



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN 2667-8381, 11 (2): 72-79, 2020
DOI: 10.38137/vetfarmatoksbulen.772452

COVID-19 İÇİN MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİNE GENEL BAKIŞ

Zeynep SEMEN^{1a}, Seda EKİCİ^{2b*}, Büşra MALAS^{3c}

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya A.D., İzmir

²Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara

³Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

ORCID^a: 0000-0002-7722-5772, ORCID^b: 0000-0002-7982-5261, ORCID^c: 0000-0002-2432-091X

*Sorumlu Yazar: Seda EKİCİ
E-Posta: seda.ergen@hotmail.com

Geliş Tarihi: 21.07.2020
Kabul Tarihi: 11.08.2020

ÖZET

Bu derleme, kısa bir süre içinde pandemiye sebep olan, yeni bir koronavirüs SARS-CoV-2'nin moleküler tanı yöntemleri ile ilgili bilgi vermek amacıyla hazırlanmıştır. Global olarak ciddi bir tahribata yol açan COVID-19 pandemisini önleyebilmek adına, hassas ve spesifik laboratuvar teşhis metodlarının geliştirilmesi, vakaların hızlı ve güvenilir şekilde tanımlanabilmesi için oldukça önemlidir. Diyagnostik testler COVID-19 pandemisinde önemli bir rol oynamıştır ve oynamaya devam edecektir. COVID-19 için şüphelenilen vaka tanısını karşılayan hastalardan hızla numune alınması ve test edilmesi klinik yönetim ve salgın kontrolü için bir önceliktir. Solunum sekresyonlarında SARS-CoV-2 saptama yeteneği, bireyin enfekte olma zamanını ve diğer kişilere bulaştırma potansiyelini belirlemek için gereklidir. Viral tespit, bireysel hastaların tanımlanması, pandemi yönetimi ve ayrıca virüsün bir topluluğa ne zaman bulaştığını ve ne kadar hızla yayıldığını belirlemek için kullanılır. Topluluklar, kapanma dönemlerinin ardından yeniden açılmaya çalıştıkça, hem SARS-CoV-2'nin hem de virüsü tanıyan spesifik antikorların saptanması, bireylerde ve topluluklarda enfeksiyon ve bağışıklığın değerlendirilmesi için bir araç olarak giderek daha önemli hale gelecektir. Bu amaçla, SARS-CoV-2 genomunu tespit etmeye yönelik nükleik asit amplifikasyon testleri ve serolojik testler kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Nükleik asit amplifikasyon testi, SARS-Cov-2, Serolojik analiz

OVERVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTIC METHODS FOR COVID-19

ABSTRACT

This review is prepared to give information about the molecular diagnosis methods of a new coronavirus SARS-CoV-2, which causes pandemic in a short time. In order to prevent the COVID-19 pandemic, which causes serious global destruction, the development of sensitive and specific laboratory diagnostic methods are crucial to identify cases quickly and reliably. Diagnostic tests have played an important role in the COVID-19 pandemic and will continue to play. Rapid sampling and testing of patients meeting the suspected case definition for COVID-19 is a priority for clinical management and outbreak control. The ability to detect SARS-CoV-2 in respiratory secretions is necessary to determine when an individual becomes infected and the potential for infecting other persons. Viral detection is used to identify individual patients, manage pandemics, as well as determine when and how quickly the virus is transmitted to a community. As communities seek to re-open after closure periods, the detection of both SARS-CoV-2 and specific antibodies that recognize the virus will become increasingly important as a tool for assessing infection and immunity in individuals and populations. For this purpose, nucleic acid amplification and serological tests are used to detect the SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, Nucleic acid amplification test, SARS-Cov-2, Serological analysis

GİRİŞ

Aralık 2019'un başlarında, Çin'in Hubei eyaleti Wuhan şehrinde kökenleri bilinmeyen ilk pnömoni vakaları tespit edildi (Hui ve ark., 2020). Kökeni bilinmeyen bu pnömoni vakalarının yeni bir koronavirüsten kaynaklandığı 7 Ocak'ta bir hastanın boğaz svab örneğinden yüksek verimli sekans kullanılarak keşfedildi ve etken Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından 11 Şubat 2020'de SARS-CoV-2, sebep olduğu hastalık da Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırıldı (Huang ve ark., 2020).

