

COVID-19 Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı *Microbiological Diagnosis in COVID-19 Infection*

Bengül DURMAZ

Yüksek İhtisas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÖZ

COVID-19'un tanımı ve tedavisinde, mikrobiyoloji laboratuvarı kritik öneme sahiptir. Akut COVID-19 enfeksiyonunu belirlemek için güncel olan tanı testi gerçek zamanlı, reverse-transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (real-time reverse-transcription polymerase chain reaction, rRT-PCR) testidir. Bu testin özgüllüğü yüksek (>%95), duyarlılığı nispeten düşüktür (~%70). Pozitif sonuçları negatif sonuca göre daha fazla güvenilirlerdir. Şüpheli vakalarda negatif sonuç, ikinci bir örnek ile tekrarlanmalıdır. Testin duyarlılığını arttırmak için viral RNA'nın en az iki hedef gen bölgesi kullanılması gereklidir. Sonuçların güvenilirliği için her testte pozitif ve negatif kontroller yanında iç kontrol de kullanmak gerekmektedir. COVID-19 pandemisi yayılmaya devam ettikçe ve vakalar biriktikçe, serolojik testler pandemiyi geçmişini anlamak ve geleceğini tahmin etmek için giderek önemli hale gelmektedir. Serolojik analizler, halk sağlığı pratiğinde vakaları bulma, yakın temaslı izleme ve karantina tavsiyesi için faydalıdır. Doğru zamanda yapıldıklarında moleküler testleri destekleyici olabilirler. Ancak serolojik yöntemlerin güçlü ve sınırlayıcı yönlerini iyi bilmek gerekir. SARS-CoV-2 virüsünün farklı antijen bölgelerini hedefleyen serolojik testlere gereksinim vardır. Antijen testleri, monoklonal antikorlar kullanılarak hazırlanırken, bugün için duyarlılığına ilişkin problemler giderilebilir ve COVID-19'un hızlı tanısında kullanılabilir. Virüslerin hücre kültürlerinde üretilmesi ise bu yeni koronavirüsün daha ayrıntılı analizi ve aşı çalışmaları için gereklidir.

Anahtar Sözcükler: SARS-CoV-2, COVID-19, mikrobiyolojik analizler, gerçek zamanlı-revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), serolojik test.

ABSTRACT

Microbiology laboratory has critical importance in the diagnosis and treatment of infectious diseases. The current diagnostic test to determine COVID-19 infection is a real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) test. The specificity of this test is high (> 95%), the sensitivity is relatively low (~70%). Positive results are more reliable than negative results. In suspicious cases, the negative result should be repeated with a second sample. To increase the sensitivity of the test, it is necessary to use at least two target genes of viral RNA. In order to ensure the reliability of the results, it is necessary to use positive and negative controls as well as internal control in each test. As the COVID-19 pandemic continues to spread and cases accumulate, serological tests are becoming increasingly important to understand the past of the pandemic and predict its future. Serological analyzes can be useful for finding cases in public health practice, monitoring close contacts, and quarantine advice. They can support molecular tests when done at the right time. However, it is necessary to know their strengths and limitations. The serological tests targeting different antigen regions of the SARS-CoV-2 virus are needed. When antigen tests are prepared using monoclonal antibodies, problems related to their sensitivity can be eliminated and they can be used in the rapid diagnosis of COVID-19. The growth of viruses in cell cultures is essential for detail analysis of this new coronavirus and for vaccination studies.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, microbiological analyses, real-time reverse transcriptase polymerase chain (RT-PCR), serological test

Cite this article as: Durmaz B. COVID-19 Enfeksiyonunda Mikrobiyolojik Tanı. YIU Sağlık Bil Derg 2020;1:12-17.

Giriş

COVID-19 pandemisi, bulaşıcı hastalıkların kontrolünde laboratuvara dayalı tanının ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. Erken ve doğru tanının COVID-19 enfeksiyonu hastaların uygun tedavisinin yanı sıra enfeksiyonun yayılımını sınırlamak için de önemi vardır. Etkin bir aşı ve tedavi henüz olmadığından, SARS-CoV-2 yayılımını azaltmak, bulaştırıcı kişileri saptamak ve izole etmek için elimizdeki geçerli olan seçenek laboratuvar tanısıdır. COVID-19

tanısında, mikrobiyolojik test standartlarının belirlenmesi ve değerlendirilmesi, laboratuvar testlerinin güvenilirliğini arttıracak ve COVID-19 pandemisinin kontrol altına alınmasında önemli katkılar sağlayacaktır. Bu bakımdan COVID-19 tanısında kullanılan mikrobiyolojik testler, analiz öncesi klinik örneklerin alınması, saklanması ve taşınması yönleriyle, analizler ve analiz sonrası testlerin yorumlanması olarak gözden geçirilmiştir.

