

Çocuklarda Covid-19 Hastalığının Mikrobiyolojik Tanısı

Microbiological Diagnosis of Covid-19 Disease in Children

Yıldız Ekemen-Keleş[®], Dilek Yılmaz-Çiftdoğan[®]

Derleme
Review

Öz

Son zamanlarda, Çin'de yeni bir koronavirüs hastalığı (COVID-19) ortaya çıkarak kısa sürede 185 ülkeye yayıldı ve sağlık sistemleri üzerinde önemli bir yük oluşturarak birçok insanın yaşamını kaybetmesine neden oldu. COVID-19 hastalığının kesin bir tedavi rejimi ya da aşısı yoktur. Fakat erken teşhis hastalığın ilerlemesini kontrol etmek ve popülasyondaki yayılımını sınırlamak için gereklidir. Bu nedenle, COVID-19'un gelecekte daha fazla yıkımını önlemek amacıyla hızlı ve doğru erken tanı yöntemleri yaşamsal öneme sahiptir.

COVID-19'un tanısı, solunum yolu salgılarından rutin olarak kantitatif gerçek zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (rRT - PCR) ile virüsün RNA'sının tespitine dayanır. RT-PCR, yüksek yanlış negatiflik oranları ve kit tedarikiyle ilgili sıkıntılar nedeniyle kuşku hastaların tanısı için memnun edici bir performans vermemektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun en iyi şekilde belirlenmesi için test kitinin kalitesinin ve standart çalışma prosedürünün hızlı bir şekilde optimize edilmesi gereklidir.

Çocuklarda COVID-19'un tanı kriterleri; yetişkin hastaların temasına dayanarak, epidemiyolojisi ve klinik belirtileri ile formüle edilmiştir. Çocuklarda farklı klinik bulguların olması ve asemptomatik enfeksiyon oranlarının fazlalığı nedeniyle farklı tanı metodlarına gereksinim vardır.

Bu derlemede, çocuklarda COVID-19 hastalığının moleküler testleri, serolojik yöntemleri, viral genomik sekanslama ve viral kültürü hakkındaki literatür bilgileri özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, pediatrik olgular, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), serolojik testler, tanı testleri

ABSTRACT

Recently, a novel coronavirus (SARS-CoV-2) has emerged in Wuhan City of, China, rapidly spreading to 185 countries, and imposing a significant burden on global health systems which caused the death of many people. A definitively effective treatment regimen or a vaccine of COVID 19 infection does not exist. Early diagnosis of COVID-19 is vital in controlling progression of the disease and limiting viral spread within the population. Thus, rapid and accurate methods of early detection have vital importance to contain COVID-19 and prevent further spread in future.

The diagnosis of COVID-19 is routinely based on the identification of the RNA of the virus obtained from respiratory secretions using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rRT-PCR) assay. Limited by the high false negative rates and inadequate kit supply, RT-PCR cannot give a satisfactory performance for diagnosing suspicious patients. It is urgent to rapidly optimize the quality of testing kit and standard operating procedure for best testing of SARS-CoV-2 infection.

The diagnostic criteria of COVID-19 in children were formulated based on the diagnosis of adult patients, combined with the characteristics of epidemiology and clinical manifestations of children. Different diagnostic methods are needed due to different clinical findings, and greater frequency of asymptomatic infection in children.

In this review, molecular tests, serological methods, genomic sequencing and viral culture of COVID-19 disease in children were summarized.

Keywords: COVID-19, diagnostic tests, polymerase chain reaction (PCR), pediatric cases, serological tests

Alındığı tarih: 08.05.2020
Kabul tarihi: 01.06.2020
Online Yayın tarihi: 10.07.2020

Yıldız Ekemen-Keleş

Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma
Hastanesi, Çocuk Enfeksiyon
Hastalıkları Kliniği,
İzmir, Türkiye

✉ kutupylz@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-6122-1726

D. Yılmaz Çiftdoğan

ORCID: 0000-0002-1065-9066

Kâtip Çelebi Üniversitesi
Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı,
İzmir, Türkiye

Cite as: Ekemen-Keleş Y, Yılmaz-Çiftdoğan D. Çocuklarda Covid-19 hastalığının mikrobiyolojik tanısı. Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi. 2020;30(Ek sayı):76-84.

Aralık 2019'dan bu yana, Çin'in Wuhan şehrinde nedeni bilinmeyen birçok pnömoni olguları ortaya çıktı. Yeni nesil tüm genom sekanslama tekniği sayesinde, insan hava yolu epitel hücrelerinden daha önce bilinmeyen bir

virüs izole edildi ve SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. SARS-CoV-2; COVID-19 olarak adlandırılan şiddetli akut solunum yolu enfeksiyonuna neden olan koronavirüs hastalığından sorumludur. MERS-CoV ve SARS-CoV gibi SARS-



© Telif hakkı T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eğit. ve Araşt. Hastanesi. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Association of Publication of the T.C. Ministry of Health İzmir Tepecik Education and Research Hospital. This journal published by Logos Medical Publishing.

Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

CoV-2'de insanları enfekte eden Betacoronavirus ailesinin yedinci üyesidir ⁽¹⁾. Araştırmalar sonucunda, bu yeni virüsün SARS-CoV ile %79,5 oranında benzer genetik yapıya sahip olduğu gösterilmiştir ⁽²⁾. SARS-CoV-2 virüsü yalnızca üç ay içinde tüm dünyaya yayılarak Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) pandemi ilan etmesine yol açmıştır ⁽¹⁾.