Tanımlanmış ilk COVID-19 vakalarının, epidemiyolojik olarak Wuhan'daki canlı hayvan ve deniz ürünleri pazarı ile ilişkili olduğu veya hastaların Wuhan geçmişi olduğu ya da COVID-19 pozitif pnömoni semptomu gösteren hasta ile teması doğrulandı (Chang ve ark., 2020; Lai ve ark., 2020). Tüm mevcut epidemiyolojik veriler ile SARS-CoV-2'nin hastane ve aile ortamlarında kişiden kişiye bulaştığı belirlendi (Chan ve ark., 2020). SARS-CoV-2'nin ölüm oranı yaklaşık %2 olarak seyretmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, 30 Ocak 2020 tarihinde SARS-CoV-2'yi "uluslararası endişe verici bir halk sağlığı acil durumu" olarak ilan etmiştir (WHO, 2020). Bu nedenle, şüphelenilen vakaları doğrulamak, hastaları taramak ve virüs gözetimi yapmak için bu enfeksiyona özgü teşhis metodlarına acilen ihtiyaç duyulmuştur. Erken aşamada, SARS-CoV-2, insan klinik örneklerinde yeni nesil sekanslama, hücre kültürü ve elektron mikroskopisi ile tespit edilmiş (Zhu ve ark., 2020) ve ardından, SARS-CoV-2'nin tam genom dizisi (29870-bp), GenBank'ta (katılım numarası MN908947) poli (A) kuyruğu hariç olmak üzere 10 Ocak 2020'de erişime açılmıştır.

Koronavirüsler, Coronaviridae familyasına ait, 65-125 nm çapında, 26 ila 32 kb uzunluğunda tek

iplikçikli RNA içeren viruslardır. Koronavirüs ailesinin alfa (α), beta (β), gama (γ) ve delta (δ) alt grupları vardır. Filogenetik analizler sonucunda SARS-CoV-2'nin β - koronaviruslar içinde yer aldığı bildirilmiştir. Filogenetik analizler, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV ile sırasıyla %79,5 ve %50 oranında sekans özdeşliğine sahip olduğunu göstermektedir (Wu ve ark., 2020).

Korona virusların protein repertuarı dört ana yapısal ve yaklaşık 16 yapısal olmayan proteinden oluşur. Dört yapısal protein arasında, Spike proteini (S-proteini), konakçı hücre zarının dış tabakasında bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörünün tanınması ve bağlanmasında rol oynar. Virus konakçı hücreye ACE2 reseptörleri vasıtasıyla girer. ACE2'nin insanlar ve hayvanlar dahil olmak üzere farklı hayvan türlerindeki amino asit dizileme çalışmaları, test edilen hayvan türleri arasında yüksek protein sekansı benzerliğini vurgulayarak viral partiküllerin daha geniş bir konakçı ile potansiyel etkileşimini ortaya koymuştur. ACE2, esas olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olan akciğer, kalp, böbrek ve bağırsakta eksprese edilen bir tip I membran proteindir (Donoghue ve ark., 2020; Jin ve ark., 2020).

SARS-CoV-2'nin insanlarda neden olduğu klinik semptomların genel olarak ateş (%88,7), öksürük (%67,8), yorgunluk (%38,1), balgam üretimi (%33,4), nefes darlığı (%18,6), boğaz ağrısı (%13,9) ve baş ağrısı (%13,6) olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, hastaların bir kısmında diyare (%3,8) ve kusma (%5,0) ile seyreden gastrointestinal semptomlar bulunmaktadır. Yaşlılar ve kronik hastalığı (hipertansiyon, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet, kardiyovasküler hastalık) olanlarda hızla akut solunum sıkıntısı sendromu, septik şok, metabolik asidoz ve pıhtılaşma fonksiyon bozukluğu gelişerek ölüme neden olabilmektedir.

Ayrıca asemptomatik kişiler herhangi bir belirti göstermeden virüsün saçılımında rol oynayabilirler (Guan ve ark., 2020; Huang ve ark., 2020).