Klinik Örneklerin Alınması, Saklanması ve Laboratuvara Gönderilmesi

Uygun solunum yolu örneğinin doğru zamanda, doğru şekilde ve doğru anatomik bölgeden alınması, COVID-19 enfeksiyonunun moleküler tanısında esas rolü oynar. Daha yüksek tanısal verim alınabilmesi, hasta tarafından daha iyi tolere edilebilmesi ve örneği alan için güvenli olması bakımından, üst solunum yolunu temsilen nazofarenjeal (NF) ve orofarenjeal (OF) örnekler birlikte alınmalıdır. Aynı eküvyonla önce orofarenjeal sonra nazofarenjeal sürüntü alınır, eküvyon tek bir sıvı viral transport ortamı (VTM) içine yerleştirilir.¹ Enfeksiyonla daha önce karşılaşma durumu olmayan ancak emin olmak için test yaptırmak isteyen asemptomatik kişiler ve epidemiyolojik taramalar için, NF sürüntü alınmadığı durumda tükürük ve nazal yıkantı da alternatif üst solunum yolu örneği olarak kullanılabilir. Balgam, endotrakeal aspirat ve BAL (Bronkoalveoler Lavaj) örnekleri, üst solunum yolu örneklerinden daha duyarlı sonuçlar verir.¹ Ayrıca geç dönemde ve şiddetli COVID-19 pnömonili hastaların takibinde, yüksek viral yüke sahip balgam veya BAL örneği entübasyon sonrası alınmalıdır ve transport ortamı kullanılmadan doğrudan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir.² Sürüntü örneği için, toksik olmayan dacron veya polyester gibi maddeden imal edilmiş ve alüminyum veya plastik kılıflı eküvyonlar tercih edilmelidir. Diğer tahta, pamuk veya kalsiyum alginatlı eküvyonlar, RT-PCR inhibitörü maddeler içerebileceğinden kullanılması önerilmemektedir.^{2,3,4}

Orofarenks duvarlarından ve tonsiller üzerinden örnek alınırken ögürtü refleksi oluşması örneğin hedef bölgeden alındığını gösterir. Nazofarenjeal örnek alınırken eküvyon burun boşluğuna derinlemesine sokularak hastadan gözyaşı gelene kadar rotasyonla burun mukozasından örnek alınması önerilir.² Örnekler en kısa zamanda ve buzdolabı ısısında

(+4 °C'de) klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir. Bazı vakalarda tükürük/orofarenjeal /nazofarenjeal örnekler, enfeksiyonun erken döneminde negatif sonuç verebilir. Bu durumda testin tekrarlanması ya da alt solunum yolu örnekleri ile tekrar test edilmesi gerekebilir.² Serum ve idrar örneklerinde hastalığın şiddeti ile ilişkili olmadan viral RNA, genellikle negatif bulunmaktadır.³ Semptomların başlamasıyla 5-6 gün içinde COVID-19'lu hastalarda üst ve alt solunum yollarında yüksek miktarda viral yük saptanmaktadır (Tablo 1).^{2,4}

Solunum yolu örneklerini alan ve testi çalışanlar kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanılmalıdır. Örneklerin lizis tamponuna transferi ve RNA ekstraksiyonu mutlaka Seviye-II biyogüvenlik kabini içinde yapılmalıdır. Viral kültür çalışmaları için biyogüvenlik kabini seviye III kullanılması gerekir.⁴ Ticari lizis tamponları (Biomerieux easyMAG veya QIAGEN EZ1) guanidyum tuzu ve deterjan gibi inaktive edici ajanlar içermekte ve canlı Koronavirüsleri inaktive edebilmektedir.²

Nükleik asit ekstraksiyonu, amplifikasyonu ve saptanmasının bir arada olduğu kapalı sistemler olarak POC (Point of Care) testlerde vardır. Küçük cihazlar kullanılarak, bir saat içinde hızlı sonuç verme kapasitesi ile SARS CoV-2 enfeksiyonlarının takibi ve salgının kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır. Bu tip testlerin sınırlamaları olmasına rağmen kalitatif sonuç vererek, klinik kararlar almaya olanak sağlamaktadır. Özellikle biyogüvenlik kabini olmayan bölgesel hastane veya kliniklerde SARS CoV-2 saptayabilen hasta başı testler olarak, gereksinimleri karşılaması açısından faydalıdır. Ancak örneğin alınmasında ve klinik örneğin transport solüsyonundan kartuja geçirilmesi sırasında örneği alan kişinin KKE (önlük, maske, eldiven, göz koruyucu) giyinmesi ve bunların kullanılması konusunda eğitilmesi gereklidir.²

