



SARS-CoV-2'nin Hızlı Tespiti İçin Tasarlanan Biyosensörler

Tuğba Begüm Karakaş^{1*} , İlayda Demirdiř¹ 

ÖZET

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) dikkat çekici bir hızla yayılması sonucunda 2019 yılında dünya çapında "salgın" olarak nitelendirilmeye başlanmıştır. COVID-19 hastalarına yapılan testlerde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar, geniş bir popülasyona yapılan tespit testlerinin uzun süre alması ayrıca yüksek maliyeti ve sağlık personellerinin yaşadığı sıkıntılar göz önüne alındığında dünyanın daha hızlı hareket etmesi gerekmektedir. Bu yüzden COVID-19 virüsünü kontrol altına alabilmek için etkili, hızlı ve son derece hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların teşhisi ve izolasyon süreçlerinin başlamasıyla birçok şirket ve enstitü başta SARS-CoV-2'nin proteinleri olmak üzere antikorlar, antijenler üzerinde çalışarak virüsün hızlı tespitine yönelik testler geliştirmeye başlamıştır. Bu derlemede SARS-CoV-2 virüsünün yapısını, SARS-CoV-2 için yapılan tespit testleri, tespit testlerinde yaşanan problemleri ve SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti için tasarlanan biyosensörleri tartışmaktayız.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

23 Ocak 2021

Kabul

02 Nisan 2021

ANAHTAR KELİMELELER

SARS-CoV-2,
hızlı tespit,
biyosensör,
COVID-19,
bakım-noktası testi

Biosensors Designed for Rapid Detection of SARS-CoV-2

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) started to be described as "epidemic" worldwide in 2019 because of the remarkable rapid spread. Considering the false negative and false positive results in the tests performed on COVID-19 patients, the long duration of the detection tests performed on a large population beside the high cost and the difficulties experienced by the healthcare personnel, the world should move faster. Therefore, effective, fast, and highly sensitive methods are needed to control the COVID-19 virus. With the diagnosis and isolation processes of patients infected with SARS-CoV-2, many companies and institutes have started to develop tests for rapid detection of the virus by working on antibodies and antigens, especially proteins of SARS-CoV-2. In this review, we discuss the structure of the SARS-CoV-2 virus, detection tests for SARS-CoV-2, problems encountered in detection tests, and biosensors designed for rapid detection of SARS-CoV-2.

ARTICLE HISTORY

Received

23 January 2021

Accepted

02 April 2021

KEY WORDS

SARS-CoV-2,
rapid detection,
biosensor,
COVID-19,
point-of-care testing

Giriş

Aralık 2019'da şiddetli akut solunum sendromuna sebep olan korona virüsün (SARS-CoV-2) neden olduğu salgın Çin'in Wuhan kentinden rapor edilmiştir. Enfekte olan hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısından metagenomik RNA sekanslaması gerçekleştirilmiştir. Yeni tipte bir RNA virüsü olduğu tespit edilmiştir. Yapılan filogenetik ve genomik analizler sonucunda virüsün koronavirüs gibi SARS ile

¹ Başkent Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara / Turkey

*Corresponding Author: Tuğba Begüm Karakaş, e-mail: tugbabkarakas@gmail.com

yakın bir genetik benzerliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur [1]. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) yeni tespit edilebilen bu virüsü Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak isimlendirerek literatürde yerini almasını sağlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından SARS-Cov-2 Uluslararası Öneme Sahip Halk Sağlığı Acil Durumu (PHEIC) olarak ilan edip, dünyayı yeni tip koronavirüse karşı duyarlı olmaya çağırmıştır [1, 2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya çapında kaydedilen 127.877.462 vaka sayısı ve 2.796.561 ölüm sayısı kayda geçmiştir [3]. Virüs, kişiye solunum damlacıkları, aerosoller ve abiyotik yüzeyle temas yoluyla yayılabileceği gibi dışkıdan da bulaşma ihtimali olduğu bilinmektedir [4]. SARS-CoV-2'nin kişide enfeksiyona sebep olmadan önce 2–7 günlük bir inkübasyon süresi olduğu bilinmektedir ancak daha da önemlisi inkübasyon süresi boyunca görülen asemptomatik durumlar nedeniyle daha da bulaşıcı bir hal almasıdır. Asemptomatik olan kişilerin sağlıklı kişilere virüsü bulaştırma ihtimali bu nedenle artmaktadır. Yapılması gereken uygun izolasyon koşulları altında tedavilerin gerçekleştirilmesidir. Enfekte kişileri tarayıp, izole etmek ve hemen tedavi altına almak bu noktada kritik öneme sahiptir [4, 1]. SARS-CoV-2'nin tespitinde yaygın olarak kullanılan 3 temel strateji mevcuttur. Bunlar: Bilgisayar tomografisi taraması, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile ribonükleik asit (RNA) saptaması ve yanıl akış immünokromatografik şerit ya da enzim bağlı immünosorbent deneyi ile antikor saptanmasıdır [4]. En çok uygulanan yöntem RT-Qpcr'dır ancak bu yöntem de dahil olmak üzere sonuçları almanın oldukça uzun sürmesi (1-3 gün arası) ve yüksek yanlış negatif sonuç oranının fazla olması yeni yöntem arayışları getirmiştir. Ayrıca, örnek hazırlama ve saflaştırma ihtiyacı, yüksek maliyetli cihazlar ve cihazların bakımları, nitelikli personel gereksinimi ve düşük hassasiyet nedenleriyle tarama aşamasının hassas, doğru, hızlı ve düşük maliyetli olması noktasında yeni teşhis araçlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır [1, 2, 4]. Bu yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlar nedeniyle kitlesel nüfusu tarayıp, teşhis etmek bizlere kesin doğru sonuçlar vermemektedir. Bu derlemenin amacı viral solunum yolu enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan farklı biyosensör türlerinin incelenmesi, SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti için tasarlanmış olan yeni tip biyosensörlerin tasarımını ve biyosensörlerin kitlesel sorunu çözmedeki hızlı teşhis performans beklentilerini ve geleceğe yönelik perspektiflerini tartışmaktır [1, 2].

