



## COVID-19 Tanısında Protein Temelli Yaklaşımlar

### *Protein-based Approaches for the Diagnosis of COVID-19*

Beyza Göncü<sup>1</sup>

#### ÖZ

Serolojik testler belirli patojenlere maruziyetin varlığını teşhis etmek ya da seyir takibi amacıyla kullanılan testlerdir. Kan veya serum örnekleri kullanılarak, patojenlere ait antijenlerin varlığı ve spesifik antikorlara bağlanma prensibine göre çalışır. Güncel olarak COVID-19 veya bir diğer deyişle SARS-CoV2 teşhisi ve seroloji testlerine ait bulguların doğrulanması gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) tekniği ile yapılmaktadır. SARS-CoV2 seroloji testlerine ilişkin gelişmeler hızlı bir şekilde güncellenmektedir. Özgün SARS-CoV2 antikorlarının tayin edilmesi, patojen varlığında immün sistemin oluşturacağı yanıtı bağlı olarak geliştirilir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı hastalardan elde edilen örneklerde farklı immünglobülin tiplerinin belirlendiği bildirilmiştir. Bu nedenle öncelikle enfeksiyondan sonra gelişen immünglobülin tiplerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Serolojik testler temelde; nötralizasyon, antijen-antikor reaksiyonu ve belirleme aşamaları ile karakterizedir. Enfeksiyonun hızlı teşhisi ve seyrinin takibi için SARS-COV2 seroloji testleri ile ilgili araştırma ve geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir. Bugüne kadar bildirilen serolojik test sonuçları, benzerlik taşıyan koronavirüs antikor testleri (SARS/MERS-CoV vb) kullanılarak elde edilmiştir. Bu sürecin tamamlanması için virüse bağlı antijenik kısımların tanımlanması gerekmektedir. SARS-CoV2'ye özgül, antijene bağlanacak antikorun, protein temelli yaklaşımlarda bir "çapa" (*anchor*) olarak kullanılması için araştırmalar devam etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Koronavirüs, COVID-19, SARS-CoV2, seroloji testleri

#### ABSTRACT

Serology tests are performed for diagnosis or monitoring of the disease for a possible exposure to certain pathogens. The strategy mainly depends on testing the presence of antigens that belongs to pathogens by binding to its specific antibody from blood or serum samples of the patient. Currently, these tests are in the process of development for the novel coronavirus or another term SARS-CoV2 and reported studies still require confirmation by RT-PCR method. The determination of the specific SARS-CoV2 antibody should develop depending on the immune system's response in the presence of a pathogen. Several studies reported different immunoglobulin types from different patient samples, additional data would indicate more specific outcome to produce detection tests. Serology tests are basically characterized by the neutralization, antigen-antibody reaction, and the appropriate detection stage. The definition of immunoglobulin types after infection is the major step. The development of serology test data related to the SARS-CoV2 being reported fast and updated rapidly. Protein-based viral serological tests are an attempt to be accelerated for diagnosis and changes in the course of infection. In order to determine a protein-based test, virus-dependent antigenic portions must be identified however SARS-CoV2 antigenic sites still under investigation. Only the antigenic similarities of the other coronavirus serological tests (such as SARS/MERS CoV) provide the serologic test outcome. Though, the effectiveness of similar coronaviruses is evaluated rapidly and reported. The particular antibody that to be bound to its antigen and act as an "anchor" for protein-based approaches of the SARS-CoV2 are still in research process.

**Keywords:** Coronavirus, COVID-19, SARS-CoV2, serology tests

<sup>1</sup>Bezmalem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

ORCID: B.G. 0000-0001-6026-8218

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Beyza Göncü, Bezmalem Vakıf Üniversitesi,  
Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi,  
İstanbul, Türkiye  
E-posta: bgoncu@bezmalemedu.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 24.04.2020

**Kabul/Accepted:** 04.05.2020

**Atıf/Citation:** Goncu B. Protein-based Approaches for the Diagnosis of COVID-19. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(Suppl.1): S31-S39.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-S1-0004>



## GİRİŞ

Viral patojenlerin protein temelli sistemlerle test edilebilmesi, enfeksiyon sürecinin doğru tanımlanması ile mümkün olmaktadır. COVID-19 gibi halk sağlığını tehdit eden patojenlere maruz kalınması ve devamında oluşan immün yanıtın takip edilmesi gerekmektedir. Viral patojenlere karşı humoral ve hücrel immün yanıt beraber görev alsa da, laboratuvar koşullarında humoral yanıtın teşhis edilmesi hücre-spesifik yanıtın belirlenmesinden daha kolaydır (1). Bir çok viroloji temelli klinik laboratuvar bu yaklaşımla teşhis sürecini hızlandırma amacı güder (2). Bu makalede SARS-CoV2'nin ("Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2) antijenik yapısı, protein temelli testler, çalışma prensipleri ve uygulama aşamaları için kullanılan yaklaşımlar değerlendirilmiştir.

