوم آزمایشگاهی، رییس انجمن دکترای علوم  
آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران  
[drhemmatilab@yahoo.com](mailto:drhemmatilab@yahoo.com)



مورد نیاز است. در حالی که PCR آزمایش استاندارد در بیماری حاد است، آزمایش‌های سرولوژیک با توجه به شیوع گسترده بیماری، جهت رفع نیازهای تشخیصی مورد توجه قرار گرفته و توسعه یافته‌اند. برخلاف آزمایش PCR که ویژگی بالایی دارد، واکنش متقاطع یک چالش بزرگ برای

## چکیده

در پاسخ به شیوع بیماری کووید-۱۹ (COVID-19)، ناشی از ویروس SARS-CoV-2، آزمایش‌های متعددی جهت تشخیص بیماری حاد، ردیابی تماس، تشخیص عفونت‌های بدون علامت و ارزیابی ایمنی جمعی

- 1- Coronavirus disease 2019
- 2- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2

آزمایش آنتی بادی COVID-19 است. با توجه به این که ۶ کرونا ویروس دیگر که انسان را آلوده می‌کنند نیز وجود دارد، توسعه روش‌های سرولوژیک با ویژگی بالا در شناسایی بیماران آلوده از اهمیت خاصی برخوردار خواهد بود.

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

با توجه به این که در سایر کشورهای جهان از آزمایش‌های سرولوژیک در ردیابی تماس، مطالعات سرواپیدمیولوژیک و برنامه ریزی و تعیین استراتژی‌های مختلف در کنترل بیماری کووید-۱۹ استفاده می‌کنند، متاسفانه اظهار نظرهای مختلفی در مورد استفاده و کیفیت آزمایش‌های سرولوژیک در فضای مجازی دیده شد که عمدتاً مبتنی بر اطلاعات اندک در ابتدای تولید کیت‌های سرولوژی و همزمانی آن با شیوع پایین بیماری بود.

در اینجا به مرور اجمالی استفاده از استراتژی‌های مختلف جهت افزایش حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی‌کنندگی مثبت در آزمایش‌های سرولوژیک پرداخته و تأثیر عوامل مختلف را بر روی آن‌ها مورد بررسی قرار می‌دهیم.

دانشمندان تعداد زیادی از سنجش‌های آنتی بادی را توسعه داده‌اند و اکنون بسیاری از این آزمایش‌ها به صورت تجاری در دسترس هستند. اگر چه هنوز هیچ یک از این سنجش‌ها به طور کامل تأیید نشده ولی، در حالی که FDA<sup>۴</sup> بر لزوم اعتبار سنجی بیشتر تأکید می‌کند، مجوز استفاده اضطراری (EUA)<sup>۵</sup> را برای برخی آزمایش‌ها صادر کرده است. چرا که استفاده گسترده از آزمایش‌های تأیید

نشده می‌تواند منجر به سیاست‌هایی شود که به جای این که همه گیری فعلی SARS-CoV-2 را کنترل کند، آن را تشدید نماید.

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

#### □ مقدمه

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

انجام آزمایش‌های سرولوژیک با کیت‌های تأیید شده، می‌تواند در شناسایی افرادی که ممکن است به درمان نیاز داشته یا برای پیشگیری از گسترش عفونت، باید خود را ایزوله نمایند، کمک کننده باشد. عدم تشخیص افراد مبتلا به کووید-۱۹ در صورت وجود ابتلا (نتیجه منفی کاذب)، ممکن است باعث به تعویق افتادن درمان شده و همچنین خطر گسترش بیشتر عفونت را به دیگران به همراه داشته باشد. شناسایی نادرست کووید-۱۹ در صورت عدم وجود بیماری (نتیجه مثبت کاذب) ممکن است منجر به انجام آزمایش بیشتر، درمان و جدا سازی غیر ضروری شخص بیمار شود. شناسایی صحیح افرادی که قبلاً کووید-۱۹

- 3- Polymerase Chain Reaction
- 4- Food and Drug Administration
- 5- Emergency Use Authorization



داشته‌اند، در اندازه‌گیری گسترش بیماری، ارزیابی موفقیت جداسازی و به‌طور بالقوه در شناسایی افراد ایمن اهمیت خاصی دارد.

مسئله مهم این است که با انتخاب یک روش با ویژگی بالا و همچنین با آزمایش جمعیت‌ها و افرادی که دارای احتمال بالایی مبنی بر آلودگی قبلی با SARS-CoV-2 (احتمال پیش‌آزمون بالا) دارند، نتایج آزمایش مثبت کاذب را به حداقل برسانیم. روش دیگر استفاده از الگوریتم متعامد<sup>۶</sup> است. بدین معنی که وقتی ارزش پیشگویی کننده مثبت یک آزمون واحد کم است از دو آزمایش مستقل برای افزایش ارزش پیش‌بینی کنندگی آزمایش استفاده نماییم.

### □ زمان مثبت شدن آزمایش‌های سرولوژیک

یکی از مواردی که موجب می‌شود آزمایش‌های سرولوژیک زیر سؤال قرار گیرند نتایج منفی آن در بیمارانی است که علائم بالینی یا رادیولوژی مثبت دارند. به نظر می‌رسد در بیشتر موارد این نتایج منفی کاذب به دلیل درخواست آزمایش در زمان نامناسب (عمدتاً کمتر از یک هفته از شروع بیماری) باشد.

