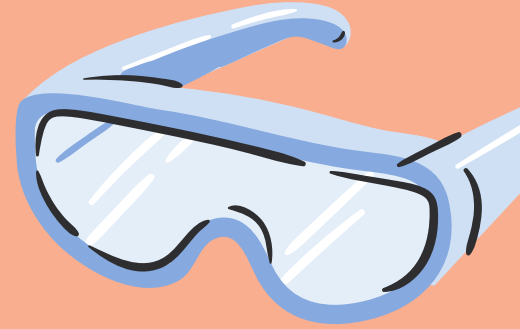


KLİMUD Haftalık Literatür Özetleri

COVID-19 LABORATUVAR TANISI

1. BÖLÜM



"Makale Avcıları"ndan

Yepyeni bir dünya ile yüzleştığımız ve bu dünyayı, yaşamı gittikçe kanıksadığımız bu günlerde, sürece olumlu katkı sunmak için elinden geleni yapmaya çalışan tüm Tıbbi Mikrobiyoloji çalışanlarına teşekkürü borç biliyorum. KLİMUD yönetim kurulu üyesi Osman Sezer Cirit önderliğinde ve pek çok arkadaşımızın desteğiyle gerçekleştirilen bu çalışmayı sizlere sunmanın heyecanını yaşıyoruz.

Bizler, Türkiye'de Tıbbi Mikrobiyoloji alanımızın hak ettiği yere gelmesi için ne gerekiyorsa yapmaya hazırız. Bu süreci sağ salim atlatıp güzel günlere kavuştuğumuzda da yine çalışmaya, üretmeye devam edeceğiz.

Alışmış olduğumuz, hoşlandığımız, hasret çektiğimiz, maalesef kıymetini geç anladığımız o güzel hayatlara bir an önce dönebilmenin ümidiyle.

Dr. Hilal Bölükbaşı

Ankara Şehir Hastanesi, Doku Tiplendirme Laboratuvarı

Mikrobiyoloji, mütevazılığını kaybetmeden özgüvenle, azimle, özveri ile çalışacak insanların işidir.

Hepsinden önemlisi ekip işidir. Bu dinamik ekipte yer almaktan dolayı mutluluk duyuyorum.

Devamının gelmesi dileğiyle...

Dr. Aylin Erman Daloğlu

S.B.Ü. Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji

Salgın süresince dünyadaki yayın trafiğinin içinden en fazla soruya cevap veren güncel makaleleri seçip özetleyerek, COVID-19 öğrenme sürecine keyif katan ve bilgiye anadilde erişimi kolaylaştıran hocalarıma, tüm emek veren arkadaşlarıma ve KLİMUD ailesine teşekkür ederim.

Dr. Ekin Kırbaş

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Dünya tarihine baktığımızda bu tür bir sürecin yeniden yaşanabileceği aşıkâr, hatta kesin diyebiliriz. Bu nedenle, “Artık Laboratuvardan çıkıp, konsültan hekim olduğumuzu hatırlamalı, filyasyon, sterilizasyon, dezenfeksiyon ve daha birçok bağlantılı işte görev ve sorumluluk almalıyız”. Bugün bu yayınlanan kısa özetler de bu sürecin bir parçasıdır. Ders aldık, gönüllü olduk ve COVID-19 konusunda çıkan yayınlarla ilgili kısa kısa bilgileri üyelere ulaştırmayı hedefledik. Bu sürece ön ayak olanları kutluyor ve onlara saygılarımı sunuyorum. Bizlere düşen de bu yayınları okumak, bilgilenmek, yenilenmek ve konsültan hekimliğimizi çalıştığımız yerlerde konuşturmak.

Branşımızın diğer branşlar arasındaki özelliğinin iyi anlaşılamadığı şu günlerde, bizler branşımızı parlatmalı, sadece laboratuvar hekimi değil, konsültan hekim olduğumuzu hatırlatmalıyız.

Dr. Ali Korhan Sığ
Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikoloji

Ülkemizi ve tüm dünyayı etkisi altına alan bir salgın ile mücadele ediyoruz. Bu mücadelede en önemli dayanağımız bilimdir ve bilim ancak paylaşıldığında faydalı olur. KLİMUD ailesi bünyesinde Türkiye'nin dört bir yanından değerli meslektaşlarımız ile birlikte, COVID-19 ile ilgili güncel makaleleri derleyerek, bilime katkıda bulunmaya çalıştık. Umarım paylaşılan bilgiler faydalı olur ve bu süreç mümkün olan en az hasar ile en kısa sürede atlatılabilir.

Emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Dr. Tuba Müderris
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD

COVID-19 pandemi sürecinde ülkemizin her köşesinde hep birlikte yoğun emek ve özveri ile katkımızı sunmaktayız. Derlediğimiz bu makaleler KLİMUD desteği ile bütün meslektaşlarımıza ulaşmakta, öğrenme ve araştırma arzumuzu canlı tutmaktadır.

Katkıda bulunan bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

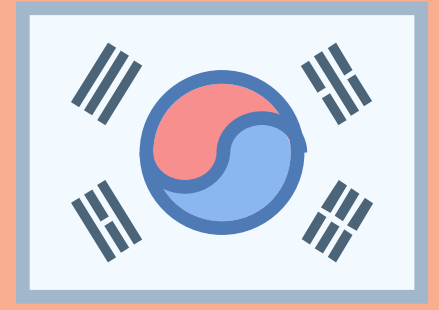
Dr. Bilal Olcay Peker
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji

Kore COVID-19 Laboratuvar Tanı Kılavuzu

Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea

Hong K et al. (Ann Lab Med 2020 40: 351-360;
doi: 10.3343/alm.2020.40.5.351)

Derleyen: Dr. Aylin Erman Daloğlu (S.B.Ü. Antalya EAH,
Tıbbi Mikrobiyoloji)



Bu belge COVID-19/SARS-CoV-2 tanısı için kılavuz niteliğindedir. Bu yönergelerin tüm telif hakları "Korean Society for Laboratory Medicine (KSLM) and the Korea Centers for Disease Control and Prevention (KCDC)'a" aittir.

Test endikasyonları nelerdir?

COVID-19 gerçek zamanlı RT-PZR;

- Şüpheli COVID-19 olgularının doğrulanmasında,
- COVID-19 hastalarının karantinadan çıkarılmasına karar verilmesinde,
- COVID-19 hastalarıyla yakın temasta olan asemptomatik bireylerin taranmasında,
- Sebebi bilinmeyen solunum yetmezliği sendromu olan olguların ayırıcı tanısında uygulanmalıdır.

Laboratuvar tanı yöntemleri nedir?

Gerçek zamanlı RT-PZR kullanılmakta ve iki gen bölgesini incelemektedir. Bir genin tanımlanması tarama testi, ikinci genin tanımlanması doğrulama testi olarak kullanılır. Bu protokollerde genlerden biri saptanmazsa, sonuçlar genellikle belirsiz veya negatif olarak yorumlanır. KCDC ve WHO tarafından, tarama testi olarak viral *E geninin* ve doğrulama testi olarak *orflb geninin RdRp bölgesi* önerilmektedir.

Örnek türleri, seçimi ve toplanması nasıl yapılmalıdır?

ÜSY örneklerinde test sonucu negatif çıksa bile, özellikle şiddetli/ilerleyen hastalık durumlarında, ASY örneklerinden testin tekrarlanması gerekir. Tanı için, semptomların başlamasından sonraki yedi gün içinde örnek alımı önerilir.

Örnek seçimi nasıl yapılır?

Asemptomatik/hafif semptomları olan hastalardan hem nazofarinks hem de orofarinks sürüntülerinin alınması önerilir; duyarlılığı arttırmak için bunlar aynı viral transport besiyerine alınmalıdır. Şiddetli semptomları bulunan, prodüktif öksürüğü olan ve entübe hastalardan ASY örnekleri alınmalıdır. Gerekirse, idrar ve dışkı gibi diğer örnekler alınabilir. Kan örnekleri, serolojik araştırmalar için düşünülebilir.

Örnek paketleme ve transportu nasıl olmalıdır?

Kurum içi transport:

Birincil kap bir vidalı kapak ile kapatılmalıdır. Kap, plastik olmalıdır. Birincil kabın dış yüzeyi, %70 etanol ile dezenfekte edilmeli, fermuarlı torbaya konulmalı ve nakliye öncesinde ikincil bir kaba konmalıdır. İkincil kap sızdırmaz ve darbelere dayanıklı olmalı ve bulaşıcı madde içerdiği için etiketlenmelidir. Pnömatik sistem kullanılmamalıdır.

Dış merkeze transport:

Üçlü paketleme sistemi (UN3373 P650) kullanılmalıdır.

Tablo. COVID-19 testi için örnekler

Örnek türü	Toplama	Taşıma koşulları	Saklama	Öneri
ÜSY örneği: NF sürüntü, OF sürüntü, NF aspirat	Dakron veya "floke uçlu eküvyon" VTM içinde	4°C	5 gün içinde: 4 ° C 5 günden daha uzun: -70 ° C	
ASY örneği: Balgam	Steril kap	4°C	48 saat içinde: 4 ° C 48 saatten daha uzun: -70 ° C	
ASY örneği: bronşiyal yıkama	Steril kap	4°C	48 saat içinde: 4 ° C 48 saatten daha uzun: -70 ° C	Patojenler dilüe olmuş olabilir; ancak, tanı testine tabi tutulabilir
ASY örneği: trakeal aspirat, transtrakeal aspirat	Steril kap	4°C	48 saat içinde: 4 ° C 48 saatten daha uzun: -70 ° C	
ASY örneği: akciğer biyopsisi	Tuzlu su bulunan steril kap	4°C	48 saat içinde: 4 ° C 48 saatten daha uzun: -70 ° C	
Serum	Serum tüpü	4°C	5 gün içinde: 4 ° C 5 günden daha uzun: -70 ° C	Serolojik testler için bir çift numune toplanır. (Akut faz: semptom başlangıcından 7 gün içinde. İyileşme dönemi: Akut fazda alındıktan 14 gün sonra) Serumun başka bir kaba dağıtılması, Sınıf II veya daha yüksek BGK'de.

Test işlemleri nasıl uygulanmalıdır?

Aerosol oluşturan işlemler biyogüvenlik kabini (BGK) içinde yapılmalıdır. Nükleik asit ekstraksiyonu veya inaktivasyonu BGK içinde gerçekleştirilmiş örnekler, standart önlemlere uygun olarak BGK dışında işlenebilir. Nükleik asit ekstraksiyonu sırasında çapraz kontaminasyona dikkat edilmelidir. Otomatik nükleik asit ekstraksiyon sistemi kullanılmıyorsa, işlemler **Sınıf II veya daha yüksek BGK'de** yapılmalıdır. İşlemler bittikten sonra veya numune kontaminasyonu olduğunda, tezgah uygun dezenfektanlar (%70 etanol, %2 glutaraldehit, sodyum hipoklorit [%0.05;500 ppm] vb) ile dezenfekte edilmelidir.

Testin yorumlanması nasıl yapılır?

Hedef genin Ct değeri \leq cut-off Ct değeri: **pozitif**, hedef gen tespit edilmedi/Ct değeri $>$ cut-off Ct değeri: **negatif** olarak kabul edilir. Hedef gen ve internal kontrol amplifikasyonu geçersiz ise test tekrarlanmalıdır. Düşük viral yükü olan örneklerde Ct değerlerine yakın değerler yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçları gösterebilir. Bu nedenle, gerekirse, aynı örnekten ya da yeni örnek istenerek test tekrarlanır.

KSLM, yalnızca tüm genler tespit edildiğinde pozitif sonuç verilmesini önerir. Sadece bir gen tespit edildiğinde, test tekrarlanması veya referans laboratuvara gönderilmesi önerilir.

- Tarama (+) ve doğrulama (+): COVID-19 için pozitif (SARS-CoV-2 tespit edildi).
- Tarama (+) ve doğrulama (-): COVID-19 için negatif (SARS-CoV-2 tespit edilmedi). Tarama testi için betakoronavirüs primerleri kullanan kitler için SARS-CoV-2 yerine betaCoV olasılığı vardır.
- Tarama (-) ve doğrulama (-): COVID-19 için negatif (SARS-CoV-2 tespit edilmedi). *İnternal kontrol de negatifse, sonuç geçersizdir ve yeniden test yapılması gerekir.*
- Tarama (-) ve doğrulama (+): Tekrar test edilmelidir/ek testler için bir referans laboratuvara başvurulur.

COVID-19 vakalarında virus saptanması için test zamanı hakkında yeterli bilgi yoktur. Bu nedenle, özellikle şüpheli bir olguda ÜSY örneğinde sadece bir negatif sonuca dayanarak hastalığı dışlamak zordur.

Yanlış negatif sonuçların olası nedenleri nelerdir?

- Yetersiz numune kalitesi
- Çok erken veya çok geç toplanan örnekler
- Uygun olmayan şekilde işlenmiş veya taşınmış örnekler
- Viral genetik mutasyon oluşumu
- PZR inhibitörlerinin varlığı
- Testten önce antiviral uygulaması

Yalancı negatif örnekler için çözüm önerileri nedir?

- Üst solunum yolu örneklerinde test sonucu negatif bulunduysa ASY örnekleri test edilmelidir.
- Hasta örnekleri, (+) ve (-) kontrol ve internal kontroller tüm reaksiyonlarda birlikte incelenmeli ve doğrulanmalıdır.
- Epidemiyolojik korelasyonu ve COVID-19 belirtileri olan bir hastanın testi tekrarlara rağmen negatifse, test edilen örnek daha ileri değerlendirme için KCDC'ye sunulmalıdır.

Ne Zaman, Kim, Hangi Test ile Ne Sıklıkta Test Edilmeli ve Test Sonuçları Nasıl Değerlendirilmeli?

Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19

Patel R et al. (mBio 2020 Mar-Apr; 11(2): e00722-20; doi: 10.1128/mBio.00722-20)

Derleyen: Dr. Rabia Can Sarınoğlu (Marmara Üniversitesi Pendik EAH, Tıbbi Viroloji)



SARS-CoV-2 testleri başlıca iki kategoriden oluşmaktadır:

1. Virüsü direkt olarak saptayan testler,
2. Konağın virüse karşı geliştirdiği bağışık yanıtı saptayan testler

Viral RNA Testleri

SARS-CoV-2'nin direkt olarak saptanmasında viral RNA'yı saptayan nükleik asit amplifikasyon yöntemi kullanılır. Bu testlerde en önemli husus toplanan örnekte viral RNA'nın mevcut olmasıdır.