Tablo 1. COVID-19 Testleri İçin Örnekler, Taşıma ve Saklama Koşulları^{4,5}

Örnek tipi	Örnek Alma Gereci	Taşıma Koşulları	Saklama koşulları	Öneriler
ÜSY: NF sürüntü, OF sürüntü, NF aspirat	Dacron uçlu eküvyon VTM içinde	4°C de	5 gün içinde 4°C >5 gün -70°C	
ASY: Balgam	Steril kap	4°C de	48 sa. içinde 4°C >48 saat. -70°C	
ASY: Bronşiyal yıkantı	Steril kap	4°C de	48 sa. içinde 4°C >48 saat. -70°C	Patojenler dilüe olabilir.
ASY: Trakeal aspirat, transtrakeal aspirat	Steril kap	4°C de	48 sa. içinde 4°C >48 saat. -70°C	
ASY: Akciğer biyopsisi	S.F. içeren steril kap	4°C de	48 sa. içinde 4°C >48 saat. -70°C	
Serum	Serum tüpü	4°C de	5 gün içinde 4°C >5gün -70°C	Serolojik testler için bir çift serum örneği toplanır. Akut fazda: Semptomlar başladıktan sonraki 7 günde. Konvelesan fazda: akut fazda alınandan 14 gün sonra. Serum ayrılması için BGK-II veya daha yüksek BGK kullanılmalı

ÜSY: Üst solunum Yolu, ASY: Alt solunum Yolu, NF: Nazofarenjeal, OF: Orofarenjeal, VTM: Viral Transport Ortamı, S.F: Serum Fizyolojik, BGK: Biyogüvenlik Kabini

Moleküler Tanı Yöntemleri

Sekans analizleri: Yeni nesil sekanslama yöntemleri kullanılarak çok sayıda SARS-CoV-2 virüsünün tüm genom baz dizisi çıkarılmaktadır. Bu çalışmalarla genomdaki mutasyonları araştırmak, virüsün moleküler epidemiyolojik çalışmalarını yapmak ve şüpheli rRT-PCR sonuçlarını doğrulamak mümkündür.^{2,6} Ancak bu testler, COVID-19 enfeksiyonlarının tanısı için pratik değildir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun etiyolojik tanısında rRT-PCR testi, tavsiye edilen ve tercih edilen moleküler testtir. Gerekliğinde nükleik asit baz dizi analizi ile doğrulanması tavsiye edilir.^{1-4,5,7}

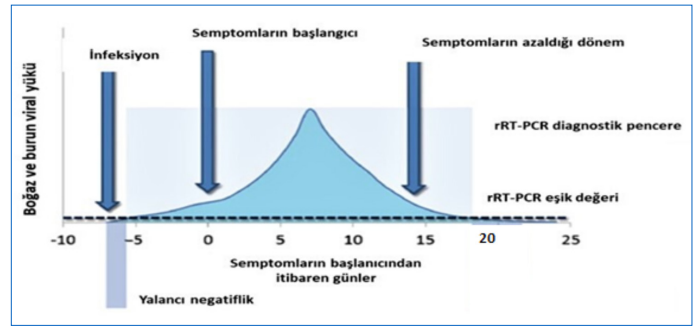
Gerçek zamanlı RT-PCR (rRT-PCR) testleri: rRT-PCR testlerinin avantajı amplifikasyon ve analizin eş zamanlı olarak yapılması ve amplifikasyon ürününün kontaminasyonuna ilişkin yanlış pozitif sonuçları en aza indirmek için kapalı bir sistem kullanılmasıdır. rRT-PCR test yapılması önerilen durumlar şunlardır:^{2,5}

1. COVID-19 semptomları olan şüpheli vakaları doğrulamak,
2. COVID-19 ile ilişkili semptomları olan yatan hastalarda tanı koymak,
3. Doğrulanmış COVID-19 hastalarının karantinadan çıkarılmasına karar vermek,
4. Şüpheli/kesin COVID-19 hastası ile temas etmiş asemptomatik bireyleri taramak,
5. Solunum yolu semptomları olanların ayırt edici tanısını koymak

Pozitif-polariteli, tek sarmallı RNA genomu içeren SARS-CoV-2'nin genomunda rRT-PCR testlerinde kullanılan çok sayıda hedef bölge bulunmaktadır. Bunlar, spike (S) ve zarf (E), transmembran (M) ve nükleokapsid (N) dahil yapısal proteinlerdir. Yapısal proteinleri kodlayan bu genlere ek olarak, türe özgü viral replikasyon için gerekli olan aksesuar genlerde vardır: Bunlar rRNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) ve ORF1a, ORF1b bölgelerini kapsar.^{2,3} rRT-PCR testinde hedef gen bölgesi olarak CDC, viral nükleokapsid proteininin iki gen bölgesini [N1 ve N2] ve RNA ekstraksiyonu için internal kontrol olarak insan RNAase P genini, DSÖ ise ilk tarama için E ve ardından doğrulama testi için de RdRp gen bölgesinin hedef alınmasını önermektedir.⁴ Her ikisinin de analitik duyarlılık ve özgüllüğü yüksektir. Herhangi birinin kullanılmasının, klinik tanı testlerinde bir avantaj sağladığı gösterilmemiştir. Endemik koronavirüslerle çapraz reaksiyonu ve SARS-CoV-2 genetik kaymalarını engellemek için testlerde en az iki moleküler hedef önerilmektedir.²

