

SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNUN MİKROBİYOLOJİK TANISI

MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF SARS-COV-2 INFECTION

Mümtaz Cem ŞİRİN¹, Emel SESLİ ÇETİN¹, Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye

Cite this article as: Şirin MC, Sesli Çetin E, Cicioğlu Arıdoğan B. Microbiological Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection. Med J SDU 2021; (özelsayı-1):137-145.

Öz

Aralık 2019'da Çin'den başlayarak çok kısa bir süre içerisinde tüm dünyayı etkisi altına alan Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemisi, bugüne kadar görülen en ciddi küresel sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Bu süreçte, zamanında ve doğru uygulanan mikrobiyolojik tanı testleri, salgının ve vaka yönetiminin önemli bir parçası olmuştur. Pandeminin başlangıcından itibaren solunum yolu örneklerinde "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)" RNA'sını saptamaya yönelik olarak geliştirilen gerçek zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), en yaygın kullanılan tanı yöntemidir. RT-PCR ile virüs RNA'sının gösterilmesi COVID-19 hastalığının kesin tanısını sağlamakla birlikte negatif test sonucu enfeksiyon olasılığını dışlamaz. Klinik şüpheli olgularda 24-48 saat arayla tekrarlayan örneklerin alınması ve ciddi akciğer bulguları olan hastalarda tanı için alt solunum yolu örneklerinin tercih edilmesi gereklidir. Düşük maliyetli, uygulanması kolay ve hızlı sonuç alınabilen antijen testlerinin kullanımı, viral yükün yüksek olduğu hastalığın akut evresi ile sınırlıdır. Duyarlılık ve özgüllük sorunlarından dolayı antijen testleriyle elde edilen sonuçların RT-PCR testleri ile doğrulanması gerekir. Antikor testleri, virüs ile karşılaşmış olduğunu gösterir. Hastaların virüse karşı antikor yanıtının değişken ve geç olması nedeniyle antikor testleri, akut dönemde hastalığın tanısında tek başına kullanılmamalıdır. Semptomların başlangıcından 2-3 hafta sonra alınan kan örneklerin-

de çalışılan antikor testleri moleküler tanıya yardımcı ek test olarak kullanılabilir. Bu derlemede, günümüze kadar elde edilen veriler doğrultusunda SARS-CoV-2 enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısında kullanılan yöntemlerin özellikleri, klinik açıdan sağladıkları avantajlar ve kısıtlı yönleri tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, polimeraz zincir reaksiyonu, antijen testi, antikor testi

Abstract

The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pandemic, which began in China in December 2019 and affected the whole world in a very short time, has become one of the most serious global health problems to date. In this process, timely and correctly applied microbiological diagnostic tests have been an important part of the epidemic and case management. Since the beginning of the pandemic, real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), which has been developed to detect "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)" RNA in respiratory tract samples, is the most widely used diagnostic method. The detection of the virus RNA by RT-PCR provides the definitive diagnosis of COVID-19 disease, but a negative test result does not exclude the possibility of infection. In clinically suspicious cases, repeated samples should be taken within 24-48 hours and lower respiratory tract samples should be preferred for diagnosis in pa-

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: drmcemsirin@yahoo.com

Müracaat tarihi/Application Date: 03.04.2021 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 10.04.2021

ORCID IDs of the authors: M.C.Ş. 0000-0002-7349-3438; E.S.Ç. 0000-0001-5231-3824; B.C.A. 0000-0003-0980-2205

tients with severe pulmonary signs. The use of low-cost and easy-to-apply rapid antigen tests is limited to the acute phase of the disease when viral load is high. Due to sensitivity and specificity problems, the antigen test results should be confirmed by RT-PCR tests. Antibody tests indicate the exposure to the virus. Antibody tests should not be used alone in the diagnosis of the disease in acute phase, because the antibody response of the patients against the virus is variable and late. Antibody tests, which are performed

on the blood samples taken 2-3 weeks after the onset of symptoms, can be used as additional tests to aid molecular diagnosis. In this review, the features, clinical advantages and limitations of the methods used in the microbiological diagnosis of SARS-CoV-2 infection are discussed in line with the obtained data to date.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, polymerase chain reaction, antigen test, antibody test

Giriş

Yirmi birinci yüzyılın üçüncü büyük koronavirüs salgını, 2019 yılı sonlarında Çin'in Wuhan şehrinde nedeni bilinmeyen pnömöni olgularının bildirilmesi ile başlamış ve hızla tüm dünyaya yayılmıştır (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), hastalığı Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) olarak tanımlamıştır. Tüm genom sekans analizleri sonucunda hastalığa yol açan etkenin Şiddetli Akut Solunum Sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS) ile ilişkili koronavirüs türleriyle yakın benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV) tarafından etken virüs SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılmıştır (2). Dünya Sağlık Örgütü, hızla yayılım gösteren bu viral hastalık için Türkiye'de de ilk vakanın görüldüğü tarih olan 11 Mart 2020'de pandemi ilan etmiştir (3). Devam eden süreçte tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de vaka sayılarında ciddi artışlar görülmüş ve COVID-19 pandemisi insanlık tarihinin en büyük küresel sorunlarından biri haline gelmiştir. Bu derlemede, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısında kullanılan laboratuvar testleri hakkında bugüne kadar elde edilen bilgilerin aktarılması ve tartışılması amaçlanmıştır.