- Test edilen en yaygın örnek; nazofarinks ve/veya orofarinksten alınan sürüntüdür.
- Eküvyon sıvı bir taşıma ortamı (viral transport besiyeri) içine alınır.
- Pnömonili hastalarda, NF ve oral sekresyonlara ek olarak balgam ve BAL gibi ASY örnekleri de test edilmelidir.
- SARS-CoV-2 saptanmasında her klinik örnek için virüs saptanma olasılığı farklıdır.
- Virus saptanma oranı hastadan hastaya ve hastalığın seyri sırasında değişebilir. Örneğin pnömoni hastalarında burun ve OF örnekleri negatifken, ASY örnekleri pozitif olabilir.
- Negatif test sonucu kişinin enfekte olma olasılığını ortadan kaldırmaz.
- Test sonucu pozitif ise sonuç büyük olasılıkla doğrudur. Ancak, viral RNA'nın test sürecine girmesi (örnek toplanırken, çapraz kontaminasyon sonucu, SARS-CoV-2 ile enfekte bir laboratuvar çalışanı tarafından) yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir.
- Viral RNA, canlı virüs anlamına gelmediği için viral RNA'nın saptanması hastanın bulaştırıcı olduğu anlamına gelmez.
- Bulaştırıcılığın semptomlar başlamadan önce, hatta semptom geliştirmeden de gerçekleşebileceği dikkate alındığında asemptomatik hastaların taranması da düşünülebilir. Ne yazık ki asemptomatik hastalardaki viral RNA tespiti hakkında çok az şey bilinmektedir ve bu tarz test stratejileri mevcut kaynakların kullanımı açısından gerçekçi değildir.

SARS-CoV-2 için mevcut test sayısı arttıkça yeni zorluklarla karşılaşmaktayız;

- Farklı örnek türleri de dahil olmak üzere çeşitli testlerin duyarlılık ve özgüllükleri arasındaki farklar daha iyi anlaşılmalıdır.
- Virüsün mutasyona uğrama olasılığı nedeniyle test performansı monitörize edilmelidir. Viral RNA saptama temelli testlerin performansını etkileyebileceğinden, primer ve prob bağlanma bölgelerindeki değişiklikleri izlemek için virüsün periyodik olarak dizi analizi yapılmalıdır.
- Viral yükün ölçümü; iyileşmenin monitörize edilmesi, tedaviye cevabın değerlendirilmesi ve/veya enfektivite düzeyinin belirlenmesi açısından yararlı olabilir. Halen kullanılan RNA temelli tanı testleri kalitatiftir. Her ne kadar viral yükü belirlemek için kalibre edilebilseler de standartlaştırılmış bir süreç mevcut değildir.

Serolojik testler

- SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastalarda **7-11 gün sonra** antikor cevabı gelişmektedir.
- Bazı hastalarda antikor gelişimi daha geç olabilmektedir. Bu nedenle antikor testleri akut hastalığın tanısında yararlı değildir.
- SARS-CoV-2 enfeksiyonunu geçiren bireylerin reenfeksiyondan tamamen ya da kısmen korunup korunmadığı ve koruyucu bağışıklığın ne kadar sürdüğü bilinmemektedir.

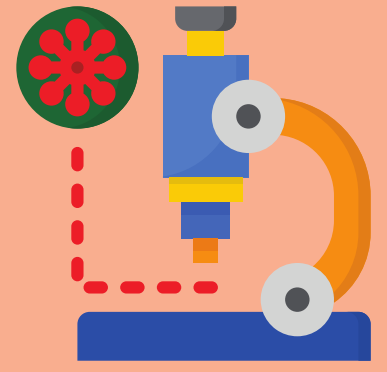
Antikor testlerinin yararlı olabileceği durumlar;

- Temaslı takibinin yapılması
- Lokal, bölgesel ve ulusal seviyede serolojik sürveyans yapılması
- Virüse karşı bağışık cevap geliştiren bireylerin tanımlanması
- Koruyucu bağışıklık geliştiği varsayılırsa, sağlık çalışanları gibi SARS-CoV-2'e tekrar maruz kalma riski olan bireylerin işe geri dönme kararının alınmasında kullanılması
- Terapötik ve profilaktik nötralizan antikorlar için verici olabilecek bireylerin tanımlanması
- PZR testlerinin duyarlılığının saptanmasında, pandeminin gerçek kapsamının belirlenmesinde ve vaka ölüm hızı gibi istatistiklerin hesaplanmasında kullanılması
- Hastalığın geç döneminde başvuran viral RNA negatif bireylerin tanı amaçlı test edilmesi

Şekil.SARS-CoV-2/Covid 19 tanısında kullanılan testler ve potansiyel kullanım alanları

Test tipi	Tespit ettiği	Önemi	Yararlanan
 <p>Viral RNA için nükleik asit amplifikasyon testi (nazofaringeal sürüntü, orofaringeal sürüntü, balgam, BAL, diğer)</p>	SARS-CoV-2 ile mevcut enfeksiyon	Hastalığın seyrini görebilmeleri ve bulaşmayı önlesin diye harekete geçebilmeleri için bireyi enfeksiyon durumu hakkında bilgilendirmek Bulaşmayı önlemek için gerekenlerin yapılması açısından hastayı yönetenleri bilgilendirmek Bulaşı önlemek için gerekli eylemler hakkında bilgilendirmek	Birey Sağlık hizmetleri Halk sağlığı
 <p>Antikor tespiti</p>	Geçmiş SARS-CoV-2 maruziyeti	Duyarlı bireyleri (antikor negatif) ve daha önce enfekte olmuş kişileri tespit etmek Nötralizan antikorları olan bireyleri tanımlamak Temaslı izlemi ve sürveyansı kolaylaştırmak	SARS-CoV-2'ye potansiyel bağışık olarak tanımlananlar (testler koruyucu bağışıklığı tespit ederse, bireyler işe geri dönebilir) Sağlık hizmetleri: Deneysel tedavi Halk sağlığı

Yeni ortaya Çıkan İnsan Koronavirüs Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı – Son Teknoloji



Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art

Loeffelholz MJ et al. (Emerg Microbes Infect 2020 Dec;9(1):747; doi: 10.1080/22221751.2020.1745095)

Derleyen: Dr. Aydan Karagül (Antalya EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji)

Klinik örneklerin alınması, taşınması ve saklanması öneriler nelerdir?

- Hem üst (nazofarinks ve orofarinks sürüntü) hem de alt solunum yolu örneklerinin (balgam, bronkoalveoler lavaj sıvısı) alınması önerilir.
- RNA **dışkı, idrar, serum** ve **kan** örneklerinden de saptanabilir. Ancak bu örnekler ile solunum örneklerinde olduğu kadar güvenilir sonuç elde edilmeyebilir.
- **Tükürüğün** de kullanılabilmesine dair yayınlar bulunmaktadır.
- Alınan sürüntü örnekleri viral taşıma besiyerine konulmalıdır.
- Örnekler 72 saate kadar buzdolabında (2-8°C) tutulmalı; >72 saat durumunda -70°C veya daha düşük sıcaklıklarda dondurularak saklanmalıdır.

Örnek alımı için en uygun zaman nedir? Test sonuçları örneğin alındığı hastalık evresinden etkilenir mi?

- ÜSY örneklerinde: *Semptom başladıktan 7-10 gün sonra* RNA pozitifliği en yüksek düzeydedir.
- ASY örneklerinde: *Hastalığın başlangıcından itibaren 3 hafta boyunca* RNA pozitifliği devam etmektedir.
- **Dışkıda:** Semptomların başlamasından yaklaşık iki hafta sonra RNA sürekli olarak saptanabilir.

Koronavirüslerin laboratuvar tanısında hangi yöntemler nasıl kullanılabilir?

Koronavirüslerin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler *Tablo*'da özetlenmiştir.

Tablo. Koronavirüslerin saptanmasında kullanılan laboratuvar teknikleri

Metot	Özellik	Test Süresi	Uygulama
Antijen EIA	Hızlı, düşük sensivite, bazıları için CLIA onaylı	<30 dk	Tanı (saptama)
Antijen IFA	Sensivite ve spesifite iyi, değerlendirme subjektif	1-4 sa	Tanı (saptama)
Hücre kültürü	Altın standart, ileri düzey araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılır, zaman alıcı	1-7 gün	Tanı (saptama, ayırt etme, tanımlama, karakterizasyon) ve araştırma
Seroloji	Retrospektif bilgi verir, çapraz reaksiyon olasılığı	2-8 sa	Enfeksiyon doğrulanması, epidemiyolojik değerlendirme ve araştırma, aşı değerlendirmesi
NAAT, monopleks, pan-HCoV	HCoV tüm türlerini kapsar ve sesivitesi yüksek	1-8 sa	Tanı (saptama) ve araştırma
NAAT, monopleks, spesifik-HCoV	Sensivite ve spesifitesi yüksek, belirli türleri özgü	1-8 sa	Tanı (saptama, ayırt etme, sınırlı düzeyde tiplendirme) ve araştırma
NAAT, multipleks	Birden fazla patojen test edilebilir, FilmArray olanlar CLIA feragatli	1-8 sa	Tanı (saptama, ayırt etme, sınırlı düzeyde tiplendirme) ve araştırma
NAAT, POCT	Hızlı ve güvenli, iyi hassasiyet ve özgüllük, bazıları CLIA feragatli	15-30 dk	Tanı (saptama, ayırt etme, sınırlı düzeyde ayırt edicilik) ve araştırma

EIA, enzim immüno analizi; IFA, immünofloresan analizi; NAAT, nükleik asit amplifikasyon testi; POCT, hasta başı testi; CLIA, Klinik Laboratuvar Geliştirme Yasası

SARS CoV-2 RNA'nın saptanmasında kullanılan gerçek zamanlı PZR protokolleri nelerdir?

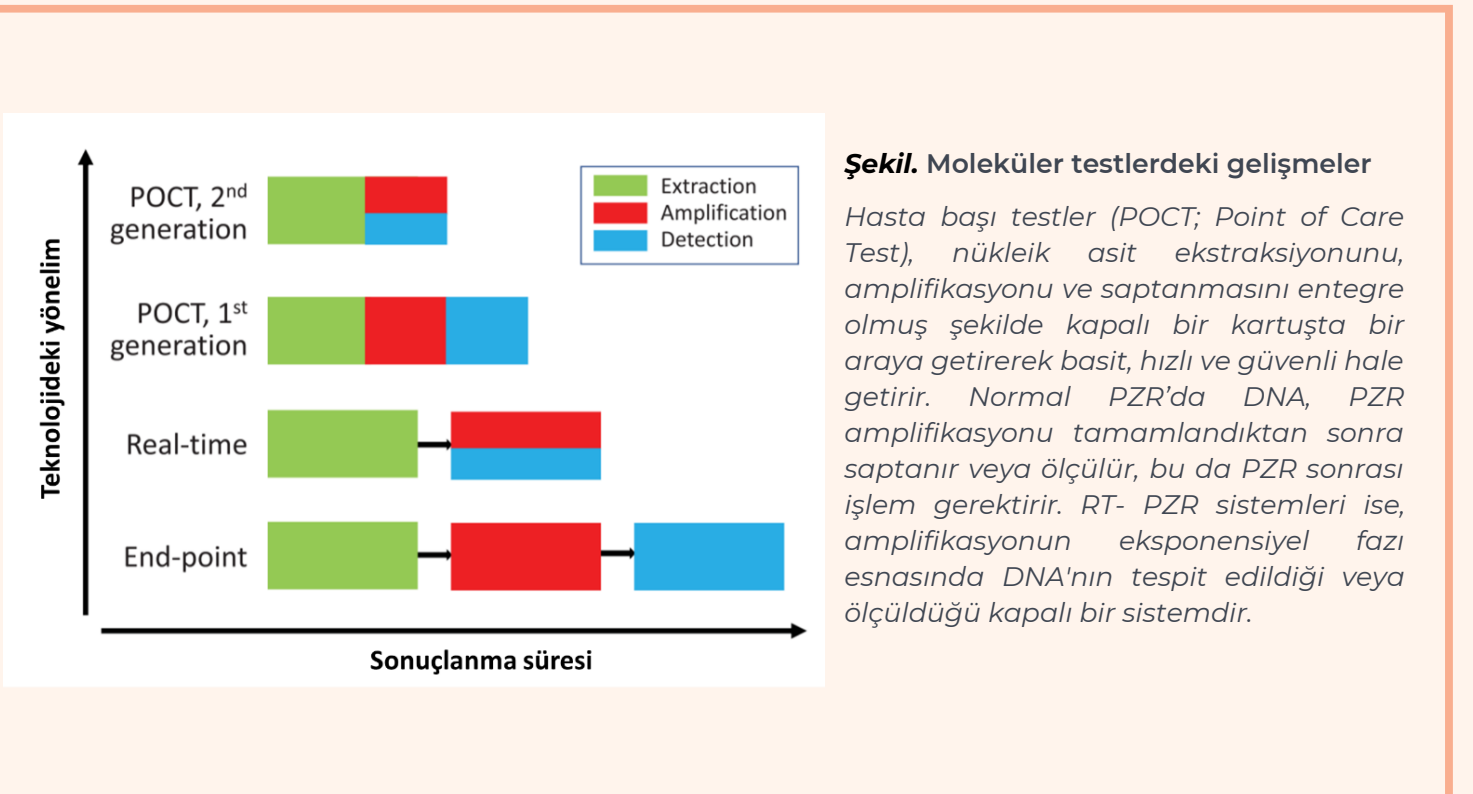
- SARS CoV-2 RNA'nın saptanmasında kullanılan gerçek zamanlı PZR protokolleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün internet sitesinde verilmiştir: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>.
- CDC tarafından geliştirilen panel, SARS benzeri tüm betakoronavirüslerin ve SARS-CoV-2'nin tespiti için gerçek zamanlı PZR panelidir. Birbirinden ayrı üç PZR, **N genini** hedef almaktadır. Bir primer/prob seti tüm betakoronavirüsleri saptarken, iki set SARS-CoV-2 için özgülüdür. Her üç sette de pozitiflik saptanması durumunda SARS-CoV-2 için pozitif rapor edilebilir. Bu panel 4 Şubat 2020'de acil kullanım izni (EUA) almıştır.
- Charité algoritmasında (Berlin, Almanya) ise, *Sarbecovirus* alt türünün (SARS-CoV, SARS CoV-2 ve yarasa ile ilişkili betakoronavirüsler) **E gen bölgesi** ve SARS-CoV-2'ye özgü **RdRp gen bölgesini** tespit eden iki gerçek zamanlı PZR bulunmaktadır. Bu iki genin birlikte pozitif saptanması durumunda SARS-CoV-2 pozitif kabul edilebilir.
- Hong Kong Li Ka Shing Tıp Fakültesi'nin protokolünde ise *Sarbecovirus* alt türünü saptamak için iki gen bölgesini hedefleyen bir yöntem (tarama için **N geninin** araştırılması ve ardından doğrulama için **Orflb geninin** araştırılması) kullanılmaktadır.

Tanı testlerinde yenilikler nelerdir?

- Lizis tamponu, numunelerin enfektivitesini ortadan kaldırmak için kullanılabilir, böylece bir biyogüvenlik kabini olmadığı durumlarda da test çalışılabilir.
- Hızlı hasta başı testlerinin şüpheli olgularda kullanılması, hasta triyajının etkin yapılmasını sağlayarak kısıtlı olan karantina imkanlarının doğru kullanılmasına yol açacaktır.

Makalede göze çarpan veriler:

SARS-CoV-2 enfeksiyonlarında hızlı ve doğru tanı için entegre, erişimi kolay hasta başı test hizmeti vermek üzere birçok moleküler cihaz geliştirilmektedir. Bu testler basit, hızlı ve güvenilir olup salgın durumunda hasta tanısı ve tedavisinde yerel hastanelerde ve kliniklerde kullanılabilir.



