

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI



SARS-COV-2 PCR POZİTİF OLGULARDA VİRAL SUBGENOMİK
RNA'LARIN VE ANTİJEN VARLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kazım Batıhan Büyükgengin

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alper Akçalı

Çanakkale/2022

TC
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS-COV-2 PCR POZİTİF OLGULARDA VİRAL SUBGENOMİK
RNA'LARIN VE ANTİJEN VARLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kazım Batıhan Büyükgengin

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Alper Akçalı

Çanakkale/2022

Bu araştırma ÇOMÜ-BAP tarafından TTU- 2021- 3637 proje kodu ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Balıkesir’de devam eden asistanlık sürecimin ardından, pandemi gibi zorlu bir süreçte beni aralarına kabul eden başta değerli hocam Prof. Dr. Alper AKÇALI olmak üzere tüm Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D hocalarına,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini daima aktaran, tezimin planlanması ve yürütülmesinde katkı sağlayan, çalışkanlığı ve özverisiyle bir kılavuz olan, bilimsel tüm sorularımı özgürce ve rasyonel olarak sorup danışabilme ortamı sağlayan, tevazu ve hoşgörüsü daima aklımda kalacak, yaklaşımı ve bilimsel kişiliğiyle kendisini örnek alacağım, dualarımla hep müteşekkir olacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Alper AKÇALI’ya,

Balıkesir’de tıp ve uzmanlık eğitimi aldığım süreçte tüm deneyimlerini, engin bilgisini aktaran ve neşesini esirgemeyen, zor görünenleri kolay kılan, pozitifliğiyle enerji katan, katlanılamayanı katlanabilir kılan, hocadan da öte bir baba gibi kendisiyle paylaştığım tüm sorun ve durumlarda yanımda duran, sadece mikrobiyolojide değil sözleri ve fikirleriyle bana hayatın birçok alanında nosyon katan kıymetli hocam Prof. Dr. M. Tefvik YAVUZ’a,

Üzerimde emeği geçen ve bana vizyon katan değerli hocalarım Prof. Dr. Müşerref OTKUN’a, Doç. Dr. Yeşim ÇAĞLAR’a, Prof. Dr. İsmail CEYHAN’a, Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi’ndeki tüm hocalarıma, tezimle ilgi katkılarından dolayı Prof. Dr. Coşkun BAKAR’a,

Hem arkadaşlıkları hem de bana kazandırdıkları akademik katkılarından dolayı Dr. Yener ÖZEL ve Doç. Dr. Alper VATANSEVER’e,

Yaşadığım tüm zorlu süreçlerde yanımda olup beni destekleyen dostlarıma, büyüklerime ve diğer tüm hocalarıma, ayrıca çalıştığım tüm laboratuvarlarda üzerimde emeği geçen biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma,

Her zaman beni destekleyen, bana güç veren ve hayatıma anlam katan annem Gevher BÜYÜKZENGİN ve babam Ayhan BÜYÜKZENGİN’e,

Fikri hür, vicdanı hür, irfanı hür bir birey olarak yetişmemi sağlayan, ülkem kurtarıcısı, kurucusu ve koruyucusuna..

ÖZET

SARS-COV-2 PCR POZİTİF OLGULARDA VİRAL SUBGENOMİK RNA'LARIN VE ANTİJEN VARLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

SARS-CoV-2'nin pandemi ilan edilmesiyle virüsün hızlı tanı ve tedavisi önem kazandı. Laboratuvarlarda tanı amacıyla yaygın olarak PCR ve antijen testleri kullanılmaktadır. Tanı testleri, virüs genomuna yönelik tespit yapabilmektedir. Bu nedenle virüsün enfeksiyöz olup olmadığı bilinemez. Hastalarda enfeksiyöz virüsü gösterebilmek karantina süresine, tedaviye çeşitli sağlık ve ekonomik kazanımlar sunabilir. Replikatif virüsün varlığı hücre kültürü ile gösterilebilse de pandemi koşullarında bunu rutin olarak gerçekleştirmek mümkün değildir. Sadece virüsün replikasyon döneminde üretilen subgenomik RNA tespiti, aktif viral enfeksiyonu tespit edebilir ve klinisyene fikir verebilir. Antijen testleri de belli bir yük miktarından itibaren virüs tespiti yapabildiği için enfeksiyözite göstergesi olabileceği tartışılmaktadır.

Amaç: Tezin amacı PCR yöntemi kullanılarak genomik RNA yerine subgenomik RNA tespiti edilebileceğini göstermek, bu tespitin klinik önemini irdelemektir. Ayrıca antijen testi de kullanılarak subgenomik RNA pozitifliği arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir. Hücre kültürü esasına dayanan sitopatolojiyi incelemek, replikasyonu göstermek açısından altın standart görünse de sürekli uygulanabilir değildir. Araştıracığımız bu yöntem viral bulaşıcılığı ve aktif enfeksiyonu göstermede çok farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Ayrıca PCR yöntemleriyle replikatif/replikatif olmayan mikroorganizma ayırımı yapılamayacağı düşünülmekte olup, viral antijen saptama testi de kullanılarak hastada virüs replikasyonu olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Antijen testinin de viral bulaşıcılığı gösterebileceği için bunun subgenomik RNA ile birlikte değerlendirilmesi, antijen testinin önemi hakkında fikir verebilecektir.

Yöntem: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na SARS-COV-2 PCR tespiti için gönderilmiş pozitif sonuçlu -80

°C'de saklanmış 109 hasta numunesi çalışmaya alındı. Bu örnekler PCR pozitifliğini doğrulama amacıyla E gen PCR gerçekleştirildi. Antijen testi, E ve N sgRNA qPCR tespiti yapıldı.

Bulgular: SARS-COV-2 PCR pozitif 109 numunenin 83'ünde (%76,14) antijen testi, 88'inde (%80,73) E gen sgRNA, 96'sında (%88,07) N gen sgRNA, 97'sinde (%89) en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır. En az bir sgRNA tespit edildiği örneklerin %77,3'ünde, negatif olanların %66,7'sinde antijen testi pozitif bulunmuş olup bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,475$). E sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,023$). E sgRNA pozitif örneklerin %98,9'unda, negatif örneklerin ise %42,9'unda N sgRNA pozitif bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0001$). Ct değeri ≤ 25 için antijen testi pozitifliği oranı %98,15 (53/54), Ct 25-30 için %57,14 (12/21), Ct ≥ 30 için %52,94 (18/34) bulunmuştur. E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 için en az bir sgRNA pozitifliği ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=1,0$; $p=0,112$).

Sonuç: E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 , ≤ 29 ve > 29 , < 30 ve ≥ 30 arasında antijen testi pozitifliğinde bulunan fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0001$). Antijen testi pozitifliği, beklendiği gibi viral yük ile ilişkili saptanmıştır. Antijen testi pozitifliği enfeksiyözite varlığının da bir yansıması olduğu için viral yük ile enfeksiyözite arasında da ilişki olabileceği gösterilmiştir. Ancak antijen testi ile subgenomik RNA pozitifliği arasında anlamlı bir fark görülmediğinden antijen testi de enfeksiyözite tespitinde önemli bir göstergeç olabilir. Enfeksiyözite göstergesi olarak sgRNA'ların kullanılabilmesini göstermek için ileri ve geniş kapsamlı çalışmalar (örn. NGS, sonuçların viral kültürle desteklenmesi gibi) gerekli görünmektedir. Subgenomik RNA tabanlı ileri çalışmalar, hastanede kalış ve sosyal izolasyon süresini kısaltabilecektir. Antijen testi ve sgRNA'ların pozitiflik oranı benzer görülmektedir, bu açıdan antijen testleri etkinliğini değerlendirmeye elverişli olabilir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, PCR, subgenomik RNA, antijen testi

ABSTRACT

EVALUATION OF VIRAL SUBGENOMIC RNA'S AND ANTIGEN PRESENCE IN SARS-COV-2 PCR POSITIVE CASES

With the declaration of SARS-CoV-2 as a pandemic, importance of rapid diagnosis and treatment of the virus increased. PCR and antigen tests are widely used for diagnostic purposes in laboratories. Diagnostic tests could detect the virus genome. Therefore, it is not known whether the virus is infectious or not. Being able to indicate the infectious virus in patients could provide various health and economic benefits to the quarantine period and treatment. Although the presence of replicative virus could be demonstrated by cell culture, it is not possible to apply this routinely under pandemic conditions. Detection of subgenomic RNA which is produced only during the replication period of the virus could detect active viral infection and provide insight to the clinician. It is argued that the antigen tests could also be an indicator of infectiousness, since they could detect viruses from a certain load amount.

Aim: The aim of the thesis is to show that subgenomic RNA can be detected instead of genomic RNA using PCR method and to examine the clinical importance of this detection. It is also to evaluate the relationship between subgenomic RNA positivity by using antigen test. Examining cytopathology based on cell culture seems to be the gold standard for demonstrating replication, but it is not consistently applicable. This method, which we will explore, offers a very different perspective in demonstrating viral contagion and active infection. In addition, it is thought that it is not possible to distinguish between replicative and non-replicative microorganisms by PCR methods, and it is aimed to evaluate whether there is virus replication in the patient by using the viral antigen detection test. Since antigen test can also show viral infectivity, evaluating it together with subgenomic RNA will give an idea about the importance of antigen test.

Methods: 109 patient samples with positive results sent to Çanakkale Onsekiz Mart University Medical Microbiology Laboratory for SARS-COV-2 PCR detection and stored at -80 °C were included in the study. E gene PCR was performed on these samples to confirm their PCR positivity. Antigen testing, E and N sgRNA qPCR detection were performed.

Findings: Of 109 SARS-COV-2 PCR positive samples, 83 (76.14%) antigen testing, 88 (80.73%) E gene sgRNA, 96 (88.07%) N gene sgRNA, 97 (89%) at least one sgRNA positive was detected. The antigen test was found to be positive in 77.3% of the samples in which at least one sgRNA was detected and in 66.7% of the negative samples, and this difference was not statistically significant ($p=0.475$). The difference between E sgRNA and antigen test positivity was significant ($p=0.023$). N sgRNA was positive in 98.9% of E sgRNA positive samples and 42.9% of negative samples, and this difference was statistically significant ($p=0.0001$). The antigen test positivity rate was found to be 98.15% (53/54) for Ct value ≤ 25 , 57.14% (12/21) for Ct 25-30, and 52.94% (18/34) for Ct ≥ 30 . There was no significant difference between at least one sgRNA positivity and antigen test positivity for E gRNA Ct value ≤ 25 and >25 ($p=1.0$; $p=0.112$).