مطالعات نشان می‌دهند که سروکانورژن بیماری کووید-۱۹ بسیار شبیه سایر عفونت‌های حاد و ویروسی است بدین معنی که با به حداکثر رسیدن غلظت IgM غلظت IgG شروع به افزایش می‌کند. با این حال مطالعات نشان دادند که افزایش تیتراژ IgG و IgM نسبت به سایر ویروس‌های تنفسی کندتر بوده که احتمالاً بیانگر پاتولوژی نسبتاً هتروژن این ویروس است. مورد دیگری که در برخی مقالات به آن استناد شده این است که سروکانورژن در بیماران کووید-۱۹ ممکن است به صورت سروکانورژن معمول (تولید IgM و سپس IgG) سروکانورژن همزمان (تولید همزمان IgG و IgM) و سروکانورژن معکوس (تولید IgG و سپس IgM) باشد و این موضوع می‌تواند تفسیر آزمایش‌های سرولوژیک را پیچیده نماید. از طرفی در ۲-۳ درصد بیماران ممکن است پاسخ ایمنی ایجاد نشود (non responder) و یا دیر ایجاد شود (late responder)

که باید مورد توجه همکاران گرامی قرار گیرد. زمان درخواست و انجام آزمایش‌های سرولوژیک بسیار مهم بوده و اگر از آن‌ها در زمان مناسب استفاده نشود جواب‌های قابل قبولی حاصل نمی‌گردد. در صورت امکان به خصوص در شرایطی که افراد علائم بالینی کمتری را نشان می‌دهند باید تجزیه و تحلیل داده‌ها ادامه یافته و بیماران را در مدت زمان طولانی‌تری مورد بررسی قرار داد.

در یک مطالعه کوهورت نتایج تجمیع شده با استفاده از نمونه ۸۵۲۶ بیمار مبتلا به بیماری کووید-۱۹ و استفاده از روش‌های سرولوژیک کمی لومینسانس، الیزا و روش جریان جانبی (LFIA) برای اندازه‌گیری IgG، IgM، IgA، آنتی‌بادی‌های توتال و IgG/IgM نشان داد که همگی طی هفته اول شروع علائم بیماری، حساسیت پائینی دارند (همگی کمتر از ۳۰٪)، در هفته دوم حساسیت آزمایش‌ها افزایش یافته و در هفته سوم به بالاترین مقدار خود می‌رسند.

حساسیت ترکیبی IgG/IgM به ترتیب در:

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

**هفته دوم:** ۸ تا ۱۴ روز بعد از شروع علائم معادل ۷۲/۲٪ (۶۳/۵ تا ۷۹/۵ با محدوده اطمینان ۹۵٪)

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

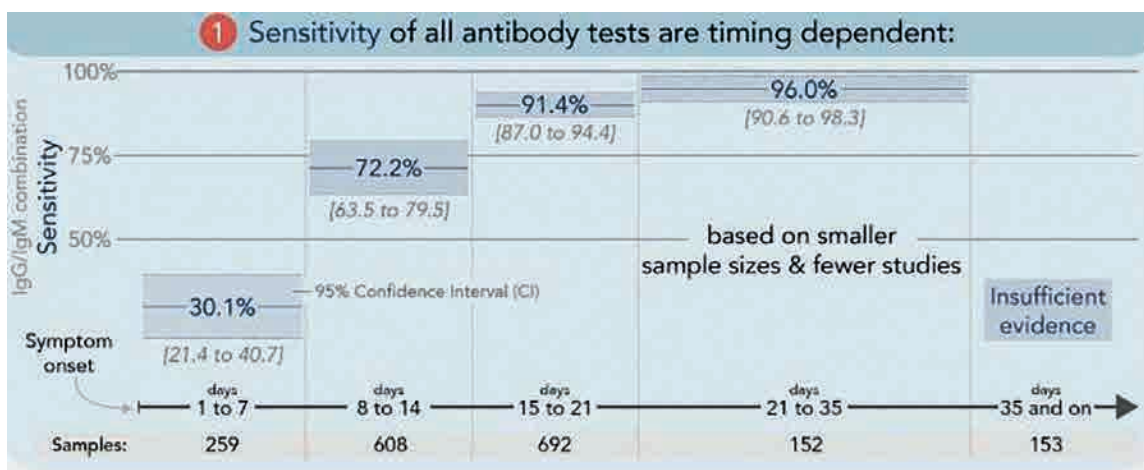
برآورد برای بیش از سه هفته، براساس حجم کمتری از نمونه و مطالعات بنا شده بودند.

**هفته‌های چهارم و پنجم:** برای روزهای ۲۱ تا ۳۵، حساسیت‌های ترکیبی IgG/IgM معادل ۹۶/۰٪ (۹۰/۶ تا ۹۸/۳ با محدوده اطمینان ۹۵٪) بودند.