Birçok ülke COVID-19 hastalığının yayılımını azaltmak amacıyla seyahat kısıtlaması ve karantina gibi faaliyetlerin kombinasyonlarını kullanmıştır. Bununla birlikte, COVID-19'un erken tanısı, hastalığın ilerlemesinin kontrol edilmesi, popülasyon içindeki virüs yayılımının sınırlandırılması ve sağlık hizmetleri üzerindeki yükü azaltmak için gereklidir. COVID-19 hastalığını saptamak için test yapma kararı klinik ve epidemiyolojik faktörlerle hasta teması varlığına göre değerlendirilmelidir. Asemptomatik veya hafif semptomatik olguların COVID-19 hastasıyla temas varlığında mevcut ise nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) önerilmektedir ⁽³⁾. Tarama protokolleri ve olgu tanımları yeni bilgiler geldiğinde düzenli olarak yerel yöneticiler tarafından gözden geçirilir ve güncellenir. COVID-19 hastalığı için şüpheli olgu tanımını karşılayan hastalardan uygun örneklerin hızlı bir şekilde toplanması ve test edilmesi; klinik yönetim ve salgın kontrolü için bir önceliktir.

Günümüzde, COVID-19'un kesin tanısı NAAT ile SARS-CoV-2 virüs RNA'sının saptanmasıyla doğrulanmaktadır ⁽⁴⁾. Olgu yönetimi gerektiriyorsa hastalar toplum kökenli pnömoni için rutin laboratuvarında kullanılan diğer solunum yolu patojenleri için de test edilmelidir. Ek testler COVID-19 testini geciktirmemelidir ve ortak enfeksiyonlar düşünüldüğünde, başka bir solunum yolu patojeni bulunsa bile şüpheli olgu tanımına uyan tüm hastalardan da SARS-CoV-2 virüsü için test yapılmalıdır ⁽³⁾.

SARS-CoV-2'nin güçlü enfektivitesi nedeniyle hastaları olası olan en kısa sürede tanımlamak, izole ve tedavi etmek amacıyla hızlı ve doğru tanı yöntemleri gereklidir; bu da ölüm oranlarını ve halkın kontami-

nasyon riskini azaltabilir. Fakat rRT-PCR sonucu 5-8 saate kadar uzayabilmekteyken bilgisayarlı tomografi (BT) sonuçları daha kısa sürede sonuçlanmaktadır. Long ve ark. ⁽⁵⁾ yapmış oldukları bir çalışmada, COVID-19 pnömonisiyle izlenen 36 olgunun tanısında BT duyarlılığı %97.2 saptanırken rRT-PCR duyarlılığı %83,3 saptanmıştır. COVID-19 hastalığı saptanan 12.270 olgu içeren büyük ölçekli bir çalışmada ise altın standart testin rRT-PCR olduğu görülmüş ve olguların zaman içinde Serum IgM ve IgG tipi antikorlarının %93'ünde saptandığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmada, BT'nin duyarlılığı %90 ve özgüllüğü %86 oranında saptanmıştır ⁽⁶⁾.

COVID-19 LABORATUVAR TESTLERİ

COVID-19 tanısında kullanılan testler moleküler testler, serolojik testler, genomik sekanslama ve virüs kültürü olarak dört bölümde incelenebilir.

1) Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

COVID-19 hastalarının rutin tanısı NAAT ile benzersiz virüs RNA sekanslarının saptanmasıyla rRT-PCR testi-ne dayanmaktadır. RNA ekstraksiyonu bir biyogüvenlik laboratuvarı içinde biyogüvenlik seviyesi 2 (BSL-2) veya eşdeğeri bir tesiste yapılmalıdır ⁽³⁾. Nükleik asit amplifikasyon testleri için primerler ve probalar yapılan araştırmalarda saptanmıştır ve üç gen tasarlanmıştır. Şimdiye kadar hedeflenen viral genler arasında kullanılan protokol örnekleri N, E, S ve RdRP genleridir. Sarbecovirus'a özgü E geni (E_Sarbeco hedef), SARS-CoV-2'ye özgü N geni (NIID-N hedef) ve kontrol için bir insan ABL1 genidir ^(7,8).

Laboratuvar çalışmalarında öncelikli olarak örneklerin bulaştırıcı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu yüzden yeterli standart işletim prosedürlerinin sağlanması numune toplama, depolama, paketleme ve taşıma için personelin eğitilmesi gereklidir ⁽³⁾. Numuneler solunum sistemi materyalinden:

- Üst solunum yolu örnekleri: Ayaktan hastalarda nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü veya yıkama

- ve/veya alt solunum yolu örnekleri: Balgam (eğer üretilirse) ve/veya endotrakeal aspirat veya daha şiddetli hastalarda bronkoalveoler lavaj

SARS ve MERS'ten sorumlu koronavirüslerde olduğu gibi SARS-CoV-2 virüsünde kanda, idrarda ve dışkıda saptanmıştır ^(9,10). Bunun yanında dışkı ya da idrarda atılma süresi ve oranı bilinmemektedir. Virüs örneklerinin toplanmasından sonra olası olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır ve örnekler hemen çalışılmayacak ise 2-8°C'de depolanabilir. Bir gecikme olması olası olduğunda laboratuvara ulaştırılacak örnekler, viral taşıma besiyeri ile taşınması önerilir. Örnekler - 20°C ya da ideal olarak -70°C dondurabilir ve daha sonra kuru buz üzerinde gönderilebilir ⁽³⁾.