Result: The difference in antigen test positivity between E gRNA Ct value ≤ 25 and >25 , ≤ 29 and >29 , <30 and ≥ 30 was statistically significant ($p=0.0001$). Antigen test positivity was found to be associated with viral load, as expected. Since antigen test positivity is also a reflection of the presence of infectiousness, it has been shown that there may be a relationship between viral load and infectiousness. However, since there is no significant difference between antigen test and subgenomic RNA positivity, antigen test may also be an important indicator for detecting infectiousness. Further and large-scale studies (eg NGS, supporting results with viral culture) seem necessary to demonstrate that sgRNAs can be used as markers of infectiousness. Further studies based on subgenomic RNA may shorten the length of hospital stay and

social isolation. The positivity rate of antigen test and sgRNAs seems to be similar, in this respect, antigen tests may be suitable for evaluating infectivity.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, PCR, subgenomic RNA, antigen test



İÇİNDEKİLER

İç Kapak	i
Teşekkür	iii
Özet	iv
Abstract	vi
İçindekiler	ix
Kısaltmalar ve Simgeler	xi
Şekiller	xiv
Tablolar	xv
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	4
2.1. Koronavirüsler	4
2.1.1. Başlıca Proteinler	5
2.2. SARS-CoV-2 (COVID-19 virüsü)	7
2.2.1. Patogenez	7
2.2.2. Viral Yük ve Bulaştırıcılık	8
2.2.3. Bağışıklık Yanıtı ve İmmünite	9
2.2.4. Genomik Özellikler	9
2.2.5. Yaşam Döngüsü ve Replikasyon	11
2.3. Replikasyon ve Transkripsiyonda Subgenomik RNA (sgRNA), Lider Dizi Kavramları ve Koronavirüslerdeki Yeri	13
2.4. sgRNA'ların Sentezi ve Subselüler Yerleşimi	22
2.5. sgRNA'ların Ekspresyon ve Tespiti	22
2.6. Klinik ve Araştırmalarda sgRNA'ların Yararları	25
2.7. sgRNA'ların Analiz Yöntemleri	27
2.8. SARS-CoV-2'de Antijen Testinin Yeri	31
2.9. SARS-CoV-2'de Gerçek Zamanlı RT-PCR'nin (qPCR) Yeri	34
2.10. SARS-CoV-2'de Diğer Saptama Yöntemlerinin Yeri	37
2.11. Subgenomik RNA Tespitinde Farklı Yaklaşımlar	40

2.12. COVID-19 Erişkin Hasta Yönetiminde Tedavi Açısından Sınıflama	43
2.12.1. Komplike Olmamış Hasta	43
2.12.2. Hafif-Orta Seyirli pnömoni	44
2.12.3. Ağır Pnömoni	44
2.12.4 Yoğun Bakım İhtiyacı Açısından Değerlendirilmesi Gereken Hastalar	44
Gereç ve Yöntem	46
3.1. Araştırmanın Uygulanışı	46
3.2. İzolasyon/Ekstraksiyon	48
3.3. Mastermiks	49
3.4. Antijen Testi	54
3.4.1. Prosedür ve Metod	55
3.4.2. Sonuçların Yorumlanması	55
3.5. İstatiksel Analiz	57
Bulgular	58
Tartışma	69
Sonuç ve Öneriler	91
Kaynaklar	93

KISALTMALAR VE SİMGELER

SARS	: Severe Acute Respiratory Syndrome
MERS	: Middle East Respiratory Syndrome
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
nCoV	: New Coronavirus
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı-19
PCR	: Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
SARS-CoV-2	: Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2
RNA	: Ribonükleik asit
gRNA	: Genomik RNA
sgRNA	: Subgenomik RNA
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ORF	: Open Reading Frame
TMPRSS2	: Tip 2 Transmembran Serin Proteaz
ACE-2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim-2
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
ARDS	: Acute Respiratory Distress Syndrome
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
TNF	: Tumor Nekroz Faktörü
TGF	: Transforming Growth Factor
CCL	: C-C Motif Chemokine Ligand 2
APC	: Antigen-Presenting Cell
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi
Ig	: İmmüoglobulin
pp	: Polipeptit
HLA	: Human Leucocyte Antigen
nsp	: Nonstructural Protein

3CLpro	: 3-Kimotripsin Benzeri Proteaz
PLpro	: Papain Benzeri Proteaz
RTC	: Replikasyon-Transkripsiyon Kompleksi
ER	: Endoplazmik Retikulum
Mpro	: Ana Proteaz
ERGIC	: ER-Golgi Ara Bölmesi
RdRP	: RNA Bağımlı RNA Polimeraz
TRS	: Transkripsiyon Düzenleyici Dizi
L	: Lider
UTR	: Untranslated Region
DNB-seq	: DNA Nanotop Dizilimi
DRS	: Doğrudan RNA Dizilimi
qPCR	: Gerçek Zamanlı RT-PCR
TGEV	: Transmissible Gastroenteritis Virus
ddPCR	: Droplet Digital PCR
NHP	: Non Human Primate
mAb	: Monoklonal Antikor
HPV	: Human Papilloma Virus
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
VOC	: Viral Variants of Concern
RDT	: Rapid Diagnostic Tests
Ct	: Döngü Eşiği
FIA	: Fluorescent Immunoassay
IA	: Immunoassay
LAMP	: Loop Mediated Isothermal Amplification
PoCT	: Point of Care Test
CRISPR	: Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
RNaz	: Ribonükleaz
AgT	: Antijen Testi
RBD	: Receptor Binding Domain

PaO₂	: Partial Pressure of Oxygen
Fio₂	: Fraction of Inspired Oxygen
SpO₂	: Peripheral Blood Oxygen Saturation
DeSCo	: Detection of Smaller Co-terminal RNA
BP	: Bloke Edici Primer
cDNA	: Komplementer DNA
FP	: Forward Primer
RP	: Reverse Primer
FCoV	: Kedi Koronavirüsü
PriProET	: Primer-Prob Enerji Transferi
P-sg-QPCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction Based on Primer-Probe Energy Transfer
DMV	: Double Membrane Vesicle
ÇOMÜ-BAP	: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SS	: Standart Sapma
NTR	: Non-Translated Region
LTR	: Long Target Region
ICC	: Integration with Cell Culture
log	: Logaritma
CE	: Conformité Européenné
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Koronavirüs yapısının üç boyutlu temsili görüntüsü	7
Şekil 2.2. SARS-CoV-2 genomik yapısı	10
Şekil 2.3. SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü, genomik ve subgenomik RNA yapılarının ortaya çıkışı, viral proteinlerin sentezi	12
Şekil 2.4. E gen subgenomik RNA'sının dizi analizi	14
Şekil 2.5. SARS-CoV-2 genom organizasyonunun, kanonik subgenomik mRNA'ların ve virion yapısının şematik sunumu	16
Şekil 2.6. SARS-CoV-2 genom organizasyonunun ve kanonik subgenomik mRNA'ların şematik gösterimi	18
Şekil 2.7. SARS-CoV-2 replikasyonu ve kesintili transkripsiyonun şematik gösterimi	18
Şekil 2.8. Koronavirüs transkripsiyonundaki önemli yapılar	19
Şekil 2.9. SARS-CoV-2 sgRNA rekombinasyon alanları	21
Şekil 2.10. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında viral yük dağılımı, klinik seyir ve qPCR testlerinin pozitifliği arasındaki ilişki	36
Şekil 2.11. Hastalık sürecinde semptomların başlangıç zamanına göre SARS-CoV-2 tanı testi sonuçlarının değişimi	38
Şekil 3.1. SARS-CoV-2 E gen PCR çalışması analiz örneği	53
Şekil 3.2. SARS-CoV-2 E sgRNA PCR çalışması analiz örneği	53
Şekil 3.3. SARS-CoV-2 N sgRNA PCR çalışması analiz örneği	54
Şekil 3.4. Solda negatif, sağda pozitif COVID-19 antijen testi sonucu	55
Şekil 3.5. Geçersiz COVID-19 antijen testi sonucu	56
Şekil 3.6. Çalışmaya alınan 10 hasta örneğinin antijen testi değerlendirmesi	56

TABLolar

Tablo 2.1. Avantaj ve dezavantajlarıyla sgRNA analiz yöntemleri özeti	30
Tablo 3.1. SARS-CoV-2 E gen PCR işlemi için kullanılan protokol, primer ve prob dizileri	50
Tablo 3.2. SARS-CoV-2 E gen PCR işlemi için her bir qPCR reaksiyonu bileşen bilgisi	50
Tablo 3.3. SARS-CoV-2 E gen, E ve N sgRNA için qPCR döngü bilgisi	50
Tablo 3.4. SARS-CoV-2 sgRNA PCR için kullanılan primer ve prob dizileri	51
Tablo 3.5. SARS-CoV-2 E ve N sgRNA için her bir qPCR reaksiyonu bileşen bilgisi	52
Tablo 4.1. SARS-CoV-2 PCR pozitif örneklerde araştırılan yöntemlerin pozitiflik sayısı ve yüzdeleri (n=109)	59
Tablo 4.2. SARS-CoV-2 E ve N sgRNA pozitifliğinin birbiriyle ilişkisini gösteren sayısal değerler	59
Tablo 4.3. SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	60
Tablo 4.4. SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	61
Tablo 4.5. SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	61
Tablo 4.6. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	62
Tablo 4.7. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	62
Tablo 4.8. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	63
Tablo 4.9. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	63
Tablo 4.10. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	64
Tablo 4.11. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler	64
Tablo 4.12. E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler	66
Tablo 4.13. E gRNA Ct değeri ≤ 29 ve > 29 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler	66
Tablo 4.14. E gRNA Ct değeri < 30 ve ≥ 30 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler	67

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koronavirüsler insanlarda ve hayvanlarda tespit edilebilen, soğuk algınlığı gibi basit bir enfeksiyondan, ağır solunum yetmezliği, Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS), Orta Doğu Solunum Sendromu (Middle East Respiratory Syndrome; MERS) gibi ciddi hastalıklara yol açabilen bir virüs ailesidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ; WHO) 31 Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, kas ağrısı gibi bulgularla seyreden sebebi bilinmeyen pnömoni vakaları bildirmiş, 7 Ocak 2020'de ise insanlarda önceden tespit edilmemiş yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) olduğu belirlenerek hastalığın adı COVID-19 (koronavirüs hastalığı-19) kabul edilmiştir (1). DSÖ tarafından 30 Ocak 2020'de COVID-19 salgını uluslararası boyutta halk sağlığı acil durumu ilan edilmiş, ardından 113 ülkede COVID-19 vakalarının görülmesiyle durumun ciddiyeti üzerine 11 Mart 2020'de pandemi ilan edilmiştir (2, 3).

SARS-CoV-2'nin (COVID-19) 11 Mart 2020 tarihi itibarıyla pandemi ilan edilmesiyle birlikte özellikle polimeraz zincirleme tepkimesi (Polymerase chain reaction; PCR) yöntemiyle SARS-CoV-2 tespiti önem kazandı ve hızla yaygınlaştı. Mevcut PCR yöntemleri ile virüs tespiti sadece virüsün RNA'sının varlığını saptamakta olup enfeksiyon yapabilen tam bir virion varlığının ayrımı yapılamamaktadır. PCR'de aranan virüs genomik RNA'sı (gRNA) pozitif kişilerin virüs bulaştırıcılığı açısından fikir sahibi olunamamaktadır. Virüslerin replikasyonları sırasında sentezlenen subgenomik RNA (sgRNA) tespiti sayesinde, virüsün enfeksiyon yapabilme kapasitesi ile bulunduğu dokudaki replikatif durumu ve bulaşıcılığı hakkında bilgi sahibi olunabileceği düşünülmektedir (4, 5)

Efektif olarak kullanılan SARS-CoV-2 tanı testleri hasta kontrolü ve salgın yönetiminde önemlidir (6). Viral enfeksiyonların tanısında genel olarak seroloji, moleküler yöntemler ve altın standart olarak virüs kültürü kullanılsa da biyogüvenlik riskinden dolayı SARS-CoV-2 tanısında virüs kültürü

önerilmemektedir. DSÖ kılavuzunda SARS-CoV-2 tanısını doğrulamada spesifik bir gen dizisini çoğaltan nükleik asit temelli PCR testi önerilmektedir (7). Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) SARS-CoV-2 tanısında referans standart test kabul edilmektedir (8).