Koronavirüs ailesine ait virüslerin hücre içine alım süreçleri reseptör-aracılı-endozitoz ile sağlandığı bilinmektedir (3). Bu virüsler dört temel yapı proteininden meydana gelir: "spike" (S), membran (M), zarf (Z) ve nükleokapsid (N) proteinleri. SARS-CoV2 temelli serolojik testlerde bu dört proteinden ikisi (S ve N proteinleri) hedeflenir (4).

### Spike proteinleri

Reseptör bağlanmasının enfeksiyonun başlangıç sürecini oluşturması sebebiyle serolojik testler genellikle Spike (S) proteinlerine karşı tasarlanmaktadır.

Her bir monomeri 180 kDa'dan oluşan trimer (üçüncül) yapıdaki S proteinleri iki alt birimden oluşur; **S1** ve **S2**. S1 bölgesi reseptöre bağlanan kısmı, S2 ise virüs ve S1 arasında kalan membrana füzyondan sorumlu protein kısmıdır (5,6). Koronavirüslerin reseptör bağlanma süreci enfeksiyon kapasitesinin anlaşılması için önemlidir.

SARS-CoV ("Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus) ve SARS-CoV2 S proteinleri amino asit dizisi %76 oranında benzerlik taşımaktadır (7). Mart 2020'de Shang J. ve ark. SARS-CoV2'nin reseptör-bağlanma bölgesi (RBB) olan yüzey S protein yapısını (NCBI Gene ID: 43740568) ve sıcak genomik (hotspot) bölgelerini bildirdiler (8). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda SARS-CoV ve MERS-CoV ("Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus")'in yüzeyde reseptör-bağlanma-motifi taşıdığı ve sırasıyla hACE2 ("Human Angiotensin Converting Enzyme-2") reseptörü ve hDPP4 ("Human dipeptidyl peptidase-4") için kritik aktivite gösterdiği bildirildi (6,9). RBB afinitesinin birbirinden farklı olduğu ve aynı bölgedeki 31. ve 353. amino asit olan lizinin (sırasıyla hotspot-31 ve hotspot-353), tüm zincirdeki farklı amino asitlerle olan ilişkisinin reseptöre bağlanma noktası oluşturduğunu gösterdi (8) (Tablo 1). Yine aynı grubun çalışması ile bu kez SARS-CoV2'nin nasıl bir farklılıkla daha enfeksiyöz etki gösterdiği açıklandı. SARS-CoV2 hotspot bölgedeki bilinen lizin

**Tablo 1.** 1255 amino asitten oluşan Spike (S) protein amino asit dizisi

MFIFLLFLTLTSGSDLDRCTTFDDVQAPNYTQHTSSMRGVYYPDEIFRSDTLYLTQDLFLPFYSNVTGFHTINHFTGNIP FKDGIYFAATEKSNVVRGWVFGSTMNNKSQSVIIINNSTNVVIRACNFELCDNPFPAVSKPMGTQHTMIFDNFNC TFEYISDAFSLDVSEKSGNFKHLREFVFNKDGFLYVYKGYQPIDVVRDLPSGFNTLKPFLPLGINITNFRAILTAFA QDIWGTSAAYFVGYLKPFTFMLKYDENGITDAVDCSQNPLAELKCSVKSFEIDKGIYQTSNFRVVPSPGDVVRFPNP TNLCPFGVEFNATKFPVYAWERKKISNCVADYSVLNSTFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSNVYADSLVVKGGDDVQ IAPGQTGVIAADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCPTPPA LNCYWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVLSFELLNAPATVCGPKLSTDLIKNQCVNFNFNGLTGTGVLTTPSSKRFQPF QQFGRDVSDFDTSVRDPKTSEILDISPSCSFGGVSVITPGTNASSEVAVLYQDVNCTDVSIAIHADQLTPAWRIYSTGNN VFQTQAGCLIGAHEVDTSYECDIPIGAGICASYHTVSLRSTSQKSIVAYTMSLGADSSIAYSNNTIAIPTNFSSITTEVM PVSMAKTSVDCNMYICGDSTECANLLQYGSFCTQLNRALSGLIAAEQDRNTREVFAQVKQMYKTPTLKYFGGFNFS QILPDKPTKRSEFIEDLLFNKVTLADAGFMKQYGECLGDINARDLCAQKFNGLTVLPLLTDDMIAAYTAALVSGT ATAGWTFGAGAAALQIPFAMQAYRFNGIGVTVQNVLYENQKQIANQFNKAIQSILTTSTALGKLDVVDVQNA QALNTLVKQLSSNFGAIVSLNDILSRDLKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVYVQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVL GQSKRVDFCGKGYHLSFPAAPHGVVFLHVTYVPSQERNFTTAPAICHEGKAYFPREGVVFVNGTSWFITQRNF FSPQIITDNTFVSGNCDVVGIIINNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVUNIQKEIDRLNE VAKNLNESLIDLQ ELGKYEYQYKWPWYVWLGFIAGLIAIVMTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVL KGVKLHYT
--