SARS-CoV-2 virüs dolaşımı olmayan bölgelerde NAAT ile olguların laboratuvarında doğrulanması:

- Pozitif NAAT sonucu: SARS-CoV-2 virüs genomundaki en az iki farklı hedeften sağlanmalıdır ve en az bir hedef tercihen SARS-CoV-2 için spesifik

olmalıdır.

- Tek hedef pozitif NAAT sonucu: Betacoronavirus olduğunu gösterir ve ayrıca SARS-CoV-2virüsünün kısmi veya tüm genomunun sekanslaması ile onaylanmalıdır.

SARS-CoV-2 virüs dolaşımı olan bölgelerde NAAT ile olguların laboratuvarında doğrulanması:

- SARS-CoV-2 virüsünün yaygın olarak bulunduğu alanlarda daha basit bir algoritma uygulanabilir. Örneğin, taramada rRT-PCR ile tek bir hedef primerin dikkate alınması yeterli olacaktır.

Yapılan çalışmalarda, rRT-PCR testinin duyarlılığı %60 oranında saptanmıştır ⁽⁶⁾. Bu yüzden bir hastada klinik kuşku halinde test yinelenmelidir. Fakat örneğin olabiliyorsa alt solunum yolundan alınması daha uygun olacaktır ⁽³⁾. Bir veya daha fazla negatif PCR sonucu SARS-CoV-2 virüs enfeksiyonunu ekarte ettirmez. Birçok faktör enfekte olmuş bir kişide olumsuz bir sonuca neden olabilir. Örneğin, hastalığın çok

Tablo 1. Semptomatik hastalardan ve temaslılardan toplanacak örnekler ⁽³⁾.

	Test	Örneğin Yeri	Örneğin Alınma Zamanı
Hasta	NAAT	- Alt solunum yolu Aspirat Lavaj Balgam	Başlangıçta toplanır
		- Üst solunum yolu Nazofarinks Orofarinks Nazofarinks yıkama/aspirat	Olasılıkla yinelenen örnekleme virüsün atılımı göstermede etkilidir.
		Dışkı, tam kan, idrar ve otopsi materyali eklenebilir.	Yinelenen örneklemenin etkinliği ve güvenilirliği amacıyla ileri araştırmalara gereksinim vardır.
Hasta	Serolojik Testler	Aynı serum bir defa kullanılabilir.	Hastalığı onaylamak için eşleştirilmiş örnekler gereklidir.
			İlk örnek hastalığın ilk haftasında alınmalı. İkinci örnek 2-4 hafta sonra alınmalı (iyileşme için en uygun zamanda)
Temaslı	NAAT	Nazofarinks ve orofarinks örnekleri	Dökümante edilen temasıyla inkübasyon süresi içerisinde
Sağlık bakım merkeziyle ilişkili salgın			Başlangıçtaki serum inkübasyon periyodu içinde olabildiğince erken alınır.
COVID-19 ile yoğun temaslı asemptomatik	Seroloji	Serum örneği bir defa kullanılabilir.	İyileşen olgudan son temastan 2-4 hafta sonra serum alınmalı (iyileşme için en uygun zamanlamada örnek olması gereklidir).

erken ya da çok geç safhasında PCR testi negatif çıkabilmektedir. Ayrıca materyalin kalitesiz alınması (az hasta DNA'sı içermesi) ve zamanında laboratuvara ulaştırılmaması da test sonucunu etkiler⁽³⁾. Bu sorunu çözmek için PCR testine bir insan hedefi ekleyerek yeterli insan DNA'sının olup olmadığına bakılabilir. İnsan ABL1 geni, minimal rezidüel hastalık belirlenmesi için moleküler tanı ve izleme için bir internal kontrol (IC) geni olarak önerilmektedir. Bu yüzden

birçok moleküler laboratuvarı bu primer/prob setini kullanır⁽¹¹⁾. Ayrıca daha bol ekspresye edilen ACTB ve GAPDH genleri de internal kontrol için kullanılabilir. Fakat PCR'da, oldukça bol hedeflerin amplifikasyonu, daha az olan hedeflerin amplifikasyonunu önleyebilir ve olasılıkla hedef saptama duyarlılığını azaltabilir⁽¹²⁾. Ayrıca rRT-PCR'ın hassasiyeti; nükleik asit ekstraksiyon yöntemi, tek aşamalı rRT-PCR reaktifi ve primer/prob setleri gibi çeşitli faktörlerden

Tablo 2. Çocuklarda COVID-19 Hastalığının Tanısı için Öneriler⁽³⁷⁾.