Mevcut SARS-CoV-2 rRT-PCR testlerinin tanısal doğruluğu, optimalden daha düşük (<%100) olabilir. SARS-CoV-2 için rRT-PCR testi negatif, bilgisayarlı tomografisi pozitif olan hastalarda testler tekrarlandığında hepsinin kademeli olarak pozitifleştiği bildirilmiştir.⁹ rRT-PCR testinin özgüllüğü >%95 dir ve

duyarlılığından (%70) yüksektir. Bu nedenle pozitif rRT-PCR testi negatiften daha anlamlıdır.^{10,11} Semptomları olan COVID-19 hastasında, bir tek negatif rRT-PCR testi, tanıyı dışlamamalıdır. Viral RNA testlerinin doğruluğu, örneğin alındığı yere (viral yükün miktarına) ve örneğin kalitesine, hastalığın evresine, virüsün çoğalma derecesine veya klirensine göre değişir (Şekil 1). rRT-PCR duyarlılığı, BAL da %93, balgamda %72, burun sürüntüsünde %63, fibrobronkoskop fırça biyopsisinde %46 ve boğaz sürüntüsünde %32 olarak rapor edilmiştir.¹² Yapılan bir çalışmada sekizinci günden önce toplanan solunum yolu örneklerinde RNA pozitifliği %66.7 iken, 8-14. günlerde %54 ve 15-39. günlerde ise %45.5'e düştüğü gösterilmiştir.¹³



Şekil 1: SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında viral yük dağılımı, klinik seyir ve rRT-PCR testlerinin pozitifliği arasındaki ilişki⁹

Gerçek zamanlı rRT-PCR testi ile tanımlanan viral yük, COVID-19 hastalığının şiddetini veya terapötik cevabı izlemede kullanmak için henüz yeterli değildir. Ancak yüksek viral yükü gösteren Ct değerleri (Ct:10-20 gibi), bulaşıcılık göstergesi olarak kullanılabilir.¹³ Tedavi sonucunu izlemede, rektal sürüntüden ardarda iki rRT-PCR testi ile negatif sonuç almak yararlı olabilir. Rektal sürüntü örneğinde rRT-PCR ile pozitif sonuç alındığında, bu örnekten hücre kültüründe virüs üretilmesi hastanın bulaştırıcı olduğuna işaret eder. Ancak aynı örnekten dışkıda rRT-PCR pozitifliği ile canlı virüs izolasyonu arasında ilişkiye dair sonuçlar henüz belirsiz olup daha fazla araştırılması gerekir.¹

rRT-PCR testlerinde yanlış negatif sonuçların sebepleri^{5,10}

- Klinik örnek kalitesinin uygun olmaması
- Klinik örneğin çok erken ya da çok geç dönemde alınması
- Klinik örneğin uygun olmayan şekilde taşıma ve saklama koşulları
- Pipetleme ve işleme sırasındaki hatalar
- PCR inhibitörlerinin varlığı
- Test yapılmadan önce antiviral verilmesi

Çözüm önerileri:

- Üst solunum yolu örneği ile test sonucu negatifse, alt solunum yolu örneği ile test tekrarlanmalı .
- Hasta örnekleri hem negatif hem de pozitif kontrollerle birlikte test edilmeli ve internal kontroller tüm reaksiyonlarda kullanılmalı ve doğrulanmalı.

- Epidemiyolojik ilişkisi olan ve COVID-19 semptomları olan hastanın test sonucu tekrarlara rağmen negatifse, örnek daha ileri testlere alınmak üzere Referans Laboratuvarına gönderilmelidir.

Serolojik Tanı Yöntemleri

Antijen Saptama Testleri: Doğrudan klinik örneklerden solunum virüslerini saptamak için kullanılan POC testleri SARS-CoV-2 için de geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin duyarlılığı ve doğru yorumlanması konusundaki solunum yolu virüsleri ile ilgili sorunlar, SARS-CoV-2 için de devam etmektedir. SARS-CoV-2 nükleokapsit proteinine karşı monoklonal antikorlar üretilmiştir. Bu antikorlar gelecekte hızlı antijen saptama testlerine temel oluşturabilir. Antijen testleri, COVID-19 hastalarındaki virüs yükünün düşük olması durumunda veya örnek tipine bağlı olarak hatalı negatif sonuçlar verebilmektedir.^{2,3}

Antikor Saptama Testleri: Klinik örneklerden SARS-CoV-2 ye karşı antikorları (IgG, IgM ve IgA) tanımlayan serolojik testler, moleküler testlere göre daha az komplekstir. Hastalık belirtileri başladıktan sonra doğru zamanda yapılırsa, aktif ve pasif enfeksiyonu gösterebilen, moleküler testleri destekleyici testler olarak kullanılabilir.^{13,14} Surveyansta tek tanı yöntemi olarak rRT-PCR kullanılması, geçirilmiş enfeksiyonları saptayamamaktadır.¹⁵