Koyu renk ile belirtilen kısım; Reseptör-Bağlanma-Bölgesi (RBB) (306-527. amino asit bölgesi), altı çizili olarak ifade edilen kısım; Reseptör-Bağlanma Motifi (424-494. amino asit bölgesi)'nin bulunduğu kısmı göstermektedir (UniProt veri tabanından temin edilmiştir-UniProt ID:P59594).

amino asidi ile beraber dört farklı amino asidin daha (482-485 amino asit pozisyonundaki: Gli-Val-Glu-Gli) *hotspot* etkinlik ve hACE2 reseptör bağlanma noktasına daha yoğun bir ilgi oluşturduğu bildirildi. Yani *hotspot*-31 yapısı SARS-CoV2'de 493. pozisyon-daki glisin ve 455. pozisyondaki lösin amino asitlerine ve *hotspot*-353 ise 501. pozisyonda bulunan asparjin amino asitine karşılık gelmektedir (8,10). Ayrıca S proteinlerinin sebep olduğu bağlanma sonrasında membrana füzyon sürecinin de Influenza (H1N1) ile benzerlik gösterdiği ve reseptör bağlanmasını takip eden proteaz aktivitesinin gerektiği bildirilmiştir (S proteini 682-685. amino asit pozisyonu) (6,11,12). UniProt veri tabanındaki bilgilere göre S proteinlerinin amino asit dizisi için 41 farklı varyant (21 Nisan 2020 itibariyle) rapor edilmiş ve altı farklı varyantın sadece RBB'de yer alan "Reseptör Bağlanma Motifi" kısmında bulunduğu gösterilmiştir (424-494. amino asit bölgesi). Ayrıca bu varyantların (biri dışında) hACE2 reseptörüne olan bağlanma afinitesinin değiştiği bildirilmiştir (13).

### Nükleokapsid (N) proteinleri

Virüsün zarf kısmı içerisinde bulunan N proteinleri, tek iplikli RNA'ya bağlı halde bulunurlar. SARS-CoV gibi virüslerde olduğu gibi N proteinleri antijenik yanıt için önem taşır ve serolojik testlerin tanısal etkinliği için kullanılmaktadır (14). N proteinleri viral genomun M proteinleri ile olan ilişkisinde görev alır (15). Stertz ve ark. 2007'de yaptıkları bir çalışma ile SARS-CoV enfeksiyonu için S proteini aracılığıyla başlayan membran füzyonu sonrasında; viral N proteinlerinin ERGIC ("*ER-Golgi Intermediate Compartment*") ve golgi çevresinde akümülyasyon sağladığı ve bu süreci enfeksiyonun başlamasından sonra üç saat kadar bir sürede tamamladığını bildirdiler. Bu sayede viral genom aktarılması sürecinin hızlı bir şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir (UniProt ID:P59595) (15).

SARS-CoV ve -CoV2 genomlarının %76 benzerlik göstermesi sebebi ile viral genom aktarılması sürecinin de benzer şekilde gerçekleştiği öne sürülmektedir (16). UniProt veri tabanına göre SARS-CoV'un N proteininin 422 amino asitten oluştuğu ve aynı dizide dört farklı varyantın bulunduğu bildirilmiştir.

SARS-CoV2 için ise N protein dizisinin SARS-CoV'a %90 benzerlik taşıdığı gösterilmiştir (SARS-CoV2 *taxon identifier* ID: 2697049) (17).

### Viral Protein Temelli Testler ve Uygulama Stratejileri

Antikor-antijen temelli testler, geçirilmiş ya da geçirilmekte olan viral enfeksiyon aşamalarının belirlenmesi için uygulanabilmektedir. Tespitin yapılabilmesi için antijen-antikor sisteminin tanımlanması olmazsa-olmaz bir durumdur.

İmmünglobülinler (Ig) antijene bağlanma görevi olan özgül moleküllerdir ve beş sınıfa ayrılır; IgA, IgE, IgD, IgG ve IgM. Genellikle hastalığın ilk günlerinde, viral enfeksiyonun başlangıcında IgM miktarı artış gösterir (ilk 1-2 gün, erken evre) ve 1-3 ay sonunda (bazen daha uzun) seviyesi neredeyse belirlenemez miktarda azalır. Doğal bağışıklığı ve/veya aşılanmayı takiben IgG seviyesi kanda birkaç gün içerisinde hızla artar ve çok daha uzun süre belirnebilecek seviyelerde kalmaya devam eder (18). IgG'nin kanda daha uzun süre seyretmesi serolojik testler için temel hedeftir. Fakat viral enfeksiyonlarda hem IgG'nin hem de IgM'nin beraber tespit edilmesi yapılan testin hassasiyetini (*sensitivity*), doğruluğunu (*accuracy*) ve spesifitesini (*specificity*) arttırmaktadır (19).

