



COVID-19 Tanısı: Serolojik ve Moleküler Testler

COVID-19 Diagnosis: Serological and Molecular Tests

Elif Seren Tanriverdi¹, Yusuf Yakupoğulları¹, Barış Otlu¹

¹İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Turkey

ABSTRACT

Since the beginning of 2020, millions of people have been caught in the COVID-19 disease and died due to the SARS-CoV-2 pandemic. Early detection of positive persons is critical in controlling the virus spread. Therefore, laboratory methods that are fast, accurate and capable of screening a large number of patients were required. For this purpose, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of molecular and serological tests in routine clinical diagnosis. Real-time PCR has become the most used test method due to its high sensitivity and specificity, its ability to result in a few hours, to show viral load and to run tests from many different clinical samples. The efficiency of serological tests in the diagnosis of COVID-19 remained low due to the variable and late antibody response of the patients to the virus. Although the routine clinical diagnosis has not yet been made, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), CRISPR and Sequencing methods have potentials for use in the diagnosis of SARS-CoV-2. In this review, the tests used in SARS-CoV-2 laboratory diagnosis, and the advantages and limitations of these test methods are summarized in the light of the available data and offered to use of medical professionals.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, serology, antibody.

ÖZET

İki bin yirmi yılı başından beri SARS-CoV-2 pandemisi nedeniyle milyonlarca insan COVID-19 hastalığına yakalanmış ve hayatını kaybetmiştir. Pozitif kişilerin erken tespiti, virüs yayılımını kontrol etmede kritik öneme sahiptir. Dolayısı ile hızlı, doğru ve aynı anda çok sayıda hastayı tarayabilecek tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bu amaçla moleküler ve serolojik testlerin rutin klinik tanıda kullanımını önermiştir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi; yüksek duyarlılık ve özgüllük ile birkaç saatte sonuçlanma, viral yükü gösterebilme ve birçok farklı klinik numuneden testin çalışabilmesi gibi özellikleri nedeniyle en çok kullanılan test yöntemi durumuna gelmiştir. Hastaların virüse karşı antikor cevabının değişken ve geç olması nedenleriyle COVID-19 tanısında serolojik testlerin etkinliği düşük kalmıştır. Her ne kadar rutin klinik tanıya henüz geçmemiş olsa da Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), CRISPR ve Dizileme yöntemlerinin SARS-CoV-2 tanısında kullanım potansiyeli görülmektedir. Bu derlemede, SARS-CoV-2 laboratuvar tanısında kullanılan testler; bu testlerin sunduğu avantaj ve sınırlılıklar mevcut veriler ışığında özetlenerek tıp uzmanlarının kullanımına sunulması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-PCR, seroloji, antikor.

Giriş

Koronavirüsler (CoV), *Nidovirales* takımı içinde sınıflandırılan, 90-130 nm çapında ve zarflı virion yapısına sahip virüslerdir. Pozitif polariteli ve helikal simetrik RNA genom, bilinen en uzun RNA genom (30 Kb) olma özelliğini taşımaktadır. Koronavirüsler, doğada birçok hayvanı rezervuar veya ara konak olarak kullanmaktadır. İlk olarak 1950'li yıllarda tanımlanmış olan Koronavirüsler; alfa, beta, delta ve gama gruplarına ayrılmaktadır. İki bin iki yılına kadar hepsi alfa grubundan olmak üzere iki insan patojeni (HCoV-229E ve HCoV-OC43) saptanmış olup bu türler insanlarda kendi kendini sınırlandıran hafif üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmuştur¹.

Ancak Kasım 2002'de Çin'in güney bölgelerindeki Guangdong eyaletinde ortaya çıkan Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) virüsü yaklaşık 8000 kişiyi enfekte ederek 778 kişinin ölümüne sebep olmuştur². Yapılan çalışmalarda bu virüsün Koronavirüs ailesinin beta grubunda bulunduğu ve yarasalardan insanlara bulaştığı saptanmıştır. Hastaların klinik özelliklerine bakıldığında, alfa Koronavirüslerinin aksine ortaya çıkan bu yeni patojenin alt solunum yollarında etkili tutulum yaptığı ve gastrointestinal sistem başta olmak üzere



vücutta birçok organ ve dokuda enfeksiyona neden olduğu görülmüştür³. Bu salgın 2003 yılı itibariyle sonlanmış ve mevcut bilgilere göre başka yeni bir SARS enfeksiyonu saptanmamıştır.