Virüsün Yapısı ve Genel Özellikleri

Koronavirüsler, Nidovirales takımı Coronaviridae ailesi içerisinde yer alan, helikal simetrik, segmentsiz, pozitif polariteli, tek zincirli RNA genomları olan zarflı virüslerdir. Filogenetik ilişkileri ve sekans analizlerine göre koronavirüsler; alfakoronavirüs, betakoronavirüs, gamakoronavirüs ve deltakoronavirüs olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır (4). Günümüze kadar memelileri ve kanatlıları enfekte edebilen 40'a yakın koronavirüs türü saptanmış olup bunlar arasında en son keşfedilen SARS-CoV-2 dahil yedi türün insanlarda hastalığa yol açtığı belirlenmiştir (2). İnsanlarda genellikle soğuk algınlığı şeklinde hafif seyirli solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan human coronavirus (HCoV) 229E ve HCoV-NL63, alfakoronavirüs cinsi

altında yer alırken; yine solunum yolu enfeksiyonu etkenleri olarak bilinen HCoV-OC43 ve HCoV-HKU1, 2003 yılında tanımlanan ve SARS salgınına yol açan SARS-CoV ve 2012 yılında tanımlanan ve Orta Doğu Solunum Sendromu (Middle East Respiratory Syndrome; MERS)'ndan sorumlu olan MERS-CoV betakoronavirüs cinsinde yer almaktadır. Yeni tanımlanmış olan SARS-CoV-2 ise Coronaviridae ailesinin tipik özelliklerine sahiptir ve betakoronavirüs cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır (4-7).

SARS-CoV-2'nin konak hücrelerindeki replikasyonu, spike (S) proteini aracılığıyla, başta akciğer olmak üzere kalp, böbrek ve ince bağırsak gibi birçok doku ve organda bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (angiotensin-converting enzyme-2; ACE-2) reseptörüne bağlanmasıyla başlar (5,8). RNA virüslerinin çoğunda olduğu gibi, tüm replikasyon döngüsü enfekte edilen hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir. Yaklaşık 30 kilobaz boyutunda olan koronavirüs genomu, bilinen en uzun RNA genomu olma özelliğini taşır, pozitif polariteli olması ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geni sayesinde konak genomuna entegre olmadan kendi viral genomunu doğrudan kalıp olarak kullanarak replike olma yeteneğine sahiptir (4,7). RNA virüslerinin replikasyonunda mutasyon oranı DNA virüslerine kıyasla daha yüksektir. Viral genomun kopyalanması sırasındaki hatalardan dolayı replikasyon sırasında birçok mutasyon meydana gelebilir ve kopyalanan baz miktarı arttıkça hata yapma olasılığı da artar. Oluşan mutasyonlara bağlı olarak antijenik yapıda ve patojenitede değişiklikler meydana gelebilir. Koronavirüslerin nispeten büyük olan genomlarında mutasyonların birikmesi ve oluşan rekombinasyonlar sonucu, farklı hücre tiplerini ve doğada yeni türleri enfekte etme yeteneği kazanan yeni virüs suşları ortaya çıkabilmektedir (4,9,10).

Replikasyon aşamasında, viral genomun yaklaşık üçte ikisini oluşturan 5' yönündeki açık okuma çerçeveleri (Open Reading Frame; ORF1a ve ORF1b) on altı adet yapısal olmayan proteini (non-structural protein; NSP) kodlarken, genomun geri kalan üçte birlik

kısmını oluşturan 3' yönündeki diğer ORF bölgelerinden ise en az dört adet yapısal protein ile birlikte aksesuar proteinler kodlanır (4,6). Viral transkripsiyon, protein sentezi ve posttranslasyonel modifikasyon aşamalarında rol oynayan helikaz, ekzoribonükleaz, replikaz, RdRp gibi enzimler yapısal olmayan proteinlerdendir (11). Dört ana yapısal proteinden S proteini, viral zarfın üzerinde taç (corona) benzeri çıkıntılar şeklinde olup ACE-2 reseptörlerine bağlanarak virüsün konak hücreye tutunmasını sağlar (8). Diğer yapısal proteinler olan membran (M), zarf (envelope; E) ve nükleokapsid (N) proteinleri ise virionun (tam virüs partikülü) birleşmesi (assembly), salınması ve konak hücre içi savunma sistemlerine karşı virüs bütünlüğünün devam ettirilmesinde rol oynarlar (4,6). Günümüzde aşı, tanıya yönelik test ve antiviral ilaç geliştirme çalışmalarının çoğu bu hedeflere odaklanmaktadır.

Tanı

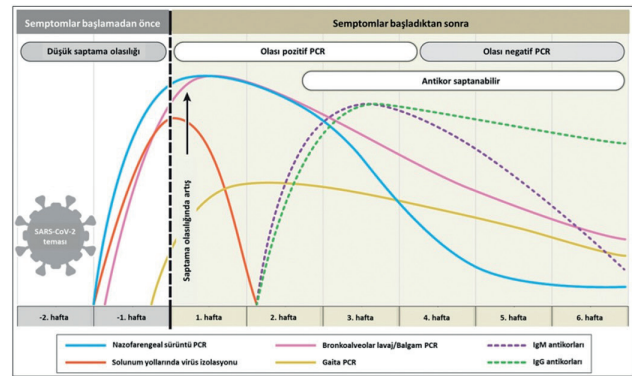
SARS-CoV-2 enfeksiyonunun hızlı ve doğru bir şekilde laboratuvar tanısının konulması, enfekte bireylerin erken tespiti, tedavisi ve izolasyonu, virüs yayılımının sınırlandırılması, etkin süreyans ve enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından son derece önemlidir. Bununla birlikte, hastalığa karşı gelişen immün yanıtta bireysel farklılıklar görülmesi, farklı yaş gruplarında ve farklı komorbiditeleri olan bireylerde hastalığın farklı seyir göstermesi, örneğin alınma zamanı, virüs atılımı ve miktarında dalgalanmaların gözlenmesi, mutant suşların ortaya çıkması ve bunun tanı yöntemleri üzerine etkisi gibi birçok değişkenin bulunması, SARS-CoV-2 enfeksiyonunda mikrobiyolojik tanının konulmasını güçleştirmektedir.