Viral replikasyonu ve enfeksiyöziteyi belirlemede altın standart hücre kültürü gibi görülse de bunu rutin olarak gerçekleştirmek laboratuvar imkanları dahilinde pratik ve uygulanabilir değildir (4).

Viral sgRNA'lar çeşitli yapısal ve fonksiyonel proteinlerin sentezinden sorumlu genom altı parçacıklardır. SARS-CoV-2 genomu ve 'kanonikal' (genel olarak bilinip kabul edilen, otoritelerce doğrulanmış) dokuz subgenomik RNA'ya ek olarak, füzyon, silme ve/veya çerçeve kaydırma ile bilinmeyen açık okuma çerçevelerini (open reading frame; ORF) kodlayan 'kanonikal olmayan' transkriptler üretir. Subgenomik RNA'lar virüs genomundan sürekli olmayan transkripsiyon yoluyla sentezlenirler. Bu sayede gRNA'daki lider diziyeye eklenerek gRNA'dan daha kısa, lider dizi ile yakınlaşmış, fonksiyonel sgRNA'lar elde edilmiş olur (5). Replikasyon ile çoğaltılan SARS-CoV-2 genomik RNA'ları buldukları hücrede paketlenerek diğer hücreleri enfekte etmek üzere hücre dışına çıkarken, sadece viral replikasyon sürecinde ortaya çıkan ve üretildiği hücrede kalıp diğer hücrelere aktarılmayan viral sgRNA bu sebepten ötürü bulaşıcılık göstergesi olabilecektir.

Subgenomik RNA tespitine dayalı bir PCR yöntemi kullanarak hem çeşitli sgRNA'ların aynı andaki tespitini kıyaslamak, hem de bu sgRNA'ların pozitifliklerinde hastaların klinik durumlarını göz önüne alarak bir fikir sahibi olmak mümkün olabilir. Subgenomik RNA tespitiyle karantina süresinden tedavi sürecine, hastanın olası klinik gidişine varan öngörüler vermek mümkün olabilir. Farklı sgRNA'ların pozitiflik saptama oranları arasında farklılık olabileceği, bunun da eksprese edilen protein miktarından, dolayısıyla değişken sgRNA miktarlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

COVID-19 tanısında mevcut referans yöntem PCR testidir. Bu yöntem ile virüsün genomik RNA'sı çoğaltılarak tespit edilebilir hale getirilir. Böylece SARS-CoV-2 varlığı belirlenmiş olur. Bu tezin amacı PCR yöntemi kullanılarak genomik RNA yerine subgenomik RNA tespiti edilebileceğini göstermek, bu tespitinin klinik önemini irdelemektir. Ayrıca SARS-CoV-2 antijen testi de kullanılarak sgRNA pozitifliği arasındaki ilişki değerlendirilecektir.

Hücre kültürü esasına dayanan sitopatolojiyi incelemek, replikasyonu göstermek açısından altın standart görünse de her hastada veya her merkezde sürekli uygulanabilir değildir. Araştıracığımız bu yöntem viral bulaşıcılığı ve aktif enfeksiyonu göstermede farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Ayrıca genom tepisine yönelik PCR yöntemleriyle replikasyon yeteneği olan mikroorganizma ayırımı yapılamayacağı düşünülmekte olup, viral antijen saptama testi de kullanılarak hastada antijen proteinlerinin sentezlendiği virüs replikasyonu olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Antijen testinin de viral bulaşıcılığı gösterebileceği için bunun sgRNA ile birlikte değerlendirilmesi, antijen testinin önemi hakkında fikir verebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüsler

Koronavirüsler, iki boyutlu transmisyon elektron mikroskobu altında incelendiğinde viral partiküllerin taç şeklinde görülmesinden dolayı Latince “taç” anlamına gelen “corona” adını almıştır (9). *Nidovirales* takımının *Coronaviridae* ailesinde yer alan koronavirüsler dört cins (Alfakoronavirüs, Betakoronavirüs, Gamakoronavirüs ve Deltakoronavirüs) ve çok sayıda alt cins içeren *Orthocoronaviridae* alt ailesindedir. Bunlardan alfakoronavirüs ve betakoronavirüs cinsinin insanları enfekte ettiği bilinir. Betakoronavirüs cinsi kendi içerisinde 5 alt cinse ayrılır. SARS-CoV-2 tipik bir koronavirüs ailesi üyesi olarak betakoronavirüsler ile benzer genoma sahiptir (1).

Koronavirüsler tek sarmallı, pozitif zincirli, zarflı ve 26-32 kilobaz (kb) arasında değişen büyüklükleriyle (SARS-CoV-2 29891-29903 nükleotit uzunlukta) RNA virüsleri içinde bilinen en büyük genoma sahiptir. Genomları büyük olduğundan, replikasyon esnasında konak hücreye bağımlılıkları görece azdır (10).

Koronavirüsler, insan dışında sığır, at, domuz, kedi, köpek, hindi, sıçan ve fare gibi pek çok hayvanda da enfeksiyona neden olabilmektedir. *Coronaviridae* ailesine ait çoğu virüsün varlığı yaklaşık 50 yıldır bilinmektedir. Geçmişte sıklıkla soğuk algınlığıyla ilişkilendirilmesine karşın 2002-2003 yılları arasında SARS ile öncekilerden farklı bir koronavirüsün ortaya çıkmasıyla koronavirüslere ilgi artmış ve bu yöndeki çalışmalar hızlanmıştır. Koronavirüslerin soğuk algınlığı dışında ciddi hastalıklara neden olabileceği görülmüştür. SARS'e ek olarak 2012'de ortaya çıkan MERS ile birlikte koronavirüslerinden hayvandan insana ve insandan insana geçebildiği tespit edilmiştir (11).

Koronavirüslerin yapısında bulunan lipid çift tabakalı zarf, zarf proteinleri ve nükleokapsit, konakçı hücrenin dışarısında virüsü korur ve çevreler. Membran (M), Zarf (E; envelope) ve çıkıntı (S; spike) gibi çeşitli yapısal proteinler virüs zarfıyla ilişkilidir. S proteini konakçı hücrelerle etkileşimde görevliken, E ve M proteini viral zarfı şekillendiren ve boyutunu koruyan yapısal proteinlerdir (12-14). Ayrıca bazı koronavirüslerde, o virüse özgü hemaglütinin esterase (HE) proteini, 3 a/b proteini, 4 a/b proteini gibi çeşitli yapısal ve aksesuar proteinler kodlanır (Şekil 2.1) (15).

Gevşek haliyle sarmal olarak bulunan ancak virüs parçacığında küresel görünen bir nükleokapsit içine kaplanmış genomu, konakçıdan kazanılan zarf çevreler. Viral RNA replikasyonu konakçı sitoplazmasında, RNA polimerazın bir lider diziye bağlandığı ve sonra pek çok yerde ayrılıp tekrar bağlandığı, ortak uçlara sahip iç içe bir mRNA molekül kümesinin üretilmesine izin veren bir mekanizmayla gerçekleşir (16).

2.1.1. Başlıca Proteinler

Spike (S; çıkıntı) proteini: Virüs yüzeyinde, zarfın üstünde bulunan, virüse “corona” adının verilme sebebi olan çıkıntılar olup yoğun şekilde glikolizohomotrimerler oluştururlar (11). Glikoprotein yapıda olup reseptöre bağlanan S1 alt birimi ve S2 membran füzyon alt biriminden oluşur. Reseptöre bağlanma ve membran füzyonunda ilk ve en önemli basamaktır. Doku tropizmi ve konak seçiminde de görevli olan bu protein antiviral peptitlerin ve nötralizan antikorların ana hedefidir (17, 18).

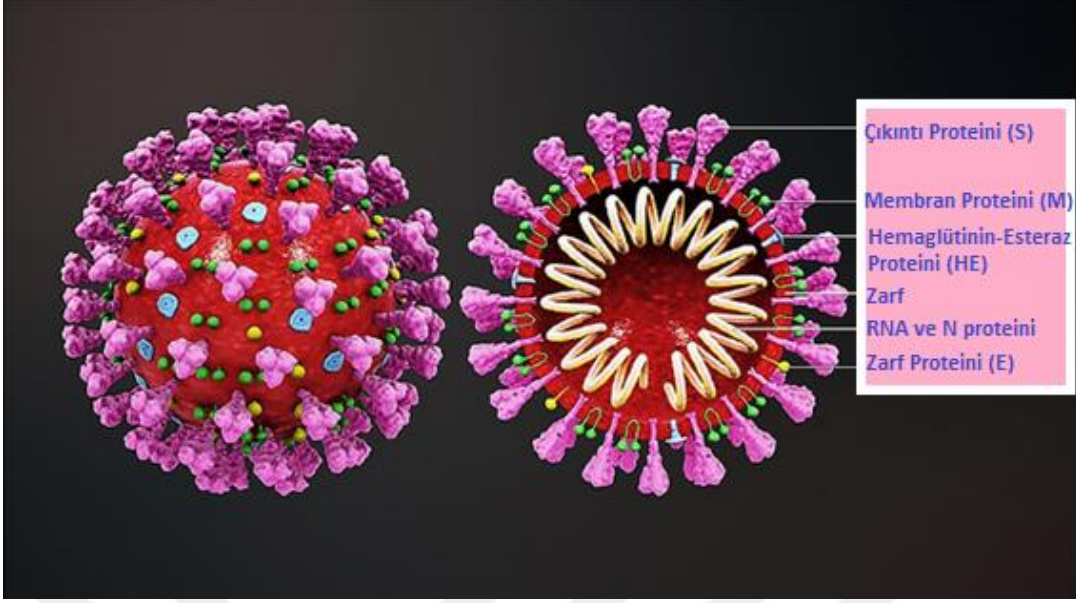
Membran (M) proteini: Viral zarfın şekillenmesinde önemlidir. Virüs parçacıkları üzerinde en çok bulunan yapısal proteindir. Virüsün salınımını ve diğer yapısal proteinlerle olan ilişkilerini yönetmede, hücre içi dengenin sağlanmasında görevlidir. Nükleokapsit proteinini stabilize ederek nükleokapsit-RNA kompleksi oluşumunda önemlidir. Konak hücrenin virüs tarafından

duyarlı hale gelmesinde bu protein önemlidir, Toll-like reseptör bağımlı mekanizma ile İnterferon beta (IFN-beta) yolağının aktive edilmesini sağlar (19).