Serolojik testler beş grupta incelenebilir; Nötralizasyon Testi (NT), Hemagglütinasyon Önlenim (inhibisyon) Testi (HI), İmmünofloresan Assay (IFA), Enzim İmmunoassay (EIA) ve İmmün Blotlama (WB) (1).

Nötralizasyon, viral teşhiste kullanılan ilk test tipidir. Testin bileşenleri; örnek, antijen ve taşıyıcı bir sistemden oluşur. Testin uygulanabilmesi için iyi karakterize edilmiş virüs örneği ("*pre-titrated*") gerekmektedir. Taşıyıcı sistem aynı zamanda testin de uygulanacağı kısmı ifade eder. Belirli bir hücre hattı (*Raji*, *Vero* hücre hatları gibi) ve/veya deney hayvanı kullanılarak uygulanabilir (20). Test; örneğin belirli bir sıcaklıkta tutulması, devamında titrasyon yapılarak miktarı belirli virüs örneği ile karıştırılması ve taşıyıcı sisteme aktarılması aşamalarını içerir. Taşıyıcı sistemin titrasyon dozlarına bağlı sağ kalımı ve canlılığı gibi durumlar izlenerek, antikor miktarından

nötralizasyon-titrasyonu seçilir. Bu testin uzun sürmesi, deneyimli personel ve ekipman gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı ile serolojik tanı testi olarak kullanımından ziyade araştırma/kit/aşı geliştirme gibi süreçlerde kullanılma oranı daha fazladır. Uzun yıllardır kullanılan bu teknik bazı virüs tiplerinin (flavivirus gibi) tespiti için halen kullanılmaktadır (21). SARS-CoV2 için nötralizasyon testleri S ve N proteinlerine karşı antikor/aşı geliştirilme aşamalarında kullanılmaktadır. Amanat ve ark., S proteinine karşı geliştirilen ve S proteinin tüm amino asit dizisine bağlanma kapasitesi olan antikorların yerine daha immünojenik bir bölge olan RBB 'ye özgü bağlanma gösteren antikorların kullandıkları ELISA ("Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay") yöntemi için daha hedefe yönelik olabileceğini bildirmişlerdir (22). Yalnızca bir çalışmada COVID-19 hasta örnekleri ile uygulanan nötralizasyon testi ile viral yükün örnek başına oran olacak hesaplanabileceği ve hastalığın seyrine göre takibinin yapılabileceği önerilmiştir (23).

HI testi, nötralizasyon testine benzer bir yöntemdir. Bazı virüsler doğal olarak eritrositlerin yüzey reseptörlerine bağlanarak aglütinasyona yol açarlar. Bu tarz virüslere karşı özgül antikor varlığının araştırılmasında "hemaglütinasyon önlenim" testi kullanılır. Bu yöntem basit ve kolay uygulanabilmesinin yanında, pahalı ekipman gerektirmemesi sebebiyle halen tercih edilmektedir (24). SARS-CoV2 için henüz bildirilen bir HI testi bulgusu bildirilmemiştir. Yakın zamanda Nisreen ve ark. tarafından MERS-CoV için geliştirilen bir HI testi bulunmaktadır (25).

IFA testi, IgG ve/veya IgM eşikli floresan işaretli konjuge edilmiş antikorların belirli bir dalga boyunda tespit edilmesine dayanmaktadır. Mikroskop altında gözlenen test sonucu, pozitif veya negatif olarak değerlendirildiğinden IFA testi için mutlaka kontrol grubu (pozitif ve negatif kontrol) kullanılması gerekmektedir. Test iki aşamadan oluşur; ilk aşama serum örneğinin cam slayda yayılması ve anti-IgG ve/veya IgM tipi antikor ile muamesini ve ikinci aşama ise floresan görüntünün alınmasıdır (1). SARS-CoV gibi koronavirüsler için floresan işaretli antikorlar üretilmiş ve IFA testi için kullanılabilir-

ği gösterilmiştir (26). SARS-CoV2 için henüz spesifik ve IFA testinde kullanılabilir bir antikor bildirilmemiştir. SARS-CoV/MERS-CoV için kullanılan antikorlar (%76 oranında benzerlik sebebiyle) ile uygulanmış bir IFA testi de bildirilmemiştir.