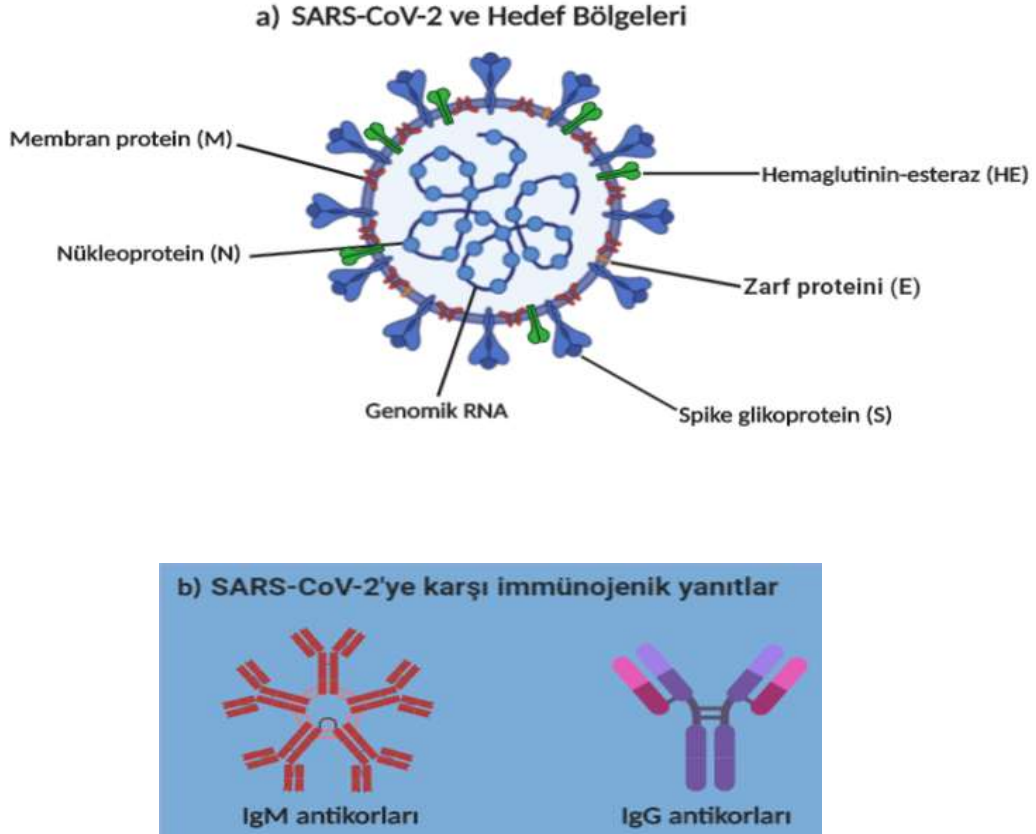
SARS-CoV-2'ye Genel Bakış

İlk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan virüs 2020 Ocak ayı başlarında SARS-CoV-2 (şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2) olarak adlandırılmıştır. Kontrol altına alınamayan virüs, tüm dünyaya yayılmıştır ve Mart 2020'de, COVID-19 olarak isimlendirilmiştir [5]. SARS-CoV-2, zarflı, pozitif ve tek sarmallı RNA (+ssRNA) virüslerindedir ve β -koronavirüs cinsine aittir [6]. SARS-CoV-2'nin de içerisinde bulunduğu CoV (Koronavirüsler)'in ortak özelliklerine bakıldığında insanların, kuşların ve diğer memelilerin solunum sistemlerini, gastrointestinal sistemlerini ve merkezi sinir sistemlerini enfekte edebilen zarflı, tek sarmallı pozitif RNA (+ssRNA) virüsleri olduğu bilinmektedir [7]. Bilinen birçok koronavirüs enfeksiyonu insanlarda sadece soğuk algınlığına neden olurken, SARS (şiddetli akut solunum sendromu) ile ilişkili koronavirüsler (SARS-CoV)'de yeni bir beta koronavirüs ajanı ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan yeni beta koronavirüs ajanı ise birçok önemli insan hastalıklarına sebep olabilmektedir [7]. Nidovirales takımında bulunan, *Coronaviridae* ailesinden gelen ve *Coronavirinae* alt ailesinde bulunan koronavirüsler, viral yüzey proteinlerini gömülü halde bulduran ve konakçı hücreden türetilmiş bir lipid membrana sahip zarflı virüslerdir [8]. Nidovirales takımında bulunan tüm koronavirüslerin genomları pozitif polariteye sahip tek sarmallı bir ribonükleik asit (RNA) biçimindedir. RNA'nın baz dizisi 5'→3' yönelimindedir ve sonraki haberci RNA (mRNA)'ya karşılık gelmektedir [9]. Corona virüs genomu, 26,4-31,7 kilobaz uzunluğuyla bilinen tüm RNA virüsleri arasındaki en büyük RNA genomudur [10]. Koronavirüs genomunun organizasyonu, 5'-lider-UTR-replikaz-S(Spike)-E(Zarf)-M(Membran)-N(Nükleokapsid)-3'UTR-poli(A) kuyruğunu içermektedir [11]. Viral RNA, RNA genomunu çevreleyen nükleokapsid (N) ve 3 zar proteinini; S-glikoprotein, Matris (M) protein, zarf protein (E)'yi kodlamaktadır [6].

Sarmal bir nükleokapsid oluşturmak amacıyla nükleokapsid protein, genom RNA'yı paketlemektedir. Nükleokapsid protein, lider sekans ve viral membranın iç yüzünde bulunan M proteinleri aracılığıyla genomik RNA'ya bağlanmaktadır. Nükleokapsid proteini aynı zamanda koronavirüste en çok bulunan proteindir. Nükleokapsid proteini fazlasıyla immünojenik bir fosfoproteindir ve bu protein koronavirüsün teşhis tahlillerinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır [12].