Çocuklarda COVID-19 hastalığının tanısı	Tanı ve tedavi önerileri	Çocuklarda enfeksiyonun tanısı, kontrolü ve önlenmesi için öneriler	
Epidemiyolojik Bağlantı	<ol style="list-style-type: none"> 1) Son 2 hafta içinde Wuhan veya yakın zamanda salgın bulunan bölgelere yolculuk veya ikamet geçmişi; 2) Son 2 hafta içinde Wuhan veya yakın zamanda salgın bulunan bölgelerde ateş veya solunum semptomları olan kişilerle yakın temas 3) Son 2 hafta içinde teyit edilen veya kuşku edilen COVID-19 olgularıyla yakın temas 4) Küme salgınları: Bu çocuğun yanı sıra, kuşku veya doğrulanmış COVID-19 olguları dâhil, ateş veya solunum yolu semptomları olan başka hastalar 5) Kuşku veya teyit edilmiş COVID-19 tanılı hamile anne ile yenidoğan bebeği 	<p>Epidemiyolojik sınıflama</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Yüksek risk: Son 14 gün içinde onaylanmış veya şüpheli COVID-19 olgularıyla yakın temas; 2) Orta risk: yaşanan yerde COVID-19'un küme salgınları; 3) Düşük risk: yaşanan yer salgın kaynağının dışındaki bölgelerdedir. 	
Sürveyans olguları		<ol style="list-style-type: none"> 1) Asemptomatik yüksek riskli çocuklar; 2) Orta veya düşük riskli çocuklar aşağıdaki semptomlardan birine sahiptir: <ol style="list-style-type: none"> a) Ateş b) Solunum semptomları, yorgunluk, bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal vb. 	
Şüpheli olgular	Klinik Bulgular	<ol style="list-style-type: none"> 1) Ateş, yorgunluk, kuru öksürük 2) Akciğer görüntülemesi SARS-CoV-2 pnömoni bulgularını gösterir; 3) Erken aşamada, lenfositler azalırken lökositler normal veya azalmış olabilir. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Ateş devam ediyorsa, belirgin solunum semptomları, nefes darlığı veya nabız oksijen doygunluğunun azalması veya bulantı, kusma, karın ağrısı ve ishal gibi gastrointestinal belirtiler mevcut ise 2) Laboratuvar testleri: lökositler normal veya azalır, lenfositler azalır, CRP normal veya hafif yüksek 3) Akciğer görüntülemesi SARS-CoV-2 pnömoni bulgularını gösterir.
	Tanı	Bir maruz kalma öyküsü ve iki klinik bulgu	<ol style="list-style-type: none"> 1) Doğum sonrası onaylanmış COVID-19 anne ile yenidoğan bebeği 2) Yüksek risk altındaki çocukların iki klinik belirtisi mevcut ise 3) Orta veya düşük riskli sürveyans olgularında grip (2 gün boyunca düzenli olarak oseltamivir fosfat uygulanması) ve diğer yaygın patojen enfeksiyonları hariç tutulduktan sonra iki klinik bulgu vardır.
Konfirme Olgular	<p>Şüpheli olgularda aşağıdaki test sonuçlarından biri vardır:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) SARS-CoV-2 nükleik asit için nazofaringeal örnek, balgam, dışkı veya kan örneğinin RT-PCR ile pozitif reaksiyonu 2) Yukarıdaki örneklerden alınan numunelerden SARS-CoV-2 genomik sekanslaması ile uyumlu sonuçların bulunması 3) Yukarıdaki örneklerden elde edilen SARS-CoV-2 virüs parçacıklarının izole edilmiş olması. 	<p>Şüpheli olgularda, nazofaringeal örnek, balgam, dışkı veya kan örneği için RT-PCR pozitifliği vardır.</p> <p>Yukarıdaki örneklerden virüs gen sekanslaması ile SARS-CoV-2 için yüksek derecede uyumlu sonuç bulunması</p>	

etkilenir ve klinik ortamlarda bu metodoloji kullanılmadan önce optimizasyon deneyleri gereklidir ⁽¹²⁾. Bunun yanında virüsün mutasyona uğraması ve PCR inhibisyonu gibi sorunlar da yanlış negatifliği doğurabilmektedir ⁽³⁾. Yapılan her NAAT testi internal ve eksternal kontrol içermeli ve laboratuvarlar standartları açısından değerlendirilmelidir.

Çocuklarda COVID-19 tanısı; yetişkin hastaların tanısına dayanarak, epidemiyolojik ve klinik bulgularla birlikte formüle edilmiştir. Yetişkinlere benzer şekilde önce epidemiyolojik öykü ile doğrulanmalıdır. Kuşku olgu olarak tanı için bir maruziyet öyküsü ve/veya iki klinik bulgu gereklidir ⁽¹³⁾. Semptomları spesifik olmayan ve hafif olan, küme salgınları ile bağlantılı olan pediatrik hastalar araştırmacılar tarafından epidemiyolojik geçmişi farklı risk seviyelerine göre ayrılmışlardır. Bu sayede iyileşme oranı yüksek çocukların daha erken tanınması ve şüpheli olguların daha doğru bir şekilde saptanması amaçlanmıştır (Tablo 2). Çocuklardaki asemptomatik enfeksiyon sıklığı nedeniyle pediatrik COVID-19 hastalığını saptamak oldukça zordur. Bu yüzden epidemiyolojik testler daha önemli bir tanı aracı olmuştur. Çin’de yapılan geniş ölçekli bir araştırmada, pediatrik olguların %26’sının asemptomatik olduğu görülmüştür ⁽¹⁴⁾. Günümüzde, çocuklarda yapılan bir çalışmada ise 2143 pediatrik olgunun %34’ünün laboratuvarda onaylanmış tanısı varken, çoğunluğunun (%66’sını) şüpheli olgu olarak saptanıldığı görülmüştür ⁽¹⁵⁾.

