

BÖLÜM 7

COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI YÖNTEMLERİ

Ayşe Rüveyda UĞUR¹

GİRİŞ

Çin'in Wuhan Bölgesi'nden ilk kez 2019'un Aralık ayında bildirilen akut solunum yolu sendromu etkeni yeni bir pandemiye neden olmuştur (1). Üç hastaya ait bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısından izole edilen yeni etken International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) tarafından Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) olarak isimlendirilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından bu viral etkenin neden olduğu hastalığa COVID-19 adı verilmiştir (2,3).

COVID-19 olası vakalardan ivedilikle uygun klinik örneklerin alınması ve SARS-CoV-2'ye yönelik tanı testlerinin yapılması, klinik olguların yönetilmesinde ve salgın kontrolünde son derece önemlidir. COVID-19'un kesin tanısı, solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2'ye ait genom dizisinin nükleik asit amplifikasyon testleriyle belirlenmesine dayanmaktadır. Bu testler mutlaka mikrobiyoloji uzmanının kontrolünde ve BGS 2 laboratuvarlarda yapılmalıdır (2). Test yapılma- dan klinik değerlendirme ile COVID-19 tanısının

konması yüksek oranlarda (yaklaşık % 62) aşırı tanılama (over diagnosing) ile sonuçlanır. Aşırı tanılama yanlış izolasyon uygulamalarına ve gereksiz tedavilere neden olmaktadır. Diğer yandan yalnızca klinik değerlendirmeye COVID-19 tanısının konması asemptomatik bireylerde yanlış negatifliklere de neden olur (4). Kanıta dayalı tıbbın önerdiği şekilde uygun tanı testlerinin yapılması yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların önüne geçmek için elzemdir.

Şüpheli olgulardan en az bir üst solunum yolu örneği ve/veya alt solunum yolu örneği alınarak, mikrobiyoloji laboratuvarına soğuk zincir koşullarında ve biyolojik materyal taşıma prensiplerine uygun şekilde ulaştırılmalıdır (4). Örneklerin laboratuvara en kısa sürede + 2-8°C'de ulaştırılması son derece önemlidir. Eğer örnek gönderiminde gecikme yaşanacaksa, örneklerin - 70°C veya - 20°C'de dondurularak kuru buz ile transportu sağlanmalıdır (5). Tekrarlayan dondurma ve erime işlemlerinden sakınılmalıdır.

Virüsün dışkı ve idrarda ne kadar süre ve sıklıkta bulunduğu bilinmemesine rağmen şüpheli

¹ Uzm. Dr. Ayşe Rüveyda Uğur, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Viroloji, ayserugur@gmail.com



rini veya N proteinini hedefler (14). SARS-CoV-2 için antijen tespit edebilen testler henüz geliştirilme aşamasındadır.

CRISPR/CAS13 SİSTEMİ

Son yüzyılda *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) adı verilen gen bölgelerinin ve CRISPR ile ilişkili Cas proteinlerinin keşfi ve kullanımı ile moleküler tanı alanında yeni bir çığır açılmıştır (17). Cas-13 tabanlı SHERLOCK (*specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking*) platformu klinik örneklerde mikrolitrede 1 kopya kadar düşük Zika virüs ve dengue virüs partiküllerini belirleyebilmektedir (18). Bu yöntemde CRISPR/Cas13 sisteminde Cas13a efektör proteini crRNA ile birleşerek crRNA öncülüğünde RNA hedefli CRISPR efektör kompleksi oluşturur ve ssRNA'yı belli bölgelerden keser. Sistem floresan reporter sayesinde çok küçük miktarlarda bile virüs tespitine olanak verir. SARS-CoV-2 tespitinde CRISPR/Cas-12 temelli tanı testi geliştirilmiştir ancak henüz klinik örneklerde kullanılmamaktadır (19). SHERLOCK platformu **Şekil 3**'te gösterilmiştir.

Sekanslama

Viral genomun sekanslanması, bir bölgede SARS-CoV-2 ilk kez tespit edildiğinde doğrulama amacıyla mutlaka yapılmalıdır (2). Örneklerin belirli bir yüzdesinin düzenli olarak sekanslanması ise viral gen mutasyonlarının belirlenmesinde, alınan tıbbi önlemlerin ve tanı testlerinin doğruluğunun değerlendirilmesinde yararlıdır. Ayrıca farklı coğrafi bölgelerden elde edilen tüm genom sekansları birbirleri ile karşılaştırılarak genomik epidemiyolojik veriler elde edilebilir. Böylece virüs mutasyonlarına ilişkin farklılıklar, patojenite ve virülans değişiklikleri değerlendirilebilir. Pandeminin başlangıcından bu yana 6 aylık sürede dünyanın çeşitli bölgelerinden 50 bini aşkın SARS-CoV-2 genom sekansı bildirilmiştir (20).