Koronavirüsler, diğer virüslerin aksine içerisinde RNA polimeraz enzimini içermezler çünkü koronavirüsler gibi pozitif polariteli, tek iplikli RNA (+ ssRNA) virüslerinde RNA, mRNA ya benzer bir aktivite göstermektedir. Böylece, viral genom doğrudan konak hücrenin ribozomları tarafından translasyona uğramaktadır. Zarf (E) proteini enfekte hücrelerde çekirdek çevresinde ve hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Membran (M) proteinleri iç tarafta bulunan nükleoproteinlere bağlanarak, çekirdek yapısını oluşturmaktadırlar [13]. Spike (S) protein, virüse antijenik özellik kazandırmaktadır. Spike (S) protein, membran proteinlerine bağlandığında, CoV'ların yüzeyindeki viral zarfta bulunan S-glikoprotein, insan hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere ve anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanabilmesini sağlamaktadır [14]. ACE2, insanların alt solunum yolunda bulunmaktadır ve hem insanlar arasındaki bulaşmayı hem de türler arasındaki bulaşmayı düzenlemektedir [15].

Spike protein konak hücre yüzeyinde bulunan sialik asite bağlandığında, virüs hemagglütinasyon yeteneğini kazanmış olmaktadır [11]. Hemagglutinin-esteraz (HE) proteini bazı β -CoV'ların yapısında bulunmaktadır. Bu protein sialik asitleri yüzey glikoproteinlerine bağlayabilmektedir. HE, protein aktivitelerini, S proteini aracılı hücre girişini ve mukozadan yayılan virüsleri arttırabilmektedir [16]. CoV'ların, sahip olduğu RdRp genetik bilginin kopyalanmasından sorumludur ve hata oranı fazlasıyla yüksektir. Bu nedenle de CoV'ler yüksek bir mutasyon oranına sahiptir [17]. Ayrıca, homolog rekombinasyonlar büyük çoğunlukla CoV'larda meydana gelmektedir [18]. Bu özellikleri nedeniyle virüsün evrimi ve yeni suşlarının oluşması sıklıkla gerçekleşmektedir. Bu nedenle, doğada büyük bir CoV çeşitliliği bulunmaktadır [18]. İnsanda koronavirüs enfeksiyonuna karşı oluşan IgM ve IgG antikorları humoral yanıtta, COVID-19 hastalığını tespit etmekte ve plazma tedavisinde kullanılmaktadır [19]. Şekil 1'de yukarıda kısaca bahsedilen SARS-CoV-2'nin hedef bölgeleri ve IgM, IgG antikorları gösterilmiştir.



Şekil 1 a) SARS-CoV-2 ve hedef bölgeleri b) IgM ve IgG antikorları (BioRender.com (2020), web sitesinden adapte edilmiştir.)

SARS-CoV-2 Tespit Testleri

Hastalardan başarıyla izole edilen SARS-CoV-2 virüsünün izole edilmesinden sonra genom dizileme tekniği kullanılarak virüsün genom dizisi tanımlanmıştır. Sonrasında ise, SARS-CoV-2'yi saptamak amacıyla pek çok yöntem ve kit geliştirilmiştir [20]. SARS-CoV-2'de tespit edilecek hedef bölgeye bağlı olarak, COVID-19 tanıl testleri ve COVID-19 taraması ile ilgili üç ana yaklaşım vardır [21]. İlki nükleik asit testleridir. Bu testler viral RNA'yı hedeflemektedir ve viral genomun nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler) olarak tanımlanmaktadır. Tespit için RT-PCR'ye dayalı bir amplifikasyon yöntemi kullanılmaktadır [21]. İkinci test antijen testleridir. Virüsün yapısal proteinlerinin tanımlanmasıyla viral bir antijenin varlığı tespit edilebilmektedir [21]. Üçüncü olarak serolojik test olarak bilinen antikor testleri bulunmaktadır. Antikor testleri, SARS-CoV-2'ye karşı üretilen antikorların varlığını tespit edebilen bir yöntemdir. En

çok kullanılan antikor testleri arasında enzime bağlı immünosorbent tahlilleri (ELISA), kemoluminesans tahlilleri (CLIA) ve yanak akış tahlilleri (LFA) bulunmaktadır [22].

Nükleik Asit Amplifikasyonuna Dayalı Yöntemler

Nükleik asit amplifikasyonu (NA) viral ajanların tespiti için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, MERS ve SARS-CoV gibi koronavirüslerin neden olduğu salgınların tespiti için kapsamlı şekilde tarama yapılabilmektedir [22]. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT), nükleik asitlerin özgül dizilerinin amplifikasyonun ve nükleik asitlerin saptanmasında kullanılan bir tekniktir. NAAT tekniği kullanılarak, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile aktif SARS-CoV-2 enfeksiyonları belirlenmektedir. RT-PCR tekniği genel hatlarıyla dört basamakta gerçekleşmektedir. Öncelikle sürüntü ile örnekler alınmaktadır. Viral RNA'nın saflaştırılmasından sonra revers transkriptaz enzimi yardımıyla tamamlayıcı DNA sentezi gerçekleştirilmektedir. Son olarak da tamamlayıcı DNA'nın sentezi ile gen ekspresyon analizleri yapılabilmektedir. Kısa bir süre önce literatüre geçen SARS-CoV-2 virüsü için yapılması tasarlanan RT-PCR testlerinin daha özgül olabilmesi için virüsün genom dizilemesinin, primerlerin ve problemlerin tasarımının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu boşluğu doldurabilmek için farklı primer/prob setlerini kullanan çeşitli RT-PCR testleri geliştirilmiştir. Bu doğrultuda tasarlanacak primer/prob testleri SARS-CoV-2 virüsünün farklı bölgelerini hedeflemelidir [23]. Washington Üniversitesi'nin çalışmasında, primer/prob setleri [23] virüsün E genini hedeflerken, N2 gen primer/prob setlerinin SARS-CoV-2 tespiti için daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu rapor edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından primer/prob setlerini kullanarak RT-PCR testlerini gerçekleştirilen klinikler, primer/prob seçimine bağlı olarak testin duyarlılığında önemli farklılık bulgularını bildirmişlerdir. Tespit ettikleri fark düşük viral yüke sahip numunede daha da belirgin düzeydedir. SARS-CoV-2'nin genetik sürüklenmeye uğramasından ve tespit sırasında koronavirüslerin diğer koronavirüs türleri ile çapraz reaksiyonundan kaçınmak için en az iki moleküler hedef seçerek RT-PCR yapılması önerilmektedir. Bununla beraber hedeflenecek olan bölgelerden birinin evrimsel süreçte korunmuş bir bölge olmasına dikkat çekilmektedir. RT-PCR tekniği her ne kadar kullanışlı bir metot gibi görünse de aslında dezavantajları bulunmaktadır. Öncelikle bu testi gerçekleştirebilmek için teknik anlamda eğitilmiş elemana ihtiyaç vardır [23]. Yapılan tespit testleri geniş bir popülasyona yapıldığı için oldukça maliyetlidir. Aynı zamanda