SARS-CoV ve MERS-CoV'ün neden olduğu daha önceki salgınlarda gözlemlendiği üzere, COVID-19 için oldukça hassas ve spesifik laboratuvar teşhis metotlarının geliştirilmesi vakaların tanımlanması, temasların izlenmesi, hayvan kaynaklarının bulunması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin rasyonelleştirilmesi için önem arz etmektedir. COVID-19 tanı testleri, nükleik asit amplifikasyon testleri, serolojik testler ve yardımcı testler olarak gruplandırılabilir. Nükleik asit amplifikasyon testleri akut tanı için en yararlı laboratuvar tanı testi olarak kullanılmaktadır (Chan ve ark., 2020).

Güncel COVID-19 Moleküler Tanı Testleri

Moleküler tekniklerin gelişimi, patojenin proteomik ve genomik kompozisyonunun veya enfeksiyon sırasında ve sonrasında konakçıda gelişen protein/gen ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin anlaşılmasına bağlıdır. SARS-CoV-2'nin genomik ve proteomik bileşimleri 24 Mart 2020 itibarıyla tanımlanmış olmasına rağmen virüse karşı konakçı yanıtı halen araştırılmaktadır (Sheridan, 2020; Udugama ve ark., 2020; Wu ve ark., 2020).

SARS-CoV-2'nin ilk genom dizisi çoklu genomları dizilemek için tarafsız ve yüksek verimli bir yöntem olan metagenomik RNA dizilimi ile gerçekleştirilmiştir. Bulgular kamuya açıklanmış ve sekans, 10 Ocak 2020'de GenBank sekans deposuna eklenmiştir. Günümüze kadar dünya çapında, Tüm İnfluenza Verilerini Paylaşmaya Yönelik Küresel Girişim (GISAID) ve GenBank'ta araştırmacılar tarafından 1000'den fazla sekans kullanıma sunulmuştur (Miller ve ark., 2020; Udugama ve ark., 2020). Genom dizilimi araştırmacılar için PCR ve

diğer nükleik asit testlerinde kullanılmak üzere, primerler ve prob dizilerinin tasarlanması için oldukça önemlidir (Udugama ve ark., 2020).

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

Nükleik asit amplifikasyon testleri, COVID-19'u teşhis etmenin birincil yöntemidir (CDC, 2020). SARS-CoV-2 için yaygın olarak kullanılan iki nükleik asit algılama teknolojisi, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ve yüksek verimli sekanslamadır. Sekanslama teknolojisinin klinik tanıda uygulanması, ekipman bağımlılığı ve yüksek maliyeti nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle RT-qPCR, solunum sekresyonları ve kandaki patojenik virüsleri tespit etmek için en yaygın, etkili ve basit yöntem olarak kullanılmaktadır (Corman ve ark., 2020). SARS-CoV-2'yi genetik olarak tespit etmek üzere bir dizi ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kiti tasarlanmıştır. Şimdiye kadar hedeflenen viral genler arasında N, E, S ve RdRP genleri bulunmaktadır. RT-PCR, SARS-CoV-2 RNA'sının izolasyonu, ardından tamamlayıcı DNA (cDNA) ipliklerine ters transkripsiyonu ve son olarak ise cDNA'nın spesifik bölgelerinin amplifikasyonunu içerir. Tasarım süreci genellikle dizi hizalama ile primer tasarımı ve test optimizasyonu süreçlerini kapsar. Test, bir primerin SARS-CoV-2 dahil olmak üzere çok sayıda koronavirüsü evrensel olarak tespit ettiği ve ikinci bir primer setinin sadece SARS-CoV-2'yi tespit ettiği iki hedefli bir sistem olarak tasarlanabilir. Primerler ve probalar tasarlandıktan sonraki adım, test koşullarının (örn., reaktif koşulları, inkübasyon süreleri ve sıcaklıklar) optimize edilmesi ve ardından PCR işleminin gerçekleştirilmesini içerir (Udugama ve ark., 2020). RT-PCR, tek aşamalı veya iki aşamalı olarak gerçekleştirilebilir. Tek aşamalı bir testte, ters

transkripsiyon ve PCR amplifikasyonu tek reaksiyonda gerçekleştirilir. Bu test formatı, yüksek verimli analiz için hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayabilir, ancak optimizasyonu zordur. İki aşamalı testte ise, reaksiyonlar ayrı ayrı tüplerde sırayla yapılır. Bu test formatı, tek adımlı testten daha duyarlıdır, ancak daha fazla zaman alır ve kontaminasyon riski daha yüksektir (Wong ve Medrano, 2020). Pozitif kontrol olarak sentetik kontrol kullanılması test sonucunun güvenilirliği ve kontaminasyon riskinin önlenmesi açısından tavsiye edilmektedir (Wang ve ark., 2020; Winichakoon ve ark., 2020).