EIA testleri çok geniş spektrumda kullanılan bir test tekniğidir. Dolaylı ("indirect"), yarışmalı ("competitive") veya çoklu ("multiplex") tiplerde, solid faz veya membran eşikli sistemlerle uygulanabilmektedir. Her testin kullanım amacına göre farklılıkları vardır. Bu farklılıklar test edilecek değişkene, uygulama sürecine ve tespit şekline bağlı olarak değişir. Birçok klinik viroloji laboratuvarında hem teşhis hem de enfeksiyon/aşılama/re-enfeksiyon gibi durumlarda optimize EIA testleri kullanılmaktadır (1, 6). SARS-CoV2 için bildirilen antikorların büyük kısmı ELISA (bir çeşit EIA testi) için kullanılmaya başlanmıştır (14).

WB, EIA testlerinden daha spesifik sonuç vermektedir fakat zaman alan ve uygun laboratuvar alt yapısı, deneyimli laboratuvar personeli gerektirdiği için zahmetli bir tekniktir. Protein örneğinin hazırlanması, elektroforez yöntemi ile büyüklüklerine göre ayrıştırılması ve sonrasında membran temelli bir sistem üzerinde uygun antijen/antikorların muamesi ile belirlenebilmesi süreçlerini içermektedir. Bu testin uygulanmasında hasta örneği (antijen içeren serum örneği) ya da viral protein örneğinin kullanımı mümkündür (1). Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) klinik viroloji laboratuvarlarında, retrovirüs enfeksiyonlarında ve HIV enfeksiyonlarında yalancı pozitifliğin önüne geçilmesi için, konfirmasyon amaçlı WB tekniğinin kullanımını önermektedir (27). Otomatize edilmiş sistemlerin üretilmesi ile hali hazırda ticari olarak viral proteinlerin aktarıldığı membranlar (*pre-loaded membrane strips*) kullanılabilir. SARS-CoV2 için üretilmekte olan antikorların bir kısmı WB için de çalışır durumdadır, fakat henüz rutin test tekniği olarak değerlendirilmemektedir (14). Finlandiyadaki ilk vakaya ait hasta örneğinden elde edilen viral proteinlerin WB ve IFA tekniği kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada, kullanılan antikorların S, N ve E proteinlerine bağlanabildiği ve

her iki tekniğin de enfeksiyonun değerlendirilmesinde kullanılabilceği bildirilmiştir (28).

### Protein Temelli Koronavirüs Testleri

SARS-CoV2 için serolojik testler halen geliştirilme aşamasındadır. Zang ve ark., N proteinine özgü (protein Rp3, UniProt ID: Q3I5I7) ELISA testi ile COVID-19 hasta serumlarından IgG ve IgM pozitivitesini belirlediler. Kullanılan kitte bulunan antikorun diğer koronavirüs N proteini ile %90 benzerlik taşımasının yeterli sonucu verdiğini ve enfeksiyonun başlangıcından itibaren, beş gün içerisinde yapılan serum testi sonucunun RT-PCR yöntemiyle de doğrulandığı bildirilmiştir (29).

SARS-CoV için geliştirilen protein temelli serolojik test antijen ve antikorlarının, SARS-CoV2 testleri içinde kullanılabilceği Mart 2020'den itibaren yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (7). Viral yükün enfeksiyonun şiddetini değiştirmekte olduğu ve bazı durumlarda serolojik testleri verimsiz kıldığı da yapılan birkaç çalışma ile bildirilmiştir. Bu çalışmalardan birinde; viral yükün az veya orta seviyede bulunduğu hastalarda, serum IgG seviyelerinin daha yüksek olduğu ve yine aynı grup hastalarda serolojinin pozitif fakat RT-PCR sonucunun negatif olabileceğini göstermişlerdir (30). Zhao ve ark. ise, 173 COVID-19 pozitif hastaya ait 535 örnekten total antikor titrelerini belirlemiştir. Enfeksiyonun ilk iki haftasında alınmış örneklerin, total antikor miktarına göre IgG ve IgM titreleri sırasıyla %94 ve %79 olarak bildirilmiştir. Antikor temelli uygulanan ELISA testinin antikor titresine bağlı olarak klinik anlamda sınıflandırılmasının mümkün olduğunu iletilmişlerdir (31). Bu nedenle teşhis yerine, hastalık sürecinin takibi için serolojik testlerden yararlanılması önerilmektedir (32). Yine Wang To ve ark., serum IgG seviyelerinin erken enfeksiyon evresinde genellikle IgM'den fazla olduğu fakat bu farkın enfeksiyonun ilk haftasından sonra (çoğunlukla 5. günden sonra) değişebildiği ve serolojik testin hastalık seyir takibinde yetersiz kalabildiğini öne sürmüştür. Bu süreçte koronavirüs IgM eşikli serolojik test hassasiyetlerinin, IgG kitlelerine göre daha az olmasının serolojik test sonucunu etkileyebileceği unutulmalıdır (30).