Bu tarihten sonra 2004 ve 2005 yıllarında insanda hastalık oluşturabilen iki yeni alfa Koronavirüs türü (HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1) daha tespit edilmiş; ancak bu türlerin klinik önemi hafif enfeksiyon tabloları oluşturmaları nedeniyle düşük kalmıştır¹.

Ardından 2012 yılında Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS), Suudi Arabistan'da şiddetli pnömoni hastalığı olan olgularda tespit edilmiştir. MERS-CoV, 2266 kişiyi enfekte ederek 804 kişinin ölümüne yol açmış ve halk sağlığı açısından önemli bir tehdit durumuna gelmiştir⁴. Ancak, MERS CoV dünyada yayılım göstermemiş, devamlı surette Arap Yarımadası'nda sınırlı kalmıştır. Önce SARS-CoV ve daha sonra MERS-CoV türleri, koronavirüslerin insanlarda çok hızlı yayılım ve ölümcül hastalığa neden olma potansiyelini tüm dünyaya göstermiştir.

SARS-CoV ve MERS-CoV'un ardından Aralık 2019'da Çin'in Wuhan eyaletinde deniz ürünleri ve canlı hayvan pazarında çalışan kişilerde etiolojisi bilinmeyen pnömoni vakaları tespit edilmiş ve hastalığın etkeninin yeni bir CoV türü olduğu 7 Ocak 2020'de anlaşılmıştır. Ardından virüsün tüm genom dizisi Küresel İnfluenza Verilerini Paylaşma Girişimi (Global Initiative on Sharing All Influenza Data-GISAID) tarafından hazırlanan viral sekans veritabanında 12 Ocak 2020'de paylaşılmış ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2019 yeni koronavirüs (2019-nCoV) olarak tanımlanmıştır. Çin dışındaki ilk olgular Tayland ve Japonya'da saptanmış ve virüs birkaç hafta içinde kıtalar arası yayılım göstermiştir. On bir Şubat 2020'de, virüsün neden olduğu hastalık Koronavirüs Hastalığı-2019 (COVID-19); etkeni ise "Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2" (SARS-CoV-2) olarak güncellenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü hızla yayılım gösteren bu virüs için 11 Mart 2020'de "pandemi" ilanı yapmıştır⁵.

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 20 Kasım 2020 tarihi itibariyle dünya çapında 56.261.952 kişinin COVID-19 hastalığına yakalandığı ve bunlardan 1.349.506 kişinin hayatını kaybettiği saptanmıştır⁶. Ülkemizde ilk COVID-19 olgusu 11 Mart 2020 tarihinde yüksek ateş ve öksürük ile başvuran Avrupa'ya seyahat öyküsü olan bir erkek hastada saptanmıştır. Takip eden aylarda salgın ülkemizde de yayılım göstermiş olup bu güne kadar 157.756 kişinin enfekte olmasına ve 123 kişinin hayatını kaybetmesine neden olmuştur⁷. Virüsün toplumda hızlı yayılımı, fiziksel ortamlarda uzun süre enfektivitesini koruması ve pozitif birçok kişide önemli klinik semptomlar oluşturmaması nedeniyle pandeminin kontrolünde halen büyük sorunlar yaşanmaktadır.

Bir salgının kontrol altına alınmasında en önemli husus, hastaların ve taşıyıcıların hızlı, etkili ve doğru olarak saptanarak onların izolasyon veya karantina altına alınması ve toplumun geri kalan kısmı ile ilişkilerinin engellenerek patojenin başka insanlara yayılımının durdurulmasıdır. Dolayısı ile COVID-19 pandemisinde tüm dünyada aniden ve yüksek sayıda test gereksinimi doğmuştur. Bu noktada, bir pandemi ile mücadele edebilme özelliği taşıyan testler en temel gereksinim haline gelmiştir.