Genellikle viral enfeksiyonların tanısında, virüs kültürü, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Tanıda altın standart olarak kabul edilen virüs kültürü ve izolasyonu, biyogüvenlik riski nedeniyle SARS-CoV-2 enfeksiyonunun rutin mikrobiyolojik tanısında önerilmemektedir (12). Kültür işlemleri virüsün özelliklerinin anlaşılması, antiviral ajan ve aşı geliştirme çalışmaları amacıyla ancak uzman bir ekip tarafından biyogüvenlik seviyesi-3 (BSL-3) şartlarını sağlayan iyi donanımlı laboratuvarlarda yapılabilmektedir. COVID-19 hastalığının kesin tanısı, uygun klinik örneklerde gerçek zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) yöntemi kullanılarak viral RNA varlığının gösterilmesiyle konulmaktadır (3,12-14). Viral antijen varlığını araştıran testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin nükleik asit amplifikasyon testlerine göre düşük olması nedeniyle rutin tanıda kullanılması önerilmemektedir. Kan örneklerinde IgM, IgA ve/veya IgG tipi spesifik antikorların serolojik yön-

temlerle araştırılması, PCR negatif şüpheli vakalarda tanının desteklenmesinde ve seroepidemiolojik araştırmalarda yarar sağlayabilmektedir (3,12,15).

Klinik Örneklerin Alınması ve Taşınması

Doğru tanı için en önemli husus, preanalitik aşamada, klinik örneğin doğru zamanda, doğru anatomik bölgeden uygun teknik ve ekipmanlarla doğru şekilde alınarak uygun şartlarda laboratuvara iletilmesidir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun RT-PCR veya viral antijen testleri ile tanısı için hastalardan öncelikle alınması gereken örnekler solunum yolu örnekleridir. Virüs en yoğun olarak solunum yolu örneklerinde bulunmakla birlikte enfeksiyonun farklı evrelerinde alınan örneklerde viral yükte farklılıklar görülebilmektedir (16,17). Örnek alımı için en uygun zaman, semptomların başlamasından sonraki ilk 5-7 gündür. Yedinci günden sonra üst solunum yollarından alınan örneklerde sonucun pozitif çıkma olasılığı düşmekte ve testin duyarlılığı azalmaktadır. Hastalığın inkübasyon süresi ortalama 5.2 gün olmakla birlikte bireyler arasında farklılıklar (1-14 gün) olduğu, solunum yollarında virüs atılımının klinik belirtilerin ortaya çıkmasından 1-2 gün öncesinde başladığı ve ağır olgularda veya immünsüprese bireylerde 14-28 gün boyunca sürebildiği bildirilmektedir (Şekil 1) (17-21). Yapılan bir çalışmada, semptomların başlamasından sonraki ilk 7 gün içinde alınan solunum yolu örneklerinde viral RNA pozitifliği %66.7 olarak saptanırken, pozitiflik oranının 8-14. günlerde %54'e ve 15-39. günlerde ise %45.5'e kadar düştüğü gözlenmiştir (22).



Şekil 1

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun seyri sırasında RT-PCR ile viral RNA saptanma olasılığı ve antikor düzeylerindeki tahmini değişim (18 nolu kaynaktan alınarak düzenlenmiştir)

Dünya Sağlık Örgütü, ayaktan hastalarda nazofarengeal ve orofaringeal sürüntü/yıkama örneklerinin birlikte alınmasını önermektedir (12). İdeal olan öncelikle orofaringeal sürüntü örneği alınması, sonrasında aynı

eküvyon kullanılarak nazofaringeal sürüntü örneğinin alınmasıdır. Sürüntü örnekleri için gövdesi kolayca esneyebilen özellikte, dacron veya polyester uçlu özel eküvyonlar kullanılmalıdır. PCR üzerine inhibitör etki göstermesinden dolayı tahta saplı, kalsiyum alginat veya pamuk uçlu eküvyonların kullanılması önerilmektedir. Örnekler alındıktan sonra viral taşıma besiyerine konulmalıdır (3,12,23).

Ciddi alt solunum yolu enfeksiyonu bulguları olan vakalarda endotrakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj veya hasta çıkarabiliyorsa balgam örnekleri tanı için kullanılabilir. Alt solunum yolu örnekleri alınırken yüksek aerosolizasyon riskinden dolayı işlem sırasında enfeksiyon önleme ve kontrol prosedürlerine kesinlikle uyulmalıdır. Yapılan çalışmalar, alt solunum yolu örneklerinde viral yükün ve virüs izolasyon oranının üst solunum yolu örneklerine kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (17,22,23). Wang ve ark. tarafından yapılan araştırmada, RT-PCR pozitifliği bronkoalveolar lavaj sıvısında %93, balgamda %72, burun sürüntüsünde %63, fibrobronkoskop fırça biyopsisinde %46 ve boğaz sürüntüsünde %32 olarak bildirilmiştir (24).

Viral RNA varlığı, solunum yolu örnekleri dışında gaita, kan, tükürük ve idrar örneklerinde de araştırılabilir ancak bu örnekler için RT-PCR testlerinin güvenilirliğinin solunum yolu örneklerine göre oldukça düşük olduğu bildirilmektedir (21,24-26). Gaita örneklerinde virüs RNA'sının klinik belirtiler düzeldikten sonra uzun süreler tespit edildiğini belirten yayınlar bulunmaktadır (Şekil 1) (18,26,27). Bununla birlikte, gaita, kan, tükürük ve idrar örneklerinde yapılan virüs izolasyonunun tanısal değerinin belirlenmesi ve viral yük kinetiklerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç vardır.