tespit için kullanılan PCR cihazları da maliyetlidir. RT-PCR, COVID-19'un kesin teşhisinde kullanılmasına rağmen, duyarlılığının göğüs BT incelemelerinden daha düşük bir orana sahip olduğu da bilinmektedir. Bu dezavantajlardan kaynaklı olarak RT-PCR'a alternatif olarak Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (DAİA) reaksiyonu olan başka bir moleküler yöntem gelecek vaat etmektedir. LAMP tekniği, izotermal amplifikasyonda, sabit sıcaklık altında gerçekleştirilebilen ve DNA'yı hızlı ve yüksek seçicilik ile çoğaltabilen bir tekniktir. Ayrıca, LAMP tekniği, özel ekipmana ve eğitimli kişilere ihtiyaç duymadan COVID-19 tespitini daha yüksek amplifikasyon verimliliği ve RT-PCR'e göre daha hızlı gerçekleştirdiğinden daha avantajlıdır [24].

Antijen Tespitine Dayalı Yöntem

COVID-19 pandemisinin yarattığı küresel sonuçlar göz önüne alındığında, daha hızlı ve ucuz tespit yöntemlerinin ihtiyacı doğmuştur. Geliştirilen antijen bazlı testler bir immünolojik test formunda olmakla beraber, virüsün S (spike) proteinini, HE proteinini (hemaglutinin glikoprotein), nükleokapsidini, zarf veya zar proteinlerini hedeflemektedir. Viral antijen özgül olarak antikora bağlandığında enzime bağlı immünosorbent tahlilleri (ELISA) veya immünofloresan boyama gibi geleneksel yaklaşımların yanı sıra optik, manyetik, elektrokimyasal ve yüzey plazmon rezonansına dayalı teknikler ile virüs tespiti gerçekleştirilmektedir [21]. RT-PCR tekniğine göre daha hızlı ve ucuz olmasının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Çok özgül bir test olmasına rağmen bu testi yapabilmek için oldukça eğitimli personele ihtiyaç vardır. Bu testin en büyük zorluklarından biri SARS-CoV-2 virüsünün, özgül proteinler için antikor eksikliği problemi ile karşı karşıya kalmasıdır [21, 24]. Viral yükün, COVID-19 hastalarında hastalığın başlangıç zamanı ile örnek toplama zamanı arasında geçen süre ile, örneğin tipi ve kalitesi ile, hastalığın şiddeti ile ve hastanın yaşı gibi faktörlerle değişebileceği rapor edilmiştir. Antijen testleri, RT-PCR ile yapılan testlere göre daha az duyarlıdır. Yukarıda belirtilen faktörlere bağlı olarak, azalan viral yükte COVID-19 tespiti, güvenilir sonuçlar vermemektedir. Bu dezavantajı yok etmek için, SELEX yöntemiyle sentezlenen SARS-CoV-2'ye özgü aptamerler kullanımı amaçlanmaktadır. Aptamerler, SARS-CoV-2 virüsünün spike proteininin reseptör bağlanma alanını hedeflemektedir. Aptamerlerin üretimi antikorlara göre daha ucuz, daha kolay ve virüse karşı daha özgüldür. Aptamerlerin kullanımı ile antijen tespitine dayalı testlerin geliştirilmesi sağlanmalıdır [21, 24].

Serolojik Testler

Serolojik testler viral antijenleri test etmek yerine test içerisinde bulunan virüse karşı geliştirilen antikorları (immünoglobulin G (IgG) ve M (IgM)) tespit etmektedir. Virüs enfeksiyonunun dolaylı olarak tespit edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Virüs organizmadan temizlendikten sonra antikorlar genellikle birkaç yıl daha kan dolaşımında varlığını sürdürmeye devam etmektedir. Bu yaklaşım teşhis açısından avantaj sağlamaktadır. Çünkü iyileştikten sonra bile kanda uzun süre kalabilen IgG konsantrasyonu, geçmiş enfeksiyonun bir göstergesidir. Serolojik testler, SARS-CoV-2'nin hastadaki enfeksiyon geçmişine dair bilgi vermekle beraber geçirilen enfeksiyon sayısının ve boyutunun belirlenmesine dair de bilgi elde edilmesini sağlamaktadır [2, 21].

SARS-CoV-2 Tespitinde Karşılaşılan Problemler

SARS-CoV-2 RNA Tespitinde Karşılaşılan Problemler

SARS-CoV-2'nin RNA bakım noktası testi, düşük algılama hassasiyetine sahiptir [26]. Düşük viral yüklerle sahip pre-septomatik ve asemptomatik hastalarda ve RNA ekstraksiyonu bulunmayan numunelerde yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir [26, 27]. Bunun dışında uzun süre gerektiren SARS-CoV-2'nin RNA tespit süresi, şüpheli COVID-19 hastaları ve sonrasında etkileşimde bulunabilecekleri insanlar için büyük problemlere neden olabilmektedir.