21 Mart 2020’de FDA hızlı bir PCR testini (Xpert® Xpress SARS-CoV-2, Cepheid (Sunnyvale, California, ABD) onaylamıştır ⁽¹⁶⁾. Bu test; nazofaringeal sürüntü, burun yıkama veya aspirat materyalinden SARS-CoV-2 virüsünü yaklaşık 45 dk. içinde saptayabilmektedir. Bu test real time PCR yöntemi ile E ve N proteini içeren iki hedef primeri saptar. Bu sistem otomatik çalışır ve özel eğitilmiş teknisyene gereksinim duymaz. Ayrıca günümüzde tüberküloz gibi birçok bulaşıcı hastalıkta da kullanılmaktadır ^(17,18). İkinci FDA onaylı test Abbott ID NOW™ dir. Abbott ID NOW™ platformunda çalışan COVID-19 için bir kutudan oluşan,

pozitif sonuçları 5 dk. gibi kısa bir sürede tespit edilebilen ve negatif sonuçları 13 dk.’da bildiren moleküler olarak uygulanan bir testtir. SARS-CoV-2 virüsünün RdRp genini hedefleyen teknolojiyi kullanır. Ayrıca bu test burun, boğaz, nazofaringeal ve orofaringeal örneklerinde hasta başı kullanımı için önerilmiştir ⁽¹⁹⁾.

RT-PCR tekniği belirli pahalı ekipman gerektirir ve eğitilmiş analistler ile sonuç için 4-8 saate gereksinim duyulur. Bu gereksinimler ve ilişkili finansal baskılar, bu tür tanımlama testlerinin etkili bir şekilde uygulanmasını engelleyebilir. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) başka bir nükleik asit amplifikasyonu yöntemidir. Artan hassasiyeti ve özgüllüğü ile önemli ölçüde hızlıdır; pahalı reaktifler veya cihazlara gereksinim duymaz ⁽²⁰⁾. Yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2’nin RNA’sını deneyden 30 dk. sonra başarılı bir şekilde saptadığı görülmüştür ⁽²⁰⁾. Ancak, önemli ilerlemeler kaydederken bu testler ve yöntemler henüz onaylanmış hasta numunelerine uygulanmamıştır. Bu çalışmada, materyallerin bulunduğu “simüle edilmiş” hasta örneklerine dayanmaktadır. Bununla birlikte, Zhang ve ark. ⁽²¹⁾; görsel, kalorimetrik yöntemleri kullanarak LAMP metodolojisi ile saflaştırılmış RNA veya hasta hücre lizisinden SARS-CoV-2’nin viral RNA’sını tanımlamışlardır. Bu sonuçlar, ayrıca Wuhan’daki COVID-19 hastalarından toplanan solunum örnekleriyle RNA kullanılarak doğrulanmıştır ve yalnızca ısıtma ve görsel bakı gerektiren testin RT-PCR testleriyle karşılaştırılabilir performans sergilediği görülmüştür ⁽²²⁾.

2) Serolojik Testler

SARS salgınından elde edilen veriler ışığında, COVID-19 hastalığında viral spesifik IgM ve IgG antikorlarının oluşabileceği düşünölmüştür ⁽²³⁾. Yapılan bir çalışmada, COVID-19 pnömonisinde SARS’a benzer akut serolojik tepkilere neden olduğu görülmüştür. Yarasa SARSr - 111 CoV Rp3 nükleokapsid proteini (NP) bir antijen olarak kullanımıyla bir hastada enzime bağılı immünoassay (ELISA) ile hem IgG hem de IgM anti-

korları belirlenebilmiştir ⁽²⁾. COVID-19'un antikor yanıtlarında diğer viral enfeksiyonlara benzer şekildedir; IgM tipi antikorlarının seviyeleri düşmeye başladığında IgG tipi antikorları yükselmeye başlar ⁽²⁾. Yapılan bir çalışmada, klinik bulgular ile serolojik sonuçlar değerlendirilmiş ve 7 olgunun yalnızca bir tanesinde SARS-CoV-2 PCR negatif saptanırken aynı olguda serum IgM antikorları pozitif saptanmıştır ⁽²⁴⁾. Serolojik testler özellikle PCR negatif, asemptomatik olgularda yararlı olabilmektedir. Çin'de 1124 olgunun dâhil edildiği bir çalışmada, olguların 13'ünün çocuk olduğu görülmüştür. Olgulardan sekizinde düzenli olarak SARS-CoV-2 IgM ve IgG antikorları bakılmış ve altısının serum IgM değerleri normal aralıkta saptanırken IgG titrelerinde artış olduğu görülmüştür. Dinamik olarak yalnızca iki olguda düzenli IgG artışı saptanmıştır ⁽²⁵⁾. Bu durum serum IgG antikorlarının kalıcı olmayabileceğini düşündürmüştür.