Bu derlemede, COVID-19 pandemisi başladığından itibaren kullanılmakta olan tanı testlerinden moleküler ve serolojik esaslı testlerin özellikleri, sundukları avantaj ve dezavantajları hakkında bilimsel literatüre yansımış veriler toplanarak klinik tanı ve tedavi ile ilgilenen tıp profesyonellerinin değerlendirmesine sunulmuştur. Ayrıca, kullanılmakta olan bu test yöntemlerinin pandemi koşullarında etkili kullanımı için bazı önerilerde bulunulmuştur.

Pandemi Koşullarında Kullanılabilecek İdeal Bir Tanı Testinin Özellikleri

Salgınlar; bir çevrede, bir sağlık kurumunda veya bir yerleşim yerinde görülebilen aniden ortaya çıkan artmış hasta yüküne neden olan yayılımlardır. Bu koşullarda hastaların hızlı tanı ve tedavisinin yapılması ve salgına neden olan unsurların hızla belirlenerek bertaraf edilmesi başlıca öncelikler haline gelmektedir. Dünya çapında oluşan yayılımlar ise pandemi olarak adlandırılmaktadır ki belirtilen bu eylemlerin global düzeyde uygulanmasını gerekli kılar.

COVID-19 pandemisi, insanlık tarihinin görmüş olduğu en ciddi sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Geçmişte yaşanan salgınlar ve devam eden COVID-19 pandemisinde edinilen deneyimlere göre; hızlı

yayılım gösteren viral bir patojen için ideal bir tanı testinin sahip olması gereken özellikler bulunmaktadır. Bu özellikler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Pandemi ile mücadelede kullanılacak tanı testlerinde beklenen özellikler

Özellik	Beklenen Amaç	Beklenen Yarar
Doğru ve Güvenilir Sonuç	Yüksek duyarlılık ve özgüllük Hastaların etkili tespiti ve hasta olmayan kişilerin doğru ve güvenilir düzeyde ayrıştırılması	Salgın ile mücadelenin temel gereksinimi olan pozitif kişilerin doğru saptanması, onların tedavi ve izolasyon süreçlerine alınması; böylelikle patojenin toplumda yayılım hızının ve neden olduğu yıkıcı etkilerin sınırlandırılması
Hızlı Sonuç	Dakikalar veya birkaç saatlik süre içinde testin sonuçlanması	Birim zaman içinde çok fazla sayıda kişinin taranarak önleyici girişimlerin ivedi olarak uygulanmasına olanak tanınması
Kolay Uygulama	Test sisteminin gereksinim olan yerlere hızlı kurulumu, Deneyimli personel gerektirmemesi, Düşük sarf malzemesi tüketimi, Kompleks mimari ve altyapı koşulları gerektirmemesi	En küçük yerleşim bölgelerine kolay ulaşılabilir tanı merkezi sağlanarak bütüncül pandemi mücadelesine destek verilmesine katkı sunacaktır. Pandemi koşullarında artan iş yüküne karşın sağlık personeli sayısı oldukça kısıtlıdır. Testin kolay kullanım özelliği; temel düzeyde teknik bilgisi olabilen kişilerin testi opere etmesine veya bireylerin kendi kendine testlerini yapabilmesi olanak tanıyacaktır
Düşük Maliyet	Kısıtlı ekonomik kaynaklar sonucu etkili tanıdan mahrum kalmasının engellenmesi	Ülkelerin ve bireylerin pandemi koşullarında bozulan ekonomik durumlarının üstüne pahalı olabilecek test maliyetlerinin binmesi tanıya ulaşımı zorlaştıracaktır. Bu durum, global bir pandemi mücadelesinde zafiyet oluşturacaktır. Ucuz test maliyeti, etkili tanının toplumda yaygınlaştırılmasının temel gereksinimidir.

COVID-19 Hastalığı Seyrinde Kullanılabilecek Tanı Testleri

Günümüze kadar edinilen bilgilere göre SARS-CoV-2 virüsü insanlara temelde solunum yolu ile bulaşmakta, öncelikle nazofarinks ve gastrointestinal sistemde kolonize olmakta ve daha sonra akciğer tutulumuna yol açmaktadır⁸. Lauer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre virüsün bulaşmasından klinik semptomların ortaya çıkışına kadar 2,1 ila 11,1 günlük bir inkübasyon süresi geçmektedir⁹. Hastaların çok büyük bir kısmı klinik semptomlar çıktıktan sonra test yapılması için doktora başvurmaktadır. Bunun dışında henüz klinik semptomu olmayan kişiler genellikle temas taraması-filyasyon çalışmaları esnasında test için numune vermektedirler. Hastalar pozitif olarak belirlendikten sonra gerekli ise tedavileri başlanmakta ve iyileşme durumlarının saptanması için hastalık semptomlarının kaybolması sonrası kontrol testi vermektedirler. COVID-19 hastalığı sürecinde kullanılabilecek tanı testleri ve klinik yaklaşımlar Şekil 1’de gösterilmiştir.