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

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

### 6- Orthogonal algorithm



### انواع روش‌های تشخیص آنتی بادی

اساس آزمایش سرولوژی COVID-19 بر پایه اتصال آنتی بادی‌ها به آنتی ژن‌های اختصاصی SARS-CoV-2 می‌باشد. اساس روش‌های مختلف سرولوژی کووید-۱۹ شامل سنجش‌های جریان جانبی<sup>۷</sup>، الایزا<sup>۸</sup> و کمی لومینسانس<sup>۹</sup> است. این سنجش‌ها در نحوه شناسایی اتصال آنتی بادی-آنتی ژن و نوع آنتی ژن به کار رفته با هم متفاوتند. اگر بیمار در برابر SARS-CoV-2 آنتی بادی‌هایی ایجاد کرده باشد، آنتی بادی‌های مربوطه آنتی ژن‌ها را تشخیص داده و به آن متصل می‌شوند و این نشانه قرار گرفتن در معرض SARS-CoV-2 است.

### نوع آنتی ژن به کار رفته و روش انجام آزمایش

تفسیر دقیق آزمایش‌های سرولوژی به ویژگی آنتی ژن آن بستگی دارد. آنتی ژن‌ها می‌توانند پروتئین، پلی ساکارید یا لیپید باشند، اما اگر ویژگی بالایی برای عامل عفونت‌زا نداشته باشند، احتمال واکنش متقاطع افزایش یافته و اطمینان از نتایج به دست آمده کاهش می‌یابد.

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

- با اندازه گیری همزمان آنتی بادی‌های N-IgM, N-IgG, S-IgG, S-IgM می‌توان تا ۷۵ درصد عفونت را در هفته اول تشخیص داد.

- اندازه گیری همزمان N-IgM + N-IgG یا N-IgG + S-IgG می‌تواند تا ۹۴٪ درصد عفونت را در هفته دوم تشخیص دهد.

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

7- Lateral flow Immunochromatographic assay(LFIA)

8- Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

9- Chemiluminescence Immuno Assay(CIA)



آنتی ژن مورد استفاده در روش‌های ایزا واکنش متقاطع و ویژگی آن را تعیین می‌کند. آنتی ژن N در بین کرونا ویروس‌ها بیشتر از (S)، و در آنتی ژن‌های اسپایک، RBD بیشتر از S1 یا S کامل (S1, S2) محافظت می‌شوند. منطقه RBD نسبت به سایر دامنه‌های پروتئین اسپایک بین کرونا ویروس‌ها کمتر حفاظت شده و دارای ویژگی بالایی است. بنابراین می‌تواند به عنوان هدف اصلی برای آنتی بادی‌های ضد SARS-CoV-2 به کار رود. مشخص شده است که آنتی بادی‌های ضد اسپایک می‌توانند اتصال پروتئین S به گیرنده سلولی hACE2 که واسطه اتصال SARS-CoV-2 و ورود به سلول‌های هدف است را مسدود کنند. هیچ مدرکی مبنی بر این که آنتی بادی‌های ضد نوکلئوکپسید بتوانند مانع ورود ویروس به سلول‌های بدن شوند، وجود ندارد. پروتئین N به دلیل قدرت ایمنی‌زایی بالای آن و تجمع داخل سلولی قبل از بسته بندی ویروس، کاندید مناسبی برای تشخیص زود هنگام عفونت است.

نگرانی عمده در شناسایی آنتی بادی به هنگام استفاده از RBD به جای اسپایک با طول کامل (S1, S2)، کاهش احتمالی حساسیت سنجش است. با این حال، در یک تحقیق مشاهده شد که بیش از ۹۵٪ از بیماران مبتلا به SARS-CoV-2، ۹ روز پس از شروع علائم آنتی بادی ضد RBD را تولید نموده‌اند. سرم بیماران درگیر با SARS-CoV-2 آنتی بادی‌هایی دارند که با دامنه اتصال گیرنده SARS-CoV-1<sup>۱۳</sup> واکنش متقابل نشان می‌دهد. از آنجا که شیوع SARS-CoV-1 و MERS-CoV در حال حاضر در انسان بسیار کم است، واکنش متقاطع آنتی بادی SARS-CoV-2 با SARS-CoV-1 بعید است که چالش‌های تشخیصی ایجاد کند. همچنین نشان داده شده که یک رابطه مشخص بین سطح آنتی بادی‌های

آنتی‌ژن‌های ویروسی زیر برای تشخیص آنتی بادی‌های SARS-CoV-2 مورد استفاده قرار می‌گیرد.

دو آنتی ژن مهم ویروس SARS-CoV-2 که علیه آن‌ها آنتی بادی‌ها تولید می‌شود، گلیکوپروتئین اسپایک (S) و فسفوپروتئین نوکلئوکپسید (N) هستند. در حالی که پروتئین S برای ورود ویروس به سلول میزبان ضروری است و در سطح ویروسی وجود دارد، پروتئین N یک پروتئین ایمنی زای بسیار قوی است که با RNA ویروسی همراه می‌باشد. اشکال متعدد پروتئین S مانند S کامل (S1+S2)، زیر واحد S1 یا دامنه اتصال گیرنده (RBD) به عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار می‌گیرند. زیر واحد S2، که شامل مناطق حفاظت شده بین کرونا ویروس‌هاست، ویژگی کمتری از RBD دارد.