Antikor testleri için de klinik örneklerin alındığı zaman önemlidir. İmmün yanıtın ve antikor oluşumunun doğası gereği semptomlar başladıktan en az bir hafta sonra alınan kan örneklerinin uygun serolojik yöntemlerle çalışılması gereklidir. Virüse özgü antikorların oluşması için belli bir süre gerektiğinden dolayı antikor testlerinin daha erken dönemde yapılması önerilmektedir. Semptomlar başladıktan 2-3 hafta sonra alınan örneklerde antikor varlığının araştırılmasının daha güvenilir sonuçlar verdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (22,28-30).

Klinik örneklerin doğru şekilde alınmaması ve uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılmaması yanlış negatif test sonuçlarına yol açabilmektedir. Alınan solunum yolu örnekleri 2-8°C'de saklanmalı ve laboratuvara mümkün olan en kısa sürede üçlü paketlenme sistemi

ile (hastane içi nakillerde iki kaplı taşıma sistemi kullanılabilir) soğuk zincir kurallarına uyularak ulaştırılmalıdır. Örneklerin naklinde beş günden fazla gecikme olması bekleniyorsa, örnekler -70°C'de dondurulmalı ve kuru buz üzerinde nakledilmelidir. Tekrarlayan dondurma ve çözme işlemlerinden kaçınılmalıdır. Numunelerin alınması ve taşınması sırasında, enfeksiyondan korunma ve kontrol prosedürlerine uyulmalı ve mutlaka kişisel koruyucu ekipmanlar (tıbbi maske, eldiven, önlük, gözlük veya siperlik) kullanılmalıdır. Örnek transferinde pnömatik tüp taşıma sistemleri, içerisindeki yüksek basınçtan dolayı numune kapaklarının açılması, sıvı materyallerin sızması ve kontaminasyon riskini artırması nedeniyle kullanılmamalıdır (3,12,31).

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

Pandeminin başlangıcından itibaren şüpheli COVID-19 vakalarında tanının doğrulanması amacıyla, rutin klinik pratikte en sıklıkla bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan RT-PCR testi kullanılmıştır. Bununla beraber, kesin tanı almış hastaların karantinadan çıkarılması kararının verilmesinde, yakın temaslı olan asemptomatik bireylerin taranmasında ve solunum sistemi hastalığı bulguları olan vakaların ayırıcı tanısında da bu yöntem tercih edilmektedir. COVID-19 olası vaka tanımına uyan hastalarda, diğer solunum yolu patojenleri tespit edilse dahi koenfeksiyonların oluşabileceği göz önünde bulundurularak hastadan alınan örnekler mutlaka RT-PCR testi ile SARS-CoV-2 RNA varlığı açısından da analiz edilmelidir (3,12).

Pandemi sürecinde dünyanın farklı ülkelerinde çeşitli araştırma merkezleri ve şirketler tarafından SARS-CoV-2 RNA'sının tespitine yönelik birçok ticari RT-PCR kiti geliştirilmiştir. Üretilen kitler, test protokolleri ve değerlendirme sonuçları DSÖ, Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve Food and Drug Administration (FDA) internet sayfalarında yayımlanmaktadır. Ülkemizde SARS-CoV-2 RT-PCR kitleri, Sağlık Bakanlığı'nın katkılarıyla üretim ve ürün geliştirme açısından gerekli koşulları sağlayabilen ulusal firmalardan sağlanmakta ve yetkilendirilmiş laboratuvarlarda COVID-19 mikrobiyolojik tanı testi olarak uygulanmaktadır. Bugüne kadar farklı versiyonları geliştirilmiş olan bu yerli üretim tanı kitleri ile ilgili çalışmalar, DSÖ'nün rehberlerinde belirttiği ve Sağlık Bakanlığı'nın onayladığı şekilde gerçekleştirilmektedir. Ulusal firmalar tarafından üretilen RT-PCR kitleri, salgın sürecinde ortaya çıkan yeni mutant suşların (İngiltere, Güney Afrika, Brezilya kökenli mutasyonlar vb.) da tanımlanmasına yönelik olarak sürekli güncellenmektedir.

COVID-19'un erken tanısı için geliştirilen çeşitli RT-PCR kitlerinin tespit ettikleri gen bölgeleri farklılıklar gösterebilmektedir. Bir veya daha fazla gen bölgesini araştırmak üzere planlanan çeşitli kit tasarımlarında genellikle RdRp, ORF1a/b, S, N ve E genleri hedeflenmektedir. Bununla birlikte, diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyondan ve olası SARS-CoV-2 genetik kaymalarından kaynaklanabilecek saptama sorunlarını engellemek için RT-PCR test protokollerinde virus genomunda yer alan en az iki farklı bölgenin hedeflenmesi önerilmektedir (32). Seçilen viral genom segmentlerinin yanısıra, bu hedeflere yönelik özgün primer ve prob seçimi, döngü sayısının ve doğru bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi de tanısal performans açısından önemlidir.

SARS-CoV-2 RNA'sını saptamaya yönelik mevcut ticari PCR kitlerinde, tek basamakta ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR uygulanmaktadır. Gerçek zamanlı PCR yönteminin en önemli avantajı, aynı cihaz içerisinde hedef nükleik asit amplifikasyon işlemi ile analiz işleminin eş zamanlı olarak yapılması ve amplifikasyon ürününün kontaminasyonuna bağlı yanlış pozitif sonuçları en aza indirmek için kapalı bir sistem kullanılmasıdır (32). RT-PCR testlerinde analiz süresi, kullanılan ticari kit ve ekstraksiyon yöntemine göre değişmekle birlikte genellikle 2-4 saattir. Deneyimli personel, özel ekipman ve en az biyogüvenlik seviyesi-2 (BSL-2) şartlarına sahip donanımlı laboratuvar gerektirir. Laboratuvarda testi çalışacak personelin uygun kişisel koruyucu ekipmanları kullanması ve bu konuda eğitim almış olması gereklidir.