Koronavirüs enfeksiyonlarında IgM tipi antikorlar, vücuttaki mevcut enfeksiyonu veya yeni geçirilmiş enfeksiyonu gösterebilen erken bir bağışıklık yanıtı olarak üretilirken IgG antikorları ise bağışıklık yanıtı olarak üretilen ve hastalığın bir iyileşme sürecinde olduğu veya önceden bir enfeksiyon olduğunu gösterir. Bu nedenle kombine IgM ve IgG antikorları yalnızca bulaşıcı hastalıkların erken teşhisini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda vücuttaki enfeksiyonun evresinin değerlendirilmesine de yardımcı olur ⁽²⁶⁾. Yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2 IgM ve IgG tipi antikor konsantrasyonlarının semptomların başlangıcından 19-21 günler arasında pik yaptıkları görülmüş ve 16-21. günler arasında yapılan testin artan belirleme oranları ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak, antikor konsantrasyonunun enfeksiyonun seyrini ve sonucunu etkilemediği görülmüştür. Ayrıca iyileşme sırasında saptanabilir düzeyde SARS-CoV-2 RNA pozitifliği olanlarda da IgG konsantrasyonlarının düşük olduğu gösterilmiştir ⁽²⁷⁾.

Bildiğimiz gibi, belirli bir virüse karşı konakçı antikorlarının üretiminde akut enfeksiyon sırasında IgM tipi antikorlar 3. güne kadar erken tespit edilebilir.

Serolojik testlerde numune gereksinimi NAAT kadar zahmetli değildir. Ayrıca virüs örnekleri solunum sisteminde bulunurken, spesifik antikorlar ise düzenli olarak kanda belirtenebilir; bu da örneklemeden kaynaklanan yanlış negatif sonuçlardan kaçınılmasını sağlar ⁽²⁸⁾. ELISA cihazları 96 mikroluka ile otomatik çalışarak kısa sürede sonuç verebilirken (2-3 saat), test kapasitesi RNA tabanlı moleküler testlere göre büyük ölçüde arttırılmıştır ve mevcut salgında çok sayıda hastayı ele almak için idealdir ⁽²⁸⁾.

Serolojik çalışmalar, devam eden bir salgının araştırılmasına ve salgının atak hızının gösterilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca salgının retrospektif olarak değerlendirilmesine olanak sağlar. NAAT testlerinin negatif olduğu ve COVID-19 enfeksiyonu ile güçlü bir epidemiyolojik bağlantı olduğu düşünüldüğü durumlarda ise eşleştirilmiş serum örnekleri (akut ve iyileşme evresi) ile serolojik tanı doğrulandıktan sonra tanıyı destekleyebilir. Bu amaçla hasta serum örnekleri saklanabilir ⁽³⁾. Örneğin, 1980-1990 yılları arasında Hantavirüse bağlı akut hemorajik ateş ve renal sendrom salgınında hızlı tanı serolojik testler sayesinde enfeksiyon kontrolü ve salgının epidemiyolojik bağlantıları saptanmıştır ⁽²⁹⁾. Benzer şekilde serolojik testler COVID-19 hastalarının uygun izolasyonunun sağlanması ve izlenmesiyle epidemiyolojik doğruluğuna katkıda bulunabilir.

Teknik açıdan bakıldığında, nükleoprotein (N) hassas bir antijen olsa da SARS-CoV-2 için spesifik epitoplara veya antijenler seroloji analizinde kullanım için araştırılmalıdır. SARS-CoV virüsünün N proteininin antijenik yapısı insan koronavirüsü 229E, kedi bulaşıcı peritonit virüsü ve domuz bulaşıcı gastroenterit virüsü gibi grup-1 hayvan koronavirüsleriyle çapraz reaksiyona girdiği bildirilmiştir ⁽³⁰⁾. Bu nedenle tüm N proteininin serolojik test için antijen olarak kullanımı potansiyel olarak özgüllük ve duyarlılık sorunlarına yol açabilir. Ancak ticari ve ticari olmayan serolojik testler hâlen geliştirilmektedir ⁽³¹⁾. Yeni koronavirüsün tanısında kolloidal altın immünokromatografi (GICA) hızlı bir tanı aracı olarak düşünülebilir. Ancak,

önemli sayıda yanlış negatif sonuçları nedeniyle GICA'da iyileştirmelere gereksinim vardır. SARS-CoV-2 nükleokapsid ve spike proteininin hazırlanıp değerlendirildiği bir çalışmada, SARS-Cov-2'ye karşı antikorları (IgM ve IgG) saptamak için GICA tekniğinden yararlanılmış ve GICA'nın performansı viral RNA PCR ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada ayrıca; prokaryotik olarak eksprese edilen rN, rN1, rN2 nükleokapsid ve ökaryotik olarak eksprese edilen rS1, rS-RBD, rS-RBD-mFc spike proteinlerini içeren rekombinant SARS-CoV-2 proteinleri elde edilmiştir. En yüksek koronavirüs spesifik IgM ve IgG ELISA titrelerine (rS1 ve rS-RBD-mFc) sahip proteinler GICA gelişimi için seçilmiştir. Sonuçta, GICA duyarlılığı ve özgülüğü sırasıyla %86.89 (106/122) ve %99.39 (656/660) saptanmıştır. Ayrıca klinik olarak onaylanmış ancak RT-PCR'nin negatif olduğu örneklerin %65.63'ü (21/32) GICA pozitif olarak görülmüştür ⁽³²⁾. Wuhan'da yapılan başka bir çalışmada; COVID-19 hastalığı saptanan 133 olgunun 44'ü orta, 52'si şiddetli ve 37'si kritik olgu olarak değerlendirilmiştir. Olguların RT-PCR pozitiflik oranı orta, şiddetli ve kritik olgularda sırasıyla %65.91, %71.15 ve %67.57 saptanmıştır. Buna karşılık olgularda IgM/IgG antikor tespitinin pozitiflik oranları orta, şiddetli ve kritik olgularda sırasıyla %79.55/%93.18, %82.69/%100 ve %72.97/%97.30 olduğu görülmüştür ⁽³³⁾.