SARS-CoV-2'nin yapısal proteinlerinden N ve S önemli antijenik bölgeler olarak görünmektedir ve COVID-19 saptanması için geliştirilen serolojik testlerde kullanılmaktadırlar. N proteini, nükleokapsidin yapısal bileşenidir ve virüsün patogeneğinde, çoğalma ve RNA paketlemesinde önemli fonksiyonu vardır. Erken tanıda en önemli antijenlerden biri olabilir. Bu protein COVID-19'un ilk iki haftasında serum ya da idrar örneklerinde pik yapmaktadır. Büyük protein olması sebebiyle ELISA testlerinde kullanıma uygundur. N antijenik bölgesine karşı antikorları saptayan testlerin duyarlılığı, S antijeninininkine göre daha yüksektir.^{16,17} İkinci antijenik bölge olan S glikoproteinini ise konak hücrelere girişi sağlar, S1 ve S2 alt birimlerinden oluşur. S1, ACE-2 reseptörüne bağlanma bölgesi (RBP-S) olup, S2 ise membran füzyonunu gerçekleştirir. S1 alt biriminin aminoterminal ucu en fazla değişken immunojenik antijendir. S protein, nötralizan antikorlar ve aşı çalışmaları yanında serolojik çalışmalarda da hedef molekül olarak kullanılmaktadır. Her iki antijenin birden kullanıldığı serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar önlenir, IgM ve Ig G saptanma duyarlılığı artar.^{10,15,16}

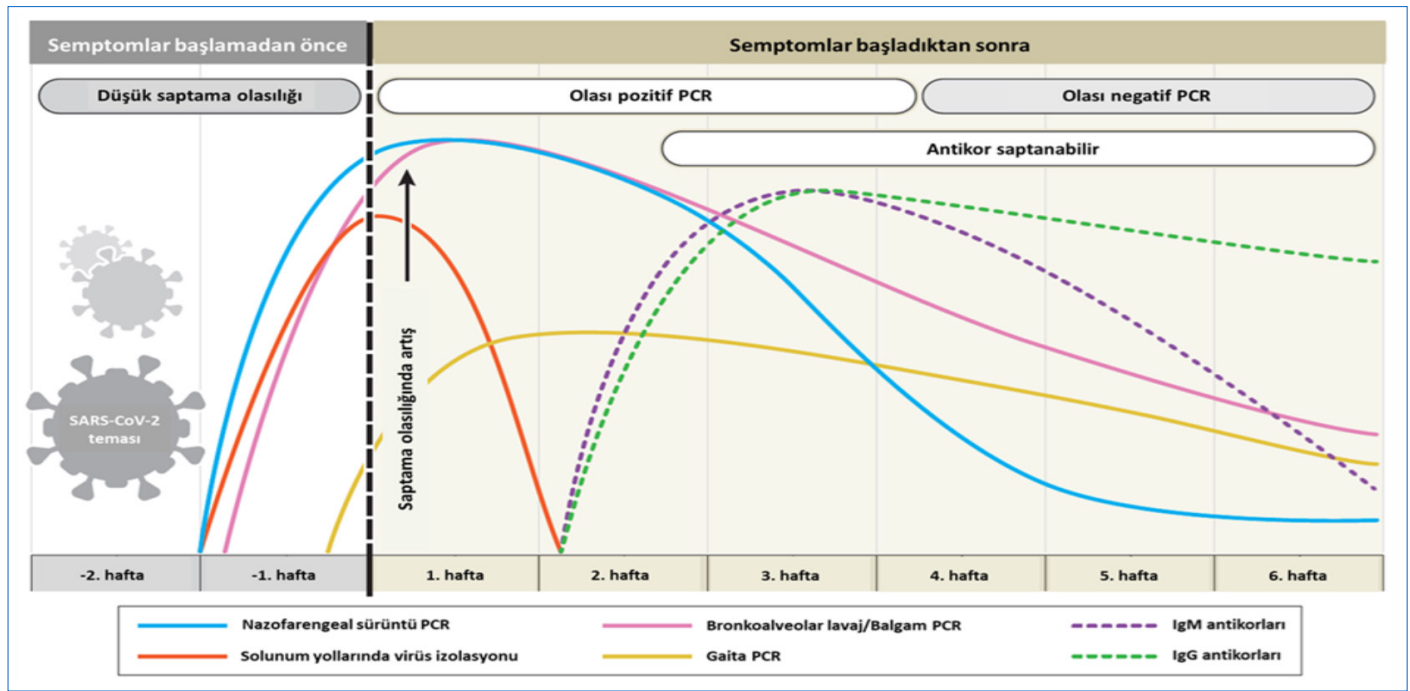
Rekombinant olarak üretilmiş N ve S antijenlerle, COVID-19 tanısı için çeşitli serolojik testlerin (Immun Assay-IA) daha kısa sürede geliştirilmesi sağlanmıştır.¹⁵ Bugün COVID-19 için, ticari olarak hazırlanmış birçok serolojik test mevcuttur. Bu testlerde serum, plazma (EDTA veya sitratlı), tam kan veya tükürük kullanılabilir. Bu testlerin FDA ve Acil Kullanım Onayı (Emergency Use Authorization-EUA) vardır. Bazıları total immunglobulin saptarken pek çoğu iki ayrı test