Türkiye’de nükleik asit tespitine yönelik test olarak, RdRp (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz) gen fragmanını hedefleyen, tek adımlı ters transkripsiyon (RT) ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) (RT-qPCR) analizleri uygulanmakta ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı tarafından yetkilendirilmiş merkezlerde gerçekleştirilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2020).

Nükleik asit amplifikasyon testinin güvenilirliğini etkileyen en önemli konulardan biri numune şeklidir. Bu amaçla nazofaringeal svaplar, orofaringeal svaplar, nazofaringeal yıkamalar ve nazal aspiratları içeren üst solunum numuneleri yaygın olarak tavsiye edilir. Balgam ve trakeal aspiratları içeren alt solunum yolu örnekleri ise aerosol üretimi riski nedeniyle önerilmemektedir (Interim Guidelines for Collecting, 2020).

Saptanabilir viral yük, hastalığın başlamasından sonraki günlere bağlıdır. Başlangıçtan sonraki ilk 14 gün içinde, SARS-CoV-2 balgamda en güvenilir şekilde tespit edilmiş ve bunu nasal svap örnekleri izlemiştir (Yang ve ark., 2020). Viral yüklerdeki değişkenlik göz önüne alındığında, solunum örneklerinden kaynaklanan

negatif bir test sonucu hastalığı dışlamaz. Bu negatif sonuçlar, uygun olmayan örnekleme tekniklerinden, örneklenen bölgedeki düşük viral yükten veya viral genomdaki mutasyonlardan kaynaklı olabilmektedir (Winichakoon ve ark., 2020). COVID-19’lu hastalarda, viral nükleik asit tespitine dayalı testler tarafından belirlenen pozitif test sonuçları şu şekilde bildirilmiştir: Bronkoalveoler lavaj (BAL) %93, bronkoskopi biyopsisi %46, balgam %72, nasal svap %63, faringeal svap %32, dışkı %29, kan %1 ve idrar %0 (Wang ve ark., 2020).

COVID-19 teşhisine yönelik en yaygın olarak kullanılan real time RT-PCR analizleri dışında, izotermal amplifikasyon, CRISPR, yeni nesil sekanslama (NGS), mikro NMR (μ NMR) analizleri de kullanılmaktadır. İzotermal amplifikasyon kullanan nükleik asit testleri tek bir sıcaklıkta gerçekleştirilir ve PCR'a benzer analitik hassasiyetler sağlamak için özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymaz (Craw ve Balachandran, 2020). Bu teknik içinde rekombinaz polimeraz amplifikasyonu, helikaza bağlı amplifikasyon ve döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) bulunur. Bazı laboratuvarlar SARS-CoV-2 için ters transkripsiyon LAMP (RT-LAMP) testleri geliştirmiş ve klinik olarak test etmiştir (Lamb ve ark., 2020; Yu ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020). RT-LAMP tekniğinde, hedef genomdaki altı farklı bölgeye bağlanmak için DNA polimeraz ve dört ila altı adet primer kullanır. LAMP fazla primer kullandığından oldukça spesifiktir. LAMP metodunun kullanımı basittir, algılama için görselleştirilmesi kolaydır, daha az arka plan sinyali vardır ve termal cykler gerektirmez. LAMP'ın dezavantajları ise primerleri ve reaksiyon koşullarını optimize etmenin zorluklarıdır (Notomi ve ark., 2020).

COVID-19'un teşhisi için yeni teknikler arayışı sürdürülse de hala en uygun standart yöntem real time RT-PCR tabanlı nükleik asit amplifikasyon testi ve sekanslama analizidir (WHO, 2020).