SARS-CoV-2 NP Antijeni ve Virüs Partikül Tespitinde Karşılaşılan Problemler

Testlerin yapıldığı klinik ortamlarda, bazı COVID-19 hastalarının düşük virüs yüklerine sahip olduğu sıklıkla gözlenmiştir [26, 27]. Güncel kullanılan SARS-CoV-2 testlerinin de virüs partikül tespit yönteminde eksiklikleri bulunmaktadır [25]. Virüs tespit yöntemlerindeki eksikliğe ek olarak NP ekspresyonunun, SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerde, SARS-CoV ve MERS-CoV ile enfekte olmuş hücrelere oranla daha düşük çıktığı gözlenmiştir. Bu da SARS-CoV-2 hastalarının vücut sıvısındaki NP konsantrasyonunun daha düşük olduğunu düşündürmektedir [28]. Bu yüzden de NP antijeni ve virüs partikül tespitinde daha güvenilir ve net sonuçlar almak için son derece hassas tespit teknolojilerine acil ihtiyaç duyulmaktadır.

SARS-CoV-2 Antikorlarının Tespitinde Karşılaşılan Problemler

Bazı koronavirüs ile enfekte olmuş hastalarda virüs vücuda girdikten sonra ölçebileceğimiz bir antikor düzeyi oluşturamaz yani bazı hastalar serokonversiyona sahip değildir ve düşük bir anti-SP antikor seviyesine sahiptir [29]. Bu enfekte hastaların doğru

bir şekilde tanımlanması gerekmektedir, bunun içinde daha hassas bir tespit yöntemine ihtiyaç bulunmaktadır. Bunların yanında, anti-RBD ve anti-NP antikollarının seviyelerinin, hastalığın erken aşamalarında çok düşük çıktığı gözlenmiştir [25]. Dolayısıyla aslında pozitif çıkması gereken birçok enfekte hastanın pozitifliğinin anlaşılabilmesi gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. COVID-19'un inkübasyon süresinin 5-6 gün olduğu bilinmektedir [30]. Bu yüzden de, pre-semptomatik ve asemptomatik hastaların taşıdığı virüs, hastaların anti-RBD ve anti-NP antikollar testleri kullanılarak tanımlanmasından önce yakınlarında temas ettikleri insanlara yaymaları fazlasıyla olasıdır. SARS-CoV-2 antikollarının tespitinde kullanılmak üzere acilen daha hassas, daha ucuz ve daha hızlı tespit yöntemleri geliştirilmelidir.

SARS-CoV-2 Tespitinde Geliştirilen Potansiyel Biyosensörler

P-FAB: Covid-19 Tespiti için Geliştirilen P-FAB Biyosensör Cihazları

Taşınabilir plazmonik fiber optik absorban biyosensörü olan P-FAB teknolojisi SARS-CoV-2 virüs partiküllerini minimum düzeyde ön işlem ile doğrudan tükürük numunesi ile çalışan tek adımlı biyosensör tipidir [31]. P-FAB ile antijenler ve endotoksinler de dâhil olmak üzere çeşitli analit gruplarını test edebilecek kadar geniş tanıma özelliğine sahiptir. P-FAB teknolojisi temelde bir çift yeşil LED ve fotodetektör kullanarak U-bükülmüş optik fiber proba sahip bir sistemdir. Fiber optik prob içinde yayılan ışıktaki yoğunluk sayısındaki değişikliğe dayanan bir sistem sayesinde ölçüm gerçekleştirilmektedir. Biyosensörde altın nanoparçacıkları, ışıktaki artan ya da azalan güç kaybının ölçümünü daha fazla güçlendirmek için kullanılmaktadır. Etiketli altın nanoparçacıklar içeren biyosensör, numunenin 25 µL'sinde birkaç yüz analit molekülü tespiti gerçekleştirilebilmektedir. Tasarlanan bu algılama stratejisi, idrar örneğinden tüberküloz teşhisini 15 dakikada gerçekleştirebilen testin çalışma prensibine dayanmaktadır [31]. Fiber optik probun biyo işlevsizleştirilmiş ve U şeklinde bükülmüş algılama bölgesi, numune içerisindeki hedeflenen N-proteinini tespit ederek ve biyosensör matrisinde dalga emilimine yol açarak SARS-CoV-2 tespitini gerçekleştirmektedir [31]. P-FAB teknolojinin N-protein tayini gerçekleştirebilmesi için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntem etiketsiz biyoanaliz, ikinci yöntem etiketli biyoassay yöntemidir [31].

Etiketsiz biyoanaliz yönteminde, biyosensör matrisi, altın nanoparçacık içeren U şeklinde bükülmüş fiber optik prob üzerinde hareketsizleştirilmektedir. Ardından anti-N protein monoklonal antikolları uygun bir kimyasal olan tiyol-PEG-NHS'e kovalent

konjugasyonu gerçekleştirilmektedir [31]. Afinitesi yüksek olan aptamerler, SPR ve ELISA testleri ile değerlendirilmektedir. Antikorlar, hareketsizleştirilmiş problara, sıgır serumu içeren albümin ile muamele edilmektedir. Burada, özgül olmayan bağlamaları engellemek için BSA kullanılmaktadır. Bu şekilde biyofonksiyonelleştirilmiş problar ile numune içerisindeki N proteinlerin 15 dakika içinde tespiti gerçekleştirilmektedir. Etiketli biyoassay yöntemi, sandviç immunoassay yönteminden baz almaktadır. Bu yöntemde, altın nanoparçacıklar kullanılarak etiketleme yapılmaktadır ve yakalama-detektör antikorları kullanılmaktadır. Öncelikle, biyosensör matrisinin, anti-N protein monoklonal antikorlarının (yakalama antikorlarının) U-bükülmüş fiber-optik prob üzerinde hareketsizleştirilmiştir. Özgül olmayan bağlamaları engellemek için sıgır albümini kullanılmaktadır. Sonraki aşamada ise, enfekte olmuş bir hastadan elde edilen numune örneği, anti-N protein monoklonal antikorları ve konjuge altın nanoparçacıklar ile 5 dakika karıştırılmaktadır. Karışım, kompleksin bükülmüş probunun algılama bölgesine eklenmektedir. Numune içerisindeki N proteinlerinin 15 dakika içinde tespiti gerçekleştirilmektedir [31].