halinde hem IgM ve hem de IgG saptayabilmektedir. En belirgin IA'lar, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için IgM ve IgG saptayabilen otomatize kemilüminesan IA (CLIA), manuel ELISA ve hızlı sonuç veren Lateral Flow IA (LFIA)'dir. Bunun yanında birkaç damla kan ve basit cihaz kullanımı ile 20 dakikadan daha kısa bir sürede yapılabilen Lateral flow IA esaslı POC serolojik testleri de bulunmaktadır ve uygulamaya girmiştir. POC testlerinin kalitesi değişkenlik göstermekte, duyarlılıkları %73-100, özgüllükleri %99-100 arasında değişmektedir. Kalitatif olup sadece antikor varlığını göstermektedir.^{2,17,18} COVID-19 tanısında kullanılan ELISA temelli IgM ve IgG saptayan testlerin duyarlılığı %77-83, özgüllüğü >%95'dir. İlk pozitif PCR testinden 2 hafta sonra alınan serum örneği ile çalışıldığında serolojik testlerin doğruluğu daha da artmaktadır.¹⁹

COVID-19 Enfeksiyonunda Serolojik Testlerin Kullanılabileceği Alanlar.^{13,14,19}

- Enfeksiyonun belirli bir popülasyondaki seroprevalansının belirlenmesi
- COVID-19 bulaşında önemli rol oynayan asemptomatik kişilerin taranması (CDC henüz önermemektedir)
- Bulaşın ne kadar süredir devam ettiğinin saptanması veya popülasyondaki asemptomatik bireylerin oranının belirlenmesi
- Temaslıların izlenmesi
- Hastalığın geç dönemlerinde viral RNA-negatif hastalarda, tanının doğrulanması
- Toplumda özellikle SARS-CoV-2 spesifik IgG antikor titreleri ölçülerek, geçmişte enfeksiyonun subklinik/klinik olduğuna bakılmaksızın, bağışık bireylerin sayısının belirlenmesi, toplam enfekte kişi sayısının tahmini
- Terapötik veya profilaktik nötralizan antikor kaynağı olabilecek bireylerin belirlenmesi
- PCR testlerinin duyarlılığı araştırmalarında, serolojik test sonuçlarından yararlanılması
- Pandeminin gerçek kapsamı, ölüm oranı gibi istatistiklerin hesaplanması
- Hastalık kontrol politikalarını belirlemek, enfeksiyonun yayılmasını ve sosyal mesafeye ilgili mevcut kısıtlamaların gevşetilmesini, sağlık çalışanları gibi SARS-CoV-2'ye tekrar maruz kalma riski olanların işe dönüş kararının verilmesi.

Serolojik Testlerin Uygulanması ve Sınırlamalar: DSÖ, SARS-CoV-2 serolojisinde akut ve iyileşme fazında alınacak örnekler için, ilk serum örneğinin hastalığın 1. haftasında, ikincisinin 3-4 hafta sonra alınmasını önermektedir. Sadece tek bir serum alınabilecekse, semptomların başlamasından en az 3 hafta sonra alınması önerilmektedir.²⁰



Şekil 2: Hastalık Sürecinde Semptomların Başlangıç Zamanına Göre SARS-Cov-2 Tanı Test Sonuçlarının Değişimi¹⁰

Serolojik testlerin kullanımında bazı sınırlamalar vardır:²¹

- Özellikle enfeksiyonun akut fazında hastalığı saptamada, testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü değişkendir. Erken tanı ve taramada rolü yoktur.
- Diğer Koronavirüslerle çapraz reaksiyona bağlı yanlış pozitif sonuçlar verebileceğinden, sonuçların doğrulanması gereklidir.
- SARS-CoV-2 yeni koronavirüs olduğundan bağışıklık için gerekli olan eşik değerleri belirlemek, zamanla antikor kinetiğini anlamak gerekir.
- Testin yaygın kullanımı için güvenilir ve maliyet etkin olması gerekir.