Serolojik testler (Protein testleri)

Koronavirüsler dört yapısal protein içerir: immünodominant reseptör bağlayıcı spike (S) proteini, nükleokapsid (N) proteini, zarf (E) proteini ve membran (M) proteini. SARS-CoV-2 proteinlerine karşı geliştirilen spesifik antikorların saptanması için kullanılan teşhis platformları arasında, yanal akış deneyleri (LFA), enzime bağlı immünosorban deneyleri (ELISA), nötralizasyon deneyleri ve kemilüminesan immüno deneyler gibi hızlı teşhis metodları (RDT) bulunur (Theel ve ark., 2020). Çeşitli serolojik testlerin performansı, SARS-CoV-2 için RT-PCR analizlerinden daha değişikdir (Lassaunière ve ark., 2020; Okba ve ark., 2020; Whitman ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu, periferik kanda tespit edilebilen doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini tetikler. Uyarlanabilir bağışıklık hücreleri arasında, B hücreleri ilgi çekicidir, çünkü bazıları SARS-CoV-2 antijenlerini tanıyan IgM veya IgG antikorları üretebilir (WHO, 2020). Bu bağlamda, pozitif titre, hastanın serum örneğindeki SARS-CoV-2'ye özgü antikorların saptanmasını ifade eder. Serokonversiyon (vücudun antikor geliştirme süreci) enfeksiyondan yaklaşık 1-2 hafta sonra ortaya çıkabilir. SARS-CoV-2'ye karşı gelişen IgM ve IgG yanıtı, semptomların başlamasından 3-6 gün sonra ortaya çıkabilir. Üç haftaya kadar, neredeyse tüm hastalar serokonverse olur ve antikorlar en az iki ay kalıcılığını sürdürür, IgG daha fazla kalıcılık gösterir, ancak her iki immünglobulin için net bağışıklık süresi henüz bilinmemektedir (Jin ve ark., 2020; Long ve ark.,

2020; Zhao ve ark., 2020). Serolojik testler SARS-CoV-2 epidemiyolojisini daha iyi anlamak ve potansiyel olarak gelecekteki hastalık riskini bildirmek için surveyans araçları olarak kullanılabilir (WHO, 2020). Diğer koronavirüslerden elde edilen kanıtlar, hastalık sonrası bağışıklığın 1 ila 2 yıl sürebileceğini göstermektedir; bununla birlikte, şu anda SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yanıt olarak gelişen bağışıklığın süresi ve doğası bilinmemektedir ve hastalıktan iyileşen COVID-19 antikor pozitif hastaların ikinci bir enfeksiyondan korunduğuna dair bir kanıt yoktur (Huang ve ark., 2020). Serolojik testler, hangi bireylerin bağışıklık kazandığını ve ne kadar sürdüğünü belirlemek için nükleik asit tespitine yönelik analizlerle paralel bir şekilde kullanılmalıdır. Sık ve geniş ölçekte yapılan serolojik testler, popülasyonun hangi kısmının COVID-19'a bağışık olabileceğini ve hangi bireylerin iş gücüne yeniden katılabileceğini belirlemeye yardımcı olmaktadır (Weissleder ve ark., 2020).

Serolojik testler konakçı yanıt proteinlerini değerlendirmek üzere afinite ligandlarına dayanır [konak immüno globulin G (IgG), IgM, interlökinler ve diğer konak bileşenleri]. Çoğu IgG / IgM serum testi, insan IgG / IgM için yakalama reaktifleri olarak *Escherichia coli* veya insan embriyonik böbrek (HEK) 293 hücrelerinden toplanan rekombinant viral proteinleri veya peptitleri kullanır. Antijen testleri ise SARS-CoV-2'nin nükleokapsid (N) veya spike (S) proteinlerini, LFA (yanal akış analizi) ve ELISA (enzime bağlı immünosorbent deneyi) testleri yoluyla araştırır. Bu testler nazofaringeal sürüntüler kullanılarak yapılabilir ve tamamlanması bir saatten az sürebilir (Weissleder ve ark., 2020). Whitman ve ark. (2020), anti-SARS-CoV-2 antikorlarını saptamak üzere 10 LFA ve 2 ELISA'yı

içeren bir karşılaştırma çalışması gerçekleştirmiştir. SARS-CoV-2 RT-PCR pozitif bireylerden alınan örnekler arasında seropozitiflik yüzdesi zaman aralığıyla artmış ve semptomların başlangıcından 20 gün sonra alınan numunelerde %81,8-100 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Zayıf LFA bantları negatif kabul edildiğinde özgüllük daha yüksek bulunmuş, ancak bu duyarlılığı azaltmıştır. Yalnızca IgM tespiti IgG'den daha değişken sonuçlar vermiş ve IgM ile IgG sonuçları birleştirildiğinde en güvenilir verim elde edilmiştir. ELISA ve LFA arasında %75,7-94,8 arasında uyuma tespit edilmiştir. Tutarlı bir çapraz reaktivite gözlenmemiştir.