Transistör Tabanlı Biyosensör Kullanımı ile İnsan Nazofarengal Sürüntü Örneklerinde COVID-19 Virüsünün (SARS-CoV-2) Hızlı Tespiti

Klinik örneklerde SARS-CoV-2 tespiti gerçekleştirebilmek için etkili transistör (FET) tabanlı biyosensör cihazı geliştirilmiştir. FET tabanlı biyosensör cihazı kullanımı ile az miktardaki numunelerde son derece hassas ve hızlı virüs tespiti hedeflenmektedir [32]. Grafen kaplı biyosensör sayesinde, yüzeydeki değişikliklere immünolojik olarak hassasiyetle tanı konulmaktadır. FET tabanlı biyosensör, grafen kaplı yüzeyin SARS-CoV-2 spike proteinine karşı özgül bir antikorla kaplanmasıyla üretilmiştir. Biyosensör tasarımında yüzeyi grafenle kaplayarak grafenin altıgen şeklinde iki boyutlu karbon atom yapısından dolayı, yüksek elektronik iletkenlik, yüksek taşıyıcı hareketliliği ve geniş özel alan özelliklerinden faydalanılmaktadır [32]. SARS-CoV-2 spike antikoru, grafen kaplı biyosensörün yüzeyine verimli bir arayüz birleştirme ajanı olan 1-pirenebutirik asit N-hidroksisüksinimid ester (PBASE) aracılığıyla immobilize edilmektedir. FET tabanlı biyosensörün algılama sınırı 1 fg/mL düzeyindedir. Biyosensörün SARS-CoV-2'yi tespit sınırı LOD: $1,6 \times 10^1$ pfu/mL ve klinik örneklerde tespit sınırı LOD: $2,42 \times 10^2$ kopya/mL düzeyindedir [32]. Sensörün performansının değerlendirilmesi hastalardan alınan antijen proteini, kültürlenmiş virüs örneği ve nazofarengal sürüntü örnekleriyle

belirlenmektedir. Geliştirilen sensör klinik örneklerde SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmekte oldukça başarılı olmuştur. FET tabanlı biyosensörün sağladığı en büyük avantajlardan biri; SARS-CoV-2 antijen proteini ile MERS-CoV'un antijen proteinini birbirlerinden ayırabiliyor oluşudur. Başarılı şekilde üretimi gerçekleştirilen FET tabanlı biyosensörün numune ön işleme veya etiketleme gerektirmiyor oluşuyla oldukça hassas bir şekilde SARS-CoV-2 tespit edilebildiği kanıtlanmıştır [32].

eCovSens-Ultrahassas Yeni Devre Kart Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Cihazı

Tasarımı bir şirket tarafından yapılmış olan iki tip eCovSens biyosensörü mevcuttur. eCovSens biyosensörleri tükürük numunelerinden nCovid-19 spike protein antijeninin (nCovid-19 Ag) tespiti için tasarlanmış olan ticari potansiyostat cihazlarıdır [33]. İlk eCovSens biyosensör modeli olan FTO tabanlı immünosensör, spike edilmiş tükürük örneklerinde nCovid-19 spike antijeninin (nCovid-19Ag) tespiti için Altın nanoparçacıklı (AuNPs) flor katkılı kalay oksit elektrot (FTO) kullanılarak potansiyostat bazlı bir sensördür. Elektriksel iletkenlikte meydana gelen değişiklikleri ölçmek için nCovid-19 monoklonal antikor (nCovid-19Ab) ile hareketsizleştirilmiştir. İkinci eCovSens biyosensör ise SPCE bazlı biyosensördür. SPCE biyosensörü, nCovid-19 Ab'yi ekran baskılı karbon elektrot (SPCE) üzerinde hareketsiz hale getirerek elektriksel iletkenlikte meydana gelen değişikliği ölçmek için tasarlanmıştır [33]. Her iki tipteki biyosensörün performansı nCovid-19 Ab'nin kendine özgü nCovid-19 Ag ile etkileşimine dayanmaktadır. Optimum koşullar altında FTO tabanlı immünosensör ve önerilen SPCE bazlı biyosensör cihazı test edilmiştir. Test sırasında 1 fM ila 1µM arasında değişen nCovid-19 Ag'nin tespiti için her iki biyosensör modeli de erken tespitte oldukça başarılı ve hızlı sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda biyosensörlerin yüksek hassasiyetli ölçümleri de rapor edilmiştir [33].

Taşınabilir Yüzey Plazmon Rezonans Algılamalı Biyosensör Cihazı ile SARS-CoV-2 Antikorları İçin Hızlı ve Kantitatif Serum Testi:

Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörü, seyreltilmemiş insan serumunda SARS-CoV-2'ye özgü olan nükleokapsid antikorlarının tespitini gerçekleştirebilen yeni bir biyosensör cihazıdır. Taşınabilir bir SPR cihazı 3-MPA-LHDLHD-COOH tabakasıyla modifiye edilen SPR yüzeyi SARS-CoV-2 nükleokapsid rekombinant protein ile işlevselleştirilerek nanomolar aralıkta anti-SARS-CoV-2 antikorlarını tespit

edilebilmektedir [34]. SPR sinyalinin suda stabilizasyonu gerçekleştirildikten sonra yüzey 1:1 sulu 100 mM N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 400 mM N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) solüsyonu ile modifiye edilerek hareketsizleştirme tamponuyla 20 saniye durulanmaktadır. SARS-CoV-2 nükleokapsid rekombinant (rN) proteini (MBS569934, MyBioSource, ABD) ile 20 dakika reaksiyona konulmaktadır. SARS-CoV-2 antikorlarının saptanması için ELISA testindeki performansını gösteren son raporlar nedeniyle de kullanıma uygunluk açısından seçilmiştir [34]. SPR tabanlı sensör ile numune/sensör temasından sonraki 15 dakika içinde sonuçlar çıkmaktadır. Bu tespit yöntemi genel olarak diğer SARS-CoV-2 antijenlerine uygulanabildiğinden bir dizi antikor sensörünün klinik örneklerde analizini gerçekleştirebilmek için uygundur. SPR cihazının taşınabilirliği ve hızlı sonuç verebilmesi ile kısa sürede sahada kullanılması beklenmektedir [34].