**پروتئین نوکلئوکپسید (پروتئین N):**<sup>۱۰</sup> پروتئینی است که به RNA متصل شده و نقش ساختاری و غیر ساختاری را در عفونت SARS-CoV-2 ایفا می‌کند. داده‌ها حاکی از آن است که این آنتی ژن نقش مهمی در پاتوژن بیماری دارد.

**پروتئین اسپایک (پروتئین‌های S):**<sup>۱۱</sup> پروتئین‌های سطحی قارچ مانند منحصراً به فردی هستند که به سلول‌های میزبان متصل شده و ورود ویروس را تسهیل می‌کنند. هر مونومر پروتئین S حاوی دو زیر واحد S1 و S2 است که به ترتیب اتصال و همجوشی غشایی را تسهیل می‌کنند. زیر واحدهای S1 و S2 ممکن است به صورت جداگانه یا به صورت کامل به عنوان آنتی ژن برای آزمایش سرولوژیک استفاده شوند.

**دامنه اتصال گیرنده یا RBD:**<sup>۱۲</sup> بخشی از پروتئین S1 است که به آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۲ (ACE2)، که گیرنده SARS-CoV-2 است متصل می‌شود.

- 10- Nucleocapsid proteins
- 11- Spike proteins
- 12- Receptor Binding Domain
- 13- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-1

## □ واکنش متقاطع

با افزایش شیوع بیماری کووید-۱۹ و به دنبال آن تولید واکسن، نیاز به آزمایش‌های سرولوژی یا آنتی بادی بیشتر از پیش احساس می‌شود. آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و شرکت‌های مختلف در جهان برای تولید آزمایش‌هایی که می‌توانند عفونت COVID-19 را با ویژگی و حساسیت کافی تشخیص دهند، با هم در حال رقابت هستند. علاوه بر SARS-CoV-2، شش ویروس دیگر (OC43، 229E، MERS-CoV، SARS-CoV، NL63، HKU1) وجود دارد که انسان را آلوده می‌کنند. هنگامی که هدف ما طراحی یک روش با ویژگی بالا باشد این‌ها چالش جدی محسوب می‌شوند. اگر چه احتمال واکنش متقاطع آنتی‌بادی در بین ویروس‌های کروناوی انسانی (hCoV)<sup>۱۵</sup> وجود دارد، SARS-CoV-1 بالاترین شانس واکنش متقاطع را با SARS-CoV-2 را به دلیل روابط نزدیک فیلوژنتیک و هویت بالای توالی ژنوم و پروتئین دارد.

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

SARS-CoV-1 و SARS-CoV-2 در حدود ۹۰٪ هومولوژی اسید آمینه را برای پروتئین‌های N مربوطه و ۷۷٪ پروتئین‌های S دارند. SARS-CoV-2 و MERS-CoV<sup>۱۷</sup> ۴۹٪ هومولوژی اسید آمینه را برای پروتئین N و ۳۳٪ را برای پروتئین S دارند. این داده‌ها ارزش استفاده از آنتی ژن‌های پروتئین S را برای افزایش ویژگی تست‌های سرولوژی برجسته می‌کند.

پروتئین S کرونا ویروس یک پروتئین بزرگ است که توسط پروتئاز میزبان به دو زیر واحد تجزیه می‌شود،

RBD در بیماران و توانایی سرم بیمار جهت خنثی سازی ویروس SARS-CoV-2 وجود دارد. بنابراین یک روش ایزای ساده مبتنی بر RBD می‌تواند ابزاری مفید برای شناسایی اهدا کنندگان پلاسما خون باشد.

روش ایزای غیر مستقیم (Indirect ELISA): روش ایزای غیر مستقیم دارای حساسیت بالایی برای شناسایی آنتی بادی در سرم بیمار است. در این روش آنتی ژن اختصاصی N یا S در کف چاهک ایزا متصل شده سپس سرم حاوی آنتی بادی به آن اضافه شده و بر اساس این که چه ایزو تایپی را بخواهیم اندازه گیری نماییم از آنتی هیومن ایمونوگلوبولین نشاندار شده با HRP<sup>۱۴</sup> استفاده می‌کنیم. یکی از معایب این روش امکان واکنش متقاطع با آنتی ژن ثابت شده در کف چاهک ایزا است که موجب افزایش سیگنال زمینه می‌گردد.

روش ایزای کپچر (Capture ELISA): استفاده از این روش موجب افزایش ویژگی سنجش می‌گردد. در این روش از یک آنتی ژن نشاندار مانند (HRP-RBD) استفاده می‌شود. چاهک ELISA با آنتی بادی‌های ضد hIgG یا ضد hIgM اختصاصی به ایزوتایپ انسانی از قبل پوشانده شده است. پس از افزودن سرم انسانی و شستشو، HRP-RBD اضافه شد و پس از آن شستشو و محلول رنگزا اضافه می‌گردد. نتایج نشان داده که این روش نسبت به ایزای غیر مستقیم حساسیت و ویژگی بیشتری (ویژگی ۱۰۰٪ و حساسیت ۹۶٪) در بیماران PCR مثبت دارد.