RNA tabanlı moleküler testler pahalı ve karmaşıktır. Ayrıca testler için üst düzey biyogüvenlikli laboratuvara gereksinim vardır. Serolojik testler herhangi bir hastanenin klinik laboratuvarında kolayca uygulanabilir; böylece moleküler testlerden çok daha geniş bir uygulama alanına sahiptir. Dikkate alınacak diğer bir konu ise asemptomatik olarak enfekte olmuş veya çok hafif bir klinik bulgusu olan büyük hasta grubunun viral RNA için test edilmeyişidir (ki bu pratik değildir), bu nedenle belirli bir IgG tipi antikor gelişmesiyle büyük ölçekli bir sero-epidemiolojik çalışma yapılabilir. Mevcut salgının sona ermesinden sonra yürütölen bir çalışma ile SARS-CoV-2'nin insandan insana bulaşmasının gerçek ölçeği anlaşılacaktır.

3) Viral Sekanslama

Tam veya hedeflenmiş genomik sekanslama teknolojileri vazgeçilmezdir. Koronavirüs gibi yeni patojenlerin için sonuçlar en kısa sürede geri dönüş sağlamış ve virüsün tüm genomik yapısı ortaya konulmuştur. Kapsamlı klinik değerlendirme, triyaj, genomik tabanlı teşhis, hastalığın epidemiyolojisi, dijital hastalık tespiti küresel patojen izleme sisteminin vazgeçilmez parçası olmuştur. Klinik örneklerin belirli bölümünün düzenli sekanslanması virüs varlığının saptanmasının yanında viral genomdaki mutasyonları izlemek için yararlı olabilir ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarda yararlı olabilmektedir ⁽³⁾.

SARS-CoV-2 virüsünün belirlenmesi için bugüne kadar geliştirilmiş birkaç test kiti vardır. Bunlar; Koronavirüs için Hızlı IgM-IgG Kombine Antikor Testi (RayBiotech Life), 2019-nCoV IgG/IgM Antikor Tespiti Kiti (MyBioSource, Inc.), qSARS-CoV-2 IgG/IgM hızlı testi (Cellex, Inc.), ARIES SARS-CoV-2 testi (Luminex Corporation), SGTi-flexCOVID-19IgM/IgG (Sugentech, Inc). Bunun yanında, ultrasonik, hızlı, taşınabilir hala geliştirme aşamasında olan SARS-CoV-2 nükleik asit sekans tespitiyle nanobiyosensör tabanlı aptamer teknolojisi mevcuttur ⁽³⁴⁾.

4) Viral Kültür

Ortaya çıkan yeni patojenler halk sağlığını tehdit etmektedir. SARS-CoV-2 virüsü, kültür ve ileri manipölasyonlar için yüksek biyogüvenlikli teknolojilere gereksinim duyar ⁽³⁴⁾. Bu yüzden günümüzde, virüs kültür çalışmaları rutin laboratuvar işlemlerinde ve tanı amacıyla kullanımı önerilmemektedir ⁽³⁾. SARS-CoV-2 birincil maymun hücrelerinde izole edilip çoğaltılmıştır. Bu hücelere böbrek Vero-E6, LLC-MK2 gibi hücreler ve hücre hatları, insan hepatom hücre hattı Huh7, insan hava yolu epitel hücreleri ve Vero-E6/TMPRSS2 (Transmembran Serin Proteaz 2) gibi materyaller de eklenmiştir ⁽³⁵⁾. Birçok güvenlik kademmesine gereksinim olduğu için tüm ölkeler virüsün izolasyonunu ve çoğaltılmasını yapamaz. WHO tüm

prosedürlerin her zaman risk değerlendirilmesine dayalı ve yalnızca yüksek oranda katı bir şekilde ilgili tüm protokolleri yerine getirme yeteneğine sahip eğitimli personel kullanılmasını önerir ⁽³⁶⁾. Virüs genom dizileme gibi tanısal laboratuvar çalışmaları ve nükleik asit amplifikasyon testleri çevreleme tesislerinde BSL-2 ile yapılması önerilirken koronavirüs kültürü, izolasyonu, hayvan aşılması veya nötralizasyon tahlilleri prosedürlerine eşdeğer minimum biyogüvenlik 3 olan (minimum BSL-3) olan içe doğru hava akışı ile yüksek biyo-kontrol laboratuvarında yapılmalıdır ⁽³⁶⁾. Bununla birlikte, SARS-CoV-2 virüsünün hücre kültürlerinde üretilmesi tanı ve tedavi için çok önemlidir.

SONUÇ

COVID-19'un tanısında daha hızlı daha spesifik moleküler ve serolojik testler geliştirilme aşamasındadır. Özellikle akut ve iyileşme dönemindeki eşleştirilmiş serum örneklerinden bakılan antikor titrelerindeki değişim bizlere hastalığın gerçek yayılımı hakkında bilgi sunabilir. Ancak serolojik testlerdeki yanlış negatiflik sorunu ve diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyona yol açmaları nedeniyle ideal bir tanı arayışı devam etmektedir. Yeni nesil sekanslama yöntemlerindeki hızlı gelişim ile COVID-19'un hızlı ve doğru tanısında umut vadetmektedir.