Uygulamada öncelikle viral RNA klinik örnekten ekstrakte edilmeli ve saflaştırılmalıdır. Viral RNA izolasyonu, konvansiyonel manuel yöntemlerle veya ticari olarak satılan kitlerle iki farklı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. PCR öncesinde uygulanması gereken nükleik asit izolasyon işleminin etkinliği, testin duyarlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. İzolasyon işlemi manuel olarak konvansiyonel yöntemlerle yapıldığında sonuç verme süresi uzayabilmektedir. Numunenin doğrudan parçalayıcı solüsyon içine alınması, ilave ekstraksiyon ve izolasyon basamağını ortadan kaldırarak daha hızlı sonuç alınmasını ve biyogüvenliği sağlayabilir (19).

Tek PCR tüpü içerisinde önce ters transkriptaz (RdRp enzimi) ile saflaştırılmış viral RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi ve sonraki reaksiyonda PCR ile spesifik primerler kullanılarak cDNA'daki ilgili gen bölgesinin amplifikasyonu üç adımda (denatürasyon, bağlanma ve uzama) gerçekleştirilir (33). Aynı anda farklı floresan boyalarla (FAM, HEX, ROX, Cy5 vb.) işaretli özgün problemler spesifik gen bölgelerine bağla-

nırlar ve amplifikasyon ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyaller spesifik kanallar aracılığıyla PCR cihazı tarafından algılanır. Oluşan amplifikasyon ürünü miktarı ile floresan yoğunluğu arasında doğru bir orantı vardır. RT-PCR işlemi tamamlandıktan sonra, hasta örneklerinin ve kontrollerin floresan ışımaya ile doğru orantılı olan amplifikasyon eğrileri değerlendirilir. İnsan ribonükleaz P (RNase P) genini hedefleyen internal kontrol kanalında ışımaya saptanmaması, örneğin iyi alınmadığını gösterir ve yeni bir örnekle test tekrar edilmelidir (21). Test sonuçları yorumlanırken amplifikasyon eğrileri nonspesifik ışımalar yönünden incelenmeli ve sigmoidal bir eğri olup olmadığı değerlendirilmelidir. Testin pozitif olarak yorumlanması için sigmoidal bir amplifikasyon eğrisinin oluşması ve hedef gene özgü eşik döngü (sinyalin saptanmaya başladığı döngü sayısı; cycle threshold; Ct) değerinin, belirlenen cut-off Ct değerinden küçük (veya eşit) olması gerekir. Viral yük ile Ct değerleri ters orantılı olup düşük Ct değerleri yüksek düzeyde viral yük olduğunu gösterir (18). Optimum tanısal performans açısından nükleik asit izolasyonundan başlamak üzere tüm analitik süreç boyunca iç kalite kontrol basamaklarının doğru uygulanması gerekmektedir.

Üst ve alt solunum yolu örneklerinde virüs RNA'sını saptamaya yönelik geliştirilen RT-PCR kitlerinin yüksek analitik duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmekle birlikte, özellikle viral yükün düşük olduğu klinik örneklerde hem kitler hem de laboratuvarlar arası duyarlılık ve özgüllük farkları görülebilmektedir. Bununla birlikte, klinik örneklerin uygunsuz veya yetersiz miktarda alınmış olması, örneğin enfeksiyonun çok erken veya çok geç döneminde alınmış olması, örneğin uygun koşullarda ve uygun sürede laboratuvara gönderilmemiş olması, örnekte PCR inhibitörlerinin varlığı, test sonuçlarının yanlış yorumlanması gibi preanalitik ve analitik süreçte yapılan hatalar yalancı negatif sonuçların elde edilmesine yol açmaktadır. Kullanılan kitin analitik performansının yetersizliği, hedef gen bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar, testten önce antiviral ilaç kullanımı da test sonuçlarını etkilemektedir. Bu nedenle, semptomları olan ve SARS-CoV-2 enfeksiyonu şüphesi yüksek olan vakalarda bir veya daha fazla sayıda negatif RT-PCR sonucu tanıyı dışlamamalıdır. Bu tür vakalarda sadece üst solunum yolu numuneleri alındıysa, 24-48 saat sonra mümkünse alt solunum yolundan da ek numuneler alınarak test tekrarlanmalıdır (3,12,33,34) .

Yalancı pozitif sonuçlar ise örneğin alınması sırasında veya çok sayıda örneğin işlenmesi sırasında meydana gelebilecek çapraz kontaminasyonlar, spesifik olmayan PCR bağlanmaları ve testin özgüllük sorunu nedeniyle ortaya çıkabilir (35,36). PCR pozitifliği,

sadece viral RNA'nın varlığını gösterir ve her zaman canlı (replike olan) virüsün varlığını göstermez (18). Laboratuvar sonuçlarının klinik tabloyu desteklemesi durumunda yeni örneklerle test tekrar edilmelidir. Tüm bu olası kısıtlılıklara rağmen RT-PCR testi pandemi sürecinde COVID-19 hastalığının kesin tanısı için en doğru ve en duyarlı mikrobiyolojik tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir.