Antikor temelli testlerin daha geniş bir enfeksiyon süreci/takibi için kullanılması da önerilmektedir (7). Başka bir çalışmada SARS-CoV ve SARS-CoV2 pozitif hasta serum örneklerinde, S proteinine özgü antikor testi yapıldığında çapraz reaksiyon oluştuğu ve hali hazırda ticari olarak bulunan bu antikor kitlerinin kullanımının avantaj sağlayacağı belirtilmiştir (33). Diğer bir çalışmada ise C-reaktif protein ve D-dimer miktarının enfekte hastalarda anormal seviyede oluşunun da diğer bir belirteç olarak değerlendirilebileceğini gösterilmiştir (34). Ticari olarak SARS-CoV2 için üretilen ve henüz validasyonları tamamlanmamış ya da tamamlanmak üzere olan ELISA kitlerinin değerlendirilmesi açısından yapılan bir çalışmada hasta serumlarındaki IgA ve IgG antikor titrelerinin hassasiyetleri ve farklılıkları belirlenmiştir. Bu ELISA kitinin S1 proteine bağlanacak şekilde tasarlandığı ve hastalığın seyrinde IgA'ya ait sonuçların anlamlı şekilde kit ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (35). Önerilen farklı parametrelerin hastalık seyri için değerlendirilmesi SARS-CoV2 serolojik testlerin enfeksiyon takibindeki özgünlüğü için önem taşıyacağı unutulmamalıdır.

SARS-CoV2 serolojik testlerine ek olarak hassasiyeti daha yüksek olacağı düşünülen farklı testler (örneğin; GICA ("Colloidal Gold Immunochromatographic Assay Kit") de önerilmektedir. Xiang ve ark. 63 COVID-19 pozitif hasta örneğini, önce IgG/IgM antikorları içeren ELISA ile test etmiş ve IgG için %82, IgM için %64 doğruluk ile kit hassasiyetinin %87 civarında olduğunu iletilmiştir. Aynı çalışma kapsamında GICA testi için 91 hasta örneğinin hassasiyet oranını IgG için %81 ve IgM için %57 ve doğruluk oranının %82 civarında olduğu gösterilmiştir. ELISA ile aralarında anlamlı fark gözlenmediği ve GICA olarak önerilen kitin kullanılabilceğini bildirmişlerdir (36). Diğer bir test, altın nanopartikül ile reseptör bağlanma motifi içeren S proteinine bağlı antijenin kullanıldığı bir testtir. Hali hazırda geniş spektrumlu antibiyotik ve RNA inhibitör tedavisi gören hastalarda (n=10) uygulanmış bu testin, enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde (15-30. gün) değerlendirildiği ve hastalığın mortalitesine ilişkin net bir öngörü

sağlamadığı iletilmiştir (37). Hızlı testlerin geliştirilmesinin özellikle asemptomatik hastaların taranmasında önem taşıyacağı belirtilmekle beraber, hastanın teşhis ya da tedaviye verdiği/vereceği yanıtın öngörülmesinde etkin olup olmayacağına dair yeterli veri henüz bulunmamaktadır.

Strip (=LIA (“line-immunoassay”) testler; membran temelli yatay (“lateral flow”) veya dikey (“vertical flow”) immunokromatografik sistem şeklinde uygulanmaktadır (38,39). Ticari olarak bulunan serolojik strip testlerinde, serum/idrar örneği özelleşmiş bir membrana bırakılır. Yatay sistemde antijen için iki alan hazırlanmıştır. İlk alanda altın-nanopartikül-antikor konjugatı ve ikinci alanda “capture” antikör bağlıdır. Örnek yatay sisteme konulmasıyla ilk altın-nanopartikül-antikör konjuge sistemine sonra oluşan kompleks, “capture” antikora bağlanır ve gözle görülebilen renk oluşumu sağlanır. Test kitlerinde; ilk çizgi, örneğin nanopartiküle bağlanması sırasında gözlenir ve ikinci çizgi ise antijen ile bağlanan nanopartikülün “capture” antikora bağlanması sonrasında oluşur. Test pozitif ise çift çizgi gözlenecektir. Bugüne kadar geliştirilen strip testleri IgG ve IgM tipi antikörler için farklı hassasiyet, doğruluk ve özgünlük ile bildirilmiştir. Bu nedenle özellikle viral

testler için geliştirilen ve geliştirilmekte olan strip testleri, IgG/IgM bir arada olacak şekilde tasarlanmaktadır (7). Bunların dışında bildirilen ve protein temelli olmayan fakat strip yaklaşımını kullanan bir test tipi daha mevcuttur. MERS-CoV için 2018 yılında tasarlanan RT-LAMP-VF (“Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique and a Vertical Flow Visualization Strip”) testidir (40). Teşhis hedefli önerilen ve SARS-CoV2 için geliştirilmekte olan serolojik test tipleri Tablo 2’de özetlenmiştir.