Optik Biyosensörler

SARS-CoV-2 tespiti için geliştirilen optik biyosensörler, plazmonik fototermal (PPT) etki kullanılarak ve LSPR'nın algılama şemasında bulunan transdüksiyon ilkeleriyle beraber kullanılmıştır. Böylece COVID-19 hastalığının doğru teşhisi için optik bir biyosensör geliştirilmiştir [35]. Nanoparçacıkların ve ışığın LSPR algılamasında kullanımıyla, plazmonik rezonans frekansında daha önce de iyi sonuç alındığı bilinen termoplazmonik nesil bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, termoplazmonik ısı kullanılarak *in situ* hibridizasyon sıcaklığının yükseltilebileceğini ve böylece de iki benzer gen dizisinin ayrımının doğru bir şekilde yapılabileceği düşünülmektedir. Gerçekten de tasarlanan bu LSPR biyosensörünün çok sayıda gen içeren bir karışımda, seçilen SARS-CoV-2 sekanslarına karşı yüksek bir hassasiyet sergilediği görülmüştür [36]. Nanofabrikasyon teknikleriyle [36] ve mikroakışkanlarla kombine edilen LSPR'ın [35] geliştirilmesiyle duyarlılığın daha da artırılacağı ve taşınabilir formatlarda kullanılacağı düşünülmektedir [36, 38]. Bahsedilen nedenlerden ötürü, LSPR'nin nanomalzemelerle kullanımıyla birlikte teşhis doğruluğunu arttırmakta büyük bir potansiyeli olduğu vurgulanmıştır. Viral enfeksiyonu doğrulayan analitlerin doğrudan algılanmasının yanında, optik biyosensörlerin ayrıca SARS-CoV-2 virüsünün yüksek çözünürlükte görüntülenmesinde de büyük rol oynayabileceği planlanmaktadır [36]. Wei ve ark. [39] yaptığı bir çalışmada, lazer diyot uyarımına bağlı olarak virüs görüntülenmesinde optik biyosensörlerin kullanımına dayalı bir sistem geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu sistem, akıllı bir telefonun kamera modülüne kolaylıkla entegre edilebilen bir optomekanik bağlantı formuna dayanmaktadır. Görüntüleme platformunun çözünürlüğü 50 nm'den az olup, kişilerin virüs tespitlerinde akıllı telefonların kullanımının sağlanmasını içermektedir [39].

Sonuç

Sonuç olarak, antikor saptama testleri ve nükleik asit saptama testleri SARS-CoV-2 enfeksiyonunu tanımlamak ve virüsün yayılmasını azaltmak adına enfekte hastaların izole edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, şu anda güncel kullanılmakta olan SARS-CoV-2 RNA saptama testlerinin uzun süreleri, düşük hassasiyet göstermesi, sadece klinik örneklerden RNA özütlemeye ihtiyacı, bu testlerin klinik uygulamasını sınırlandırmaktadır ve hatalı sonuçlara yol açabilmektedir [25]. Düşük virüs yüklerine sahip hastalarda ve ayrıca enfekte hastalarda erken dönemde gözlenen kandaki düşük antikor seviyesi hastalığın daha fazla yayılmasına neden olabilmektedir. Bunun nedeni ise tespit testlerinin hassasiyetinin düşük olması nedeniyle verilen yanlış negatif sonuçlarla birlikte, enfekte hastalar virüsü daha da yayabilmektedirler [40]. Bu nedenle, hızlı, ucuz, yüksek hassasiyetli ve taşınabilir taramayla laboratuvarlardan bağımsız, kişiselleştirilmiş ve bakım noktası tanı yaklaşımları geliştirmek fazlasıyla önemlidir.

Gelecek Perspektifleri

Bu yazımızda, biyosensörlerin hızlı, yüksek hassasiyetli ve klinik çalışmalarda SARS-CoV-2 RNA tespiti için büyük potansiyellere sahip olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca SARS-CoV-2 RNA tespitiyle ilgili olarak, doğrudan amplifikasyon için klinik örneklerden elde edilecek SARS-CoV-2 RNA'ların daha basit ve daha hassas algılanması için daha fazla çalışma yapılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. SARS-CoV-2 RNA'nın hızlı, gerçek zamanlı ve oldukça hassas tespiti için birçok teknolojinin ve disiplinler arası çalışmaların gerekliliği açıktır. Ayrıca, biyosensörlerin, nanoteknolojiyle birleştirilmesiyle gelecekte daha hızlı ve daha hassas tespit stratejilerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Bizi gelecekte hangi viral veya patojenik mikrobiyal salgınların beklediğini bilemiyoruz fakat elimizdeki teknolojiyi kullanarak ve bunu daha da geliştirerek en azından yeterli önlemleri alabilme şansımız bulunmaktadır. Moleküler biyoloji ve sentetik biyolojideki ilerleme sayesinde, nanobodiler ve aptamerler gibi yeni

bağlayıcı ajanların keşfi gerçekleştirilecektir. Bu ajanların biyomühendislikte kullanılması ile de virüsleri tespit etmekte yüksek seçicilik sağlanacaktır. Biyosensörlerle birlikte kullanılacak yapay zekâ ve yeni algılama stratejileri herhangi bir potansiyel hastalığın kontrolsüz yayılmasının önüne geçebilmek ve kontrol altına alabilmek için büyük kolaylık sağlayacaktır [41].