RT-PCR dışında, çeşitli firmalar tarafından COVID-19 tanısına yönelik ters transkripsiyon döngü aracılı izothermal amplifikasyon (reverse transcription-loop mediated isothermal amplification; RT-LAMP) yöntemi, düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats; CRISPR) sistemi gibi daha kısa sürede sonuç veren, uygulanması nispeten kolay, yüksek analitik duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilen moleküler yöntemler geliştirilmiştir (33,37,38). Henüz yaygın kullanım olanağı bulunamamış olan ancak ümit vadeden bu testlerin optimize edilmesi ve performanslarının artırılması için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sekans Analizi

Sekans analizi, virüs kaynağının belirlenmesi, bulaşma dinamiklerinin anlaşılması, virüs genomundaki değişikliklerin tanımlanması ve mutasyonların monitörizasyonu açısından oldukça önemlidir. Özellikle RT-PCR testlerinin performansını etkileyebilecek primer ve prob bağlanma bölgelerinde ortaya çıkabilecek mutasyonların saptanması açısından elde edilen örneklerden periyodik sekans analizi yapılması önerilmektedir. Ayrıca RT-PCR sonucu şüpheli pozitif olan bir hastada COVID-19 tanısının doğrulanması için sekans analizinin yapılması önerilmektedir. Ancak sekans analizi COVID-19 rutin tanısı için kullanılacak pratik bir yöntem değildir. Yüksek maliyetli olması, deneyimli personel ve yoğun iş yükü gerektirmesinden dolayı iyi donanımlı referans laboratuvarlarında uygulanabilen bir yöntemdir. Dünya Sağlık Örgütü, COVID-19 salgınına daha iyi anlamak, yönetmek ve önlemler geliştirmek için laboratuvarların elde ettikleri sekans verilerini GenBank, GISAID, EMBL-EBI gibi ilgili platformlarda paylaşmalarını önermektedir (3,12,32,33,35).

Antijen Testleri

Antijen testleri, solunum yolu örneklerinde doğrudan SARS-CoV-2'ye özgü viral protein varlığının immüno-kromatografik yöntemle saptanması esasına dayanır (39). Hızlı antijen veya kart testleri olarak da isimlendirilen bu testlerde genellikle virüsün N proteinine karşı monoklonal antikorlar kullanılmaktadır (40,41). Test sürecinde viral antijenin işaretli (lateks, kolloidal

partiküller veya florofor nanopartiküller ile işaretlenmiş) özgül monoklonal antikor ile birleştikten sonra nitrosellüloz membrandan oluşan katı faz boyunca akarak hareket etmesinden dolayı, bu teknik lateral akım yöntemleri (lateral flow immunoassay) olarak da anılmaktadır. Sonuçlar gözle görünür koyu renkli bantların oluşması ile değerlendirilir. Testin geçerliliği için kontrol bandının da görülmesi gereklidir.

Düşük maliyetli, kolayca uygulanabilen ve kısa sürede (15-20 dk) sonuç alınabilen bu testler ile ilgili en önemli sorun yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe ulaşamamalarıdır (39). Bugüne kadar farklı üreticiler tarafından birçok ticari kit geliştirilmiş ve bir kısmı FDA onaylı olmasına rağmen, henüz global ölçekte tanısız algoritmalara girebilecek düzeyde ve performansta bir test bulunmamaktadır. Ülkemizde de antijen testleri COVID-19 vaka yönetim algoritmasında yer almamaktadır.

Antijen saptayan testler, PCR testine ulaşılamayan durumlarda, PCR test kapasitesinin yetersiz olduğu veya zorlanıldığı durumlarda ya da hızlı bir ön değerlendirme gerektiren durumlarda kullanılabilir. Klinik örneğin alındığı hastalık evresi, viral yük, örnek kalitesi gibi çeşitli faktörler testin performansını etkilemektedir (32). Bu testler ancak yüksek viral yüke sahip enfekte kişileri saptayabilmektedir. Bu nedenle semptomların başlamasından önceki 1-2 gün ve akut dönemde enfeksiyonun ilk yedi günü içerisinde kullanılması uygundur (39,40). Viral yükün düşük olması veya örnek kalitesinin yetersizliğine bağlı olarak yanlış negatif sonuçlar görülebilmektedir. Negatif sonuç alınan durumlarda klinik şüphe varlığında (özellikle yüksek prevalanslı topluluklarda) mutlaka RT-PCR testinin yapılması önerilmektedir. Bununla birlikte, diğer koronavirüsler ile çapraz reaksiyona bağlı yalancı pozitiflikler de görülebilir. Pozitif sonuçlar 24 saat içinde RT-PCR ile doğrulanmalıdır. Bu süre içinde hasta enfekte olarak kabul edilmeli ve izole edilmelidir (42). Antijen testleri için solunum yolu örneklerinin (nazal/nazofaringeal sürüntü) alınması gereklidir. Örnek alma ve test işlemleri, bu konuda eğitimli ve deneyimli sağlık personeli tarafından kişisel koruyucu ekipman ve diğer biyogüvenlik kurallarına uyularak gerçekleştirilmelidir.

Antikor Testleri

Virüse özgü antikorların saptanması, etkenle karşılaşmış olduğunu gösterir. Serolojik yöntemler ile serum veya plazma örneklerinde SARS-CoV-2'ye karşı gelişmiş olan IgM, IgA, IgG tipi spesifik antikorların veya total antikorların varlığı araştırılabilir. Enfeksiyona karşı antikor yanıtının oluşması, konakçı immünitesi ile doğrudan ilintili olup hastanın

yaşı, hastalığın şiddeti, immünsüpresif ilaç kullanımı, eşlik eden hastalıklar gibi faktörlerden etkilenebilmektedir. Hastaların çoğunda ilk antikor yanıtının belirtilerin başlamasından 7-11 gün sonra geliştiği gösterilmekle birlikte bu süre değişebilmektedir (35). Genellikle 2-3. haftadan sonra birçok olguda antikorların pozitifleştiği belirtilmektedir (Şekil 1). IgM tipi antikorların önce oluştuğu ve sıklıkla yedinci haftaya doğru kaybolduğu, IgG tipi antikorların ise IgM ile eş zamanlı veya IgM'yi takiben oluşmaya başladığı ve daha uzun süreler serumda saptanabildiği gösterilmiştir. IgA, çoğunlukla IgM ile birlikte yükselmeye başlamakta ancak IgM'den daha uzun süre serumda tespit edilebilmektedir (43). Antikor yanıtındaki bu doğal gecikmenin bir sonucu olarak rutin klinik pratikte akut enfeksiyon tanısında antikor testlerinin kullanımı önerilmemektedir (12,15). Antikor testlerinde akut evrede negatif sonuç elde edilmesi SARS-CoV-2 enfeksiyonunu dışlamaz. Akut enfeksiyon şüphesi durumunda hastalığın ilk haftasında sadece PCR testlerinin veya belli koşullar altında antijen testlerinin kullanılması daha doğru bir yaklaşımdır. Bununla birlikte, özellikle IgM testlerinde diğer koronavirüslerle olan çapraz reaksiyonlara, hastada romatoid faktör veya otoantikorların varlığına bağlı olarak yalancı pozitif sonuçlar görülebilmektedir. Ayrıca hastalığı geçirip iyileşen hastalarda veya aşılama durumunda gelişen immünitenin (IgG yanıtı) süresi ve sonraki enfeksiyonlara karşı koruyuculuğu da henüz tam olarak bilinmemektedir (29,30,43).