Diğer testler

Lenfosit sayısı, nötrofil-lenfosit oranı, CRP, troponin T, D-dimer, LDH, prokalsitonin, IL-6 ve ferritin dahil olmak üzere çeşitli biyobelirteçler COVID-19'da hastalık teşhisinde tanımlayıcı markerlar olmasalarda, hastalığın ilerlemesi ve mortalitesini öngörmek açısından önemlidir. Bu laboratuvar testleri komplikasyon riski taşıyan hastaların tespit edilmesi ve tedavi müdahalelerine rehberlik etme konusunda hayati bir rol oynamaktadır (Henry ve ark., 2020, Herold ve ark., 2020).

SONUÇ

SARS-CoV-2'yi ve SARS-CoV-2'ye karşı gelişen spesifik antikor tepkilerini saptamak üzere geliştirilen laboratuvar testleri hem hasta bakımı hem de halk sağlığı kararlarında yol gösterici niteliktedir. Ancak, bu testlerin sınırlamaları olabilir ve her zaman epidemiyolojik ve klinik bilgilerle birlikte yorumlanmalıdır.

Serolojik testler yararlı bir şekilde epidemiyolojik bilgi verebilirken, nükleik asit amplifikasyon testleri hastalığın erken evrelerinde

dahi yüksek hassasiyette doğru sonuç verebilmekte ve bu nedenle tanı için referans standart olmaya devam etmektedir. Ancak, numune alım şekli, alım zamanı, testlerin çalışma koşulları ve standardize edilmemiş testler gibi nedenlerle hatalı negatif sonuçlar alınabilmektedir. Negatif bir sonuca güvenip güvenmeme kararı, hastanın klinik durumu ile her zaman desteklenmeli ve mümkünse seroloji testi ile tamamlanmalıdır. Güçlü bir klinik şüphe olması durumunda testin tekrarlanması yoluna gidilmelidir.

Sonuç olarak, teşhis, salgınlarla başa çıkmak için sağlık sisteminin en önemli parçalarından biridir ve sağlık çalışanlarının kaynakları COVID-19'lu hastalara yönlendirmelerini sağlar ve bulaşıcı patojenlerin yayılmasını engelleyebilir, mortaliteyi azaltabilir. Devam eden COVID-19 pandemisi, yukarıda tartışılan farklı tipte teşhis metodlarının kombinasyonlarını ve birlikte kullanımını gerektirmektedir. Gün geçtikçe, daha hassas ve spesifik kitler ticari olarak edinilebilmektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı başarılı olmak için, bu testlerin rutin olarak, geniş ve tekrarlanan bir şekilde uygulanması gerekmektedir. Ayrıca, uzun saflaştırma adımlarını basitleştiren ve çok daha kısa zaman aralıklarında sonuç verebilen test kitlerinin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- CDC (2020) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel; Division of Viral Diseases, U.S. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, 2020.
- Chan J. F., Yuan S., Kok K. H. (2020) A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* (London, England), 395(10223): 514-23.
- Chan J.F.W, Yip C.C.Y., To K.K.W, Tang T.H.C, Wongh S.C.Y., Leung K.H., Fung A.Y.F, Ng A.C.K, Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K.Y., Tam