Çıkar Çatışması: Yoktur.

Finansal Destek: Yoktur.

Conflict of Interest: None.

Funding: None.

KAYNAKLAR

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*. 2020;382(8):727-33. [\[CrossRef\]](#)
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3. [\[CrossRef\]](#)
3. World Health Organization (WHO), Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance:Laboratory testingfor2019-nCoV inhumans,Interimguidance. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-insuspected-human-cases-20200117>, 2020 (accessed 8 April 2020).

4. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2020;25(3).
5. Long C, Xu H, Shen Q, et al. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European journal of radiology*. 2020:108961. [\[CrossRef\]](#)
6. Mahmood A, Gajula C, Gajula P. COVID 19 Diagnostic Tests: A Study of 12,270 Patients to Determine Which Test Offers the Most Beneficial Results. *Surgical Science*. 2020;11(04):82. [\[CrossRef\]](#)
7. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):2000045. [\[CrossRef\]](#)
8. Shirato K, Nao N, Katano H, et al. Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2020:JJID. 2020.061. [\[CrossRef\]](#)
9. Linton NM, Kobayashi T, Yang Y, et al. Incubation Period and Other Epidemiological Characteristics of 2019 Novel Coronavirus Infections with Right Truncation: A Statistical Analysis of Publicly Available Case Data. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(2). [\[CrossRef\]](#)
10. Zhang W, Du R-H, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):386-9. [\[CrossRef\]](#)
11. Beillard E, Pallisgaard N, Van der Velden V, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)-a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-86. [\[CrossRef\]](#)
12. Ishige T, Murata S, Taniguchi T, et al. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta*. 2020. [\[CrossRef\]](#)
13. Chen Z, Fu J, Shu Q, et al. Diagnosis and treatment recommendation for pediatric coronavirus disease-19. *Journal of Zhejiang University (medical science)*. 2020;49(1):0-.
14. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama*. 2020;323(13):1239-42. [\[CrossRef\]](#)
15. Dong Y, Mo X, Hu Y, et al. Epidemiological characteristics of 2143 pediatric patients with 2019 coronavirus disease in China. *Pediatrics*. 2020.
16. Mboowa G. Current and emerging diagnostic tests available for the novel COVID-19 global pandemic. *AAS Open Research*. 2020;3(8):8. [\[CrossRef\]](#)
17. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013(1). [\[CrossRef\]](#)
18. Gaydos CA, Van Der Pol B, Jett-Goheen M, et al. Performance of the Cepheid CT/NG Xpert rapid PCR test for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1666-72. [\[CrossRef\]](#)
19. ID NOWTM COVID-19. Alere is now Abbott. Accessed April 2, 2020.

20. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*. 2020;109786. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhang Y, Odiwuor N, Xiong J, et al. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. *medRxiv*. 2020:2020.02.26.20028373. [\[CrossRef\]](#)
22. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. 2020. [\[CrossRef\]](#)
23. Xiao SY, Wu Y, Liu H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(5):464-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Bai S, Wang J, Zhou Y, et al. Analysis of the first cluster of cases in a family of novel coronavirus pneumonia in Gansu Province. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2020;54:E005-E.
25. Xie M, Tian J, Hun M, et al. Analysis of Epidemiological and Clinical Characteristics of Children with Mild COVID-19 and Discussion on the Clinical Significance of SARS-CoV-2 Antibody. 2020. [\[CrossRef\]](#)
26. Li Z, Yi Y, Luo X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*. 2020.
27. Hu Q, Cui X, Liu X, et al. The production of antibodies for SARS-CoV-2 and its clinical implication. *MedRxiv*. 2020. [\[CrossRef\]](#)
28. Xiao SY, Wu Y, Liu H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus Infection: proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring [Commentary/ Review]. *Journal of Medical Virology*. 2020. [\[CrossRef\]](#)
29. Xiao S, Zhu B, Zhang M, Zhang T, Zheng Z, Xiang J. A sequential study of serum specific IgM antibody responses in patients with epidemic hemorrhagic fever and its relationship to the severity of illness. *Chinese J Immunol*. 1986;4:218-21.
30. Sun Z, Meng X. Antigenic cross-reactivity between the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and polyclonal antisera of antigenic group I animal coronaviruses: implication for SARS diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(5):2351-2. [\[CrossRef\]](#)
31. Meyer B, Drosten C, Müller MA. Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus Research*. 2014;194:175-83. [\[CrossRef\]](#)
32. Zhang P, Gao Q, Wang T, et al. Evaluation of recombinant nucleocapsid and spike proteins for serological diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *MedRxiv*. 2020. [\[CrossRef\]](#)
33. Liu R, Liu X, Han H, et al. The comparative superiority of IgM-IgG antibody test to real-time reverse transcriptase PCR detection for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *medRxiv*. 2020. [\[CrossRef\]](#)
34. Rapid microbiology: Pinpoint's Low-Cost Handheld COVID-19 Aptamer-based Diagnostic Device in Development. Accessed April 8, 2020.
35. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(13):7001-3. [\[CrossRef\]](#)
36. World Health Organization: Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. World Health Organization; 2020.
37. Duan YN, Zhu YQ, Tang LL, Qin J. CT features of novel coronavirus pneumonia (COVID-19) in children. *European radiology*. 2020. [\[CrossRef\]](#)