## SONUÇ

SARS-CoV2 tanı ve tedavi sürecine ait yaklaşımlara ilişkin bilgiler hızla değişmekte ve sayısı artmaktadır. Hastalığın yayılma sürecinin; teşhis edilme hızından daha çabuk oluşu serolojik yönden tarama aşamasının, yavaş ilerlediğini düşündürmektedir. Fakat serolojik testlerin optimizasyonu ve standardizasyonu için zaman gerekmektedir. Üretildiği bildirilen kitlerle ilgili farklı hassasiyet ve doğrulukların bildirilmesi yerinde bir yaklaşım olmakla birlikte, daha fazla hastanın bu testler kapsamında değerlendirilmesi, bu teknolojinin optimize olmasını destekleyecektir. Klinik viroloji laboratuvarları, verilerin

**Tablo 2.** SARS-CoV2 için geliştirilme aşamasında olan serolojik tanı testleri

Kullanılan Teknoloji	Çalışılmış Örnek Sayısı*	Çalışılmış Örnek Tipi	Test Stratejisi	Ref.π
ELISA	96	Kan	Mikro-akışkan kaset tipi ELISA	(41)
ELISA	30	Serum	Kalorimetrik standart ELISA	(42)
Dijital ELISA	30	Serum	Dijital olarak elde edilen sayısal veri ile değerlendirilen ELISA	(43)
GICA	126	Serum	Colloidal altın kaplı, antikör kullanılarak uygulanan dikey tip strip testi	(36)
Manyetik biosensör	12	Serum	Hedeflenen protein molekülünün manyetik olarak ayrılması	(44)
Strip Test	117	Serum	Altın kaplı antikör sisteminin kolorimetrik değerlendirilmesi ile uygulanan membran bazlı yatay tip strip testi	(45)
DNA-eşlikli immunoassay	18	Serum	İndirekt olarak proteinin, DNA-altın nanopartikül konjugasyonu ile hedefin belirlenmesi	(46)
WB ve IFA	1	Hücre hattı	Hasta örneğinden elde edilen viral proteinin hücre hattına aktarılması ve lizatlarda S, N ve E proteinlerine bağlanan antikörler kullanarak belirlenmesi	(28)

\*Çalışılmış örnek sayısı olarak 20 Nisan 2020 tarihine kadar olan çalışmalar ve örnek sayıları dahil edilmiştir. π; Referanslar test tekniğinin stratejisini ilk öneren çalışma açısından belirtilmiştir. Tekniğe yapılan atıf SARS-CoV2 pozitif örnek sayısı açısından değişkenlik gösterebilir.

değerlendirilmesi ve takip edilmesi gibi aşamalar için olgu sayısı arttıkça kılavuzlar geliştirebilecektir. Böylece serolojik test sistemlerinin otomasyonu ile aynı süreçte gelişme kaydedilebilecektir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- B.G.; Veri Toplama- B.G.; Veri Analizi/Yorumlama- B.G.; Yazı Taslağı- B.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- B.G.; Son Onay ve Sorumluluk- B.G.; Malzeme ve Teknik Destek- B.G.; Süpervizyon- B.G.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- B.G.; Data Acquisition- B.G.; Data Analysis/ Interpretation- B.G.; Drafting Manuscript- B.G.; Critical Revision of Manuscript- B.G.; Final Approval and Accountability- B.G.; Technical or Material Support- B.G.; Supervision- B.G.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

#### KAYNAKLAR

- Xia D WD, Preas C, Schnurr D. Serologic (Antibody Detection) Methods. In: Loeffelholz M HR, Young S, Pinsky B, editor. *Clinical Virology Manual*. 50 ed. Washington, DC: ASM Press; 2016. p. 105-16.
- Avivar C. Strategies for the successful implementation of viral laboratory automation. *Open Virol J*. 2012;6:115-21.
- EA JA, Jones IM. Membrane binding proteins of coronaviruses. *Future Virol*. 2019;14(4):275-86.
- Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol*. 2020.
- Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):747-56.
- Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*. 2020;11(1):1620.
- Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020.
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020.
- Iacobellis G. COVID-19 and diabetes: Can DPP4 inhibition play a role? *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2020;162.
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
- Qian Z, Dominguez SR, Holmes KV. Role of the spike glycoprotein of human Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in virus entry and syncytia formation. *PLoS One*. 2013;8(10):e76469.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-80 e8.
- Li W, Zhang C, Sui J, Kuhn JH, Moore MJ, Luo S, et al. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J*. 2005;24(8):1634-43.
- Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. *Isr Med Assoc J*. 2020;22(4):203-10.