Temas-İnkübasyon	Klinik Hastalık	İyileşme
Moleküler Testler ¹ RT-PCR Dizileme	Klinik Bulgular Ateş, kas-eklem ağrısı, öksürük, nefes darlığı, sensori-nöral bulgular Radyoloji BT ² , Akciğer filmi Moleküler testler RT-PCR, CRISPR, Dizileme Serolojik Testler ³ SARS-CoV-2 IgM ve IgG Akut Faz Reaktanları CRP, IL-6, Sedimantasyon Biyokimyasal Testler Ferritin, KCFT Kan Sayımı WBC, Lenfosit, Platelet sayısı Koagülasyon testleri	Klinik bulguların kaybolması + Moleküler testler RT-PCR, CRISPR, Dizileme Serolojik Testler SARS-CoV-2 IgM ve IgG Radyoloji BT ² , Akciğer filmi + Biyokimyasal ve hematolojik testlerin normalleşmesi

¹Temas sonrası 3-4. gün pozitif sonuç; ²BT: Bilgisayarlı tomografi; ³Serolojik testler semptomların çıkmasından bir hafta sonra pozitif olmaya başlar.

Şekil 1. COVID-19 hastalık sürecinde kullanılabilir tanı yöntemleri ve klinik bulgular. Hastalığın her üç döneminde de RT-PCR yöntemi kullanım alanı bulunmakta ve hastalığın süreci hakkında önemli veriler sunmaktadır. Antikor saptama esaslı testler hastalık sürecinin 10-14. gününden itibaren güvenilir sonuçlar sunmaktadır.

Moleküler Yöntemler

Moleküler testler, semptomatik veya asemptomatik SARS-CoV-2 taşıyıcılarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Şu an için SARS-CoV-2 viral RNA'sının tespiti için geliştirilmiş, Dünya Sağlık Örgütü'nün önerdiği ticarileştirilmiş 319 farklı kit bulunmaktadır¹⁰. Bu testler için temel performans kriteri, yüksek duyarlılığa sahip olmaları ve düşük yalancı negatif sonuç vermeleridir. Sethuraman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada moleküler tanı yöntemlerinin enfekte bireyleri semptomların başlangıcından bir hafta önce belirleyebileceğini ortaya koymuştur¹¹. Bu nedenle moleküler tanı yöntemleri COVID-19'un erken tanısında kullanılabilir tek testtir.

Gerçek Zamanlı RT-PCR

Gerçek zamanlı RT-PCR, balgamda, nazofaringeal veya orofaringeal sürüntülerde, bronkoalveolar lavaj sıvısında, nazal veya nazofaringeal aspiratta ve alt solunum yolu aspiratlarında amplifiye edilmiş SARS-CoV-2 genomunu tespit etmektedir. Farklı üreticiler tarafından çeşitli RNA geni hedefleri kullanılmaktadır. Çoğu test zarf (env), nükleokapsid (N), spike proteini (S), RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ve ORF1 genlerinden en az birini hedeflemektedir. RT-PCR, spesifik genomik sekansın tek bir kopyasını amplifiye ederek tespit edebilir ve bu nedenle son derece duyarlı bir testtir¹². Bununla birlikte gerçek zamanlı RT-PCR, RNA kopyalarının sayısının üssel olarak artması nedeniyle kantitatif bir yöntemdir. Şu anda, COVID-19'un erken teşhisi için kullanılan ticarileştirilmiş testlerin büyük çoğunluğu gerçek zamanlı RT-PCR testlerine dayanmaktadır¹³. Tipik bir RT-PCR testinin sonuçlanması 4-6 saat sürmektedir¹⁴. COVID-19 tanısı için çeşitli gerçek zamanlı RT-PCR protokolleri kullanılmaktadır; bu protokollerin tespit ettikleri gen bölgeleri farklılıklar göstermektedir. COVID-19 tanısı için optimal gerçek zamanlı RT-PCR protokolünün tanımlanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Temel olarak gerçek zamanlı RT-PCR, spesifik SARS-CoV-2 genomik dizisini veya dizilerini amplifiye etmek amacıyla kullanılır. Bu amaçla, öncelikle viral RNA biyolojik örnekten ekstrakte edilir ve saflaştırılır. Saflaştırılmış viral RNA, ters transkriptaz (RNA bağımlı DNA polimeraz enzimi) ile cDNA'ya (komplementer DNA) dönüştürülür. Daha sonra cDNA, PCR ile üç adımda amplifiye edilir: cDNA'nın 95°C'de denatürasyonu, primerlerin ve probun 60°C'de denatüre cDNA ipliklerine bağlanması ve RNA kopyalarının 72°C'de DNA polimeraz tarafından sentezi. Amplifiye edilmiş ürünler, çok sayıda RNA kopyası oluşturmak için aynı döngüyü izler.