Şekil. Moleküler testlerdeki gelişmeler

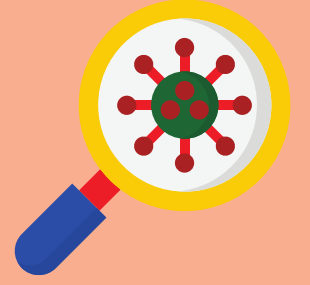
Hasta başı testler (POCT; Point of Care Test), nükleik asit ekstraksiyonunu, amplifikasyonu ve saptanmasını entegre olmuş şekilde kapalı bir kartuşta bir araya getirerek basit, hızlı ve güvenli hale getirir. Normal PZR'da DNA, PZR amplifikasyonu tamamlandıktan sonra saptanır veya ölçülür, bu da PZR sonrası işlem gerektirir. RT- PZR sistemleri ise, amplifikasyonun eksponensiyel fazı esnasında DNA'nın tespit edildiği veya ölçüldüğü kapalı bir sistemdir.

COVID-19'un Laboratuvar Tanısı: Güncel Sorunlar ve Zorluklar

The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges

Tang YW et al. (J Clin Microbiol 3 April 2020; doi:10.1128/JCM.00512-20)

Derleyen: Dr. Ali Korhan Sığ (Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi, Tıbbi Mikoloji)



Bu derlemede COVID-19'un laboratuvar tanısındaki güncel sorunlar ve zorluklar konusunu incelemiştir.

Preanalitik Konular:

Örnek Alımı:

- Enfeksiyonun ilk 5-6'ncı günlerinde üst ve alt solunum yollarında viral yük yüksektir. Nazofaringeal ve/veya orofaringeal silgeç erken enfeksiyon tanısında ve tarama için önerilmektedir. RNA tespiti OF örneklerinde, NF örneklere kıyasla daha düşüktür. Her ikisinden de örnek alınması ve aynı/ayrı transport besiyerleri ile taşınması uygundur.
- Doğru NF örnek almak için nazal kavitenin derin noktalarına ulaşmak gerekir. Hastada göz yaşarması olması ve hastanın geri çekilmesi genellikle hedefe ulaşıldığının kanıtıdır. OF örnekleme sırasında bazı hastalarda öğürme refleksi oluşabilir. Silgeçler örnek alanında en az 10 saniye tutulmalı ve 3 defa döndürülmelidir.
- Örnek alımının teorik olarak da olsa bulaş sebebi olma ihtimali bulunmaktadır.
- "Floke uçlu silgeçler" bulunmaması durumunda diğer silgeçler kullanılabilir.
- Bazı olgularda tekrarlayan örnek alımı veya ASY örneği gerekebilir.
- Diğer solunum yolu virüsleri ekarte edilmelidir.
- Hastada bir viral pnömoni tablosu varsa, potansiyel bir maruziyet söz konusu ise ve/veya radyolojik bulgular COVID-19 yönünde ise tekrarlayan örnek alımı tavsiye edilmektedir.

Geç dönem virüs tespiti ve ciddi pnömoni olgularının monitorizasyonu:

- İdeal olarak balgam veya BAL en yüksek viral yükü göstermesi açısından tavsiye edilir.
- Ciddi pnömoni veya ARDS tablolarında entübasyon sırasında ASY örneği almak faydalıdır. Entübasyon sonrası da balgam ve/veya BAL örneği alınabilir.
- Pnömoni olgularında dışkıda da yüksek düzeyde viral yük saptanmıştır. SARS koronavirüsler *enterositlerde gösterilmiş* ve *dışkı kültürlerinden izole edilmiştir*. Bu nedenle solunum örneğinin yanında rektal silgeçten RT-PZR çalışılması faydalı olacaktır.

PZR Öncesi ve Sırasında Biyogüvenlik:

- Solunum örnekleri *Sınıf 2 BGK*'lerde çalışılmalıdır. Örneklerin ideal olarak BGD3 laboratuvarlarda çalışılmasına yönelik tartışmalar mevcuttur.
- Ekstraksiyon öncesi, örnek kabin içerisinde guanidyum bazlı ve deterjan olmayan bir inaktivatör içeren lizis tamponu ile muamele edilmelidir. VTM de guanidyum tuzları içermelidir.
- Tükürük/silgeç örnekleri viral RNA'nın degrade olmasını engellemek için lizis tamponu ile dezenfekte edilmelidir. *Viral RNA'nın degrade olmasına neden olabileceğinden, örnekler 56 °C'de ısıtılıp bekletilmemelidir.*
- RNA ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve tespiti için ID NOW™ (Abbott, San Diego, CA), cobas® Liat® (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) and GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) gibi kapalı, doğrudan örneğin eklendiği sistemler de mevcuttur.

Analitik Konular:

İmmün bazlı yöntemler:

Genellikle yatay akım sistemine dayanan ve hasta başı çalışılan bu testler, virüs antijenlerinin veya antikorların (IgM ve IgG) tespitine yöneliktir.

Antijen testi:

- Maliyet ve zaman açısından avantajlı gibi gözükse de, duyarlılık açısından ciddi sorunludur.
- Hastaların viral yükündeki ciddi değişkenliğe bağlı olarak olgular gözden kaçırılabilir.

Antikor testi:

- Hastalığın küresel yükünün tespiti, asemptomatik olguların rolünün belirlenmesi, hastalığın artış oranları ve genel mortalitesinin hesaplanması için gereklidir.
- IgM cevabının özgül olmaması, özgül IgG cevabının ise haftalar alması; gecikmiş olguların tanısı/doğrulanması ile sağlık çalışanlarının salgın süresince bağışıklığının kontrolü dışında aktif vaka takibinde faydalı olamayacaktır.

Moleküler Yöntem Seçimi:

- Yeni nesil dizileme teknikleri, mutasyonların saptanmasında faydalıdır ancak tanısız anlamda elverişsizdir.
- Çoğu moleküler tanı yöntemi gerçek zamanlı RT-PZR'ye dayanmaktadır.
- "Loop-mediated" izotermal amplifikasyon, mikroarray tespit sonrasında multipleks izotermal amplifikasyon gibi diğer yöntemler de kullanılabilir.

Gerçek Zamanlı RT-PZR için Hedef Seçimi:

- Virüsün genomunda spike (S), zarf (E), transmembran (M), helikaz (Hel) ve nükleokapsid (N) gibi moleküler hedefler bulunur.
- Türe özgü, viral replikasyon için gerekli aksesuar genler (RdRp, HE, ORF1a ve b) mevcuttur.
- CDC, hedef olarak nükleokapsid hedeflerini önerirken, DSÖ, E geni saptanmasının ardından RdRp'ye bakılmasını önermektedir.
- Çapraz reaksiyonları önlenmek amacıyla, en az 2 moleküler hedefin çalışılması önerilir.
- Farklı hedeflerin kullanıldığı tekniklerin birbirine üstünlüğü saptanmamıştır. *En az bir korunmuş ("conserved") hedef ile en az bir türe özgü hedef seçilmesi uygun gözükmektedir.*

Analiz Sonrası Konular:

Sonuçların Yorumlanması:

- Her iki moleküler hedefin pozitifliği laboratuvarca onaylanmış vaka kabul edilir.
- CT (cycle threshold) değeri 40'ın altında olanlar pozitif, üstündeki değerler negatif kabul edilir.
- CT değeri 40'ın altında olup hedeflerden sadece birinin pozitif olması: Test tekrarı gerektirir.
- Viral yük ile hastalığın seyri arasında ilişki kurulmuş olsa da, RT-PZR ile terapötik cevap ve/veya prognoz konusu henüz kullanıma girmemiştir. Öte yandan, yüksek viral yükü işaret eden düşük CT değerleri bulaştırıcılık açısından önemlidir.

Enfektivite (Bulaşıcılık) ve Tedaviye Yönelik Testler:

- Pnömoni olgularının taburcu edilmesi ve izolasyondan çıkarılması için test yapılmalıdır.
- Hastaların kendi kendilerini 1 aya kadar karantina altına almaları tavsiye edilir.
- Tedavi başarısına işaret etmek için en iyi yöntemin, **ardışık iki kez alınan rektal silgeçlerden** yapılan RT-PZR testlerinin negatif çıkması olacağı değerlendirilmektedir. Bunlardan birinin pozitifliği hastanın halen canlı virüs taşıdığına ve bulaştırıcılığın devam ettiğine işaret eder.

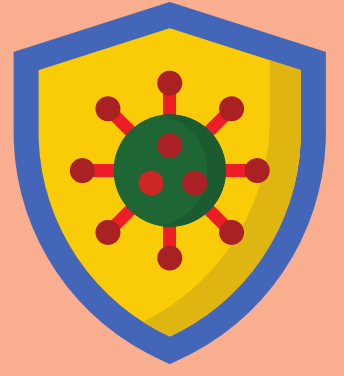
COVID-19 Serolojisi:

- S ve N proteinleri, serolojik testler için anlamlı antikorlar oluştururlar. Hastalarda özellikle N'ye karşı antikorlar saptanmıştır ki erken dönem tanıda önemli olduğu düşünülmektedir.
- Serokonversiyon hastalığın ilk 7 gününde hastaların %50'sinde, 14. günde ise hepsinde gerçekleşmesine rağmen, viral yükte anlamlı düşüş olmamıştır. Bu nedenle antikor tespitinde kullanılan hızlı testlerin, hastalığın epidemiyolojisinin tespitinde, asemptomatik olguların bağışıklık durumunun saptanmasında ve olguların doğrulanmasında etkili olacağı ama **tarama testi olarak kullanılmalarının veya erken dönem olguların saptanmasında faydalı olmayacakları düşünülmektedir.**

Sonuçlar:

- NF silgeçler, OF silgeçlere göre üstündür. Her iki bölgeden de alım duyarlılığı artırır.
- Silgeç bulunamayan yerlerde hastanın kendisinin tükürük biriktirmesi veya nazal yıkama sıvısı getirmesi yoluyla test yapılabilir. Bu yöntem özellikle asemptomatik olan ve "endişeli" popülasyonlarda, epidemiyolojik incelemelerde etkindir.
- Silgeç analizleri negatif çıkan yatan hastalarda balgam ya da BAL örneği tavsiye edilir.
- Rektal silgeçler yoluyla geç dönem enfeksiyonların tanısı veya enfektivite (bulaşıcılık) ve tedaviye yönelik kullanılması konusu henüz aydınlatılmamıştır.
- Gerçek mortalitenin gösterilmesi için diğer epidemiyolojik belirteçler ile birlikte geniş kapsamlı moleküler ve/veya serolojik taramaya ihtiyaç vardır.

SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2'nin (2019-nCoV) Laboratuvar Testleri: Güncel Durum, Karşılaşılan Zorluklar ve Alınan Tedbirler



Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures

Yan Y et al. (Rev Med Virol 2020;e2106; doi: 10.1002/rmv.2106)

Derleyen: Dr. Bilal Olcay Peker (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji)

Uygun numune toplanması ve işlenmesi niçin önemlidir?

- Viral RNA, üst solunum yolu (ÜSY), alt solunum yolu (ASY), dışkı, kan ve idrar örneklerinde saptanabilmektedir.
- Tedavi sırasında viral saçılımı göstermek için tekrarlayan örneklemeler yapılmalı ve test edilmelidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), klinik olarak iyileşen bir hastada en az 24 saat arayla iki ardışık gerçek zamanlı revers transkriptaz PZR (rRT-PZR) testinde negatif sonuç elde edilene kadar örnek toplama sıklığının en az 2 ila 4 günde bir olması gerektiğini önermektedir.
- Numunelerin kalitesi; örnek toplanması, taşınması ve saklanması basamaklarından etkilenir. Örnek toplamaya ilgili önemli hususlar *Tablo'da* gösterilmiştir.
- Farklı gen bölgelerini hedefleyen farklı rRT-PZR yöntemleri kullanılmasına rağmen nazofaringeal (NF) ve orofaringeal (OF) örneklemede eşik döngü (CT) değeri, tek başına NF veya OF örneklemeden çok daha düşük bulunmuştur.
- Dışkıdaki viral yük kinetiği hala çok açık değildir. SARS-CoV-2 RNA, OF örneğinde saptanmasa bile anal sürüntü örneğinde bulunabilmektedir. Bu nedenle ASY örnekleri mevcut olmadığında dışkı örnekleri test edilerek SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanısı mümkündür.

Nükleik asit testlerinde hangi gen bölgesi/bölgeleri hedeflenmelidir?

- SARS-CoV-2 < 10 kopya/reaksiyonu tespit edebilen **ORF1b** ve **N** genini hedefleyen kantitatif rRT-PZR testi bildirilmiştir. N geninin analizi ORF1b genine kıyasla pozitif klinik örneklerde 10 kat daha duyarlı bulunmuştur. **Test özgüllüğünü arttırmak için, ikinci bir genom bölgesinin varlığının gösterilmesi önemlidir.**
- **E** genini ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (**RdRp**) genini hedefleyen, sırasıyla 5,2 ve 3,8 kopya/reaksiyon saptama sınırı (LOD) ile en iyi hassasiyeti elde eden testler geliştirilmiş, N gen analizi daha az duyarlı bulunmuştur.
- Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, **hem ORF1ab hem de N geninin birlikte tespit edilmesini pozitif test sonucu olarak kabul etmektedir. Yalnızca bir bölge pozitifse, sonucun yeniden test edilmesi gerekmektedir.**
- Almanya'da Charité sağlık kuruluşu, E gen analizini (LOD: 5,2 kopya/reaksiyon) **tarama testi** olarak, RdRp gen analizini ise (LOD: 3,8 kopya/reaksiyon) **doğrulama testi** olarak önermektedir.
- CDC'ye göre, pozitif sonuç için N genini hedefleyen 3 farklı bölgenin de saptanması gerekmektedir. Yalnızca bir hedef pozitifse, test tekrarlanmalıdır.

Tablo. Örnek toplamanın önemli noktaları

Örnek tipi	Toplama amacı	Toplama materyali	Taşıma ve saklama	Numune stabilitesinin sağlanması ve NAT testlerini etkilemeden inaktivasyon	Numuneden kaynaklanan NAT testlerindeki yanlış negatiflikten kaçınma
NF ve OF sürüntü	Tanı için	Plastik şafta sahip sentetik fiber eküvyon ve steril kap	1) 24 saat içinde test edebilirsiniz 4° C'de saklayınız. Aksi takdirde -70° C saklayın	Guanidin tuzu içeren virus taşıma vasatı	1) Ekstraksiyon ve amplifikasyonda pozitif, negatif ve inhibisyon kontrolü kullanın 2) Eşzamanlı insan RNaz P geni kullanın
Balgam	Tanı için	Steril kap	2) Serum 4° C'de 3 gün boyunca saklanabilir Uzun süreli saklama için ≤ -20° C		
BAL	Ciddi hastalarda tanı için	Steril kap			
Endotrakeal aspirat ve NF aspirat		Steril kap	3) Uzun mesafe taşınacaksa kuru buz veya diğer soğutma yöntemleri gereklidir		
Kan	NAT testleri için tanı oranını yükseltmek, viremiyi izlemek, epidemiyolojik sürveyans	EDTA antikoagülanlı, vakumlu kan toplama tüpü	4) Tekrarlanan dondurma ve çözündürmeden kaçının		
Serum	Serokonversiyonu izlemek için antikor testlerinde kullanılmak üzere akut ve konvelesan dönemde 2 örnek, epidemiyolojik sürveyans	Antikoagülan içermeyen vakumlu kan toplama tüpü			
Gaita	ASY örnekleme sağlanamıyorsa tanı oranını yükseltmek için	Steril kap			
İdrar	ASY örnekleme sağlanamıyorsa tanı oranını yükseltmek için	Steril kap			

“Toplama materyali” ve “Taşıma ve saklama”, DSÖ ve Çin Ulusal Sağlık Komisyonu tarafından oluşturulan 2019-nCoV laboratuvar test kılavuzlarına atıfta bulunmaktadır. ASY: Alt solunum yolu, NAT: Nükleik asit testi

Serolojik testler hangi durumlarda, ne zaman kullanılmalıdır?