Zarf (E; Envelope) proteini: Major yapısal proteinlerden en küçük olanıdır. Replikasyon esnasında enfekte hücreden büyük miktarda ekprese edilir ancak zarfa çok az bir kısmı katılır. Proteinin önemli bir kısmı hücre içi kısımda olup, virüs parçalarının bir araya getirilmesi, matürasyon ve tomurcuklanarak hücreden ayrılmasında rol alır. E proteininin eksik olduğu rekombinantkoronavirüslerde viral yükte düşüklük, matürasyon ve yeni virüs oluşumunda yetersizlik gözlenmiştir (19).

Nükleokapsit (N) proteini: Viral RNA transkripsiyonu ve replikasyonunda görevli bir RNA bağlayıcı proteindir. Virüsle enfekte hücrede en fazla bulunan protein olup virüs RNA'sı paketlenirken sarmal ribonükleoproteinlerin oluşturulması, viral RNA sentezinin düzenlenmesi ve enfekte hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli işlevleri vardır. N proteini yüksek düzeyde immünojeniktir ve enfeksiyon esnasında çok miktarda sentezlenir. Ayrıca viralreplikasyon sırasında konak hücreden interferon (IFN) sentez ve salınımı inhibe eder (20, 21).

Hemaglütinin Esteraz (HE) proteini: Zarf üzerindedir, daha spesifik olarak beta koronavirüslerde -dolayısıyla SARS-CoV-2'de de- bulunur. Virüsün sialik asit içeren reseptörlere tutunmasını sağlar (11).



Şekil 2.1. Koronavirüs yapısının üç boyutlu temsili görüntüsü.

Kaynak: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:3D_medical_animation_coronavirus_structure.jpg.

2.2.SARS-CoV-2 (COVID-19 virüsü)

2.2.1.Patogenez

Virüsün konakçı hücredeki döngüsü bağlanma, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve salınım olmak üzere beş adımdan oluşur. Öncelikle SARS-CoV-2 konakçı hücreye bağlanır, ardından proteazlar aracılığıyla S proteinleri aktive olur (22). Konak hücredeki Tip 2 transmembran serin proteaz (TMPRSS2), anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (Angiotensin converting enzyme 2; ACE-2) reseptörünü yarıp S proteinini aktifleştirerek virüsün konak hücreye girişini sağlar (23). Sonraki biyosentez aşamasında virüs replikasyon amacıyla konakçı nükleusuna geçer, virüs mRNA'sı (subgenomik RNA) çeşitli proteinlerin sentezi için kullanılır (24).

Pek çok solunum yolu virüsünde olduğu gibi SARS-CoV-2'de, T lenfositleri enfekte ederek ağır lenfopeni tablosu oluşturabilir. Doğal ve

kazanılmış immün yanıt aracılığıyla lenfopoez bozulup lenfosit apoptozisi artabilir (25, 26).

Enfeksiyon ilerleyip virüs replikasyonu hızlandığında, epitelyum-endotelyal bariyer bütünlüğü tehdit altına girer. Epitel hücrelerine ek olarak pulmoner kapiller endoteli hücrelerinin de enfekte olmasıyla inflamatuvar yanıt tetiklenir ve monositler ile nötrofillerin akışı uyarılır. İnterstisyel mononükleer inflamatuvar infiltrasyonlar, ödem, endotel bariyer hasarı, alveoler-kapiller oksijen tanışımasında bozukluk ve oksijen difüzyon kapasitesinde azalma gelişir (27).

Akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome; ARDS); SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV için temel immünopatojenik olaydır. Bağışıklık hücrelerinden salınan proinflamatuvar sitokinlerin (IFN-alfa, IFN-gama, IL-1beta, IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF-alfa, TGF-beta gibi) ve kemokinlerin (CCL2,CCL3, CCL5, CCL8, CCL9, CCL10 gibi) salınımıyla sitokin fırtınası denilen ölümcül, kontrolsüz sistemik bir inflamatuvar yanıt durumu ortaya çıkabilir. Bunun sonucunda ARDS ve çoklu organ yetmezliğine giden şiddetli bir sürece girilir ve ölüm gerçekleşebilir (28).

2.2.2. Viral Yük ve Bulaştırıcılık

SARS-COV-2'nin bulaştırıcılık süresi net olarak bilinmemekte ancak semptomatik dönemden 1-2 gün önce başlayıp semptomların kaybolmasıyla sona erdiği tahmin edilmektedir. Bulaşta en çok üzerinde durulan konulardan birisi viral yüküdür. Bir çalışmada, semptom başladıktan hemen sonra hastalardaki viral yükün arttığı gösterilmiştir. Asemptomatik hastalarda, viral yük çok nadir olarak semptomatik hastalarinkine benzemektedir (29).

Boğaz sürüntülerinde viral yük, semptomların ortaya çıkışıyla en yüksek değere ulaşır ilk 7 günde hızla düşer, bu durum ikinci haftaya da uzayabilir. Posterior farinks örneklerinde de benzer tablo görülmekte, virüs temizlenme

süresi semptom sonrası ilk 10 günde gerçekleşirken, ağır vakalarda uzamakta, nazofaringeal sürüntü ve dışkı örneklerinde ise bu süre uzamakta ve bir aydan fazla bir süreye ulaşabilmektedir. Viral yük, hastalığın şiddeti ve prognoz açısından önemli bir parametredir. Ağır olgularda hafif olgulara göre 60 kattan fazla viral yük olduğu gösterilmiştir (1).

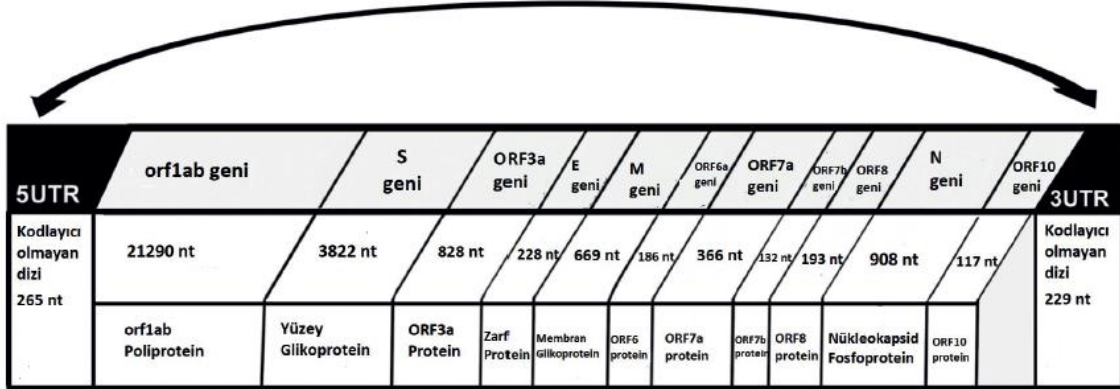
2.2.3. Bağışıklık Yanıtı ve İmmünite

Viral antijenler ilk olarak antijen sunan hücreler (APC; antigen-presenting cell) aracılığıyla sunulur. Major histokompatibilite kompleksi (MHC) veya insanlarda insan lökosit antijeni (Human Leucocyte Antigen; HLA) aracılığıyla sunulan antijenik peptitler, virüse özgül sitotoksik T lenfositler tarafından tanınır. Başlıca MHC I molekülleriyle olmak üzere MHC II de antijen sunumunda görev alır. Sonuçta virüse özgül hümmoral ve hücrel bağışıklık yanıtı uyarılmış olur (30). Diğer virüs enfeksiyonlarındaki gibi SARS-COV-2'ye karşı IgM ve IgG yanıtı oluşur. IgM antikoru enfeksiyonun 7-21. gününde, IgG'de ise 14. günde tespit edilmeye başlanır. IgG tipi antikoru S ve N antijenlerine karşı oluşur ve uzun süre sentezlendiği çalışmalarda gösterilmiştir (31).

2.2.4. Genomik Özellikler

SARS-CoV-2'nin tam genomik uzunluğu 29891-29903 nükleotiddir (Şekil 2.2). 5' ucunda ORF 1a/b ile kodlanan 16 adet yapısal olmayan protein (nonstructural proteins; nsp) ve 3' ucunda başka ORF'lerden kodlanan dört adet yapısal protein (S, M, N, E) kodlayan bölge bulunur. Yapısal olmayan proteinlerin büyük bir kısmının virüs replikasyonundaki görevi tanımlanmıştır (11, 32, 33).

SARS-CoV-2 Tüm Genom (29903 nükleotid)



Şekil 2.2. SARS-CoV-2 genomik yapısı. Şekil Khailany ve ark.'ndan alınmıştır (42).

Esas olarak ORF 1a/b bölgesi olarak adlandırılan viral 30 kb RNA genomunun ilk üçte ikisi, iki polipeptide (pp1a ve pp1ab) dönüşür ve yapısal olmayan proteinlerin çoğunu kodlar. Virüs genomunun geri kalan kısımları da; yardımcı proteinleri ve spike (S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsit (N) proteini de dahil olmak üzere dört temel yapısal proteini kodlar. Koronavirüs enfeksiyonlarını tedavi etmek için geliştirilen mevcut antiviral ilaçlar öncelikle S proteinini, 3C benzeri proteazı (3CLpro) ve papain benzeri proteazı (PLpro) hedef alır. Fakat antiviral proteaz inhibitörleri, hücresel homolog proteaz üzerinde spesifik olmayan bir şekilde etki ederek konakçı hücre toksisitesine ve ciddi yan etkilere neden olabilir. Ayrıca S proteininde mutasyon olan virüsler, farklı konak hücre reseptör bağlanma modelleriyle hedeflenen terapötikten kaçmaya eğilimlidir. Bu nedenle, bu yeni koronavirüs SARS-CoV-2'nin neden olduğu akut solunum yolu enfeksiyonlarıyla mücadele etmek için yeni antiviral stratejiler gereklidir (20, 34).

Dört yapısal protein olan S, M, E ve N proteinleri; koronavirüsün dış yapısını oluşturarak, içerdeki RNA'yı korur. Ayrıca viryonun paketlenmesi ve koronavirüsün enfeksiyonu başlatması için gereklidirler. Viral replikasyonda görev alan yapısal olmayan proteinlerin ise; konakçı proteinlerini post-translasyonel modifikasyona uğratarak konağın bağışıklık sisteminin

baskılanması (nsp3), RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi (nsp12) ve ekzoribonükleaz aktivitesi (nsp14) gibi işlevleri vardır (21).