Gen hedefine bağlı olarak, sekansa özgü primerler ve çift işaretli bir florojenik prop gerçek zamanlı RT-PCR teşhisinde tasarlanır ve kullanılır. RT-PCR testlerinde kullanılan oligonükleotid proplar genellikle TaqMan probları olarak adlandırılan, 5' ve 3' uçlarına kovalent olarak bağlanmış bir florofor ve bir susturucu (quencher) ile çift işaretli olan proplardır. TaqMan probu, PCR sırasında DNA polimeraz tarafından indirgendığında, florofor salınımı floresans rezonans enerji transferi (FRET) prensibine dayalı bir floresans sinyali ile sonuçlanır¹⁵.

Test sonuçları yorumlanırken hedef genin threshold (Ct) değeri, cut-off Ct değerinden küçük veya eşit ise sonuç pozitif olarak yorumlanır. Genel olarak COVID-19 enfeksiyonunun teşhisi için Ct <40, klinik olarak pozitif kabul edilir.

Bazı protokoller, iki aşamalı algoritma kullanarak iki geni inceler. Bu protokollerde, bir genin identifikasyonu tarama testi olarak kullanılırken, ikinci gen doğrulama testi olarak kullanılır. Buna karşın, üç veya daha fazla geni inceleyen diğer protokollerin sonuçları sadece tüm genler tespit edildiğinde pozitif kabul edilir. Bu protokollerde genlerden biri tespit edilmezse, sonuçlar genellikle belirsiz veya negatif olarak yorumlanır.

Moleküler testler SARS-CoV-2 viral RNA'sının son derece duyarlı şekilde tespitini sağlamaktadır. Ancak bir pandemide kitlelere tanı koymak için kullanıldıklarında, oldukça karmaşık, pahalı ve yavaş testlerdir. Tek bir RT-PCR test kiti 100 USD'den fazla maliyete sahiptir. Analiz süresi 4-6 saattir fakat numunenin alınmasından laboratuvara transferi ve sonuçlanma süresi toplamda 24 saatten fazladır. Dahası, moleküler yöntemler kalifiye laboratuvar personeli ve donanımlı laboratuvarlar gerektirmektedir.

Klinik örneklerden RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR işlemleri iyi laboratuvar uygulamaları ve prosedürleri uyarınca gerçekleştirilmelidir. Örnekler en az sınıf II biyogüvenlik kabinleri içinde ve biyogüvenlik düzey-2 şartlarına sahip laboratuvarlarda çalışılmalıdır. Laboratuvarında testi çalışacak personelin uygun kişisel koruyucu ekipmanları kullanması ve bunların kullanımı konusunda eğitilmiş olması gereklidir.

Bunun yanında uygunsuz örnek alınması, saklanması ya da transferi hatalı RT-PCR sonuçlarına neden olabilir. Swablardan ekstrakte edilen RNA'nın kalitesi de sonuçları etkiler. Saflaştırılmış RNA'nın degradasyonu, RT-PCR inhibitörlerinin varlığı veya genomik mutasyonlar gibi diğer faktörler yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Öte yandan, örneklerin işlenmesi sırasında numunelerin çapraz kontaminasyonu veya teknik hatalar yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Tüm bu istenmeyen durumların olasılığına rağmen, gerçek zamanlı RT-PCR şu anda SARS-CoV-2'nin en erken ve büyük ölçekli tespiti için en doğru ve en duyarlı tanı yöntemidir.