این آزمایش را به راحتی می‌توان با همان قالب برای شناسایی سایر ایزوتایپ‌ها (IgA، IgE، IgD) یا ساب تایپ‌ها (IgG1-4) با اندکی تغییر سازگار کرد. آنتی‌ژن HRP-RBD در دسترس بوده و پروتکل عملیاتی کلی آن نیز وجود دارد. در این روش به جای استفاده از HRP-RBD می‌توان از پروتئین X با HRP (HRP-X)، که در آن X می‌تواند پروتئین یا آنتی‌ژن‌های دیگری از SARS-CoV-2 باشد، برای شناسایی آنتی بادی استفاده نمود.

14- Horseradish Peroxidase

15- Human coronaviruses

16- Common Coronaviruses

17- Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus



زیر واحد S1 در ناحیه N ترمینال (اسید آمینه ۱ تا ۶۸۵) مسئول اتصال به گیرنده و زیر واحد S2 در ناحیه C- ترمینال که مسئول همجوشی غشایی است. دامنه اتصال گیرنده (RBD) در منطقه C ترمینال زیر واحد S1 (اسیدهای آمینه ۳۱۹ تا ۵۹۱) واقع شده است، نشان داده شده است که RBD نوترکیب به تنهایی برای اتصال به گیرنده سلولی (ACE2) کافی است.

در یک مطالعه عملکرد پروتئین‌های S1، N و RBD از SARS-CoV-2 و SARS-CoV در چهار روش مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد که پروتئین RBD بهترین ویژگی (specificity) را در این روش‌ها داشته‌اند، در حالی که پروتئین N هر دو ویروس به دلیل سطح بسیار بالای واکنش متقاطع برای تشخیص آنتی‌بادی‌های ویروسی مناسب تشخیص داده نشدند. همین‌طور در این مطالعه مشخص شد که الیازی کچر می‌تواند ویژگی آزمایش را بیشتر نموده و بهبود بخشد. همچنین این سنجش را می‌توان به راحتی برای مطالعه ایزوتایپ‌ها (IgA, IgE, IgG) و ساب‌تایپ‌های ایمونوگلوبولین‌ها (IgG1-IgG4) جهت نیازهای تحقیقاتی سازگار کرد.

از سوی دیگر به وجود یک سنجش حساس نیاز است تا از عدم شناسایی افراد مبتلا به عفونت‌های خفیف در مطالعات اپیدمیولوژیک جلوگیری شود. به همین منظور لازم است در مطالعات سرولوژیک جهت شناسایی آنتی‌بادی‌ها از دو آنتی‌ژن مختلف برای تأیید یافته‌ها و جلوگیری از منفی‌های کاذب استفاده شود.

## □ حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی کننده تست‌های سرولوژیک

همان‌طور که قبلاً گفته شد تعیین حساسیت و ویژگی آزمایش‌های سرولوژیک به هدفی که از انجام آن متصور است، بستگی دارد و بایستی قبل از اجرای آن در نظر گرفته شود. برای ارزیابی بیماران علامت دار و تشخیص آن‌ها حساسیت بالایی لازم است (به‌طور کلی بیشتر از ۹۰

درصد) در این حالت کاهش جزئی در ویژگی و وجود برخی نتایج مثبت کاذب ممکن است قابل تحمل باشد مشروط بر این که نتیجه سایر اقدامات تشخیصی و ارزیابی‌های آزمایشگاهی در نظر گرفته شود زیرا وجود نتایج مثبت کاذب ممکن است به مداخلات، آزمایش‌ها و درمان‌های غیر ضروری و حتی قرنطینه فرد منجر گردد. با این حال اگر آزمایش‌ها برای حذف محدودیت‌های اجتماعی و بازگشت به فعالیت‌های عادی به کار گرفته شود بایستی ویژگی بالایی داشته باشد، زیرا نتایج مثبت کاذب افراد غیر ایمن را ممکن است به خطر اندازد. بنابراین موارد فوق باید با توجه به میزان شیوع بیماری تعیین شوند.

محققان از این موضوع نگرانند که ممکن است حساسیت و ویژگی آزمایش سرولوژیک در هنگام استفاده از آن‌ها در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک کمتر از مقدار ادعا شده باشد، زیرا این آزمایش‌ها بیشتر در بیماران بستری ارزیابی شده و معلوم نیست که آیا آن‌ها می‌توانند سطوح پایین آنتی‌بادی را در سرم بیماران خفیف و بدون علامت تشخیص دهند یا خیر؟

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

خصوصیات عملکردی آزمایش‌های سرولوژی (حساسیت و ویژگی) با استفاده از مجموعه مشخصی از نمونه‌های منفی و مثبت تعیین می‌شود. علاوه بر این، ارزش پیشگویی کنندگی آزمون نیز باید در نظر گرفته شود زیرا مقادیر آن بر نتایج کلی آزمایش تأثیر می‌گذارد. ارزش پیشگویی کننده مثبت (PPV)<sup>۱۸</sup> بدین معنی است که بیمار با نتیجه آزمایش مثبت، آنتی‌بادی داشته باشند. ارزش پیشگویی کننده منفی (NPV)<sup>۱۹</sup> این احتمال را نشان می‌