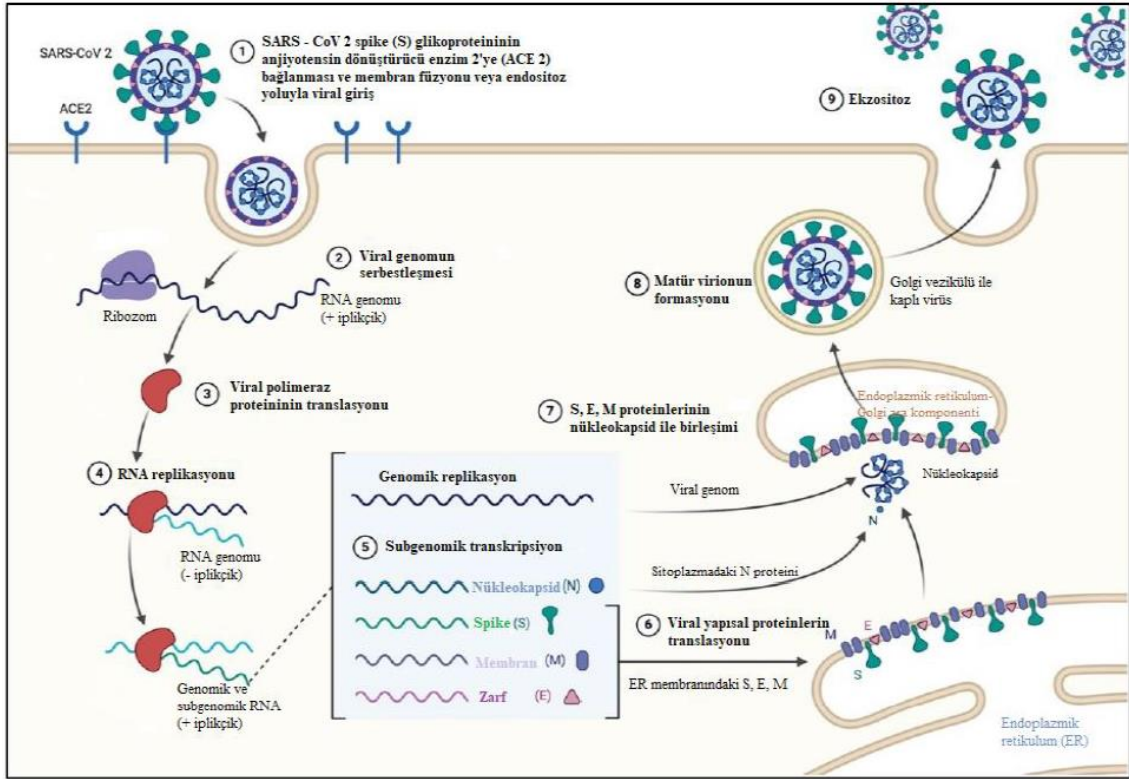
2.2.5. Yaşam Döngüsü ve Replikasyon

SARS-CoV-2 esas olarak kirpikli bronşial epitel hücrelerini ve tip II pnömositleri enfekte edip yüzey reseptörü olan ACE-2'ye, kendi yüzeyinde bulunan S glikoprotein ile bağlanır. Ardından viral zarfın konakçı hücre zarı ile doğrudan füzyonu veya endozomlar yoluyla genomunu konakçı hücreye enjekte eder. Sonra viral gRNA kaplanmaz ve konakçı hücre sitoplazmasına salınır, ardından konaktaki ribozomlar tarafından translasyon işlemi gerçekleştirilir (35-36).

S glikoproteini S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. S1, konakçı özgüllüğünü ve hücresel tropizmi belirleyerek hedef hücrelere bağlanmayı kolaylaştırır. S2, viral ve hücresel membranların füzyonuna aracılık ederek, endositoz yoluyla viral girişi sağlar. S glikoproteini ACE-2'ye bağlandığında, hücre yüzeyiyle ilişkili TMPRSS2 ve katepsin molekülleri, trimer S proteininin bölünmesini başlatır (23). SARS-CoV-2'nin S glikoproteini ile ACE-2 bağlanma etkinliği arasındaki afinitenin SARS-CoV'dan 10-20 kat daha yüksek olduğunu gösteren bir çalışma mevcuttur (37, 38).

Virüsün S glikoproteinleri, ACE-2'ye bağlandıktan sonra virüs endozomal yol ile hedef hücrelere girer. Ardından viral RNA sitoplazmada açığa çıkar. ORF1a ve ORF1ab, replikasyon-transkripsiyon kompleksinin (replication-transcription complex; RTC) proteazları tarafından parçalanan pp1a ve pp1ab poliproteinlerini üretmek için translasyona katılır. Replikasyon sırasında RTC, genomun (-) iplikçikli RNA kopyalarını üretir ve bu kopyalar (+) iplikçikli RNA genomları için kalıp olarak kullanılır. Transkripsiyon sırasında, sürekli olmayan bir transkripsiyon şeklinde iç içe geçmiş bir alt genomik RNA (sgRNA) seti üretilir. Bu sgRNA'lar birkaç açık okuma çerçevesine (ORF'ler) sahip olabilmesine rağmen, sadece en yakın ORF (5' ucuna) çevrilir. SARS-CoV-2

yapısal proteinlerinin üretimini takiben nükleokapsitler sitoplazmada toplanır ve ardından endoplazmik retikulum (ER) - golgi ara bölmesinin lümenine tomurcuklanır. Ardından virionlar enfekte olmuş hücreden ekzositoz yoluyla salınır (Şekil 2.3) (39).



Şekil 2.3. SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü, genomik ve subgenomik RNA yapılarının ortaya çıkışı, viral proteinlerin sentezi. Şekil Cascella ve ark.'ndan alınmıştır (39).

Yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin kodlanacağı RNA eldesi, ORF'ler arasında yerleşmiş olan transkripsiyon düzenleyici sekanslardan sağlanır. Tipik bir koronavirüsün genomu ve alt genomları en az altı ORF içerir. İlk ORF'ler (ORF 1a/b), tüm genom uzunluğunun yaklaşık olarak üçte ikisini oluşturur ve 16 adet yapısal olmayan protein bu şekilde kodlanır (nsp1-16). ORF 1a ve ORF 1b arasında transkripsiyon sonucu üretilen iki polipeptit olan pp1a ve pp1ab; virüsün kodladığı kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro) veya ana proteaz (Mpro) tarafından proteolizle yapısal olmayan proteinler olan nsp1-16'ya dönüştürülür.

Diğer faktörlerle beraber bazı nsp proteinleri (nsp2-16), enfekte olmuş konakçı hücre içinde RTC'yi oluşturmak için birleşir. nsp2-11 destekleyici rol oynarken nsp12-16 RTC içinde viral genom replikasyonu/ transkripsiyonu için enzimatik rol alır. RNA (+) sarmalı önce RNA (-) sarmalına replike olur ve daha sonra bu negatif iplik, ya yeni viryonun oluşturulması için RNA (+) sarmalının replikasyonunun yapılmasında ya da sgRNA'ların transkripsiyonu için kullanılır. Genomun kalan üçte birini oluşturan diğer ORF bölgelerinden kodlanan sgRNA'lar yapısal proteinlerden spike-çıkıntı (S), membran (M), envelope-zarf (E) ve nükleokapsit (N) proteinleri olmak üzere en az 4 proteine ve yardımcı proteinlere dönüştürülür. S, M ve E proteinleri endoplazmik retikuluma (ER) girer ve N proteini, nükleoprotein kompleksi üretmek için genomik RNA (+) sarmalına bağlanır. Nükleoprotein kompleksi ve yapısal proteinler; viryonların birleştirildiği, olgunlaştığı ve küçük veziküller şeklinde Golgi'den tomurcuklandığı ER-Golgi ara bölmesine (ERGIC) taşınır. Ardından bu veziküller, ekzositozoluyla hücre dışı bölgeye salındıkları konak hücre zarına giderler. Salınan virüsler, hastalığın ilerlemesine yol açan yeni bir hücresetini enfekte ederler (11, 40).

SARS-CoV-2 RNA genomu, 16 adet nsp'yi ve spike(S), zarf (E), membran (M), ORF 6, ORF 3a, ORF 7a, ORF 7b, ORF 8, nükleokapsit (N) ve ORF 10'u içeren en az 10 adet yapısal protein kodlamaktadır (41).

2.3. Replikasyon ve Transkripsiyonda Subgenomik RNA (sgRNA), Lider Dizi Kavramları ve Koronavirüslerdeki Yeri

SARS-CoV-2 genomu, kalıp olarak kullanılarak viral poliproteinlerin translasyonunda mRNA işlevi yürütür. Böylece yapısal ve yapısal olmayan proteinler kodlanır. Önce genomik RNA'dan pp1a/pp1ab sentezi yapılır. Bu proteinler de nsp'leri kodlayarak replikasyon transkripsiyon kompleksini (RTK) oluşturur. Sonra, iç içe geçmiş bir dizi sgRNA, RTK tarafından kesintili (aralıklı) transkripsiyon tarzında sentezlenir (Şekil 2.4). Transkripsiyonun sonlandırılması ve daha sonra yapısal proteinleri kodlayan RNA'nın eldesi, ORF'ler arasında

yer alan transkripsiyon düzenleyici sekanslarda meydana gelir. Bu negatif iplikçikli sgRNA'lar, pozitif iplikçikli sgRNA'ların üretimi için kalıp işlevi görür. Tüm yapısal ve yardımcı proteinler koronavirüslerin sgRNA'larından translasyona uğrar (43).

Viral RNA replikasyonu, konakçı sitoplazmasında, RNA polimerazın bir lider sekansına bağlandığı ve daha sonra birçok yerde ayrılıp yeniden bağlandığı, ortak uçlara sahip iç içe bir mRNA molekülleri (sgRNA) kümesinin üretilmesine izin veren bir mekanizma ile gerçekleşir (44).



Şekil 2.4. E gen subgenomik RNA'sının dizi analizi. Lider dizi (mor), putatif transkripsiyon düzenleyici diziler (TRS) (gri) ve E geninin 5'-proksimal kısmını kodlayan nükleotitler (sarı kutu) gösterilmiştir. Şekil Wölfel ve ark.'ndan alınmıştır (45).

Koronavirüsler, tüm RNA virüs aileleri arasında en büyük genomları (26-32 kb) taşır. Her viral transkript, 5' kepli bir yapıya ve 3' poli(A) kuyruğa sahiptir. Hücre girişi üzerine, genomik RNA, ORF1a ve ORF1b'den nsp'ler üretmek üzere çevrilir. ORF1a, 11 nsp'ye bölünen pp1a (440–500 kDa) üretir. ORF1b'nin devamlı translasyonuna izin veren ribozom çerçeve kayması, ORF1a durdurma kodonunun hemen akış yukarısında meydana gelir. Bu da 15 nsp'ye ayrılan büyük bir polipeptit (pp1ab, 740-810 kDa) verir. Proteolitik bölünmeye, sırasıyla papain benzeri bir proteaz bölgesi ve 3C-benzeri bir proteaz bölgesi barındıran viral proteazlar nsp3 ve nsp5 aracılık eder (46).