LAMP

Loop Mediated isothermal amplification (LAMP) PCR ilk kez 2000 yılında kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı nedeniyle çeşitli viral hastalıkların tanısında gittikçe popüler bir yöntem haline gelmektedir. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), Japon Ensefalit virüsü, Chikungunya virüsü, insan papillomavirüsü, Dengue virüsü, Batı Nil virüsü ve Kabakulak virüsü, SARS virüsü ve MERS virüsünde tanısal amaçlı kullanılmaktadır. Yüksek duyarlılığa sahip olması, konvansiyonel PCR'a göre daha hızlı olması ve maliyetinin daha az olmasıyla dikkat çekmektedir. COVID-19 pandemisinde de özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve sınırlı kaynaklara sahip laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntem olması yönüyle önem taşımaktadır¹⁶.

LAMP PCR yönteminde temel olarak 4-6 primer kullanılarak, izotermal şartlarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. RNA virüslerini saptamak için ek bir bileşen olarak ısıya dayanıklı bir ters transkriptaz enzimine de ihtiyaç vardır. Yalnızca örnekler ve reaktifler tek bir reaksiyon tüpüne konup ısıtılarak gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. LAMP testi yaklaşık bir saat içinde amplifikasyon yapabilir ve 60-65 °C'de geleneksel PCR'dan genellikle 100 kat daha fazla DNA kopyası üretebilir¹⁷. Bunun yanında, hedef dizilerin amplifikasyonu, başlangıç miktarıyla bağlantılı olarak, reaksiyonun bir yan ürünü olan magnezyum pirofosfatın beyaz çökmesinden kaynaklanan bulanıklığın basit bir görsel incelemesi ile değerlendirilebilir.

LAMP teknolojisindeki son gelişmeler, COVID-19 gibi bir pandemide büyük bir hasta popülasyonunun hızlı tanısına yardımcı olacak, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip hedef dizilerin tespit edilmesinde önemli ilerleme kaydedildiğini göstermektedir. Fakat hala önünde bazı zorluklar bulunmaktadır. LAMP tabanlı yöntemler tüm reaksiyonun aynı sıcaklıkta gerçekleşmesi kolaylığını sağlamasına rağmen primer dizaynlarının yapılması oldukça karmaşıktır. Bir başka olası sınırlaması ise, özellikle otomatik bir platforma yükseltildiğinde yanlış pozitif sonuçlar üretebilmesidir.

COVID-19 tanısında RT-LAMP temelli *Point of Care Test* (PoCT)'ler uygulanabilirse modern tanı imkanlarına erişimi olmayan büyük nüfuslar için hayat kurtaran bir yöntem olacaktır. Bunun yanında gelişmiş ülkelerin hastalığın yayılmasını kontrol etme mücadelesine büyük ölçüde fayda sağlayacaktır.

CRISPR

Geniş kitleleri hızlı ve duyarlı bir şekilde taramak için geliştirilecek yeni SARS-CoV-2 testlerine olan ihtiyaç devam etmektedir. Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) sistemi, insan örneklerinde Dang virüsü, insan papilloma virüsü ve Zika virüsünün tespiti için moleküler tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, CRISPR-Cas / gRNA komplekslerinin nükleik asitleri hassas bir şekilde tespit etmek için kullanımı son yıllarda yaygınlaşmaktadır¹⁸. COVID-19 tanısında CRISPR tabanlı testlerin kullanımı için ise FDA ilk olarak 6 Mayıs 2020 tarihinde Sherlock Biosciences tarafından geliştirilen bir SARS-CoV-2 testine acil kullanım onayı vermiştir¹⁹.