18- Positive Predictive Value

19- Negative Predictive Value

دهد که افراد با نتیجه آزمایش منفی واقعاً آنتی بادی منفی باشند. مقادیر پیشگویی کننده مثبت و منفی با درصد واقعی افراد آنتی بادی مثبت در جمعیت مورد آزمایش (شیوع، احتمال پیش آزمون) و حساسیت و ویژگی آزمایش تعیین می شود. مثلاً در یک جامعه با شیوع بالای بیماری، ارزش پیشگویی کننده مثبت افزایش می یابد - بدین معنی که احتمالاً افرادی که آزمایش مثبت آنتی بادی دارند، واقعاً آنتی بادی مثبت هستند - از این رو وقتی از یک آزمایش در جمعیتی استفاده می شود که شیوع بیماری در آنجا پایین است، ارزش پیشگویی کننده مثبت کاهش می یابد زیرا نتایج مثبت کاذب بیشتر است چون احتمال پیش از آزمون کم است. به همین ترتیب، ارزش پیشگویی منفی نیز تحت تأثیر شیوع قرار دارد. در یک محیط شیوع بالا، ارزش پیشگویی کننده منفی کاهش می یابد در حالی که در یک محیط با شیوع پایین، افزایش می یابد. در بیشتر کشورها شیوع آنتی بادی SARS-CoV-2 از ۰.۵٪ تا ۲۵٪ متغیر است، به طوری که آزمایش در این مرحله ممکن است منجر به نتایج نادرست شود یعنی نتایج مثبت کاذب بیشتر و نتایج منفی کاذب کمتر است.

در همه گیری فعلی، به حداکثر رساندن ویژگی و در نتیجه ارزش پیشگویی کننده مثبت در یک بررسی سرولوژیک ارجح است، زیرا که شیوع آنتی بادی ها در برخی جوامع ممکن است پایین باشد. به عنوان مثال، در جمعیتی که شیوع بیماری در آن ۰.۵٪ است، آزمایشی با حساسیت ۹۰٪ و ویژگی ۹۵٪ ارزش پیشگویی کننده مثبت ۴۹٪ را به همراه خواهد داشت. به عبارت دیگر، کمتر از نیمی از آزمایش های مثبت واقعاً آنتی بادی دارند. از طرف دیگر، اگر همین آزمایش در یک جمعیت با شیوع بیماری بیشتر از ۵۰٪ انجام شود، ارزش پیش بینی کنندگی مثبت بیشتر از ۹۵٪ خواهد بود، بدین معنی که کمتر از ۰.۵٪ افراد (یک در هر ۲۰ نفر که آزمایش آنتی بادی مثبت دارند)، نتیجه آزمایش آن ها مثبت کاذب خواهد بود.

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

۱- انتخاب آزمایشی با ویژگی بسیار بالا، شاید

۹۹/۵٪ یا بیشتر، در جمعیت های آزمایش شده با شیوع ۰.۵٪ ارزش پیشگویی کننده مثبت بالایی خواهد داشت.

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

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

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

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

- استفاده از دو آزمایش مختلف مانند الیاز و کمی لومینسانس با آنتی ژن های یکسان یا متفاوت الگوریتم ها می توانند با حداکثر ویژگی در عین حفظ حداکثر حساسیت طراحی شوند. به عنوان مثال، در مورد بالا با شیوع جمعیت ۰.۵٪، اگر نمونه هایی مثبت در مرحله اول با روش متفاوت دوم که دارای ۹۰٪ حساسیت و ۹۵٪ ویژگی است آزمایش شوند، می توان ارزش پیشگویی کننده مثبت ۹۵٪ را به دست آورد. عملکرد الگوریتم متعادل به طور سیستماتیک مورد ارزیابی قرار نگرفته است اما می توان با استفاده از یک نرم افزار محاسباتی آن را تخمین زد. (جدول)

در همین راستا همکار محترم جناب آقای دکتر بیات نرم افزاری را طراحی نموده اند که همراه با توضیحات جهت استفاده همکاران در سایت انجمن دکترای علوم آزمایشگاهی قرار داده شده است.



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

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

SE: Sensitivity

SP: Specificity

PPV: Positive Predictive Value

۴- همچنین آزمایش نمونه‌های دوتایی روی سرم‌های گرفته شده از بیمار یکی همزمان با PCR اولیه و یکی ۲ هفته بعد می‌تواند دقت تشخیصی را افزایش دهد. به طور معمول، اکثر آنتی‌بادی‌ها علیه فراوان‌ترین پروتئین ویروس که نوکلئوکپسید ویروسی است، تولید می‌شوند. بنابراین، آزمایش‌هایی که آنتی‌بادی‌ها ضد NC را شناسایی می‌کنند، حساس‌تر هستند. با این حال، آنتی‌بادی‌های ضد RBD-S اختصاصیت بیشتری داشته و انتظار می‌رود خنثی کننده نیز باشند. بنابراین، استفاده از یک یا هر دو آنتی‌ژن برای تشخیص IgG و IgM منجر به حساسیت بالایی می‌شود.