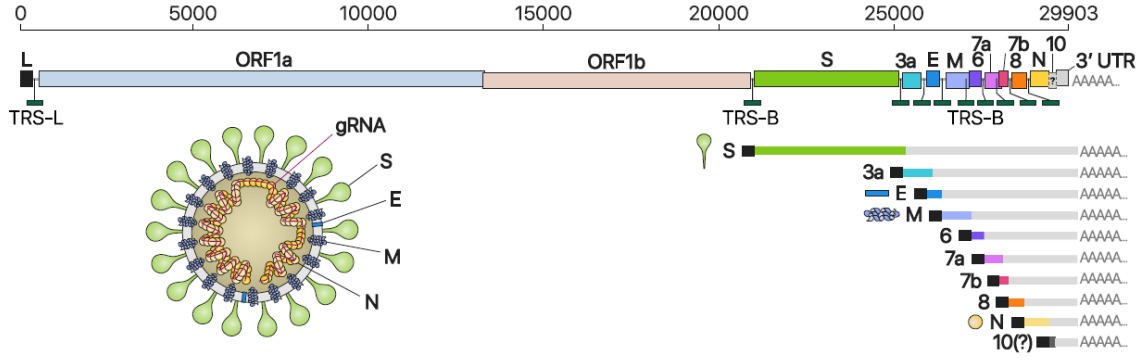
Viral genom ayrıca, RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRP) aktivitesini barındıran nsp12'nin aracılık ettiği replikasyon ve transkripsiyon için kalıp olarak

kullanılır. Negatif iplikçikli RNA ara ürünleri, pozitif iplikçikli gRNA ve sgRNA sentezi için kalıp olarak hizmet etmek üzere üretilir. Viryonları birleştirmek için gRNA yapısal proteinler tarafından paketlenir. Daha kısa sgRNA'lar, korunmuş yapısal proteinleri ve birkaç yardımcı proteini kodlar. SARS-CoV-2'nin mevcut verilere göre en az altı yardımcı proteine (3a, 6, 7a, 7b, 8 ve 10) sahip olduğu bilinmektedir (GenBank: NC_045512.2). Bu kompakt genomdan hangi aksesuar genlerin gerçekte ifade edildiği günümüzde belirsizdir (46).

Her koronaviral RNA, genomun akış aşağı (downstream) kısmından "body" (gövde) dizisine kaynaşmış yaklaşık 70 nükleotitlik (nt) ortak 5' "lider" diziyi içerir. Kabul edilen modele göre, lider-gövde füzyonu, ORF'lerin hemen bitişiğinde yer alan transkripsiyon düzenleyici diziler (TRS'ler) olarak adlandırılan kısa motiflerde negatif iplik sentezi sırasında meydana gelir. TRS'ler, değişken dizilerle çevrili, korunmuş bir 6-7 nt'lik çekirdek dizisi (CS) içerir. Negatif iplik sentezi sırasında, RdRP gövdedeki bir TRS'yi (TRS-B) geçtiğinde duraklar ve kalıbı lider dizideki (TRS-L) TRS'ye geçirir, bu da kesintili transkripsiyona yol açar. Birleştirilmiş negatif zincirli ara ürünlerden, pozitif zincirli mRNA'lar (sgRNA'lar) kopyalanır (Şekil 2.5) (46).

Replikasyon ve transkripsiyon mekanizması diğer koronavirüslerde incelenmiştir. Bununla birlikte, genel mekanizmanın SARS-CoV-2 için de geçerli olup olmadığı ve SARS-CoV-2 transkriptomunda bilinmeyen herhangi bir bileşen olup olmadığı belirsizdir. Teşhis ve tedavi araçlarının geliştirilmesi ve bu yeni virüsün anlaşılması için SARS-CoV-2 genomunun organizasyonunu tanımlamak kritik öneme sahiptir (46).

Diğer pozitif iplikli RNA virüslerinde olduğu gibi, koronavirüs genom replikasyonu, soy virüs genomlarının üretimi için kalıp olarak tam uzunlukta bir komplementer negatif iplikli RNA'yı kullanan sürekli bir sentez sürecidir (47).



Şekil 2.5. SARS-CoV-2 genom organizasyonunun, kanonik sgRNA'larının ve virion yapısının şematik sunumu: Bir mRNA olarak da hizmet eden tam uzunluktaki genomik RNA'dan (29,903 nt) ORF1a ve ORF1b çevrilir. Genomik RNA'ya ek olarak, dokuz sgRNA üretilir. Küçük yardımcı proteinleri temsil eden kutuların boyutları, daha iyi görselleştirme için ORF'nin gerçek boyutundan daha büyük olarak ifade edilmiştir. Siyah kutu lider dizisini göstermektedir. Şekil Kim ve ark.'ndan alınmıştır (46).

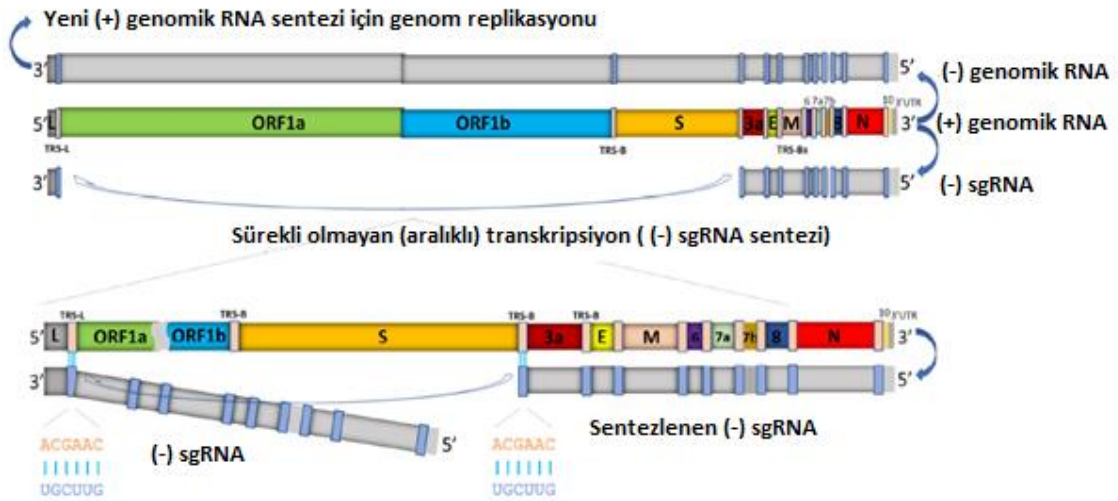
Replikasyonun aksine koronavirüs transkripsiyonu, sgRNA'ların üretimi sırasında sürekli olmayan bir adım içerir. Bilinen RNA virüsleri arasında benzersiz olan bu süreç, *Nidovirales* takımının bir özelliğidir ve nihayetinde virüs genomu ile 5' ve 3' ko-terminalli iç içe geçmiş bir sgRNA seti oluşturur. Bu sgRNA'ların tümü 5' ucunda, farklı koronavirüslerde 65 ile 98 nt arasında değişen uzunlukta ortak bir lider dizi içerir. Bu ortak lider dizi, genomun 5' ucunda yalnızca bir kez bulunur ki bu sgRNA'ların gövde olarak adlandırılan bitişik olmayan dizilerin, lider ve her mRNA kodlama dizisinin 5'ucunun füzyonuyla sentezlendiği anlamına gelir (Şekil 2.7, Şekil 2.8). Koronavirüslerdeki transkripsiyon mekanizması, dahili (internal) başlatma ve erken sonlandırma gibi diğer pozitif zincirli RNA virüslerindeki transkripsiyon mekanizmalarıyla karşılaştırıldığında karmaşık görünmektedir. Aslında, koronavirüs ve arterivirüs sgRNA'larının aksine, torovirüsler ve ronivirüsler gibi diğer *Nidovirales* üyelerinin subgenomik transkriptleri ortak bir 5' lider diziyeye sahip değildir. Bu durum, koronavirüs sgRNA'larında lider dizinin varlığının virüse herhangi bir seçici avantaj sağlayıp sağlamadığı sorusunu gündeme getirmektedir. 5' lider

sekansın varlığının, SARS-CoV mRNA'larını, kapaklı mRNA'ların nsp1 ile indüklenen endonükleolitik yarılmasından koruduğu ve enfeksiyon sırasında viral mRNA'ların ve proteinlerin etkin bir akümüasyonu için bir avantaj sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, lider dizinin tamamlayıcısı pozitif iplikli RNA sentezinin başlatılmasına katkıda bulunur ve negatif iplikli sgRNA'ları, pozitif iplikli sgRNA'ların daha fazla amplifikasyonu için bir kalıp haline getirir (47, 48).

Nidovirales takımındaki virüsler, pozitif polariteli gRNA için kalıp görevi gören negatif polariteli RNA ara ürünlerinin ve negatif iplikli RNA'nın sentezi sırasında kesintili transkripsiyondan üretilen bir dizi sgRNA'nın transkripsiyonu yoluyla çoğalır. 5' çevrilmeyen bölgede (untranslated region; UTR) lider dizinin sonunda yer alan TRS'ler ve genomun distal üçte birlik kısmındaki çeşitli genlerin akış yukarısında (upstream) yer alan 'gövde' TRS dizilerindeki kalıp değişimleri sayesinde 5' UTR lider dizisiyle 3' genlerden köken alan gövde dizisi içeren sgRNA'lar oluşmuş olur (49-52). Çoğu ORF (yani yapısal/aksesuar ORF'ler) için SARS-CoV-2 translasyonu ara ürünleri olarak sgRNA'lar aracılığıyla gerçekleştiğinden, bu sgRNA'ların kapsamlı bir şekilde tanımlanması viral proteinlerin, replikasyon mekanizmasının ve patojenite ile ilgili konak-viral etkileşimlerin araştırılması için bir gereklilik teşkil etmektedir. Genom ve proteinlerin üçte ikisi ORF1a/b'den çevrildiğinden, teknik olarak sgRNA'lar viral proteinlerin azınlığını oluşturur. (47, 53). Subgenomik RNA'ların konak hücre translasyon süreçlerini modüle ettiği gösterilmiş ve subgenomik transkripsiyonun, patogeneizde yer alan viral yapısal proteinlerin ve proteinlerin ekspresyonunda varyasyona izin verebileceği öne sürülmüştür (47, 54). Subgenomik RNA'ların viral evrimde rol oynama ihtimali vardır, çünkü kalıp değiştirme, koronavirüslerde gözlemlendiği gibi yüksek oranda rekombinasyona neden olabilir (Şekil 2.6, Şekil 2.7) (55, 56).

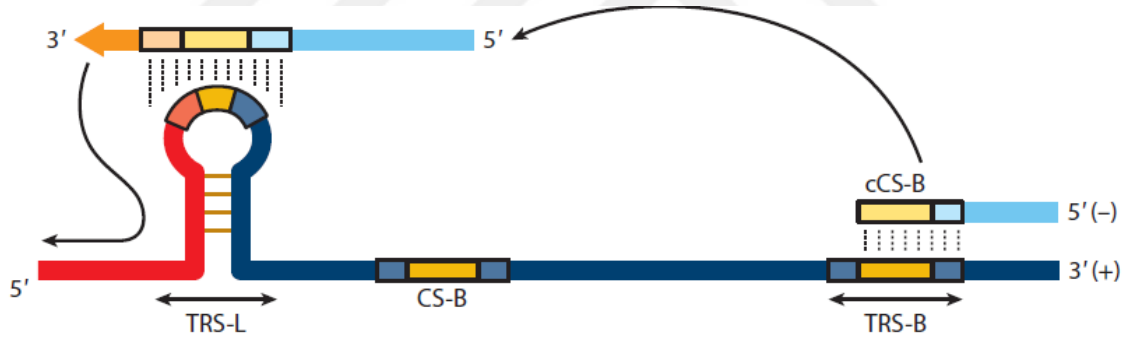


Şekil 2.6. SARS-CoV-2 genom organizasyonunun ve kanonik subgenomik RNA'ların şematik gösterimi: Genom, toplam 16 yapısal olmayan proteini (nsp1-nsp16) (birincil translasyon) kodlayan iki büyük gen, ORF1a ve ORF1b içerir. Yapısal proteinleri kodlayan yapısal genler arasında sırasıyla spike (S), envelope (E), membran (M) ve nükleokapsite (N) ek olarak birkaç küçük yardımcı proteini kodlayan genler bulunur (3a, 6, 7a, 7b, 8 ve 10). Sağ altta 10 kanonik subgenomik mRNA gösterilmiştir. Şekil Kim ve ark.'ndan alınmıştır (46).