15. Stertz S, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martinez-Sobrido L, Garcia-Sastre A, et al. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology*. 2007;361(2):304-15.
16. Cong Y, Ulasli M, Schepers H, Mauthe M, V'Kovski P, Kriegenburg F, et al. Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *J Virol*. 2020;94(4).
17. Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Musella V, Britti D, Bonizzi L, et al. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. *Microbes Infect*. 2020.
18. Klimpel GR. Immune Defenses. In: th, Baron S, editors. *Medical Microbiology*. Galveston (TX)1996.
19. Basile AJ, Horiuchi K, Panella AJ, Laven J, Kosoy O, Lanciotti RS, et al. Multiplex Microsphere Immunoassays for the Detection of IgM and IgG to Arboviral Diseases. *PLOS ONE*. 2013;8(9):e75670.
20. Mukherjee S, Dowd KA, Manhart CJ, Ledgerwood JE, Durbin AP, Whitehead SS, et al. Mechanism and significance of cell type-dependent neutralization of flaviviruses. *J Virol*. 2014;88(13):7210-20.
21. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. *Cell Host Microbe*. 2008;4(3):229-38.
22. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmaier S, Nguyen T, Chromikova V, McMahon M, et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *medRxiv* April 16, 2020. DOI:10.1101/2020.03.17.20037713
23. Woelfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Mueller MA, et al. Clinical presentation and virological assessment of hospitalized cases of coronavirus disease 2019 in a travel-associated transmission cluster. *medRxiv*. March 08,2020: DOI: 10.1101/2020.03.05.20030502
24. Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol*. 2014;1161:11-25.
25. Nisreen MAO, Ivy W, Wentao L, Corine HG, Elmoubasher ABAF, Mohammed A-H, et al. Serologic Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Functional Antibodies. *Emerging Infectious Disease journal*. 2020;26(5):1024.
26. Wu HS, Chiu SC, Tseng TC, Lin SF, Lin JH, Hsu YH, et al. Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(2):304-10.
27. Alexander TS. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(4):249-53.
28. Haveri A, Smura T, Kuivanen S, Osterlund P, Hepojoki J, Ikonen N, et al. Serological and molecular findings during SARS-CoV-2 infection: the first case study in Finland, January to February 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(11).
29. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):386-9.
30. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, Tam AR, Wu T-C, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. March 23, 2020. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
31. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. pii: ciaa344. doi: 10.1093/cid/ciaa344. [Epub ahead of print]



32. Health BSoP. Serology testing for COVID-19: Johns Hopkins Center for Health Security; 02/28/2020 [updated 02/21/2020. Available from: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200228-Serology-testing-COVID.pdf>.
33. Lv H, Wu NC, Tsang OT-Y, Yuan M, Perera RAPM, Leung WS, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. *bioRxiv*. March 17, 2020; DOI:2020.03.15.993097.
34. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. February 28, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032
35. Nisreen MAO, Marcel AM, Wentao L, Chunyan W, Corine HG, Victor MC, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerging Infectious Disease journal*. 2020;26(7).
36. Xiang J, Yan M, Li H, Liu T, Lin C, Huang S, et al. Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold- Immunochromatographic Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19). *medRxiv Marc 01, 2020*. DOI:2020.02.27.20028787.
37. Xu Y. Dynamic profile of severe or critical COVID-19 cases. *medRxiv*. March 20, 2020. DOI:2020.03.18.20038513.
38. Maclachlan D, Vogt P, Wu X, Rose L, Tyndall A, Hasler P. [Comparison between line immunoassay (LIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of antibodies to extractable nuclear antigens (ENA) with reference to other laboratory results and clinical features]. *Z Rheumatol*. 2002; 61(5): 534-44.
39. Schüpbach J, Bisset LR, Regenass S, Bürgisser P, Gorgievski M, Steffen I, et al. High specificity of line-immunoassay based algorithms for recent HIV-1 infection independent of viral subtype and stage of disease. *BMC Infectious Diseases*. 2011;11(1):254.
40. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J, et al. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV. *Front Microbiol*. 2018;9:1101.
41. Laksanasopin T, Guo TW, Nayak S, Sridhara AA, Xie S, Olowookere OO, et al. A smartphone dongle for diagnosis of infectious diseases at the point of care. *Science Translational Medicine*. 2015;7(273):273re1.
42. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, Lim W, et al. Detection of Antibody to Avian Influenza A (H5N1) Virus in Human Serum by Using a Combination of Serologic Assays. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 937.
43. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol* 2010;28(6):595-9.
44. Aytur T, Foley J, Anwar M, Boser B, Harris E, Beatty PR. A novel magnetic bead bioassay platform using a microchip-based sensor for infectious disease diagnosis. *J Immunol Methods*. 2006;314(1):21-9.
45. Bosch I, de Puig H, Hiley M, Carré-Camps M, Perdomo-Celis F, Narváez CF, et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Sci Transl Med* 2017;9(409): eaa1589.
46. Thaxton CS, Elghanian R, Thomas AD, Stoeva SI, Lee J-S, Smith ND, et al. Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines “undetectable” PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(44):18437-42.