- Serolojik testler, nükleik asit testlerinin (NAT) mümkün olmadığı nadir durumlarda tanı için, devam eden bir salgının araştırılması için veya bir salgının derecesini geriye dönük olarak değerlendirmek de dahil olmak üzere serolojik araştırmalar için yapılabilir.
- Serolojik testlerde temel konu antijenin kaynağıdır. CoV'lar arasındaki korunmuş diziler nedeniyle çapraz reaksiyon görülebilir.
- Rekombinant antijen temelli testler, hem özgüllüğü hem de duyarlılığı en üst düzeye çıkarmak için immünojenik ve virüse özgül antijenlerin seçilmesini sağlar ve standardizasyon için daha uygundur. SARS-CoV ve MERS-CoV'de N ve S proteini, başlıca immünojenik proteinlerdir ve rekombinant antijen üretmek için ilk tercihtir. Çapraz reaksiyon rekombinant antijenler kullanıldığında da görülebilir.
- DSÖ, ardışık numunelerden (akut ve iyileşme fazında) SARS-CoV-2 serolojisinin izleminde, ilk serum örneğinin hastalığın 1. haftasında, ikincisinin ise 3-4 hafta sonra toplanmasını önermektedir. Sadece tek bir serum örneği alınabiliyorsa semptomların başlamasından en az 3 hafta sonra incelenmesi önerilmektedir.
- SARS'ta IgG serokonversiyonu hastaların %93'ünde ortalama 20 gündür. Hastaların çoğunda nötralize edici antikor titresinin 5. ve 8. haftalar arasında zirve yaptığı ve sonrasında 6,4 haftalık bir yarılanma ömrüyle azaldığı gösterilmiştir. İlk örneklemede hem IgM hem de IgG titreleri nispeten düşük veya saptanamaz düzeydedir. Beşinci günde, hastalarda viral antikorlarda bir artış görülebilir. IgM pozitiflik oranı %50'den %81'e yükselirken IgG pozitiflik oranı %81'den %100'e yükselmektedir.
- SARS-CoV-2'nin IgG ve IgM kinetiklerini doğrulamak için daha fazla kanıt gerekmektedir.

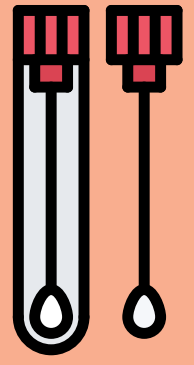
SARS-CoV-2 RNA'nın NAT kapasitesini artırmak için ne yapılmalıdır?

- ASY örnekleri mevcut değilse, NAT'ın pozitiflik oranını arttırmak için enfeksiyonun ileriki dönemlerinde dışkı ve kan örnekleri toplanmalıdır.
- Virüsü etkisiz hale getirmek ve RNA'yı korumak için örnekler **guanidin tuzu** içeren reaktiflere konmalıdır (TRIZOL, TRIZOL LS veya AVL tamponu gibi).
- Testlerin kalite kontrolünü sağlayabilmek amacıyla ekstraksiyon ve amplifikasyon basamakları için uygun pozitif, negatif ve inhibisyon kontrolleri kullanılmalıdır.
- Yanlış negatif sonuçları önlemek için insan **RNase P** geni internal kontrol olarak kullanılmalıdır.

Makalede göze çarpan veriler:

- SARS-CoV-2 için farklı gen bölgelerini hedefleyen farklı ticari NAT kitleri mevcuttur. N geninin analizi ORF1b genine göre pozitif klinik örneklerde 10 kat daha duyarlı bulunmuştur.
- SARS-CoV-2'nin serolojik kanıtı hala zayıftır. Farklı antijenleri hedefleyen çeşitli testlere ihtiyaç vardır.
- Çift örneklemin yapılması, farklı hastalık dönemlerinde virüsün kinetiğinin ve pozitif serolojik test oranlarının izlenmesine yardımcı olacaktır.
- ASY örnekleri mevcut olmadığında dışkı örnekleri test edilerek SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısını arttırmak mümkün olabilmektedir.
- NAT sonuçlarının güvenilir olmasını sağlamak için uygun kontroller oluşturulmalıdır. SARS-CoV-2 RNA'sını amplifiye ederken RNase P dahil kontrol olarak önerilmektedir.

SARS-CoV-2 Moleküler Tanısında Burun Sürüntü Örneğinin Alınması: Nazofaringeal Eküvyon Yokluğunda Uygun Bir Alternatif Olabilir mi?



Nasal swab sampling for SARS-CoV-2: A convenient alternative in time of nasopharyngeal swab shortage

Péré H et al. (J Clin Microbiol 2020 Apr 15. pii: JCM.00721-20; doi:10.1128/JCM.00721-20)

Derleyen: Dr. Halil Er (Antalya EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji)

Burun sürüntü örneği nazofarinks sürüntü örneği yerine kullanılabilir mi?

Nazofaringeal sürüntü, Dünya Sağlık Örgütü tarafından SARS-CoV-2'yi saptamak için önerilen örnekleme yöntemidir. Bu çalışmada SARS-CoV-2 enfeksiyonunun moleküler tanısı için bakteriyolojide kullanılan eküvyonlar ile burun sürüntüsü alınarak alternatif bir işlem uygulanmıştır. COVID-19 şüphesi ile yatan 44 hastadan nazofarinksten (Xpert Nasopharyngeal Sample Collection Kit, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) ve burundan (Copan Transystem, Copan, Brescia, Italy) eküvyon ile sürüntü örnekleri alınarak SARS-CoV-2 için moleküler test uygulanmıştır.

Burun ve nazofarinksten örnek alınması amacıyla eküvyon bir engele (sırasıyla alt konka ve nazofaringeal boşluğun arkası) çarpana kadar burun deliğine sokulmuş, beş kez döndürülüp çıkarılmıştır. Örneklemeden sonra, nazofaringeal sürüntü, 3 mL viral transport besiyerine (Xpert Viral Transport medium, Cepheid), burun sürüntü örneği ise 3 mL tuz çözeltisi (NaCl %0.9) içeren 15 mL'lik bir tüpe yerleştirilmiştir. SARS CoV-2, gerçek zamanlı PZR (Allplex 2019-nCoV Testi (Seegene, Seoul, Korea) ile araştırılmıştır.

Bulgular

- Hastaların %84,1'inde nazofaringeal sürüntü örneklerinde pozitiflik saptanmıştır. Pozitif saptanan 37 hastanın 33'ünde burun sürüntü örneklerinde de pozitiflik elde edilmiştir. Nazofarinks sürüntü örneği SARS-CoV-2 negatif saptanan tüm hastalarda burun sürüntü örneği de negatiftir (*Tablo*).
- Burun ve nazofarinks sürüntü örneklerinin sonuçları karşılaştırıldığında, 7 (%15,9) gerçek negatif, 4 (%9,1) yanlış negatif ve 33 (%75) gerçek pozitif sonuç elde edilmiştir. Buna göre, burun sürüntü örneklerinden çalışılan SARS-CoV-2 gerçek zamanlı PZR testinin duyarlılığı %89,2 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.

Sonuç:

Burun sürüntü örneği, altın standart kabul edilen nazofaringeal sürüntü örneği ile karşılaştırıldığında elde edilen gerçek zamanlı PZR sonuçları birbirine benzerdir. Elde edilen sonuçlar SARS-CoV-2 moleküler tanısında nazofaringeal örnekleme yapılamadığı durumlarda burun sürüntü örneklerinin kullanılabilmesini göstermektedir.

Tablo. SARS-CoV-2'nin moleküler tanısında nazofarinks ve burun sürüntü örneklerinin karşılaştırılması

Nasopharyngeal sample/Nasal sample results	n (%)
Concordant results	
Positive/Positive	33 (75.0%)
Negative/Negative	7 (15.9%)
Discordant results	
Positive/Negative*	4 (9.1%)
Total	44 (100.0%)

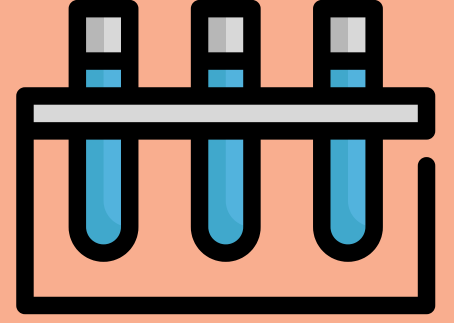
* Out of the 4 discordant results, 2 had very low viral loads ($C_T=38$ on the N gene).

SARS-CoV-2 Testi İçin Viral Transport Besiyerine Alternatif Olarak Salin, Fosfat Tamponlu Salin ve Minimum Temel Besiyeri Kullanılabilir mi?

Evaluation of saline, phosphate buffered saline and minimum essential medium as potential alternatives to viral transport media for SARS-CoV-2 testing

Kyle G et al. (J. Clin. Microbiol 2020 Mar 30. pii: JCM.00590-20; doi: 10.1128/JCM.00590-20)

Derleyen: Dr.Hilal Bölükbaşı (Ankara Şehir Hastanesi, Doku Tiplendirme Laboratuvarı)



Neden viral transport yerine başka besiyerleri denenmiştir? Hangi transport besiyerleri kullanılmıştır?

Salgında doğan ihtiyaç nedeniyle daha çok test istenmekte ve buna paralel olarak taşıyıcı besiyeri gereksinimi artmaktadır. Bu amaçla çalışmada **%0.9'luk tuzlu su** (Baxter; Eerfield, IL), **PBS** ("phosphate buffered saline") ve **MEM** ("minimum 21 essential media"; Corning; NY) ortamlarının nazofarinks sürüntü örneklerinin transportunda kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Transport besiyerlerinin karşılaştırılmasında hangi moleküler testler kullanılmıştır?

Cobas® SARS-CoV 2 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) ve valide edilmiş ancak henüz FDA onayı olmayan SARS-CoV-2 testi (LDT) kullanılmıştır. SARS-Cov-2 LDT testinde, nükleokapsit (NUC) ve açık okuma çerçevesi (ORF) genleri hedef alınarak çalışılmıştır.

Klinik örnekler nasıl çalışılmıştır?

SARS-CoV-2 pozitif hasta örneği (konsantrasyon: 10 000 kopya/ml) eklenmiş toplam 48 örnek çalışılmıştır. Örneklerin alındığı gün (0. gün), viral transport besiyerine (M4-RT), %0.9'luk tuzlu su, PBS ve MEM olmak üzere dört farklı besiyerine koyulan 6 örnek (toplam 24 örnek) ve negatif kontroller iki yöntemle çalışılmıştır (*Tablo*). İlk testlerin ardından örneklerin yarısı buzdolabında (2-8 °C) saklanırken kalan yarısı alikotlar halinde -15 ile -25 °C'de saklanmıştır. 1, 3 ve 7. günlerde her iki metotla da test edilmek üzere alikotlar stoktan çıkarılarak kullanılmıştır. Taşıyıcı besiyerleri, uyum (+/- 2 Ct şeklinde) ve stabilite (7 gün boyunca +/- 2 Ct değerleri) yönünden VTM ile karşılaştırılmıştır.

SARS-CoV-2 tespiti için viral transport mediuma (M4-RT) alternatif olarak tuzlu su, PBS ve MEM kullanıldığında test sonuçları nasıldır?

Her iki testin SARS-CoV-2 sonuçları değerlendirildiğinde hem buzdolabında saklanmış hem de dondurulmuş stok örneklerinde tüm taşıyıcı besiyerleri için benzer sonuçlar elde edilmiştir (*Tablo*). Duyarlılık ve stabilite açısından bir kayıp saptanmamıştır.

SONUÇ:

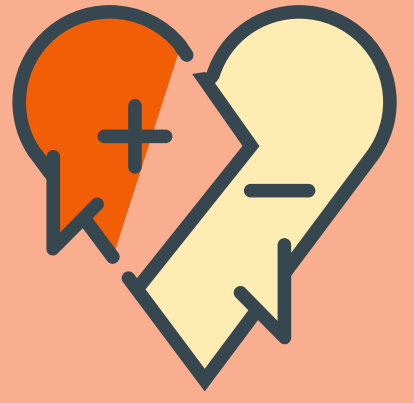
SARS CoV-2 tanısında en sık kullanılan ve en tercih edilen klinik örnek türü ve transport şekli viral transport besiyerinde gönderilen nazofarinks sürüntü örneğidir. Bu çalışmada elde edilen veriler SARS CoV-2 tayininde MEM, PBS veya %0,9'luk tuzlu suyun VTM'ye alternatif olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Tablo. M4-RT, MEM, PBS veya tuzlu suda saklanmış nazofarinks örneklerine ait sonuçlar