Sekans Analizi

Sekans analizi, virüs kaynağının belirlenmesi, virüs genomundaki değişikliklerin tanımlanması ve mutasyonların anlaşılması açısından önem taşımaktadır. RT-PCR sonucu şüpheli pozitif olan bir hastanın doğrulaması sekans analiziyle yapılabilmektedir. Bunun yanında COVID-19 tanısında kullandığımız PCR primer ve prob tasarımının en doğru şekilde yapılabilmesi için sekans analizi yapılması gerekmektedir. Yine SARS-CoV-2 virüsü ile ilgili moleküler, immünolojik ve aşı geliştirme çalışmaları için dünyanın pek çok bölgesinde virüsün sekans analizi yapılmaktadır⁸. Fakat yüksek maliyet, uzun zaman gerektirmesi, deneyimli personel ile yoğun iş yüküne neden olması, biyoinformatik analizlerin hala istenen düzeyde gelişmemiş olması gibi sebepler nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır. Wang ve arkadaşları NCBI ve GISAID veri tabanlarından temin ettikleri SARS - CoV - 2 genomik sekanslarını analiz ederek bu virüs için referans sekans oluşturmuştur. Yaptıkları çalışmada tam uzunluktaki genomik sekanslar arasındaki genel homolojinin% 99.99 (% 99.91 -% 100) olduğunu ve 15 (% 15.79) klinik izolatin referans suş ile aynı olduğunu göstermişlerdir²⁰.

Serolojik Yöntemler

Serolojik testler, genel popülasyonda virüsün bulaşma dinamiğini anlamak gibi sürveyans ve epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir araçtır. Akut enfekte kişileri tespit edebilen nükleik asit amplifikasyonu testleri gibi doğrudan viral tespit yöntemlerinin aksine, antikor testleri, test edilen kişinin hiç semptom göstermemiş olsa bile daha önce enfekte olup olmadığını belirlemeye yardımcı olur²¹. Yapılan çalışmalar COVID-19'un serolojik tanısında Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) tabanlı IgM ve IgG antikor testlerinin yüksek özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir. Koronavirüs spike (S) ve nükleokapsid (N) proteinlerinden sorumlu antikorların (IgM ve IgG) konsantrasyonunu tespit etmek için, ELISA ve kemilüminesans yöntemleri geliştirilmiştir. Ek olarak, S proteini boyunca yer alan reseptör bağlanma alanı (RBD), SARS-CoV-2'ye özgü antikorların varlığını tespit etmek için ilgililenen bir hedefdir²².

ELISA, doğrudan veya dolaylı olarak örneklerde ilgili antijen veya antikoru tespit etmek için kullanılan hassas bir yöntemdir. Doğrudan yöntemde, enzime bağlı bir antikor doğrudan numunedeki antijeni belirler. Dolaylı yöntemde, bir mikroplyet üzerine kaplanmış bir antijene bağlanmak için bir birincil antikor kullanılır. Daha sonra birincil antikoru saptamak için ikincil enzim etiketli antikor uygulanır. SARS-CoV-2'ye karşı oluşan IgM, IgA ve IgG antikorlarını tespit etmek amacıyla kaplama antijenleri olarak saflaştırılmış rekombinant N proteinleri kullanılmaktadır.

Sethuraman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bağışıklık yanıtı antikorlarının tespiti için bir zaman çizelgesi yayınlamış; SARS-CoV-2 spesifik antikorların yalnızca 8 gün sonra tespit edilebileceğini ortaya koymuştur¹¹. Yapılan başka bir çalışmada ise hem anti-SARS-CoV-2-IgM hem de IgG seviyelerinin enfeksiyon aşamaları ile birlikte kademeli olarak arttığı ve IgM'nin 3 gün, IgG'nin ise 4 gün kadar erken tespit edildiğini belirtmiştir²³. Xiao ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise, SARS-CoV-2'ye özgü IgM'nin 1 ay sonra serumda hala mevcut olduğunu bildirmiştir²⁴.

SARS-CoV ve MERS-CoV için bildirilene benzer şekilde, SARS-CoV-2'ye bağlı enfeksiyonu olan hastalarda hastalığın şiddeti ile IgM ve IgG antikorlarının yüksekliği ilişkili görünmektedir²⁵. Farklı olarak SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında baskın IgG alt tipi, İnfluenza gibi diğer grip benzeri enfeksiyonların aksine, IgG1 yerine IgG3 olarak görünmektedir²⁶.