Şekil 2.7. SARS-CoV-2 replikasyonu ve kesintili transkripsiyonun şematik gösterimi: Tam uzunluktaki (+) genomik RNA, genom replikasyonunu sağlayan

(-) gRNA'nın üretilmesi için bir şablon olarak hizmet etmenin yanı sıra, yapısal ve yardımcı proteinleri kodlayan (+) sgRNA'ları sentezleyen (-) sgRNA'ları üretmek için bir kalıp görevi görür. Sentezlenen (-) sgRNA, bir gövde transkripsiyon düzenleyici dizisinden lider TRS'ye bir kalıp değişimini (TRS-L, genomun 5' ucuna yaklaşık 70 nükleotit yakınlıkta) içerir. Lider-gövde füzyonuna yol açan bu kesintili transkripsiyon işlemi, herhangi bir TRS-B'de meydana gelebilir ve sonunda karakteristik bir iç içe geçmiş (+) sgRNA kümesinin sentezi ile sonuçlanır. SARS-CoV-2 sgRNA'ları yapısal olarak polisistroniktir, ancak işlevsel olarak monosistronik oldukları varsayılır, çünkü her sgRNA'da bir sonraki daha küçük sgRNA'da bulunmayan yalnızca ilk ORF çevrilir (57, 58). Sol altta ve orta altta tasvir edilen, lider ve vücut dizilerindeki korunmuş TRS motifidir (ACGAAC). Ek olarak, SARS-CoV-2'de, TRS-L ve anti-TRS-B arasındaki korunmuş motifin ötesinde 7-12 ardışık baz çifti ile kapsamlı baz eşleşmesi gözlenmiştir (52). Şekil Long S.'den alınmıştır (59).

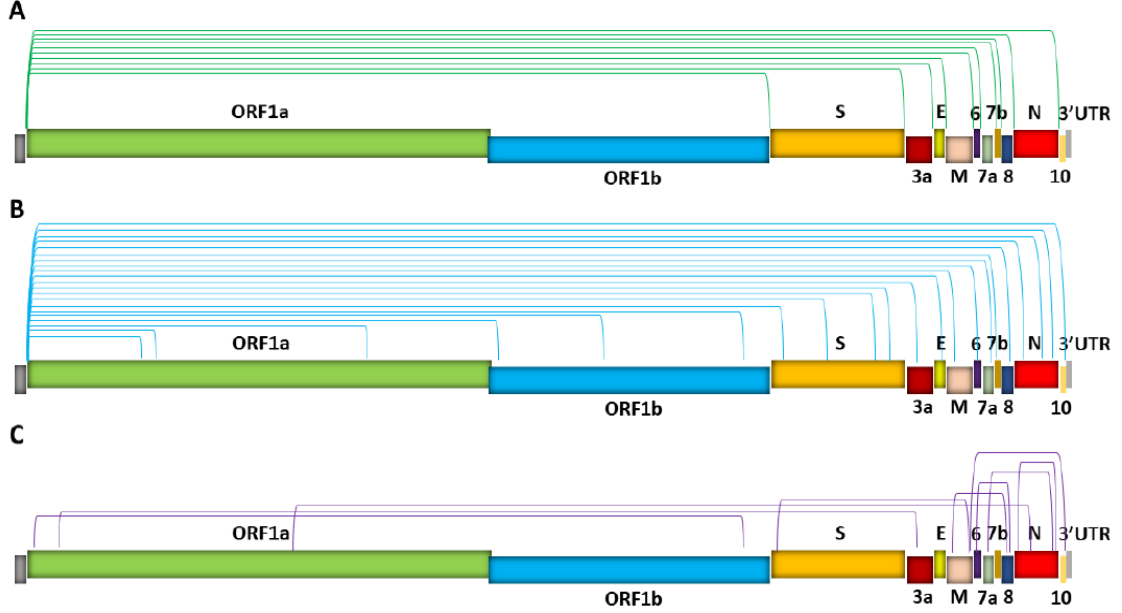


Şekil 2.8. Koronavirüs transkripsiyonundaki önemli yapılar: Bir TRS, genlerin her birinden (TRS-B) önce gelir ve çekirdek dizi (CS-B) ile değişken 5' ve 3' yan dizileri içerir. Çekirdek diziyi içeren liderin TRS'si (TRS-L), genomun 5 ucunda (TRS-L alanındaki turuncu kutu) bulunur. TRS-B'nin kopyası TRS-L ile hibritleştiğinde, negatif iplikli RNA'nın (açık mavi) sentezi sırasında kesintili transkripsiyon meydana gelir. Noktalı çizgiler, pozitif iplikli ve negatif iplikli RNA dizileri arasındaki komplementerliği gösterir. Şekil Sola ve ark.'ndan alınmıştır (47).

Kim ve ark., tamamlayıcı DNA nanotop dizilimi (DNB-seq) ve nanopor doğrudan RNA dizilimi (DRS; direct RNA sequencing) tekniklerini kullanarak SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş Vero hücrelerinde birkaç kanonik sgRNA tanımladı; bunlar yapısal proteinler S, E, M, N ve SARS-CoV-2 transkriptomunun ve epitranskriptomunun bir parçası olarak yardımcı proteinler 3a, 6, 7a, 7b, 8 ve 10 idi. Her kanonik bağlantı noktası, akış aşağısında ortak bir ilk açıklamalı genin akış yukarısına benzer, ancak farklı füzyon bağlantılarına sahip bir subgenom grubunu temsil eder (52). Ayrıca, kesik füzyonların (truncated fusions), çerçeve kayması (frameshift) olan ORF'lerin ve gövdeden gövdeye bağlantı noktalarının (body-to-body fusions) bir sonucu olan, genom boyunca yaygın bir bağlantı modeli yaratan ve viral açık okuma çerçevelerinin manzarasını değiştirebilen karmaşık, sürekli olmayan transkripsiyon olaylarını gösteren çok sayıda kanonik olmayan sgRNA da tanımlanmıştır (Şekil 2.8, Şekil 2.9) (46, 51, 52, 60, 61, 62). Ek olarak Kim ve ark. ile Nomburg ve ark., ORF1a'nın 5' ucuna sahip kanonik olmayan sgRNA'ların, yapısal olmayan viral proteinlerin miktarını modüle edebileceği fikrini ortaya atmıştır. Bunlar gelecekteki çalışmalar için önemli konular olabilir. Ek olarak, kanonik olmayan sgRNA'ların oluşumunu kontrol eden faktörleri ve mekanizmaları anlamak önemli veriler sunabilir (46, 62).

Potansiyel ilgi alanlarından biri, kanonik olmayan sgRNA'lardır (58). Bu çeşitli füzyon transkriptleri hem DRS hem de DNB-seq'de bulunmuş ve bazılarının ifadesi qPCR ile doğrulanmıştır. Birleştirilmiş kanonik olmayan sgRNA dizi okumaları, sayı olarak aksesuar transkriptlerinkine benzer olabilir (46). Önemli olarak, bu RNA'ların çoğu kodlama potansiyeline sahiptir ve ürünleri bilinen yardımcı proteinlerin veya bilinen viral proteinlerden farklı proteinlerin kesilmiş versiyonları olabilir. Aslında, Davidson ve ark., yakın zamanda, bir kısmı kanonik olmayan sgRNA kaynaklı olabilen, önceden bilinmeyen viral proteinlerin saptandığını gösteren tandem kütle spektrometrisinden peptit haritalama kanıtı sağlamıştır (60). Kanonik olmayan sgRNA'larda gözlemlenen benzersiz rekombinasyon dizilerine dayanarak, bunların ayrıca kusurlu RNA'lar (RNA virüsü çoğalma sürecinde hataya açık

viral replikaz tarafından üretilen subviral RNA'lar) olarak işlev görebilecekleri öne sürülmüştür (52).



2.4. sgRNA'ların Sentezi ve Subselüler Yerleşimi

Betakoronavirüslerde Konak hücrelerde virüsün toplam hücre protein translasyon miktarı, enfeksiyondan sonraki saatler içinde 20.000 kata kadar yükselirken, virüsün pozitif polariteli RNA miktarı 200 kata kadar artar, bunların çoğu sgRNA'dır (63, 64). SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerde hücre içi glikoz ve folattaki önemli azalma, viral sgRNA replikasyonu talebine yanıt vermek için konakçının glikoz ve folat metabolizmasını çaldığını düşündürür. Buna, muhtemelen viral biyosentez için konakçı nükleotit beslemesini kanalizasyon yapmak için konak transkripsiyonunu kapatma yeteneğinden dolayı, konak mRNA miktarında önemli bir azalma eşlik eder. SARS-CoV-2'nin yeni enfekte olmuş hücrelerde transkripsiyon sonrası glikoliz ve tek karbon metabolizmasını indüklediğini gösteren bir modelde göre; serin metabolizması özellikle konakçı tek karbon metabolizmasının sitozolik dalında yer alan serin hidroksiltransferaz-1 tarafından, de novo pürin sentezi için karbon birimleri üretir, büyük sgRNA ve yapısal olmayan protein üretimi ve viral replikasyon sağlar (64).

RNA-FISH ile SARS-CoV-2 ile enfekte hücre kültürlerinin, farelerin, ve hasta otopsi örneklerindeki viral RNA'nın çoğunlukla sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir (59). Wu ve ark SARS-CoV-2 sgRNA'larının mitokondri ve nükleolusta yerleşiminin yoğun olduğunu göstermiştir (65). Cortese ve ark. mitokondriyal ATP sentaz alt birimi 5B'de şiddetli bir azalma da dahil olmak üzere, mitokondriyal morfolojide (örneğin, şişmiş krista ve matris yoğunlaşması) ve enfekte hücrelerde işlevde güçlü bir bozulma gözlemlemiştir (66-69).

2.5. sgRNA'ların Ekspresyon ve Tespiti

sgRNA'lar erken semptomatik enfeksiyon sırasında ve bazı durumlarda semptomlar azaldıktan sonra saptanabilir. Tespit edilebildikleri süre semptom başlangıcından 2 ile 162 güne kadar çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterebilir. Bunlar örneğin kendisi, alındığı yer ve alınma şekli, örnek alınma

anındaki semptom şiddeti, hastanın yaşı, immünsüpresyon durumu, altta yatan koşulları ve uygulanan tedavi gibi faktörlerdir (45, 70-79).