VİRÜS KÜLTÜRÜ

Rutin tanı laboratuvarlarında SARS-CoV-2 izolasyonunun yapılması yüksek infektivite ve patojenite nedeni ile önerilmemektedir. Virüs kültürünün yapılması için BGS 3 laboratuvar şartlarına gereksinim vardır. Virüs kültürü, aşı ve ilaç geliştirmek için, virüsün stabilitesini araştırmak ve patogeneze çalışmalarında kullanılmaktadır (21). MDCK (*Madin Darby Canine Kidney cell line*), Vero (*monkey kidney cell line*), Huh7 (*human hepatoma cell line*), 293T (*human kidney cell line*) SARS-CoV-2 transdüksiyonu için kullanılabilen hücre serileridir (22).

Sonuç

COVID-19 kesin tanısı, solunum yolu örneklerinden başlıca SARS-CoV-2 nükleik asit amplifikasyon yöntemi ile konulmaktadır. Serolojik testler tanı koymada tek başına yeterli değildir ancak yardımcı test olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020. 26;382(13):1199-1207. doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
2. DSÖ (2020) Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: Interim Guidance. 19 Mart 2020. (20/06/2020 tarihinde <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329> adresinden ulaşılmıştır).
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020; 382(8):727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
4. Patel R, Babady E, Theel ES, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *mBio.* 2020;11(2):e00722-20. doi:10.1128/mBio.00722-20.
5. Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):386-389. doi:10.1080/22221751.2020.1729071
6. Yong SK, Su PC, Yang YS. Molecular Targets for the Testing of COVID-19. *Biotechnol J.* 2020;15(6):e2000152. doi: 10.1002/biot.202000152.
7. Vermeiren C, Marchand-Sen  cal X, Sheldrake E, et al. Comparison of Copan ESwab and FLOQSwab for CO-



- VID-19 Diagnosis: Working around a Supply Shortage. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00669-20.
8. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;2;172(11):726-734. doi: 10.7326/M20-1301.
 9. Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12(6):E582. doi:10.3390/v12060582.
 10. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (2020).COVID-19 (SARS-CoV-2 ENFEKSİYONU) GENEL BİLGİLER, EPİDEMİYOLOJİ VE TANİ Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması. Ankara 2020. (19/06/2020 tarihinde <https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/tr/covid-19-rehberi.html> adresinden ulaşılmıştır).
 11. Jina Y, Wanga M, Zuo Z et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis.* 2020;94:49-52. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.065.
 12. Caini S, Bellerba F, Corso F, et al. Meta-analysis of diagnostic performance of serological tests for SARS-CoV-2 antibodies up to 25 April 2020 and public health implications. *Euro Surveill.* 2020;25(23):10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2000980. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.23.2000980).
 13. Zainol Rashid Z, Othman SN, Abdul Samat MN, et al. Diagnostic performance of COVID-19 serology assays. *Malays J Pathol.* 2020;42(1):13-21.
 14. D'Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:468. doi:10.3389/fcell.2020.00468.
 15. Zhong L Chuan J, Gong B, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci.* 2020; 63:777-780. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1688-9>
 16. 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. *J Med Virol.* 2020;92(5):464-467. doi:10.1002/jmv.25702.
 17. Xiang X, Qian K, Zhang Z, et al. CRISPR-cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia [published online ahead of print, 2020 May 26]. *J Drug Target.* 2020;1-5. doi:10.1080/1061186X.2020.1769637.
 18. Jin Y, Yang H, Ji W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4):372.
 19. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.
 20. GISAID (2020).Genomic epidemiology of hCoV-19. (20/06/2020 tarihinde <https://www.gisaid.org/> adresinden ulaşılmıştır).
 21. CDC (2020). SARS-CoV-2 Viral Culturing at CDC. (16/06/2020 tarihinde <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/grows-virus-cell-culture.html> adresinden ulaşılmıştır).
 22. Nie J, Li Q, Wu J, et al. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9:680-6. doi: 10.1080/22221751.2020.1743767