### محدودیت‌های آزمایش سرولوژیک

در حال حاضر، ایمنی و مصونیت ناشی از عفونت SARS-CoV-2 به خوبی مشخص نشده است. افراد جامعه می‌خواهند بدانند آیا آزمایش‌های مثبت سرولوژیک نشان دهنده ایمنی و محافظت در برابر SARS-CoV-2 است یا خیر؟ این کار شامل ارزیابی سطح آنتی‌بادی‌های مورد نیاز جهت محافظت از ابتلا مجدد، مدت زمان آن و همچنین عوامل مرتبط با توسعه پاسخ آنتی‌بادی محافظت کننده است. کینتیک پاسخ آنتی‌بادی، طول عمر آنتی‌بادی‌ها، توانایی آنتی‌بادی‌ها در محافظت در برابر عفونت مجدد و ارتباط بین تیتراژ آنتی‌بادی با توانایی

خنثی‌کنندگی آن هنوز مشخص نشده است. اگر چه مطالعات مربوط به چالش حیوانات در کوتاه مدت از این موضوع حمایت می‌کند، اما نشان دادن ایمنی طولانی مدت در انسان نیاز به مطالعات بیشتری دارد. از این رو، حضور آنتی‌بادی‌ها با ایمنی فرد از عفونت SARS-CoV-2 نمی‌تواند یکسان در نظر گرفته شود.

### بحث و نتیجه‌گیری

هنگام مقابله با شیوع بیماری‌های عفونی مانند COVID-19، توسعه سریع سنجش‌های تشخیصی بخش مهمی از پاسخ سیستم‌های بهداشتی است. آزمایش‌های مولکولی، عمدتاً PCR، بسیار سریع‌تر توسعه می‌یابند، اما قادر به پاسخگویی به تمام نیازهای شیوع نیستند. سرولوژی می‌تواند با پاسخ آنتی‌بادی در مرحله اولیه عفونت، تشخیص مبتنی بر PCR را تکمیل کند، که به ویژه در مورد آنتی‌بادی‌های Igm صادق است.

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

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

به نظر می‌رسد با شیوع هر چه بیشتر بیماری کووید-۱۹ و از طرفی تولید واکسن در آینده روش‌های مولکولی قادر به پاسخگویی به نیازهای تشخیصی کشور نبوده و استفاده از روش‌های سرولوژیک جدید اجتناب‌ناپذیر است. در این حالت به نظر می‌رسد روش مناسب برای شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد SARS-CoV-2 روش الایزای کپچر با آنتی‌ژن N و S و یا هر دو باشد که می‌تواند ایزوتایپ‌ها و ساب‌تایپ‌های ایمونوگلوبولین‌ها را نیز شناسایی نماید.

همچنین با استفاده از بررسی‌های شیوع یابی، می‌توان در مورد کل افراد آلوده، از جمله عفونت‌هایی که احتمالاً شناسایی نشده‌اند، اطلاعات مناسبی کسب نمود و تخمینی از میزان جمعیتی که هنوز آلوده نشده‌اند به دست آورد. همچنین به متولیان بهداشت کمک می‌کند تا برای نیازها و مداخلات مراقبت‌های بهداشتی آینده، برنامه ریزی کنند و با تعیین ریسک بیماری در زمان‌ها و مکان‌های مختلف و بین جمعیت‌های مختلف، مداخلات لازم در تعیین وضعیت شهرها از نظر احتمال ابتلا به بیماری و روند آن و در نتیجه اتخاذ اقدامات کنترلی بیشتر یا کمتر، مانند فاصله‌گذاری اجتماعی را فراهم نماید. این ارزیابی‌ها همچنین می‌تواند چگونگی گسترش عفونت در طول زمان در بین جمعیت را پیش‌بینی نماید و با ارزیابی ایمنی جمعی (Herd Immunity)، تخمینی از میزان واکنش مورد نیاز و دارو را در اختیار تصمیم‌گیران نظام سلامت قرار دهد.

بررسی‌های شیوع می‌تواند عوامل خطر برای ابتلا به بیماری، مانند سن، محل زندگی یا شرایط بهداشتی فرد را ارزیابی نموده و مدت پایداری آنتی بادی در بدن افراد به دنبال عفونت را تعیین نماید. همچنین در شرایط کنونی که فشارها برای بازگشایی دوباره فعالیت‌ها و گردش اقتصاد در کشور در حال افزایش است می‌توان از آن به عنوان ابزار کمک تشخیصی و در کنار آزمایش‌های تشخیص مولکولی، در زمینه ایده «گذرنامه ایمنی» یا «گواهی ایمنی» برای شناسایی افرادی که قبلاً به ویروس مبتلا شده‌اند، استفاده نمود.

از طرف دیگر با توجه به توزیع جغرافیایی مناسب آزمایشگاه‌های خصوصی و دولتی در سطح کشور، هم‌اکنون امکان دسترسی به آزمایش‌های سرولوژی در اقصی نقاط کشور به صورت مناسبی وجود دارد و می‌توان با طراحی یک فرآیند تعریف شده و مشخص و استفاده از بستر الکترونیک سامانه‌های موجود در نظام سلامت و به صورت متمرکز، به نحو مناسبی و با کمترین هزینه به جمع‌آوری اطلاعات مورد نیاز پرداخت. از این نظر با توجه به طیف وسیع کاربردهای ارزیابی‌های سرولوژیک در مدیریت بیماری کرونا در کشور، استفاده از ظرفیت آزمایشگاه پزشکی خصوصی می‌تواند به عنوان یک راهبرد مؤثر، در این زمینه‌ها راهگشا باشد.