- A.R., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang O.T.Y., Yuenb K.Y. (2020) Improved molecular diagnosis of 1 COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol*, 58 (5), e00310-20.
- Chang D, Lin M, Wei L, et al. (2020) Epidemiologic and Clinical Characteristics of Novel Coronavirus Infections Involving 13 Patients Outside Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1092-1093.
- Corman V. M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, *Euro Surveill*. 25(3), 2000045.
- Craw P., Balachandran W. (2012) Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Point-of-Care Diagnostics: A Critical Review. *Lab Chip*, 12, 2469.
- Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R. (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res*, 87, E1-E9.
- Guan W. J., Ni Z. Y., Hu Y., Liang W. H., Ou C. Q., He J. X. (2020) Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China; *N. Engl. J. Med*, 382(18), 1708-1720.
- Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. (2020) Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*, 58(7), 1021-1028.
- Herold T., Jurinovic V., Arnreich C. (2020) Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*, 146(1), 128-136.e.
- Huang A.T., Garcia-Carreras B., Hitchings M. D. T., Yang B., Katzelnick L., Rattigan S. M., Borgert B., Moreno C., Solomon B. D., Rodriguez-Barraquer I., Lessler J., Salje H., Burke D. S., Wesolowski A., Cummings D. A. T. (2020) A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: Antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.20065771>.
- Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 395(10223), 497-506.
- Interim Guidelines for Collecting (2020) Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19); Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- Jin Y., Wang M., Zuo Z. et al. (2020) Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis*, 94, 49-52.
- Jin Y., Yang H., Ji W., Wu W., Chen S., Zhang W., Duan G. (2020) Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*, 12, 372.
- Lai C. C., Shih T. P., Ko W. C., Tang H. J., Hsueh P. R. (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents*, 105924.
- Lamb L. E., Bartolone S. N., Ward E., Chancellor M. B. (2020) Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *MedRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.20025155>.
- Lassaunière R., Frische A., Harboe Z.B. et al. (2020) Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.04.09.20056325>.
- Long Q. X., Liu B. Z., Deng H.J. et al. (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*, 26, 845-848.
- Miller S., Chiu C., Rodino K. G., Miller M. B. (2020) Point-Counterpoint: Should We Be Performing Metagenomic Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis in the Clinical Laboratory *J. Clin. Microbiol*, 58(3), e01739-19.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K. (2000) Amino, N.; Hase, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28 (12), e63.
- Okba N. M. A., Müller M. A., Li W. (2020) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific antibody responses in coronavirus disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*, 26(7):1478-1488.
- Sheridan C. (2020) Coronavirus and the Race to Distribute Reliable Diagnostics. *Nat.*

- Biotechnol., DOI: 10.1038/d41587-020-00002-2.
- T.C. Sağlık Bakanlığı (2020). COVID-19 Rehberi. https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/rehberler/COVID-19_Rehberi.pdf
- Theel E. S., Slev P., Wheeler S., Couturier M. R., Wong S. J., Kadkhoda K (2020) The role of antibody testing for SARS-CoV-2: Is there one?. *J Clin Microbiol*, 58 (8), e00797-20.
- Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H. N., Malekjahani A., Osborne M., Li V. Y. C., Chen H., Mubareka S., Gubbay J. B., Chan W. C. W. (2020) Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano* 2020, 14, 3822–3835.
- Wang W., Xu Y., Gao R., Lu R., Han K., Wu G., Tan W. (2020) Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA*, 323, 1843–1844.
- Weissleder R., Lee H., Ko J., Pittet M. J. (2020) COVID-19 diagnostics in context, *Sci. Transl. Med.* 12 (546), eabc1931.
- Whitman J. D., Hiatt J., Mowery C. T. (2020) Test performance evaluation of SARS-CoV-2 serological assays. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.04.25.20074856>.
- WHO (2020) Clinical management of severe acute respiratory infection when Novel coronavirus (nCoV) infection is suspected: interim guidance. Jan 11.
- Winichakoon P., Chaiwarith R., Liwsrisakun C., Salee P., Goonaa A., Limsukon A., Kaewpoowat Q. (2020) Negative Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swab Does Not Rule Out COVID-19. *J. Clin. Microbiol*, 00297-20.
- Wong, M. L.; Medrano, J. F. (2020) Real-Time PCR for mRNA Quantitation. *BioTechniques*, 2005, 39 (1), 75–85.
- Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y. M., Wang W., Hu Y., Song Z. G., Tao Z. W., Tian J. H., Pei Y. Y. (2020) Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.01.24.919183>.
- Yang W., Dang X. et al. (2020) Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription RT-LAMP Method. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030130>.
- Yang Y., Yang M., Shen C., Wang F., Yuan J., Li J., Zhang M., Wang Z., Xing L., Wei J. (2020) Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of 2019-nCoV Infections. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>.
- Yu L., Wu S. et al. (2020) Rapid Colorimetric Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform: iLACO. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>.
- Zhang Y., Odiwuor N. et al. (2020) Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. *medRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028373>.
- Zhao R., Li M., Song H. (2020) Early detection of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients as a serologic marker of infection. *Clin Infect Dis*, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa523>.
- Zhu N, Zhang D, Wang W (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 382(8): 727-33.