Antikor testleri geliştirilirken kullanılan antijenin özellikleri önemlidir ve testlerin analitik duyarlılığı ile özgüllüğü seçilen hedef antijenden büyük ölçüde etkilenir. Koronavirüslerin benzer genetik yapısı nedeniyle çapraz reaksiyon meydana gelmesi olasıdır. Bu yüzden standardizasyon ve güvenilirliğin sağlanması için daha immünojenik ve daha spesifik antijenler (saflaştırılmış rekombinant antijenler) tercih edilmelidir (21). Antikor testlerinde sıklıkla hedef olarak seçilen proteinler, virüse özgü yapısal proteinlerden olan S ve N proteinleridir. S proteini, S1 ve S2 olmak üzere fonksiyonel olarak iki alt bölüme ayrılır. S2 alt bölgesi membran füzyonunu gerçekleştirirken, S1 alt bölgesi ACE-2 reseptör bağlanma bölgesini (receptor binding domain; RBD) içerir ve kuvvetli bir immünojendir. Bu bölge aynı zamanda virüs nötralizasyonu için de hedef bölgedir. S proteinlerine karşı oluşan antikorların daha özgül, N proteinlerine karşı oluşan antikorların ise daha duyarlı olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (14,18,44,45). N proteinin, diğer koronavirüs türleri ile homolojisinin yüksek olması nedeniyle, S proteinine göre daha fazla çapraz reaksiyona neden olabileceği belirtilmektedir.

Pandemi sürecinde SARS-CoV-2'ye spesifik antikorların tespiti için farklı firmalar tarafından Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), kemilüminesans immünoassay (CLIA) ve immünokromatografik yöntemleri içeren çok sayıda ticari kit geliştirilmiştir. Antikor testlerinin moleküler yöntemlere göre kullanım kolaylığı, daha kısa sürede sonuç alınabilme, kolay ulaşılabilirlik ve yaygın kullanılabilme gibi birtakım avantajları bulunmaktadır. Ancak özellikle hastalığın erken evresinde doğruluk, duyarlılık ve özgüllükleri moleküler yöntemlere göre daha düşüktür. Hızla piyasaya sürülen bu antikor saptayan ticari kitlerin tanılabilir performansını değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır (14,29,45-49). Bu çalışmaların çoğunda IgG tipi antikorları saptayan testlerin IgM ve IgA testlerine göre daha güvenilir olduğu, kantitatif analiz yapan yöntemlerin kalitatif yöntemlere (immünokromatografik testler) tercih edilmesinin daha uygun olacağı raporlanmıştır. Özellikle standardize edilmiş prosedürler ve otoanalizörler ile çalışılan serolojik yöntemlerin kullanılması, daha doğru sonuçların alınması açısından önemlidir. Hızlı antikor veya kart testleri olarak da adlandırılan immünokromatografik yöntemlerin, ELISA ve CLIA yöntemlerine göre doğruluk, duyarlılık ve özgüllüklerinin daha düşük olduğu bildirilmektedir. Test formatı ve tasarımındaki farklılıklar nedeni ile antikor testlerinin rutin kullanıma sunulmasından önce laboratuvarlar tarafından verifikasyon çalışmasının yapılması gerekir. Ayrıca sonuçlar değerlendirilirken toplumda seroprevalansın henüz düşük olmasına bağlı olarak yanlış pozitiflik riskinin olabileceği mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Mevcut kısıtlılıklarına rağmen antikor testleri, hastalık belirtileri başladıktan sonra doğru zamanda yapılırsa, moleküler tetkikleri destekleyici testler olarak kullanılabilir. Yüksek klinik şüpheye rağmen RT-PCR sonuçları negatif çıkan vakalarda antikor testlerinin çalışılması tanıyı destekleyebilir. Bunun dışında antikor testleri, seroepidemiolojik çalışmalarda toplumdaki bağışıklık düzeylerinin belirlenmesinde, aşı geliştirme çalışmaları sırasında verilen immün yanıtın değerlendirilmesinde, immün plazma vericilerinde antikor düzeyinin belirlenmesinde ve çocuklarda COVID-19 sonrası gelişen multisistemik inflamatuvar sendromun destekleyici tanısında kullanılabilir (3,12,15). Ancak antikor testi sonuçları enfeksiyon riskinin değerlendirilmesi ya da izolasyon ve karantina ile ilgili kararların alınması süreçlerinde kullanılmamalıdır. Ayrıca, diğer kitlesel aşılmalarda olduğu gibi, antikor testlerinin aşılama sonrasında virüse karşı bağışıklığın değerlendirilmesinde veya aşılammamış bir kişide aşılama ihtiyacının değerlendirilmesi amacıyla kullanılması önerilmemektedir.