Storage Temp (°C)	Media (N)	LDT C _t values								Cobas SARS-CoV-2 C _t values							
		Day 0		Day 1		Day 3		Day 7		Day 0		Day 1		Day 3		Day 7	
		NUC	ORF	NUC	ORF	NUC	ORF	NUC	ORF	ORF/a	E	ORF/a	E	ORF/a	E	ORF/a	E
2-8	M4 (3)	29.3	28.3	28.8	28.1	28.6	28.0	28.8	28.1	26.24	27.00	26.43	27.20	26.65	27.29	26.85	27.50
		29.6	28.6	29.0	28.2	28.9	28.2	29.6	28.7	25.92	26.84	26.37	27.31	26.66	27.24	21.01	27.80
		29.3	28.3	28.6	27.8	28.2	27.2	29.0	28.2	25.99	26.81	26.23	26.90	26.54	27.16	26.83	27.47
-20	M4 (3)	29.2	28.2	29.0	28.1	28.9	28.2	29.0	28.4	26.92	27.62	26.65	27.37	26.79	27.43	26.99	27.93
		28.8	27.5	29.2	28.4	28.6	28.6	29.2	28.3	26.16	27.05	26.58	27.24	26.87	27.45	26.78	27.44
		30.2	28.8	30.7	29.0	30.0	30.0	29.8	28.9	25.72	26.58	26.70	27.43	26.71	27.19	26.96	27.65
2-8	MEM (3)	29.3	28.5	29.0	28.5	28.8	28.4	29.3	28.9	26.55	27.50	26.81	27.73	26.92	27.78	26.92	28.01
		28.9	28.1	28.6	28.2	28.4	28.1	28.6	27.9	26.00	26.83	26.89	27.76	27.22	28.02	27.27	28.04
		28.8	28.2	28.6	28.4	28.4	28.2	28.4	27.9	26.44	27.33	26.93	27.88	26.70	27.58	27.25	28.13
-20	MEM (3)	30.1	28.7	29.8	28.6	29.6	28.6	29.7	28.7	26.49	27.33	26.70	27.76	27.29	28.15	27.53	28.31
		29.7	28.0	29.2	28.4	27.8	26.5	29.4	28.6	26.54	27.59	26.99	27.99	27.35	28.21	27.58	28.50
		28.6	27.7	28.5	28.2	28.6	28.6	29.6	29.0	26.79	27.63	27.09	27.99	27.34	28.10	27.53	28.47
2-8	PBS (3)	30.1	28.7	29.0	27.8	29.7	28.7	29.7	28.7	26.77	27.28	26.73	27.62	26.88	27.95	27.17	28.14
		28.0	26.9	26.2	25.5	26.8	26.0	26.8	25.9	26.42	27.24	26.79	27.53	26.80	27.57	27.22	27.99
		29.1	28.0	28.6	28.1	28.8	28.0	29.4	28.6	26.28	27.01	26.83	27.70	26.84	27.56	26.88	27.68
-20	PBS (3)	29.7	28.7	28.7	28.0	29.1	28.2	30.1	29.3	26.15	26.88	26.65	27.49	26.95	27.73	26.86	27.93
		29.6	28.2	29.6	28.6	29.5	28.3	29.6	28.7	26.41	27.36	26.34	27.26	26.33	27.37	26.75	27.69
		29.8	28.5	29.0	28.0	29.3	28.8	29.8	29.1	26.52	27.40	26.85	27.80	26.60	27.46	27.06	27.99
2-8	Saline (3)	29.8	28.9	29.3	28.6	29.0	28.2	29.1	28.3	26.77	27.65	26.98	27.91	26.92	27.80	27.31	28.30
		30.0	28.9	29.5	28.7	28.6	27.5	29.8	29.2	26.48	27.47	27.06	28.00	27.14	28.10	27.41	28.41
		29.7	28.7	29.3	28.9	29.7	28.9	29.9	29.1	25.99	27.07	27.06	28.03	27.28	28.30	27.42	28.47
-20	Saline (3)	30.2	28.9	29.8	28.8	29.7	28.7	29.6	28.9	26.64	27.62	27.02	27.93	27.21	28.10	27.29	28.17
		29.0	27.9	29.2	28.6	30.1	29.1	29.5	28.8	26.26	27.21	26.88	27.86	27.28	28.29	27.14	28.07
		30.1	28.9	29.6	28.7	30.8	29.1	29.8	29.0	26.33	27.33	26.76	27.88	26.80	27.92	27.23	28.21

N, test edilen örnek sayısı; *LDT*, laboratuvarında geliştirilen test; *NUC*, nükleokapsit hedef; *ORF*, açık okuma çerçevesi hedefi; *E*, zarf hedefi; *C_t*, cycle threshold; *MEM*, minimum esansiyel besiyeri; *PBS*, fosfat tamponlu tuzlu su

Rekürens DEĞİL! RT-PZR Sonuçlarında Yalancı Negatiflik ve COVID-19 Olgularında Uzamış Nükleik Asit Konversiyonu



False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence

Xiao AT et al. (J Med Virol 2020 Apr 9; doi: 10.1002/jmv.25855)

Derleyen: Dr. Ekin Kırbaş (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Klinisyen:

- Hastanın ardışık iki negatif PZR testi sonrasında, şimdiki PZR testi tekrar pozitif geldi. Bu duruma 'tekrarlayan pozitiflik' veya 'rekürrens' diyebilir miyiz?

Mikrobiyolog:

- Hayır, karşılaştığımız durum PZR testinde yalancı negatiflik' görülebilmesi veya 'uzamış viral klerens' sebepli de olabilir.

Nükleik asit (NA) konversiyon süresi nedir?

Semptomların başlangıcı ile birinci negatif PZR sonucu arasında geçen süre olarak tanımlanmıştır.

İki negatif PZR sonucundan sonra pozitif sonuç saptanabilir mi?

Çalışmaya dahil edilen 70 COVID-19 hastasının 15'inde (%21.4) ardışık iki negatif PZR sonucunu takiben, tekrar pozitif PZR sonucu saptanmıştır. 'Tekrar pozitifleşme' yanlış negatif PZR testi veya uzamış NA konversiyonu sebepli olabilir.

PZR sonucu tekrar pozitifleşen hastaların diğer hastalardan farkı var mıdır?

Ardışık iki negatif PZR sonucu sonrasında tekrar pozitif PZR sonucu saptanan hastalara kıyasla kontrol grubundaki hastaların, daha genç olduğu ($p=0.093$) ve nükleik asit konversiyon sürelerinin çok daha kısa (Kontrol grubu: 21 gün; PZR sonucu tekrar pozitifleşen hastalar: 36 gün, $p<0.001$) olduğu belirlenmiştir.

Nükleik asit konversiyonu radyolojik bulgulardan ve semptomlarda olan düzelmelerden bağımsız mı görülmektedir?

COVID-19 hastalarının bir kısmında radyolojik bulgularda ve semptomlarda olan düzelmelerden bağımsız olarak NA konversiyonu görülebilir. 70 hastanın birinde, semptomların başlangıcından 45 gün sonra PZR sonucu pozitif saptanmıştır.

Makalede göze çarpan veriler:

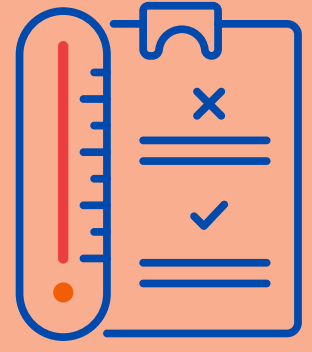
Güncel rehberde, hastada ardışık iki negatif PZR test sonucu taburculuk şartlarından biridir. Ancak viral testte yalancı negatiflik oranının yüksek olması ve uzamış NA konversiyonu olan hastaların oranının göz ardı edilmesi nedenlerinden dolayı 'tekrar pozitifleşme' veya 'rekürrens' yerine; 'yalancı negatif PZR sonucu' ya da 'uzamış viral klerens' görülüyor olabilir.

SARS-CoV-2'nin Moleküler Tespiti İçin Alternatif İş Akışı - Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti Eksikliğine Çözüm

An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage

Fomsgaard AS et al. (Euro Surveill 2020 Apr;25(14); doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398)

Derleyen: Dr. Müge Hacer Özkarataş (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD)



Çalışmanın amacı nedir?

Bu çalışmada nükleik asit (NA) ekstraksiyonu yapılmadan elde edilen RT-qPZR sonuçları (pozitif sayısı ve Ct değerleri) ile NA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra (MagNA Pure 96 veya QIAcube Connect (Qiagen, Hilden, Germany) elde edilen RT-qPZR sonuçları karşılaştırılmıştır.

NA ekstraksiyonu yapılmadan RT-qPZR başarılı olabilir mi?

a) NA ekstraksiyonu yapılmayan örnekler için ne uygulanmıştır?

Çalışmada RT-qPZR öncesi klinik örnekler 3 farklı yaklaşım kullanılarak minimum düzeyde işlenmiştir:

- **Örneğin doğrudan kullanımı:** Tuzlu su/taşıma çözeltisinden 5 µL alınıp herhangi bir işlem yapmadan RT-qPZR reaksiyonuna eklenir.
- **PBS ile seyreltme:** PBS ile 1:1 seyreltikten sonra tuzlu su/taşıma çözeltisinden 5 µL RT-qPZR reaksiyonuna eklenir.

Isıyla ön işlem yöntemi: 10 µL tuzlu su/taşıma solüsyonu üzerinde dört farklı ısıl işlem uygulanmıştır (95 °C'de 5 dak; 95 °C'de 10 dak; 98 °C'de 5 dak; 98 °C'de 10 dak). Belirtilen şekilde ısıl işlem uygulanmış tüm klinik örnekler 2 dakika boyunca 4 °C'de soğutulduktan sonra 5 µL alınıp RT-qPZR reaksiyonunda kullanılmıştır.

b) NA ekstraksiyonu için MagNA Pure 96 ve QIAcube Connect sistemleri kullanılmıştır. Malzeme sıkıntısı nedeniyle MagNA Pure 96 kullanımından QIAcube Connect kullanımına geçilmiş ve dolayısıyla 39 örnek MagNA Pure 96 sistemiyle, 50 örnek QIAcube Connect sistemiyle ve 24 örnek her iki NA ekstraksiyon yöntemiyle çalışılmıştır.

c) SensiFAST SARS-CoV-2 RT-qPZR testi kullanılmıştır.

NA ekstraksiyonu yapılmadan elde edilen sonuçlar başarılı mıdır?

- MagNA Pure 96 kullanılmış örneklerle kıyaslandığında, ısıyla (98°C'de 5 dak) ön işlem yönteminin duyarlılığının %97,4; özgüllüğünün %100 ve doğruluğunun %98,3 olduğu görülmüştür (Tablo 1).
- Üç yaklaşımla elde edilen sonuçların duyarlılığı, özgüllüğü ve doğruluğu **QIAcube Connect** kullanılmış örneklerle kıyaslandığında **DAHA DÜŞÜK**, **MagNA Pure 96** kullanılmış örneklerle kıyaslandığında **DAHA YÜKSEK** bulunmuştur.
- MagNA Pure 96 ile ekstrakte edilmiş örneklerle kıyaslandığında, ısıyla ön işleme (98 °C'de 5 dak) tabi tutulmuş örneklerin medyan Ct değeri +1,8 olacak şekilde minör farklılık göstermiştir (Tablo 2).
- **RealStar SARS-CoV-2 RT-PZR kiti** NA ekstraksiyonu yapılmayan örneklerin eklenmesiyle belirgin bir şekilde inhibe olmuştur. Bu da bize tüm RT-PZR kitlerinin bu yeni uygulamayla uyumlu olmadığını göstermektedir.

Tablo 1. RT-qPZR öncesi minimum düzeyde işlem yapılan üç farklı yaklaşım ve ticari kit ile NA ekstraksiyonu yapılmış klinik örneklerde RT-qPZR (SensiFAST Real-time PZR kiti) ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması (n = 87 hasta örneği).

RT-qPCR Öncesi İşlem	Gerçek Pozitif Sayısı	Yalancı Pozitif Sayısı	Gerçek Negatif Sayısı	Yalancı Pozitif Sayısı	Duyarlılık (%)	%95 Güven Aralığı (95% CI)	Özgüllük (%)	%95 Güven Aralığı (95% CI)	Doğruluk	%95 Güven Aralığı (95% CI)
MagNA Pure ^d	39	0	22	0	100.0	91.0-100.0	100.0	84.6-100.0	100.0	94.1-100.0
Direct	32	1	21	7	84.8	71.1-93.7	95.5	77.2-99.9	88.2	78.1-94.8
1:1 vol. PBS ^e	36	1	21	2	94.7	82.3-99.4	95.5	77.2-99.9	95.0	86.1-99.0
5 min/95°C	37	0	22	2	94.9	92.7-99.4	100.0	84.6-100.0	96.7	88.7-99.6
10 min/95°C ^e	34	0	22	4	89.5	75.2-97.1	100.0	84.6-100.0	93.3	83.8-98.2
5 min/98°C ^e	37	0	22	1	97.4	86.2-99.9	100.0	84.6-100.0	98.3	91.1-99.9
10 min/98°C ^e	35	0	22	3	92.3	79.1-98.4	100.0	84.6-100.0	95.1	96-3-99.0
QIAcube ^f	50	1	21	0	100.0	92.9-100.0	95.5	77.2-99.9	98.6	92.5-99.9
Direct	42	1	21	8	84.0	70.9-92.8	95.5	77.2-99.9	87.5	77.6-94.1
1:1 vol. PBS	45	1	21	5	90.0	78.2-96.7	95.5	77.2-99.9	91.6	82.7-96.9
5 min/95°C	44	0	22	6	88.0	77.7-95-5	100.0	84.6-100.0	91.7	82.7-96.9
10 min/95°C	46	0	22	4	92.0	80.8-97.8	100.0	84.6-100.0	94.4	86.2-98.4
5 min/98°C	46	0	22	4	92.0	80.8-97.8	100.0	84.6-100.0	94.4	86.2-98.4
10 min/98°C	47	0	22	3	94.0	83.4-98.8	100.0	84-6-100.0	95.8	88.3-99.1

Tablo 2. Pozitif SARS-CoV-2 olgularında saptanan ve saptanamayan örnekler için medyan Δ Ct değerleri, Ct değerleri ve çeyrekler arası aralığın (IQR) analizi (n = 87 hasta örneği)

RT-qPCR Öncesi İşlem	Medyan Δ Ct	SARS-CoV-2 Pozitif Olup Tespit Edilen Örnekler		SARS-CoV-2 Pozitif Olup Tespit Edilemeyen Örnekler	
		Medyan Ct	IQR	Medyan Ct	IQR
MagNA Pure ^b	0.0	28.7	7.1	0.0	0.0
Direct	+4.0	32.0	5.5	33.9	2.5
1:1 vol. PBS	+2.6	32.2	6.7	35.1	1.2
5 min/95°C	+1.3	29.7	6.9	33.0	3.2
10 min/95°C	+1.9	31.3	6.4	32.7	3.4
5 min/98°C	+1.8	31.0	7.2	29.8	0.0
10 min/98°C	+2.0	31.1	6.3	34.7	1.2
QIAcube ^c	0.0	27.6	8.6	0.0	0.0
Direct	+3.9	32.2	6.1	34.6	3.0
1:1 vol. PBS	+2.2	31.0	6.6	36.2	10.7
5 min/95°C	+1.7	30.4	7.4	35.5	3.7
10 min/95°C	+1.4	30.6	7.4	29.8	9.5
5 min/98°C	+1.6	30.5	8.6	29.3	8.2
10 min/98°C	+1.5	30.3	7.8	26.1	8.4

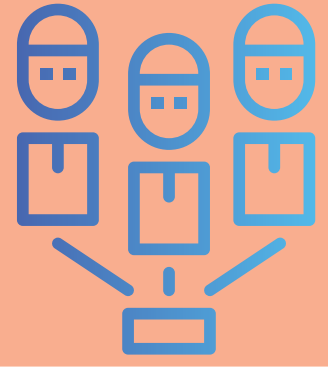
NA ekstraksiyonu yapılmadan SARS-CoV-2'nin moleküler tespiti mümkün müdür?

- RT-qPZR kitleri arasındaki farklılıklar nedeniyle, ısıyla ön işlem uygulaması kullanılması planlanıyor ise tüm RT-qPZR testlerinin klinik tanı amacıyla kullanılmadan önce valide edilmesi önerilmektedir.
- SARS-CoV-2 RT-qPZR yapılmadan önce orofaringeal sürüntü örneklerinin 98 °C'de 5 dakika ısıtılması ve 2 dakika boyunca 4 °C'de soğutulmasının, NA saflaştırılmış numuneler ile gerçekleştirilen RT-qPZR reaksiyonları kadar hassas veya doğru olmadığı unutulmamalıdır.
- ısıyla ön işlem gören örnekler ile NA ekstraksiyonu yapılmış örneklerin Ct değerleri arasında önemli bir fark saptanmamış olmakla birlikte, ısıtma sırasındaki RNA yıkımı olasılığı göz ardı edilmemelidir.