Sonuç

Bu derlemede, SARS-CoV-2 laboratuvar tanısında kullanılan genel olarak iki kategoriye ayrılabilen testleri değerlendirdik: viral nükleik asit tespitine dayanan moleküler testler ve serolojik testler. Nükleik asit tespiti için en sık kullanılan test RT-PCR testidir. Ayrıca, SARS-CoV-2'ye karşı genel bağışıklığı ölçmek için SARS-CoV-2'ye özgü IgG ve IgM antikorlarının tespit edildiği serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik yöntemlerden en yaygın olanı ELISA yoluyla antikor tespitidir. Serolojik testler aynı zamanda bir popülasyonda sürü bağışıklığına ulaşıp ulaşılmadığını belirlemek için de önemlidir. Hastalığın laboratuvar tanısındaki gelişmeler, nükleik asit ve antikor/antijen analizlerinde kantitatif test yaklaşımlarını beraberinde

getirecektir. COVID-19 hastalığı hakkında her geçen gün daha fazla şey öğrendiğimiz için, hastalığın laboratuvar tanısında hızlı gelişmeler olacağını düşünüyoruz.

Kaynaklar

1. Tanrıverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlu B. COVID-19 etkeninin özellikleri. In: Mikrobiyoloji ve COVID-19, 1nd ed (Çiçek C) : 7-14. Ankara, Türkiye Klinikleri. 2020.
2. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. *Advances in virus research*. Vol 81: Elsevier. 2011:85-164.
3. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P et al. Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology*. 2020;92:424-432.
4. Dawson P, Malik MR, Parvez F, Morse SS. What have we learned about Middle East respiratory syndrome coronavirus emergence in humans? A systematic literature review. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2019;19(3):174-192.
5. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research*. 2020;7(1):1-10.
6. World Health Organization (WHO). Available from: [who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019). Accessed 20.11.2020.
7. T.C. Sağlık Bakanlığı. Available from: <https://covid19.saglik.gov.tr/>. Accessed 20.11.2020.
8. Otlu B, Tanrıverdi ES, Fadhilah A, Yakupoğulları Y. Laboratory Diagnosis of COVID-19. In: *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Turkey Perspective*, 1nd ed (Eds Taşova Y, Çelen MK): 29-40. Ankara, Hipokrat Yayıncılık. 2020.
9. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Annals of internal medicine*. 2020;172(9):577-582.
10. Foundation for Innovative New Diagnostics (FINDDX). Available from: https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?avance=Commercialized&type=all&test_target=RNA&status=all§ion=show-all&action=default. Accessed. 20.11.2020.
11. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *Jama*. 2020.
12. Artika IM, Wiyatno A, Ma'roof CN. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;81:104215.
13. Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020;12(6):582.
14. Sheridan C. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol*. 2020;10.
15. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988;85(23):8790-8794.
16. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T et al. Loop-mediated isothermal amplification (Lamp): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of covid-19 pandemic. *Biology*. 2020;9(8):182.
17. Zhang S-Q, Tan B, Li P, Wang F-X, Guo L, Yang Y et al. Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhoea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches. *Journal of virological methods*. 2014;207:204-209.
18. Chertow DS. Next-generation diagnostics with CRISPR. *Science*. 2018;360(6387):381-382.
19. Javalkote VS, Kancharla N, Bhadra B, Shukla M, Soni B, Sapre A et al. CRISPR-Based Assays for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Preprints*. 2020.
20. Wang C, Liu Z, Chen Z, Huang X, Xu M, He T et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of medical virology*. 2020;92(6):667-674.
21. Ravi N, Cortade DL, Ng E, Wang SX. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;165:112454.
22. Lee CY-P, Lin RT, Renia L, Ng LF. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:879.
23. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Song Y, Feng F, Qiu Y et al. Immune phenotyping based on the neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG level predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *Frontiers in molecular biosciences*. 2020;7:157.
24. Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: the first report. *The Journal of infection*. 2020.
25. Lee N, Chan P, Ip M, Wong E, Ho J, Ho C et al. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome. *Journal of clinical virology*. 2006;35(2):179-184.
26. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen TH, Chromikova V, McMahon M et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature medicine*. 2020:1-4.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Barış Otlu
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Malatya, Turkey
e-mail: baris.otlu@inonu.edu.tr

Geliş tarihi/ Received: 02.11.2020

Kabul tarihi/Accepted: 17.11.2020