Sonuç

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun rutin mikrobiyolojik tanısında altın standart solunum yolu örneklerinde RT-PCR testi ile viral nükleik asitin gösterilmesidir. Testin analitik performansının yanısıra preanalitik süreçte klinik örneklerin uygun zamanda ve doğru bir şekilde alınması, sonuçların güvenilirliği açısından oldukça önemlidir ve multidisipliner çalışmayı gerektirir. Anti-kor testleri, akut enfeksiyon tanısında özellikle erken evrede tek başına kullanılmamalıdır. RT-PCR testi negatif bulunan şüpheli COVID-19 vakalarında enfeksiyonun ilerleyen döneminde alınan kan örneklerinde anti-kor testlerinin çalışılması tanıyı destekleyebilir. Antijen testleri, viral yükün yüksek olduğu enfeksiyonun ilk yedi günü içerisinde kullanıldığı takdirde yarar sağlayabilirler. Ancak düşük duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olmalarından dolayı antijen testleri ile elde edilen sonuçların RT-PCR testleriyle doğrulanması gerekmektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun laboratuvar tanısında kullanılan testlerin kendine özgü avantajlarının yanında birtakım kısıtlılıklarının da olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Mikrobiyolojik tanıda kullanılacak yöntemlerin seçilmesi, uygulanması, kalitenin sağlanması ve sonuçların yorumlanması, hastalığın kesin tanısının konulması açısından son derecede önemlidir ve bu aşamada süreç kliniklerle işbirliği içinde Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanının kontrolünde yürütülmelidir.

Kaynaklar

- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270-3.
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5:536-44.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi, Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı [Internet]. 7 Aralık 2020 [Cited 30 March 2021] Available from: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid-19rehberigenelbilgilerepidemiyojivetanipdf.pdf>.
- Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016;24:490-502.
- Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* 2020;26:450-2.
- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res* 2020;24:91-8.
- Ortiz-Prado E, Simbana-Rivera K, Gomez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2020;98:115094.
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395:565-74.
- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181-92.
- Zhang YZ, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 2020;181:223-7.
- Chen Y, Liu Q, Gou D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020;92:418-23.
- World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance. [Internet]. 11 September 2020 [Cited 30 March 2021] Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254>.
- Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Hayden MK, Englund JA, Lee MJ, et al. The Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Molecular Diagnostic Testing. *Clin Infect Dis* 2021;22:ciab048.
- Caruana G, Croxatto A, Coste AT, Opota O, Lamoth F, Jatton K, et al. Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1178-82.
- Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, Englund JA, Hayden MK, Lee MJ, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing. *Clin Infect Dis* 2020 12;ciaa1343.
- Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med* 2020;382:1177-9.
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020;20:411-2.
- Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 2020;323:2249-51.
- Erensoy S. COVID-19 Pandemisinde SARS-CoV-2 ve Mikrobiyolojik Tanı Dinamikleri. *Mikrobiyol Bul* 2020;54:497-509.
- Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med* 2020;382:1199-1207.
- Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol* 2020;30:e2106.
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020;71:2027-34.
- Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:747-56.
- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 2020;323:1843-4.
- To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, 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. *Lancet Infect Dis* 2020;20:565-74.
- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020;581:465-9.
- Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* 2020;9:386-9.
- Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26:845-8.
- Chen M, Qin R, Jiang M, Yang Z, Wen W, Li J. Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review. *Int J Infect Dis* 2021;104:415-22.
- Qu J, Wu C, Li X, Zhang G, Jiang Z, Li X. Profile of Immunoglobulin G and IgM Antibodies Against Severe Acute Respira-

- tory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* 2020;71:2255-8.
31. World Health Organization, Infection prevention and control during health care when COVID-19 is suspected, Interim guidance [Internet]. 19 March 2020 [Cited 30 March 2021] Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331495>.
 32. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00512-20.
 33. Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H. SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Anal Bioanal Chem* 2021;413:49-71.
 34. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction-Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med* 2020;173:262-7.
 35. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, George KS, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio* 2020;11:e00722-20.
 36. Surkova E, Nikolayevskyy V, Drobniewski F. False-positive COVID-19 results: hidden problems and costs. *Lancet Respir Med* 2020;8:1167-8.
 37. Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 2020;13:950-61.
 38. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 2020;38:870-4.
 39. Peeling RW, Olliaro PL, Boeras DI, Fongwen N. Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. *Lancet Infect Dis* 2021; (published online Feb 23).
 40. World Health Organization, SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests: an implementation guide [Internet]. 21 December 2020 [Cited 30 March 2021] Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240017740>.
 41. Diao B, Wen K, Chen J, Liu Y, Yuan Z, Han C, et al. Diagnosis of Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection by Detection of Nucleocapsid Protein. *medRxiv* 2020; DOI: 10.1101/2020.03.07.20032524.
 42. COVID-19 Mikrobiyolojik Tanı Testlerinin Pandemi Akılcı Kullanımı [Internet]. Ocak 2021 [Cited 30 March 2021] Available from: <https://www.klimudkoronavirus.org/wp-content/uploads/2021/02/COVID-19-MİKROBİYOLOJİK-TANI-TESTLERİNİN-PANDEMİDE-AKILCI-KULLANIMI-Klinisyen-2.pdf>
 43. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügger MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy* 2020;75:1564-81.
 44. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis* 2020;26:1478-88.
 45. Zhong L, Chuan J, Gong B, Shuai P, Zhou Y, Zhang Y, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci* 2020;63:777-80.
 46. Coste AT, Jaton K, Papadimitriou-Olivgeris M, Greub G, Croxatto A. Comparison of SARS-CoV-2 serological tests with different antigen targets. *J Clin Virol* 2021;134:104690.
 47. Kohmer N, Westhaus S, Rühl C, Ciesek S, Rabenau HF. Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests. *J Med Virol* 2020;92:2243-7.
 48. Pan Y, Li X, Yang G, Fan J, Tang Y, Zhao J, et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J Infect* 2020;81:e28-e32.
 49. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020;92:1518-24.