Makalede göze çarpan veriler:

- Isı ile ön işlem uygulanması, sadece altın standart yaklaşımlar mevcut değilse yapılmalıdır.
- Isıyla ön işlem yapılarak COVID-19 pozitif hastaların %97,4'ü yanlış pozitiflik olmaksızın tespit edilebilmesinin yanı sıra düşük oranda yanlış negatiflik riski olabilir; bu risk testin iki kez çalışılması ile azaltılabilir.

Asemptomatik Taşıyıcıları Tespit Eden Yüksek Verimli SARS-CoV-2 Testi



Efficient high-throughput SARS-CoV-2 test to detect asymptomatic carriers

Shental N et al. (medRxiv 2020 preprint; doi: 10.1101/2020.04.14.20064618)

Derleyen: Dr. Tuba Müderris (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD)

Yapılan çalışmalarda SARS-CoV-2 ile enfekte hastaların %10-30'unun asemptomatik olduğu bildirilmiştir. Asemptomatik bireyler hastalığın yayılmasında önemli role sahiptir. Dolayısıyla bu bireylerin belirlenmesi SARS-CoV-2 pandemisinin etkili kontrolü için kritiktir. Bununla birlikte, birçok ülke genom ekstraksiyonu ve PZR reaktiflerine sınırlı erişim nedeni ile COVID-19 pandemisinin yönetilmesinde önemli bir darboğaz içerisindedir. Bu nedenle, asemptomatik taşıyıcıları da taramak için verimli tanı testlerine acil ihtiyaç vardır. Bu tür testler, bir aşı geliştirilinceye kadar rutin olarak gerekli olacaktır.

P-BEST ("Pooling-Based Efficient SARS-CoV-2 Testing") nedir?

Grup testi yaklaşımı kullanarak, geniş bir örneklem içinde tüm pozitif olguların tanımlanması için gerekli olan test sayısının azaltılmasını sağlayan bir yöntemdir (*Şekil*). Her numune ayrı ayrı test edilmek yerine örnekler gruplanarak havuzlar oluşturulur ve her bir havuza PZR uygulanır. Her örnek birden fazla havuzun üyesidir, böylece kombinasyonel havuzlama stratejisi uygulanarak maksimum düzeyde tüm pozitif bireyler tanımlanabilir.

P-BEST ne zaman kullanılabilir?

Test edilen örneklerde taşıyıcıların yüzdesi yeterince düşükse (yaklaşık %1), az sayıda test kullanarak P-BEST yöntemiyle tüm pozitif bireyler doğru bir şekilde tanımlanabilir.

P-BEST kavramını kanıtlayan çalışma nasıl yapılmıştır?

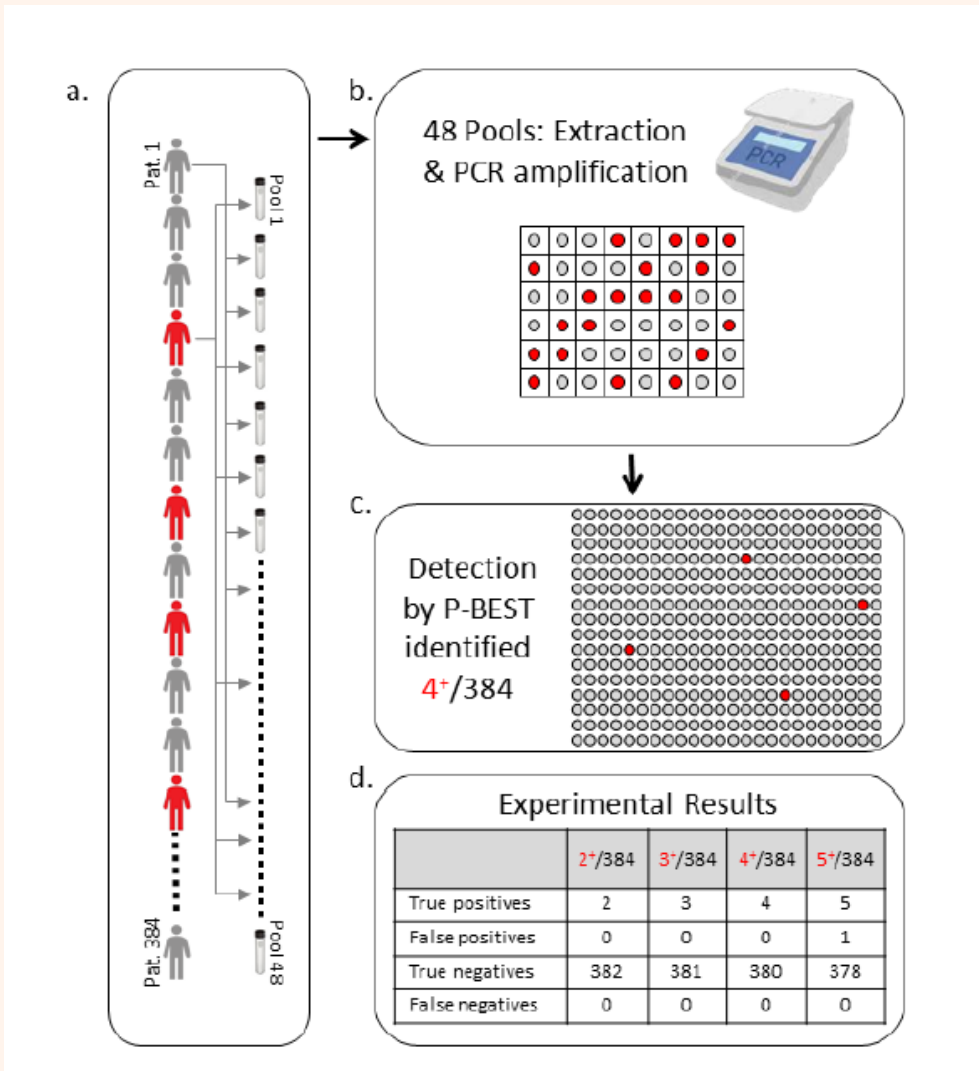
- Daha önce COVID-19 açısından test edilmiş 384 hasta örneği çalışmaya dahil edilmiş, 48 havuza 48'er örnek dahil edilmiştir.
- Bir kişiye ait örnek, 6 farklı havuzda çalışılmıştır.
- 384 numunenin temel bir sıvı dağıtım robotu (Arise EZMate-601) kullanılarak 48 havuzda toplanması 5 saatten kısa sürmüştür.
- Bütün viral partikülleri inaktive eden lizis tamponu kullanılarak dilüsyon yapıldığı için işlemler standart BSL-2 laboratuvarında yapılmıştır.
- P-BEST yönteminde 384 numuneden 4 farklı set oluşturulmuştur ve bu setlere giderek artan sayıda pozitif taşıyıcı (2 ile 5) eklenmiştir.
- Tüm havuzların genom ekstraksiyonunu ve PZR amplifikasyonunu takiben, doğrulama için ayrı ayrı test edilen taşıyıcıları tanımlamak için bir kod çözme algoritması kullanılmıştır. (P-BEST'in uygulanması için gerekli kod ve protokoller <https://github.com/NoamShental/PBEST> adresinde bulunmaktadır.)

P-BEST kavramının kanıtlanması için yapılan çalışma sonuçları nelerdir?

Her bir setteki tüm pozitif taşıyıcılar, set başına sadece 48 test kullanarak doğru bir şekilde tanımlanmıştır. Simülasyonlar, yöntemin taşıyıcıları 5/384 (%1,3)'e kadar doğru bir şekilde tanımlayabildiğini, yanlış pozitifliğin ortalama 2,75'ten, yanlış negatifliğin ise ortalama 0,3'ten daha az olduğunu göstermiştir.

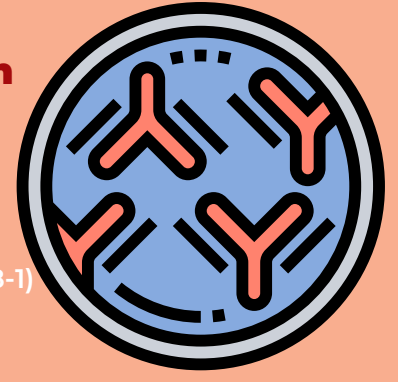
Sonuç olarak:

- Mevcut havuz tasarımı ile test verimliliğinde 8 kat artış sağlanır, havuz başına örnek sayısı artırılarak bu daha da geliştirilebilir.
- P-BEST, düşük taşıyıcı frekanslı (%1.3) popülasyonları etkili bir şekilde test etmek için optimize edilmiştir. Bu nedenle, doğrulanmış SARS-CoV-2 vakaları ile yakın temasta olan hastalar hariç, enfekte olma riski yüksek olmayan asemptomatik popülasyonları taramak için en uygun yöntemdir.
- Uygulama için otomatik bir sıvı dağıtım robotunun kullanılmasını gerektirir.
- Dilüsyonda lizis tamponu kullanılarak yapıldığı için, örneklerin havuzlanması standart BSL-2 laboratuvarında yapılabilir.



Şekil. Enfekte 4 hasta içeren 384 örnek kümesi için elde edilen P-BEST tasarımı ve elde edilen sonuçlar. a. P-BEST'e dayalı 384 örnekten 48 havuz gerçekleştirilmesi; her numune altı havuza dağıtılır. Kırmızı renkli denekler, 384 numune içinde tanımlanmamış dört enfekte kişiyi temsil eder. Havuzlar, taşıyıcıların saptanmasını optimize eden, bir kombinasyonel havuzlama ile oluşturulmuştur. b. Havuzlardan genetik materyalin ekstrete edilmesi ve ardından standart PZR amplifikasyonu. Pozitif havuzlar kırmızı dairelerle gösterilir. c. P-BEST, optimizasyon tabanlı bir algoritma kullanarak 384 örnekten pozitif numuneleri tanımlar. d. Sırasıyla 2, 3, 4 veya 5 pozitif örnek içeren dört deneyin sonuçları. İki ila dört pozitif örnek için hata oluşmazken, beş pozitif için gerçek pozitif örneklere tek bir yanlış pozitif örnek eklenmiştir.

SARS-CoV-2 İçin Antikor Geliştirilmesi: COVID-19 Pandemisinde Anahtar Rol Oynayan Antikor Testi İçin Laboratuvar ve Medikal Tanı Şirketleri Yarışıyor



Developing antibody tests for SARS-CoV-2

Petherick A (Lancet Apr 4;395(10230):1101-1102; doi: 10.1016/S0140-6736(20)30788-1)

Derleyen: Dr. Nevgün Sepin Özen (Antalya EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji)

COVID-19'a karşı hükümetler ekonomik zorluklara rağmen yaklaşık 3 milyar insanın kişisel özgürlüklerini kısıtlayan kurallar uygulamaktadır. Bazı ülkelerde testler yaygın olarak kullanılırken bazı ülkelerde ise yalnızca hastaneye yatırılan hastalarla sınırlandırılmıştır. Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) hastalığıyla ilgili ortaya çıkan yeni bilgiler ışığında mevcut viral enfeksiyonu değil, ciddi akut solunum yetmezliği sendromuna karşı gelişen bağışıklığı değerlendirmek için test geliştirme yarışı başlamıştır.

Test optimizasyon çalışmalarında karşımıza çıkan sorular nelerdir?

Antikor testlerinin optimizasyon çalışmalarında karşımıza çıkan mevcut sorulardan biri, 'Virüs, sağlıklı bir immün sistem tarafından nasıl tanınır ve viral nötralizasyonu nasıl uyarıyor?' konusudur.

Neden antikor testlerine ihtiyaç var?

Covid-19'dan etkilenen tüm ülkelerde ekonomik kaybın en aza indirilebilmesi için en kısa sürede insanların işe dönmesi sağlanmalı ve sınırlar tekrar açılmalıdır. Bağışıklık durumu gösterilebilirse, bireyler risk almadan işe tekrar başlayabilirler. Bu, PZR ile değil ancak bir antikor testi ile sağlanabilir.

Antikor testi çoklu amaç için kullanılabilir:

1. Klinik araştırmalarda aşılardan amaçlandığı gibi çalıştığını gösterir.
2. Enfeksiyon şüphesi olan bireylerin ve temaslılarının haftalarca veya daha uzun takip edilebilmesini sağlar.
3. Popülasyonda bulunan asemptomatik olguların sayısı hakkında bilgi verir.
4. Çocukların enfektif olduğu ama asemptomatik olduğu düşünülmekte ancak bunun sayısı hakkında elimizde veri bulunmamaktadır. Antikor testleriyle bu sayının belirlenmesi okulların açılıp açılmama konusunda alınacak kararlara yardımcı olacaktır.

Antikor testlerinin geliştirilebilmesi için viral proteinler hakkında bilgiye sahip olmamız gerekli midir?

Özellikle immün sistemi uyararak ve virüsü nötralize eden antikor yapımını tetikleyen proteinler hakkında bilgiye ihtiyaç vardır. Bu proteinler laboratuvarlarda işlenerek ELISA gibi testlerde kullanılabilir. Testlerde kullanılacak olan proteinin tam olarak doğru biçimde eksprese edilebilmesi test yapımında en zor basamaktır.

Hangi antijen bu amaçla kullanılmalıdır?

- Virüsün "spike" proteini nötralizan antikor cevabına yol açması ve hücreye girişten sorumlu olan tek protein olması nedeniyle aday proteinlerden biridir.
- "Spike" protein, tedavi konusundaki çalışmalarda da kullanılmaktadır. In vitro koşullarda SARS-CoV-2'yi nötralize eden monoklonal antikor geliştirilmiştir.

- Çin'deki Wuhan Viroloji Enstitüsü'nde **nükleokapsit proteini** ve **S proteini** kullanılarak geliştirilen antikor testi, Çin'de uygulanan on antikor testinden biridir. Araştırmacılar en fazla bulunan proteinin nükleoprotein olduğunu ancak S proteininin, daha özgül olması ve koronavirüsler içinde en yüksek çeşitliliğe sahip olması sebebiyle her iki antijenin de kullanıldığını belirtmişlerdir.
- SARS-CoV-2, diğer koronavirüslerle karşılaştırıldığında S proteini SARS-CoV ile %75, diğer virüslerle %50-60 oranında benzerlik gösterir. Bu benzerlik nedeniyle çapraz reaksiyon gelişme olasılığı antikor testlerinde seçilen S protein bölgesine bağlıdır.
- S proteini, hücreye girişten sorumlu tek proteindir. Dolayısıyla SARS-CoV-2 mutasyona uğradıkça bu proteinin stabilitesi, yeni bir suşla reenfeksiyonun muhtemel olup olmadığını anlamak için önemlidir.
- S proteini yüksek korunaklı bir proteindir. Virologlar SARS-CoV-2 reenfeksiyonu ile ilgili yayınlanan bildirimlerin büyük olasılıkla hatalı PZR testlerinden kaynaklandığını düşünmektedir.

Bir koronavirüse karşı antikor oluştuğunda hayat boyu bağışıklık sağlayabilir mi?