Semptomlar başladıktan itibaren ilk haftadan sonra hastaların $\leq 40\%$, 15. günden itibaren de %100'ünde antikor cevabı gelişmekte ve takiben 6-9 günde platoya ulaşmaktadır. Hastaların %94'ünde İgM, %80-100'ünde İgG bulunmaktadır. Buna karşın, viral RNA'nın saptanabilirliği yedinci günden önce toplanan örneklerde %67 iken, 15-39. günlerde %45'e indiği rapor edilmektedir (Şekil 2).^{10,13,19,21} RNA ve antikor tanımlama testini birleştirmek enfeksiyonun erken evresinde ilk haftada COVID-19 tanısında duyarlılığı artırır. Antikorların doğal oluşumundaki gecikmenin bir sonucu olarak antikor testi negatif sonuçlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunu elimine etmez. SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş ve daha sonra iyileşen kişilerin gelecekteki SARS-CoV-2 enfeksiyonundan korunmasını sağlayabilecek bağışıklığın, ne kadar sürebileceği tam olarak bilinmemektedir. Yapılan Rhesus makak çalışmasından elde edilen son kanıtlarla, birincil enfeksiyonun iyileşmesinden sonra koruyucu bağışıklık oluştuğu gösterilmiştir. Ancak bunu

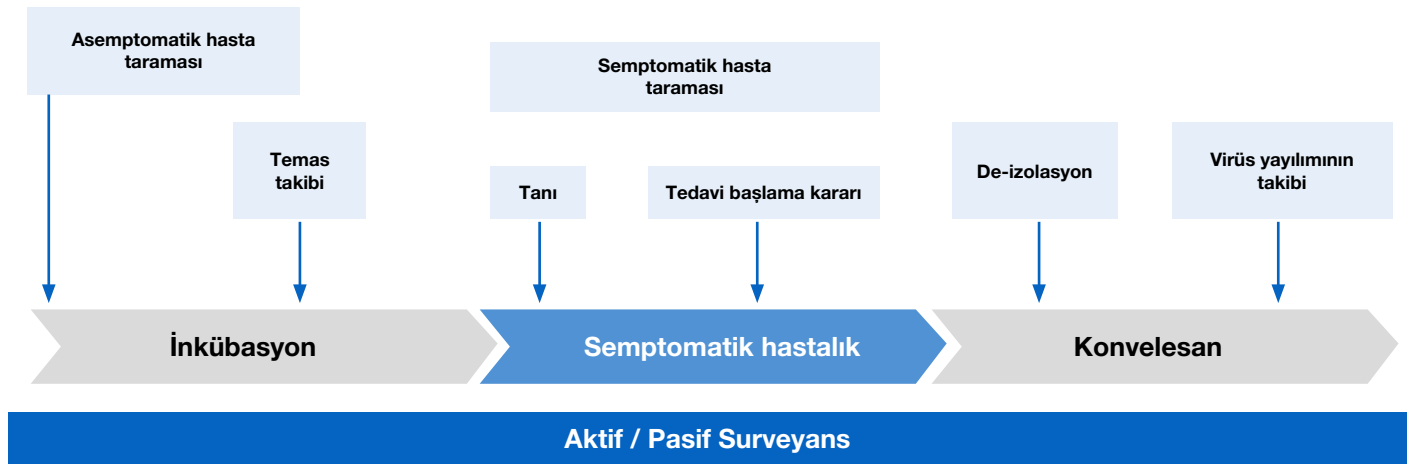
doğrulayacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.¹ Ayrıca oluşan antikorlar, nötralizan antikorlar değilse, reenfeksiyon durumunda antikor varlığına rağmen koruyuculuk oluşmadığından hasta virüsü yaymaya devam edebilir.²²

COVID-19 antikorları da dahil olmak üzere, tüm serolojik testlerin doğal olarak değişken, rastgele ve öngörülemez analitik hata oranlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Bu durum, aktif bağışıklık süresince oluşacak bazı antikor sınıfları ve alt sınıflardan kaynaklandığı gibi ayrıca bireylerdeki endojen antikorlarla tesadüfen etkileşimi sonucu da olabilir. Bu nedenle, en iyi teknikler, en güvenilir reaktifler, iç ve dış kalite kontrolleri uygulandığında bile, bazı yetersizlikleri vardır. COVID-19'un klinik tanısı için kullanılmadan önce testlerin yetersizliklerinin dikkatlice değerlendirilmesi gerekir.

Hücre Kültürü

Hücre Kültürlerinde virüs izolasyonu, rutin tanı yöntemi olarak tavsiye edilmemektedir. Virüs izolasyonu virüsün özelliklerini çalışmak ve aşı geliştirme için kullanılır. Virüsün başlangıç izolasyonu için, insan solunum epitel hücre kültürleri kullanılmaktadır.⁶

Sonuç olarak, özellikle toplumsal kaynaklı şüpheli COVID-19 vakalarının ayırt edilmesi açısından, mikrobiyolojik laboratuvar tanısının önemine odaklanılması gerekir. Ancak, COVID-19 enfeksiyonu tanısı için %100 güvenilir bir tanı testi yoktur. Bir vakada kullanım için uygun bir test diğeri için yetersiz olabilir. Şu an için, semptomatik hastaların tanısında rRT-PCR testleri gereksinimleri büyük ölçüde karşılamasına rağmen; inkübasyon dönemindeki asemptomatik bireylerin taranması ve tedavi