Kaynaklar

1. Samson, R., G. Navale, and M. Dharne, Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. 3 Biotech, 2020. 10(9): p. 385-394.
2. Santiago, I., Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology, 2020. 21(20): p. 2880-2889.
3. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2021; Available from: <https://covid19.who.int>. [Erişim Tarihi: 20.06.2021]
4. Cui, F. and H.S. Zhou, Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. Biosensors and Bioelectronics, 2020. 165: 112349.
5. *Timeline: WHO's COVID-19 response*. 2021; Available from: [Timeline of WHO's response to COVID-19](#). [Erişim Tarihi: 15.06. 2021]
6. Fehr, A.R. and S. Perlman, Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) Coronaviruses. Methods in Molecular Biology, 2015. 1282: p. 1-23
7. Weiss, S. R. and J. L. Leibowitz, Coronavirus pathogenesis. Advances in virus research, 2011. 8: p. 85–164.
8. Cui, J., F. Li, and Z.L. Shi, Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology, 2019. 17: p. 181–192.
9. Ludwig, S. and A. Zarbock, Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. Anesthesia and Analgesia, 2020. 131(1): p. 93–96.
10. Woo, P. C., et al., Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Experimental Biology and Medicine, 2009. 234(10): p. 1117–1127.
11. SARS-Cov-2 (2019-NCov) Antigen Reagents. 2021; Available from: <https://www.sinobiological.com/research/virus/2019-ncov-antigen>. [Erişim Tarihi: 19.06.2021]
12. Hurst, K. R., C. A. Koetzner, and P. S Masters, Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. Journal of Virology, 2009. 83(14): p. 7221–7234.
13. Escors, D., et al., The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. Journal of Virology, 2001. 75(3): p. 1312–1324.
14. Tortorici, M. A. and D. Veessler, Structural insights into coronavirus entry. Advances In Virus Research, 2019. 105: p. 93–116.
15. Jia, H.P., et al., ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. Journal of Virology, 2005. 79(23): p. 14614– 14621.
16. SARS-CoV-2 (COVID-19) research reagents. 2021; Available from: <https://www.prosci-inc.com/covid-19/>. [Erişim Tarihi: 15.06.2021]
17. Duffy, S., L. Shackelton, and E. Holmes, Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. Nature Reviews Genetics, 2008. 9: p. 267–276.
18. Lai M. M., RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiological Reviews, 1992. 56(1): p. 61–79.

19. Chen, L., et al., Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2020. 20(4): p. 398–400.
20. Rabiee, N., et al., Point-of-use rapid detection of SARS-CoV-2: Nanotechnology-Enabled Solutions for the COVID-19 Pandemic. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(14): 5126.
21. Soler, M., et al., How nanophotonic label-free biosensors can contribute to rapid and massive diagnostics of respiratory virus infections: COVID-19 Case. *ACS sensors*, 2020. 5(9): p. 2663–2678.
22. Woo, P., et al., Rapid detection of MERS coronavirus-like viruses in bats: potential for tracking MERS coronavirus transmission and animal origin. *Emerging Microbes and Infections*, 2018. 7(1): 18.
23. Mathuria, J. P., R. Yadav, and Rajkumar, Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*, 2020. 13(7): p. 901–905.
24. Zhen, W., et al., Clinical evaluation of three sample-to-answer platforms for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020. 58(8): e00783-20.
25. Ji, T., et al., Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020. 166: 112455.
26. Pan, L., et al., Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: A descriptive, cross-Sectional, multicenter Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 2020. 115(5): p. 766–773.
27. Pan, Y., et al., Potential false-negative nucleic acid testing results for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clinical Chemistry*, 2020. 66(6): p. 794–801.
28. Lv, L., et al., Transcriptional difference between SARS-COV-2 and other human coronaviruses revealed by sub-genomic RNA profiling. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.
29. Togay, A. and N. Yılmaz, Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2. *The Journal of Tepecik Education and Research Hospital*, 2020. 30(2): p. 70-75
30. Backer, J. A., D. Klinkenberg, and J. Wallinga, Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020. *Euro surveillance : European Communicable Disease Bulletin*, 2020. 25(5): 2000062.
31. Murugan, D., et al., P-FAB: A Fiber-optic biosensor device for rapid detection of COVID-19. *Transactions of the Indian National Academy of Engineering*, 2020. 5: p. 211–215.
32. Seo, G., et al., Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, 2020. 14(4): p. 5135–5142.
33. Mahari, S., et al., eCovSens-ultrasensitive novel in-house built printed circuit board based electrochemical device for rapid detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.
34. Djaileb, A., et al., A rapid and quantitative serum test for SARS-CoV-2 antibodies with portable surface plasmon resonance sensing. *ChemRxiv*, 2020. 12118914.v1.
35. Qiu, G., et al., Dual-functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection. *ACS Nano*, 2020. 14(5): p. 5268–5277.
36. Bhalla, N., et al., Opportunities and challenges for biosensors and nanoscale analytical tools for pandemics: COVID-19. *ACS Nano*, 2020. 14(7): p. 7783–7807.
37. Roether, J., et al., Real-time monitoring of DNA immobilization and detection of DNA polymerase activity by a microfluidic nanoplasmonic platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019. 142: 111528.
38. Rampazzi, S., et al., A localized surface plasmon resonance-based portable instrument for quick on-site biomolecular detection. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 2016. 65(2): p. 317– 327.

39. Wei, Q., et al., Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone. *ACS Nano*, 2013. 7(10): p. 9147–9155.
40. Xu, L., et al., Facile biosensors for rapid detection of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020. 170: 112673.
41. Jeong, H., J.A. Rogers, and S. Xu, Continuous on-body sensing for the COVID-19 pandemic: Gaps and opportunities. *Science Advances*, 2020. 6(36): eabd4794.