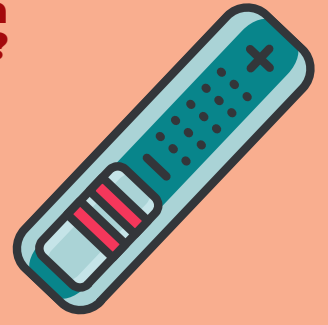
SARS ve MERS için oluşan antikorların ne kadar süreyle koruyuculuk sağladığı laboratuvar koşullarında araştırılmıştır. Bir hastada **SARS enfeksiyonundan 17 yıl sonra nötralizan antikorlar saptanmış** ve bu antikorların hala SARS virüsünü nötralize edebildiği gösterilmiştir.

ŞARS-CoV-2 ile Enfekte COVID-19 Hastalarının Tanısında İmmünokromatografik Testler Bir Alternatif Olabilir mi?

Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients

Pan Y et al. (J Infect 2020 Apr 10. pii:S0163-4453(20)30175-4; doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.051)

Derleyen: Dr. Büşra Betül Özmen Çapın (Marmara Üniversitesi Pendik EAH, Tıbbi Parazitoloji)



SARS-CoV-2 tanısında altın standart test nedir?

Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ("real-time RT-PCR") SARS-CoV-2 tanısında altın standart test olarak kabul edilmiştir. Tepkimenin gerçekleştirilmesi için tasarlanmış, *ORF1ab*, *zarf proteini geni (E geni)* ya da *nükleokapsit protein genini (N geni)* hedefleyen primerler diğer koronavirüsleri (229E, OC43 ve MERS) ve influenza virüsleri (H1N1, H3N2, H5N1 ve H7N9) dışlayarak en duyarlı ve özgül şekilde SARS-CoV-2'yi saptamaktadır.

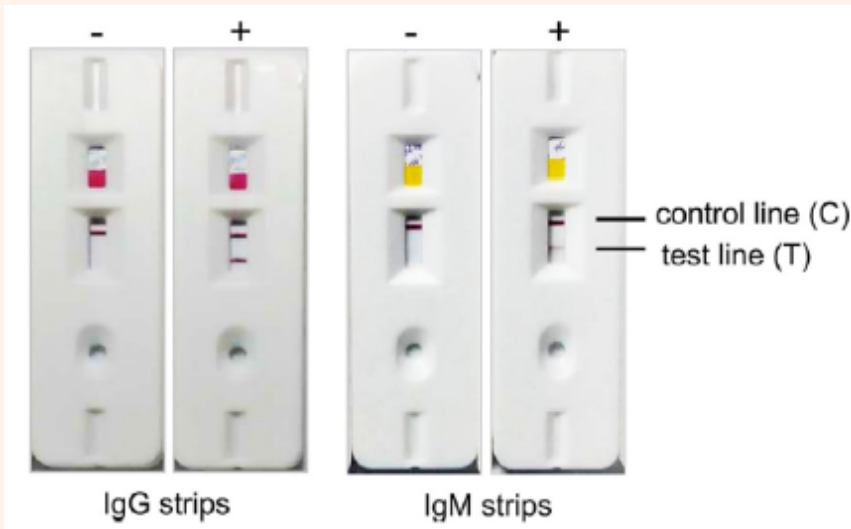
Gerçek zamanlı RT-PZR yöntemi ile SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısı koymanın kısıtlılıkları nelerdir? Bu kısıtlılıkların önüne hangi test ve yöntemlerle geçilebilir?

Tüm dünyada SARS-CoV-2 için rutin tanısal yöntem olarak gerçek zamanlı RT-PZR kullanılmakla beraber, yöntemin kısıtlılıkları mevcuttur. Farklı kit ve çözeltilerin kullanımı, hastalığın farklı dönemlerinde alınması gereken uygun örneğin değişkenlik gösterebilmesi, örnek alındığı sırada hastanın anti-viral kullanıyor olması (anti-HIV ilaçlar vb.) nükleik asit saptanmasına dayalı testlerde yalancı negatifliğe yol açabilir.

PZR ile pozitif elde edilen sonuçlar ile SARS-CoV-2 enfeksiyon tanısı konulurken, negatif sonuç ile enfeksiyon dışlanamaz. Görüntüleme yöntemleri ile viral pnömoni görünümü saptanan ancak eş zamanlı PZR sonucu negatif çıkan hastaların bir kısmında takip sırasında PZR testinde pozitifleşme görülmüştür. Wuhan Üniversitesi Zhongnan Hastanesi'nde yürütülen bu çalışmada, **kolloidal altın bazlı immünokromatografik (ICG) test yöntemi** (Zhuhai Livzon Diagnostic Inc.) ile elde edilen sonuçlar, PZR sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Yöntemler için çalışmada kullanılan örnekler nelerdir?

İmmünokromatografi testi için serum/plazma ve tam kan örneği kullanılmış; PZR için ise boğaz sürüntü örnekleri alınmıştır.



Şekil.

SARS-CoV-2'ye karşı gelişen IgG ve IgM antikorları ile negatif ve pozitif sonuç veren ICG test kartuşları. Her kartuştaki üstteki çizgi kontrol çizgisini (C), alttaki çizgi (T) pozitif sonucu göstermektedir.

Sonuçlar

- IgM ve IgG **dördüncü günde** saptanabilmiştir.
- ICG yönteminin duyarlılığı günler içinde yükselerek **15. günde en üst değere** ulaşmıştır.
- Enfeksiyonun **erken döneminde** IgM pozitifliği %11,1 IgG pozitifliği %3,6 iken, **hastalığın ara (intermediate) ve geç evresinde IgM pozitifliği %75'e ve IgG pozitifliği %96,8'e çıkmaktadır.**
- IgM ve IgG ICG testlerinin birlikte kullanılması durumunda **en etkin** sonuç elde edilmektedir.
- Klinik tanı alan ancak PZR sonucu negatif olan 37 hastaya ait 39 örneğin dokuzunda (%23,1) IgM, 15'inde ise (%38,5) IgG saptanmıştır. IgM ve IgG testleri birlikte değerlendirildiğinde ise 17 (%43,6) örnek pozitif saptanmıştır.
- Tam kan ve plazma örnekleri (24 pozitif ve 10 negatif örnek) arasındaki uyum araştırıldığında, her iki örnek türünde IgM için %100, IgG için %97,1 uyumlu sonuç elde edilmiştir.

ICG yöntemini kullanmanın avantajları nelerdir?

- Test, özellikle semptomların başlamasından bir hafta sonra, yüksek duyarlılığa sahiptir.
- Nükleik asit testi negatif ancak radyolojik bulgusu olan (klinik COVID-19 tanısı alan) hastaları saptamada etkilidir.
- Ekipman gerektirmez. Tanı kapasitesi düşük sağlık kurumlarında tercih edilebilir.
- İşlevsel, kullanıma hazır ve test süresi kısadır (<15 dakika).
- Örnek alma süreci daha düşük risk barındırır, aerosol oluşumuna yol açmaz.
- Asemptomatik bireylerin saptanmasında kullanılması epidemiyolojik verilere katkıda bulunur.

Çalışmanın geliştirilmesi gereken yönleri nelerdir?

- PZR için boğaz sürüntüsü kullanılmıştır. Alt solunum yolları örneği alınmadığı durumda, orofaringeal ve nazofaringeal örnekleme yapılmalıdır.
- Salgın dolayısıyla enfekte olmayan bireyler seçilememiş ve bu nedenle özgüllük analizi yapılmamıştır.
- Test bandında görülen renk yoğunluğu antikorun miktarı hakkında fikir verse de pozitif/negatif şeklinde sonuç vermektedir. Antikor titresi saptanmak istenirse ELISA yöntemi ile antikor araştırılabilir.

Tablo. Tam kan ve plazma örneklerinin karşılaştırılması sonucunda IG saptanması açısından uyumu

IgG detection concordance between whole blood and plasma samples.

	Serum/Plasma		In total
	+	-	
Whole Blood	23	0	23
In total	24	10	34
Cohen's kappa coefficient	0.93 (95% CI,0.80–1.06; P-value, <0.000)		

CI, confidence interval.

Altın İmmüno-kromatografisinde ve ELISA Testlerinde SARS-CoV-2 IgM Yanlış Pozitifliklerini Önlemek İçin Bir Yöntem

A method to prevent SARS-CoV-2 IgM false positives in gold immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays

Wang Q et al. (Journal of Clinical Microbiology 10 April 2020; doi:10.1128/JCM.00375-20)

Derleyen: Dr. Orçun Zorbozan (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji AD)



SARS-CoV-2 IgM tespiti yapan GICA ve ELISA testlerinde interferans nedenleri nelerdir?

Çalışmada bu sorunun yanıtını bulmak için 86 hasta serumuna [5 influenza A virüsü (Flu A) IgM (+), 5 influenza B virüsü (Flu B) IgM (+), 5 *Mycoplasma pneumoniae* IgM (+), 5 *Legionella pneumophila* IgM (+), 6 HIV (+), 36 romatoid faktör IgM (RF-IgM) (+), 5 hipertansiyon hastası, 5 diabetes mellitus hastası, 14 COVID-19 hastası] SARS-CoV-2 IgM saptayan GICA ve ELISA testleri uygulanmıştır.

36 RF-IgM (+) hastanın 22'sinde her iki yöntemle de SARS-CoV-2 pozitif saptanmış ve RF-IgM pozitifliğinin interferans oluşturabileceği düşünülmüştür.

Oluşan interferansı önlemek için ne yapılabilir?

Çalışmada interferansı önlemek amacıyla üre ayrışma testinin kullanılabileceği öne sürülmüştür. İlk inkübasyon ve yıkama aşamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (0-1-2-4-6-8 mol/l,) üre içeren PBS solüsyonu ile 37 °C'de 10 dakikalık bir inkübasyon basamağı eklenmiştir.

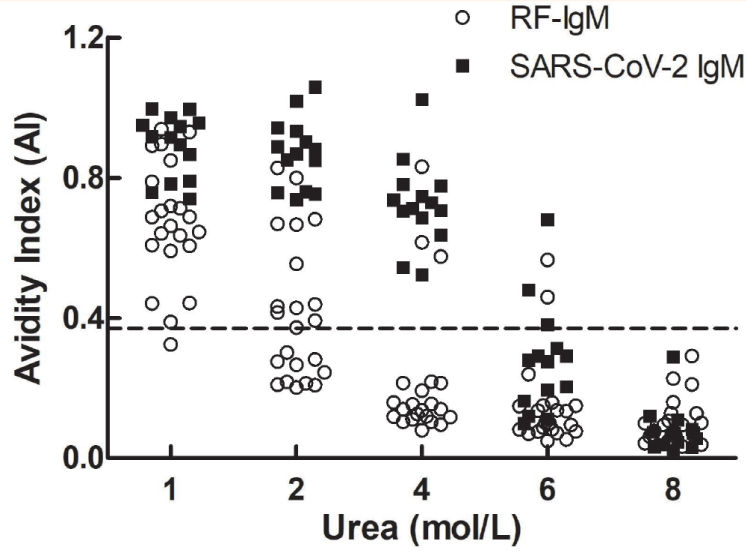
Yalancı pozitif sonuçlanan örneklerin afinite indeksi (AI) en yüksek olan değer ile tüm SARS-CoV2 örneklerinden AI'si en düşük olan değer arasındaki orta değer eşik AI değer olarak belirlenmiş ve pozitiflik bu eşik değerine göre saptanmıştır. AI değeri eşik değerden düşük olanlar negatif, yüksek olanlar pozitif kabul edilmiştir (Şekil).

Farklı konsantrasyonlardaki ürenin interferansa etkisi ne şekildedir?

- GICA testi pozitif olan 22 RF-IgM (+) serumun 21 tanesi 6 mol/l üre varlığında negatife dönerken, 14 COVID-19 hastasının hepsi pozitif olarak kalmıştır.
- ELISA testi pozitif olan 22 RF-IgM (+) serumun 19 tanesi 4 mol/l üre varlığında negatife dönerken, 14 COVID-19 hastasının hepsi pozitif olarak kalmıştır.
- Her iki test için üre öncesi ve sonrası özgüllük ve duyarlılık değerleri *tablolarda* verilmiştir.

Makalede göze çarpan veriler:

- Çalışmada örneklemin küçük olması biasa yol açabilecek olmakla birlikte uygulanan yöntemin testin özgüllüğüne etkisi dikkate değerdir.
- Çalışmada RF-IgM konsantrasyonu 70 IU/ml altında olan 7 hastanın serumlarında interferans görülmez iken 70 IU/ml üzerinde olan 29 hasta serumunun 22'sinde interferans görülmüştür.



Şekil. SARS-CoV-2 IgM afinite indeksi farklı üre ayrışma konsantrasyonları kullanılarak tespit edildi. Üre ayrışma konsantrasyonu 4 mol/L olduğunda ve AI hesaplama yöntemi 0,371 olduğunda, RF-IgM pozitifliği olan 19 serumda SARS-CoV-2 IgM negatife döndü, 14 COVID-19 hasta serumu SARS-CoV-2 IgM pozitif kaldı.

Tablo 1. GICA üre öncesi ve sonrası SARS-CoV-2 IgM tespiti özgüllüklerinin karşılaştırılması

Control	Cases	Specificity	
		Before dissociation	After dissociation
RF-IgM negative	36	100.00% (36/36)	100.00% (36/36)
RF-IgM-positive	36	38.89% (14/36)	97.22% (35/36)*
total	72	69.44% (50/72)	98.61% (71/72)*

*: $P < 0.001$ (Compared with before dissociation)

Tablo 2. ELISA üre öncesi ve sonrası SARS-CoV-2 IgM tespiti özgüllüklerinin karşılaştırılması

Control	Cases	Specificity	
		Before dissociation	After dissociation
RF-IgM-negative	36	100.00% (36/36)	100.00% (36/36)
RF-IgM-positive	36	38.89% (14/36)	91.67% (33/36)*
total	72	69.44% (50/72)	95.83% (69/72)*

*: $P < 0.001$ (Compared with before dissociation)

SARS-CoV-2'nin CRISPR-Cas12 Temelli Tespiti



CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2

Broughton JP et al. (Nat Biotechnol 2020 Apr 16; doi: 10.1038/s41587-020-0513-4)

Derleyen: Dr. Cihan Yeşiloğlu (Abdi İbrahim Medikal Direktörlük)

Çalışmanın amacı nedir?

Bu çalışmada "SARS-CoV-2 DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter (DETECTR)" adı verilen CRISPR-Cas12 temelli yeni bir yöntem kullanarak solunum yolu sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 saptanması amaçlanmıştır.

Yöntemde hangi genler hedeflenmiştir?

SARS-CoV-2'nin E (zarf) ve N (nükleoprotein) genlerini hedefleyen primerler sentezlenmiştir. E geninden üç SARS- benzeri koronavirüs tespiti için, N geninden yalnızca SARS-CoV-2 tespiti için Cas12 kılavuz RNA'lar (guide RNA; gRNA) sentezlenmiştir. Kontrol olarak insan RNaz P geni kullanılmıştır.

DETECTR yöntemi ne kadar sürede sonuçlanmaktadır?