Şekil 3: Kanıtlanmış/şüpheli COVID-19'lu kişilerde tanı testlerinin farklı endikasyonlarda kullanımı.³ Semptomatik vakaların tanısı ve tedaviye başlanılmasında rRT-PCR testleri tatmin edici sonuçlar vermektedir. Konakda oluşan özgül antikorların saptanması ile ilişkili testler; surveyans, salgın tahmini ve bağışıklığı anlamak için yarar sağlayacaktır.

sonrası canlı virüs saçılımının anlaşılması konusundaki katkıları sınırlıdır³ (Şekil 3). SARS-CoV-2'ye karşı konakta oluşan antikorların saptanması, surveyans, salgın tahmini ve bağışıklığı anlamak için çok daha güvenli serolojik testlere gereksinim vardır. Test sonuçlarının hasta yönetiminde kullanılabilmesi için testlerin kullanım amaçları, analitik duyarlılığı, özgüllüğü ve test edilen popülasyonla ilgili özelliklerin dikkate alınması gerekir. Moleküler testler için optimal klinik örnek alma zamanı, tipi ve virüsün konaktaki çoğalma dinamiğinin, serolojik testler için ise çeşitli popülasyonlarda hastalığın şiddetine göre bağışıklık seyrinin bilinmesi gerekmektedir. Daha güvenilir sonuçlar verebilecek serolojik testlerin geliştirilmesi ve mevcut moleküler testlerle karşılaştırılması konularında araştırmalara gereksinim devam etmektedir.

Kaynaklar

1. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, George K et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. 2020 Mar 26;11(2): e00722-20. doi: 10.1128/mBio.00722-20
2. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. The Laboratory Diagnosis of COVID-19 Infection: Current Issues and Challenges J Clin Microbiol 2020 May 26;58(6): e00512-20. doi: 10.1128/JCM.00512-20
3. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. A Narrative Review. Ann Intern Med. doi:10.7326/M20-1301
4. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases WHO. Interim guidance, 19 March 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng>.
5. Hong K, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. Ann Lab Med 2020 40: 351-360; doi: 10.3343/alm.2020.40.5.351
6. Ozma MA, Maroufi P, Khodadadi E, Köse S, Esposito I, Ganbarov K et al. Clinical manifestation, diagnosis, prevention and control of SARS-CoV-2 (COVID-19) during the outbreak period. Le Infezioni in Medicina, n. 2, 153-165, 2020.
7. Padhi A, Kumar S, Gupta E. Laboratory Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. Saxena SK. (ed) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Therapeutics. (eBook) doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7
8. Lu H, Stratton CW, and Tang YW. An Evolving Approach to the Laboratory Assessment of COVID-19. J Med. Virol. 2020 Apr 29. doi: 10.1002/jmv.25954
9. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Clin Chem Lab Med Mar 2020; doi: 10.1515/cclm-2020-0285
10. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA 6 May 2020; doi: 10.1001/jama.2020.8259
11. Watson J, Whiting PF, Brush. JE. Interpreting a covid-19 test result. BMJ 12 May, 2020;369:m1808 doi: 10.1136/bmj.m1808
12. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA 2020 May 12; 323(18):1843-1844.
13. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019
14. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. Lancet Infect Dis 2020 Online/Articles. doi:10.1016/S14733099(20)302735
15. Lu H, Stratton CW, Tang YW. An Evolving Approach to the Laboratory Assessment of COVID-19, 2020 Apr 29. doi: 10.1002/jmv.25954
16. Zhong L, Chuan J, Gong B, Shuai P, Zhou Y, Zhang Y et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. Sc China Life Sc 2020; 63(5); doi: 10.1007/s11427-020-1688-9
17. Vashist SK. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. Diagnostics 2020, 10, 202; doi:10.3390/diagnostics10040202
18. Rashid ZZ, Othman SN, Abdul Samat MN, Ali UK, Wong KK. Diagnostic performance of COVID-19 serology assays. Malaysian J Pathol 2020; 42(1): 13-21
19. Stowell S, Guarner J. Role of serology in the COVID-19 pandemic. Clin. Infect Dis. Published online 2020 May 1. doi: 10.1093/cid/ciaa510
20. Yang Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. Rev. Med. Virol. Rev Med Virol. 2020;30:e2106. doi.org/10.1002/rmv.2106
21. Ismail AA. Serological tests for COVID-19 antibodies: Limitations must be recognized. Annals of Clinical Biochemistry. May 14, 2020. doi:10.1177/2F0004563220927053
22. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK et al, Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 Nature Medicine 29 April 2020.
23. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike-Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? Lab Medicine 2020;XX;2-3 DOI: 10.1093/labmed/lmaa025