همچنین لازم است که مسئولین، سیاست‌گذاران و مسئولین در وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و سایر سازمان‌ها و نهادهای مربوطه با تشویق و راهنمایی شرکت‌های دانش‌بنیان و ارائه تسهیلات لازم به آن‌ها زمینه‌ساز حرکت به سمت توسعه روش‌های سرولوژیک با حساسیت و ویژگی بالا شده تا بتوان با افزایش کارایی این روش‌ها، به نحو موثرتری در شیوع یابی و بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص بیماران، استفاده نمود.

### □ ره یافت‌ها

۱- استفاده از آنتی ژن‌های اسپایک خصوصاً آنتی ژن RBD در آزمایش‌های سرولوژی موجب افزایش ویژگی و حساسیت آزمایش می‌گردد.

۲- روش الایزای کچپر با آنتی ژن‌های اسپایک (RBD, S2, S1) دارای حساسیت و ویژگی بالایی است.

۳- استفاده از آنتی ژن N موجب افزایش حساسیت روش و استفاده از آنتی ژن‌های S موجب افزایش ویژگی روش می‌گردد.

۴- استفاده ترکیبی از آنتی ژن‌های S و N به همراه ایمونوگلوبولین‌های IgM و IgG موجب افزایش حساسیت تشخیصی آزمایش‌های سرولوژیک در شناسایی بیماران در هفته اول پس از شروع علائم بیماری می‌گردد.

۵- استفاده از الگوریتم متعامد (ارتوگونال) موجب افزایش ارزش پیشگویی کننده مثبت آزمایش‌های سرولوژیک در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و تشخیصی می‌گردد.

۶- آنتی بادی‌های ضد آنتی ژن N چند ماه پس از بیماری در سرم شروع به کاهش نموده در صورتی که آنتی‌بادی‌های ضد آنتی ژن RBD همچنان در سرم بیمار قابل شناسایی هستند، بنابراین عدم شناسایی آنتی بادی‌های ضد N دلیلی بر نبود ایمنی و یا کاهش پاسخ ایمنی نیست و باید در این گونه موارد برای شناسایی آنتی بادی‌ها از روش‌هایی که در آن‌ها آنتی ژن‌های RBD به کار رفته است استفاده نمود.

۷- در هنگام درخواست آزمایش‌های سرولوژیک باید به حساسیت تشخیصی آزمایش‌های سرولوژیک در هفته‌های مختلف بیماری توجه نمود.



ویژگی بالا شده می‌تواند با افزایش کارایی این روش‌ها، در شیوع‌یابی و بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک و کمک به تشخیص بیماران، بهبود دهد.

۱۲- استفاده از ظرفیت آزمایشگاه‌های پزشکی بخش خصوصی می‌تواند به عنوان یک راهبرد مؤثر، در جمع‌آوری اطلاعات مورد نیاز در بررسی‌های سرواپیدمیولوژیک و مدیریت بیماری کرونا در کشور، راهگشا باشد.

### تشکر و قدردانی

در پایان لازم است از راهنمایی‌های همکاران ارجمند جناب آقای دکتر حمید رضا امیر مقدمی و سرکار خانم دکتر نرگس سلاجقه و جناب آقای دکتر غلامرضا حمزه‌لو تشکر و قدردانی نمایم.

۸- در حدود ۹۸٪ افراد بیمار قادر به تولید آنتی بادی بر علیه ویروس SARS-COV-2 هستند بنابراین در تفسیر مواردی که آزمایش‌های سروولوژیک منفی می‌شوند باید افراد Nonresponder و Late responder را نیز در نظر گرفت و در صورتی که هنوز شک بالینی به بیماری کووید-۱۹ وجود دارد باید از یک آزمایش دوم با ساختار متفاوت استفاده نمود.

۹- در اندازه‌گیری آنتی بادی‌های ضد SARS-COV-2 روش الیزای کپچر نسبت به الیزای غیر مستقیم واکنش مثبت کاذب کمتری دیده شده است.

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

۱۱- توسعه روش‌های سروولوژیک با حساسیت و

## References

- 1-Yu-Lin Lee. Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *Journal of Infection* · April 2020
- 2-F J IbarraNdo. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *NEJM*. July 21, 2020.
- 3-Ria Lassaunière, Anders Frische, Zitta B. Harboe, Alex C.Y. Nielsen, Anders Fomsgaard, Karen A. Krogfelt, Charlotte S. Jørgensen. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *medRxiv preprint doi: <https://doi.org/2020.04.09>*
- 4-Nuccetelli et al. SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown? *Cell Death Discovery* (2020)6:38 <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>
- 5-Interpreting a covid-19 test result. *BMJ* 2020; 369 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.m1808> (Published 12 May 2020).
- 6-COVID-19 Serology Testing Explained. [www.asm.org](http://www.asm.org). May 19, 2020
- 7-Brandi Freeman et al. Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and sero-surveillance. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.24.057323>
- 8-Fan Wu et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
- 9-Nandini Sethuraman, Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. <https://jamanetwork.com/on/07/04/2020>.
- 10-Lakshmanane Premkumar et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 5, eabc8413 (2020) 11 June 2020.
- 11-Baoqing Sun et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging*



*Microbes & Infections* 2020, VOL. 9 <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>

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

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

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

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

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

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

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