RT-LAMP reaksiyonu, 20-30 dk, CRISPR Cas12 temelli saptama 10 dk olmak üzere **DETECTR tanı testi yaklaşık olarak 30-40 dakikada** tamamlanıp yatay akış şeridi üzerinde görülebilir hale gelmektedir. *E ve N geni birlikte saptanırsa sonuç pozitif, E veya N genlerinden yalnızca biri saptanırsa olası pozitif olarak değerlendirilmiştir.*

RT-PZR ile kıyaslandığında tespit edebilir sınır değer nedir?

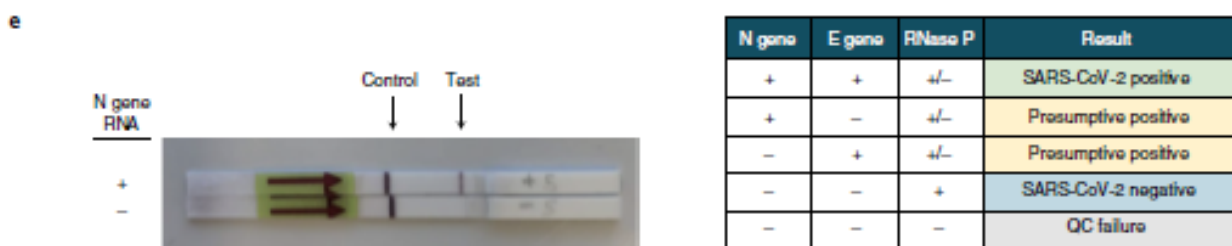
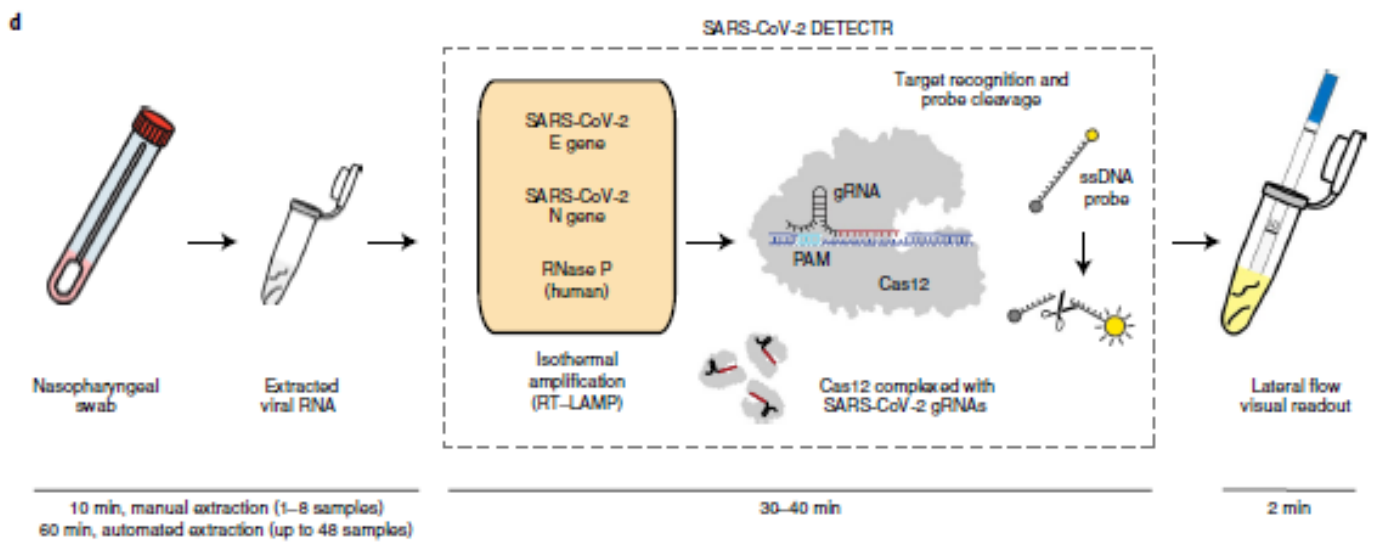
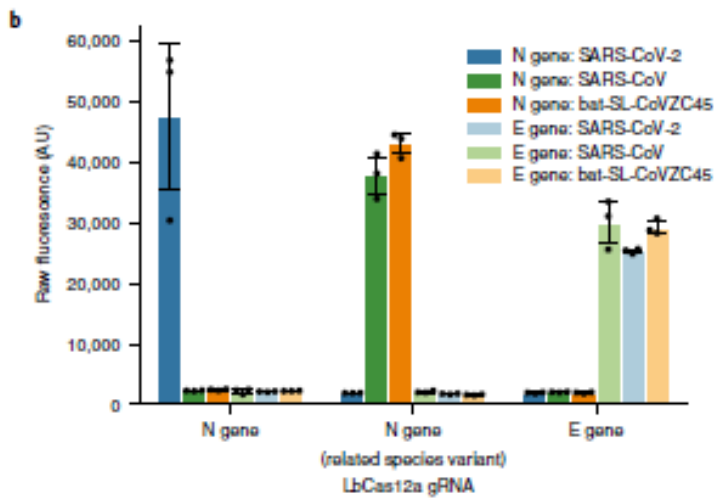
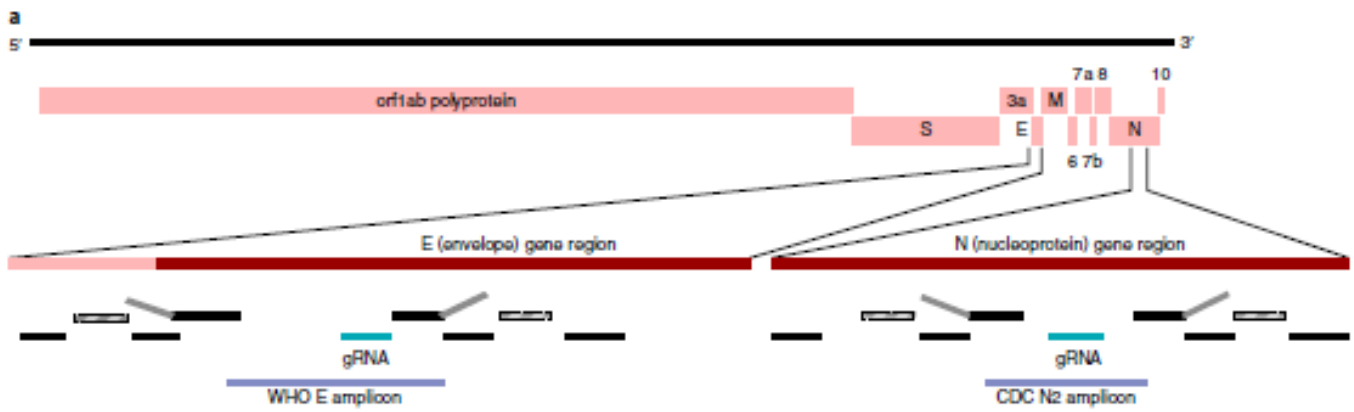
RT-PZR testiyle karşılaştırıldığında virüs varlığının kalitatif gösterimi açısından daha kolay değerlendirme sağlamaktadır. CDC'nin testi için tahmin edilen sınır değer 1 kopya/μl, DETECTR testi için ise 10 kopya/μl'dir.

Diğer solunum yolu virüsleriyle çapraz reaksiyon var mıdır?

Altı COVID-19 hastasından (PZR pozitif) alınan 11 solunum yolu sürüntü örneği ve 12 solunum yolu virüsüyle enfeksiyonu (5 influenza, 7 diğer) olan hastadan alınan nazofaringeal sürüntü örnekleri DETECTR testi ile değerlendirilmiştir. COVID-19 hastasından alınan 11 örneğin 9'u pozitif olarak tespit edilmiştir (2 örneğin tespit edilebilir aralıkta olmadığı belirlenmiştir). Diğer solunum yolu virüsleri ile çapraz reaksiyon saptanmamıştır.

SONUÇ:

- CRISPR temelli DETECTR yöntemi, RT-PZR yöntemine göre hızlı, gözlemlenebilir, pozitif prediktif değeri %95, negatif prediktif değeri %100 olan alternatif bir yöntemdir.
- DETECTR testi maliyeti yüksek laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyan qRT-PZR yöntemiyle kıyaslanabilir doğrulukta sonuç veren, piyasada bulunan hazır reaktiflerle ve rutin protokollerle gerçekleştirilebilen bir testtir.



Tablo. DETECTR (RT-LAMP/Cas12) ve CDC qRT-PZR yöntemlerinin karşılaştırılması

	SARS-CoV-2 DETECTR, RT-LAMP/Cas12	CDC SARS-CoV-2 qRT-PZR
Hedef	E geni ve N geni ^a	N geni (üç amplikon, N1, N2 ve N3)
Kontrol	RNase P	RNase P
Tespit edilebilir sınır değer	10 kopya/μl input	1 kopya/μl ^b ve 3.2 kopya/μl ^c
Reaksiyon süresi (yaklaşık)	30–40 dk	120 dk
Örnekten sonuca değerlendirme süresi (yaklaşık)	45dk (Manuel RNA ekstraksiyon)	4 saat (RNA ekstraksiyonuyla birlikte)
Sonuç	Kalitatif	Kantitatif
Testin bileşenleri	RT-LAMP (62 °C, 20–30 dk) Cas12 (37 °C, 10 dk) Yanal Akış Şeridi (RT, 2 dk; floresan okumayla ek süre ihtiyacı yok)	UDG reaksiyonu (25 °C, 2 dk) ters-trankripsiyon (50°C, 15 dk) denaturasyon (95°C, 2 dk) amplifikasyon, (95°C, 3 s; 55°C 30s; 45 siklus)
Yüklü ekipman ihtiyacı	Hayır	Evet
US FDA EUA onayı	Klinik validasyon bekleniyor	Evet

^a E geni primeri WHO protokolüyle aynı hedef amplikonu kullanır; N geni primeri CDC protokolüyle aynı hedef N2 amplikonu kullanır. UDG, urasil-DNA glikozilaz

^b Saptanabilir sınır değer doğrulaması CDC 2019-nCoV RT-PZR tanı kiti QIAGEN QIAmp DSP Viral RNA Mini Kit ile birlikte

^c Tespit edilebilir sınır değer doğrulaması

Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon Yöntemi İle SARS-CoV-2'nin Saptanması

Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay

Yan C et al. (Clin Microbiol Infect 2020 Apr 8 pii: S1198-743X(20)30186-5; doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001)

Derleyen: Dr. Oğuz Alp Gürbüz (S.B.Ü. Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH, Tıbbi Mikrobiyoloji)



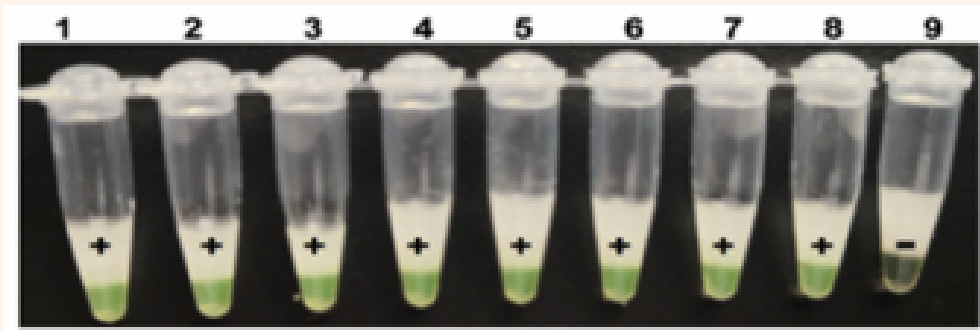
COVID-19 laboratuvar tanısında PZR yönteminin yerine daha hızlı, basit, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test kullanılabilir mi?

Gerçek zamanlı PZR testi zahmetli, zaman alıcı ve özel ekipman gerektiren bir yöntemdir. Şüpheli hasta, asemptomatik hasta ve yakın temaslı kişi sayılarında görülen artış nedeniyle teste duyulan ihtiyaç artmakta ama bu talep karşılanamamaktadır.

Bu sorunların üstesinden gelebilmek için hızlı ve uygulaması daha kolay olan testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada SARS-CoV-2'nin saptanmasında ters transkripsiyon döngü aracılı izotermal amplifikasyon yöntemi (RT-LAMP) değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar RT-PZR ile karşılaştırılmıştır.

RT-LAMP çalışma prensipleri nedir?

- Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP-Loop-mediated isothermal amplification), hızlı, duyarlılığı yüksek ve etkili bir görsel nükleik asit amplifikasyon yöntemidir.
- RT-LAMP reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla Loopamp RNA amplifikasyon kiti (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılmıştır.
- Süreç Loopamp Gerçek Zamanlı Türbidimetre (LA-230; Eiken Chemical Co., Ltd., Tochigi, Japonya) kullanılarak izlenmiş, yoğunluk 650 nm'de değerlendirilmiştir. Bulanıklık değeri > 0.1 olan reaksiyonlar pozitif olarak kabul edilmiştir.
- Görsel değerlendirme için karışıma *floresan kalsein* eklenmiş ve turuncudan yeşile renk değişimi gözlemlendiğinde reaksiyon pozitif olarak kabul edilmiştir (*Şekil*).
- *Gerçek zamanlı PZR* referans yöntem olarak kullanılmıştır.



Şekil. RT-LAMP sonuçlarının görsel değerlendirilmesi

SARS-CoV-2'nin klinik örneklerden saptanmasında RT-LAMP ve RT-PZR karşılaştırılması

- SARS-CoV-2 enfeksiyonu şüphesi olan hastalardan sürüntü örneği veya BAL olmak üzere toplan 130 klinik örnek alınmıştır. RNA örnekleri amplifikasyon için ikiye bölünmüştür.
- Çalışmada, her iki yöntemle de 58 hasta SARS-CoV-2 ile enfekte saptanmıştır (Tablo).
- RT-LAMP yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Tablo. SARS-CoV-2'nin saptanmasında RT-LAMP ve RT-PZR yöntemlerinin karşılaştırılması

Sonuç	RT-LAMP		RT-PZR
	<i>orf1ab</i> geni	S geni	
Pozitif	58 Ortalama süre (\pm SD): 25.36 \pm 5.09 dakika Aralık (16-35 dakika)	58 Ortalama süre (\pm SD): 27.21 \pm 5.74 dakika Aralık (19-40 dakika)	58 (Ct<38)
	Negatif	72 (renk değişikliği yok)	

RT-LAMP yöntemi RT-PZR'ın yerini alabilir mi?

- Sonuçların değerlendirilmesi kolaydır (Pozitif: turuncudan yeşile renk değişimi).
- Diğer solunum patojenleri ile çapraz reaksiyon görülmemiştir.
- RT-LAMP analizi, 26,28 \pm 4,48 dakikalık ortalama (\pm SD) sürede pozitif sonuçlar verirken, RT-PZR testi, 1-2 saat arasında sonuç vermektedir.
- RT-LAMP önemli bir "point of care (POCT)" yöntemidir: Küçük bir cihazla, 63 °C'de sabit ısıda, tek bir adımda virus saptanabilir. Sahada ve hasta başında uygulanabilir.
- **Çalışmanın kısıtlılığı:** Hedef genin primer dizisi bölgesinde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle testin duyarlılığı etkilenebilir. Bu nedenle, virüs genomunda meydana gelebilecek mutasyonlar bütün genom dizilimi ile izlenmelidir.