Çeşitli çalışmalarla SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücre hatlarında tek tek kanonik sgRNA'ların ölçümü için eksprese edilen RNA'yı spesifik olarak saptayan yöntemler kullanılmış ve incelenmiştir. Örneğin Kim ve ark., N sgRNA'nın en sık eksprese edilen kanonik sgRNA türü olduğunu ardından sırasıyla S, 7a, 3a, 8, M, E, 6 ve 7b'nin geldiğini göstermiştir. Davidson ve ark. N ORF'den sonra gelen ikinci yaygın sgRNA grubunun M ORF olduğunu göstermiştir ki bu çalışma da sonuçlarıyla ve SARS-CoV'deki protein seviyelerine ilişkin daha önce yayınlanmış raporlarla büyük ölçüde uyumludur. Telwatte ve ark., N sgRNA' en yüksek ekspresyon seviyesini, ardından M ve 3a, en düşük olarak ise E sgRNA'yı bildirmişlerdir. Genel olarak, sgRNA miktarı muhtemelen sgRNA sentez sürecindeki polariteden kaynaklanır, örneğin N sgRNA miktarı en fazla olandır çünkü onun TRS-B'si, negatif RNA dizisi elongasyonu esnasında nadiren atlanır (46, 59, 60, 80-83).

Nomberg ve ark., çeşitli hücre kültürü ve viral izolatlardan elde ettiği verilere göre kanonik olmayan sgRNA'ların, toplam sgRNA'ların 1/3'ünü oluşturduğunu gösterdi –ki bu genel olarak diğer transkriptom analizleriyle tutarlıdır- ve bu durum enfeksiyon sırasında zamanla artar. Ayrıca kanonik olmayan sgRNA okuma sayılarının kanonik sgRNA transkript düzeyleriyle de karşılaştırılabilir olduğu bulgusuyla tutarlı olduğu bildirilmektedir (46,62). Kanonik sgRNA transkripsiyonunun replikasyon için gerekli olduğu iyi bilinmesine rağmen, kanonik olmayan sgRNA transkripsiyonunun önemi henüz belirlenmemiştir. Kanonik olmayan sgRNA'ların gerçekten çevrilip çevrilmediğini ve fonksiyonel ürünler üretilip üretilmediğini kesin olarak belirlemek ve negatif polariteli RNA virüslerinde kusurlu genomların antiviral direnci, dendritik hücre matürasyonu ve interferon üretimi ile ilişkili olduğunu göz önünde bulundurulduğunda viral yaşam döngüsünü ve konakçı bağışıklık tepkilerindeki potansiyel rollerini incelemek önemli olacaktır. Kanonik ve kanonik olmayan sgRNA'ların replikasyon, virüsün hücre içindeki faaliyetleri ve patogeneizde

benzer önemde olduğu düşünülmektedir. Özgün kanonik olmayan sgRNA türleri düşük seviyelerde ifade edilir ancak bu türlerin sayısı fazladır (84-87).

Analitik yöntemle bağılı olarak, gRNA'ya göre sgRNA miktarının tespitiyle ilgili önemli farklılıklar mevcuttur. Deneysel sistemlerin (örn. enfekte hücreler, hasta örnekleri gibi numune türleri dahil), qPCR (gerçek zamanlı RT-PCR) veya dizileme gibi aynı kantitasyon yöntemi kullanılsa bile örneklerin nasıl toplandığı, hatta aynı kantitasyon yönteminin, kanonik ve kanonik olmayan sgRNA'ların yaygınlığı ve/veya tespiti üzerinde önemli bir etkisi vardır. Örneğin *Coronaviridae* ailesinin başka bir üyesi olan transmissible gastroenteritis virus (TGEV) ile yapılan hücre serilerindedaha önceki Northern blot ve ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) tabanlı verilere göre sgRNA'ların toplam miktarı, gRNA'ninkini önemli ölçüde aşabildiği ve tek tek kanonik sgRNA miktarı, gRNA düzeyine yaklaşabileceği -bazı durumlarda daha yüksek olabileceği gösterilmiştir (50, 88). Buna karşılık, bir RT-ddPCR (droplet digital PCR) sgRNA yöntemi, akut olarak enfekte olmuş bir SARS-CoV-2 hastasında toplam kanonik sgRNA türlerinin gRNA kopyalarının ~%55'ini veya toplam viral RNA'nın yaklaşık %36'sını temsil ettiğini tahmin etmiştir (82). Wölfel ve ark., real-time-PCR (gerçek zamanlı PCR) tabanlı yöntem kullanarak hastanede yatan hastaların örneklerinde sgRNA miktarının SARS-CoV-2 gRNA'nın sadece %0,4'ü olduğunu göstermiştir. SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücreler, pozitif ve negatif polariteli genomik ve subgenomik RNA içerir. Ancak hücre içermeyen bir kültür süpernatanı veya klinik bir örnek muhtemelen genomik RNA için zenginleştirilmiştir. Wölfel ve ark. RNA ekstraksiyonu öncesinde balgam örneklerini santrifüj etmiş, Telwatte ve ark. ise nazofaringeal sürüntü örneklerini bilerek pellet haline getirip RT-ddPCR çalışmışlardır (45, 82). Klinik örneklerin işlenmesindeki bunun gibi farklılıklar, bu son iki çalışmadaki %0,4'e karşı %55 gibi farklı sonuçları büyük ölçüde açıklamaktadır.

2.6. Klinik ve Araştırmalarda sgRNA'ların Yararları

Hem hastalarda hem de hayvan modellerinde sgRNA'ya özgü qPCR yöntemleri, SARS-CoV-2'nin replikasyonunu ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (45, 72, 89, 90). Wölfel ve ark.'nın çalışması, E sgRNA tespiti ile hastanede yatan hastaların boğazında aktif virüs replikasyonunu saptayan ilk raporlar arasındaydı (45). Bu çalışmanın aktif enfeksiyon tespitiyle ilgili çalışmaları ve SARS-CoV-2 tespitiyle ilgili farklı bakış açıları sunmaktadır. E sgRNA'dan sıklıkla önemli miktarda fazlaca eksprese edilen N sgRNA da bu araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Nükleokapsit bölgesine özgü tasarlanan primerler çoğu klinik qRT-PCR testinde kullanılır; sonuç olarak, nükleokapsit sgRNA'nın tespiti, SARS-CoV-2 klinik testlerinin ve halk sağlığı çabalarının önemli bir yönü olmuştur. Bu iki yöntem de viral tropizmi ve hasta akciğerleri ile hava yollarındaki replikasyonun hücresel hedeflerini saptamak ve vasküler endotelial hücrelerde doğrudan viral enfeksiyonu göstermek için kullanılmıştır (77). Ayrıca enfekte olduğu düşünölen ancak üst solunum yolu numuneleri negatif sonuç veren yatan hastaların dışkı örneklerinden ve uzamış persistan SARS-CoV-2RT-PCR sinyalleriyle aktif viral replikasyonu göstermede geliştirilmeye uygun olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir (79, 91).

SARS-CoV-2'nin bağışıklığı baskılanmış bireylerde kalıcı enfeksiyonu bir endişe kaynağı oluşturur çünkü bu tür konakçılar mutasyon birikimi için rezervuar görevi görebilir ve enfeksiyon sırasında veya aşı tarafından indöklenen bağışıklık tepkilerden kaçabilen yeni viral suşlar oluşabilir (74-76). En azından bir SARS-CoV-2 varyantı/soyu, özellikle yakından ilişkili viral izolatların yokluğunda, bağışıklığı baskılanmış bir konakta uzun süreli replikasyondan kaynaklanmış olabilir (92). İlginç olarak, tamamlayıcı dizileme analizi, artan enfektivite, anti-spike protein 4a8 bloke edici/nötrale edici monoklonal antikorun bağlanması ortadan kaldırılması, antikor kaçışının sağlanması, spike proteinin ACE-2 reseptörüne bağlanması afinitesini artırılması ve Güney Afrika S.501Y.V2 soyu ile ilişkilenirilen spike geni içindeki çeşitli bölgelerde mutasyonlar göstermiştir (93-95). Benzer

mutasyonların (N440D, E484A ve E484K gibi) persistan olarak enfekte olmuş diğer bağışıklığı baskılanmış hastalarda bağımsız olarak ortaya çıkmış olması dikkat çekmektedir(75). Bu bulgular, bağışıklığı baskılanmış pediatrik ve genç yetişkin popülasyon ile bağışıklığı baskılanmış hastaların yönetimi ve bakımında genomik sürveyansın ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasının gerekliliğini vurgulamaktadır (92).

SARS-CoV-2 patogenezi ve bulaşma dinamiklerini anlamak ve aşuların ve terapötiklerin etkinliğini değerlendirmek için birkaç önemli çalışma al yanaklı makaklar, sinomolgus maymunları ve Afrika yeşil maymunları gibi klinik olarak ilgili insan olmayan primat (non human primate; NHP) modellerinde yapılmıştır (96-98). Bir solunum virüsü olarak, SARS-CoV-2 bu hayvanlarda birtakım sorunlara sebep olabilir, çünkü, enfeksiyon izlemede aynı anatomik bölgelerden örnekler kullanıldığından klinik öncesi çalışmalar solunum yollarında çeşitli viral güçlükler yaratır. Bu tür çalışmalarda, toplam RNA veya viral gRNA hedefine dayalı testler, hem anatomik girişe bağlı klinik takip zorluğunu aşabilir hem de yeni çoğalan virüsleri tanıyabilir. Bazı önemli NHP aşı çalışmalarında (mRNA-1273, ChAdOx1 nCoV-19 ve Ad26 aşularının etkinliğini test etme) ve NHP modellerinde doğal bağışıklık ile monoklonal antikörlerin (mAb) koruyucu etkisini değerlendirmede sgRNA tespiti ile replike olan virüs yükünü saptamak mümkün gösterilmiştir (97). Bu sonuçlar, NHP modellerinde aşuların, mAb'lerin ve antivirallerin profilaktik ve terapötik etkinliğini araştıran çalışmalarda sgRNA'nın fayda ve kullanılabilirliğini vurgulamaktadır.

Truong ve ark., çeşitli viral ara maddelerin tespiti ile viral kültür verileri arasında genel olarak iyi bir korelasyon bildirdi, bu da sgRNA'nın enfektivite değerlendirilmesi için de uygun bir moleküler seçenek olabileceğinin altını çizmiştir (76). Hatta Speranza ve ark., dokularda sgRNA'nın, doku kültüründe virüs izolasyonundan daha hassas bir saptama yöntemi olduğunu, fakat bu durumun viral kültür yöntemlerindeki örnek kalitesinin sınırlanmasından kaynaklanabileceğini belirtmiştir (96).

Viral ara ürünler olan sgRNA'ların yani mRNA'ların klinik tanı ve takipte kullanımına farklı bir örnek servikal kanserler verilebilir. Human papilloma virüs (HPV) kaynaklı serviks kanserinin hastalığa özgü moleküler belirteçleri, prekanseröz lezyonları saptamak için yüksek duyarlılık ve yüksek özgüllüğün bir kombinasyonunu sağlar. Bu belirteçlerin çoğu, HPV ile ilişkili karsinogenez mekanizmasına dayalı olarak tanımlanmıştır. HPV enfeksiyonunun onkojenik potansiyeli, viral E6/E7 onkoproteinlerinin üretimine bağlıdır. Böylece, E6/E7 mRNA transkriptlerinin tespiti, kanser öncesi lezyonları tespit etmek için spesifik bir test imkanı sağlar. Yalnızca enfeksiyonun varlığı ve viral tipi hakkında bilgi sağlayan DNA testinin aksine E6 ve E7 mRNA'nın tespiti, rahim ağzı kanserinde en sık bulunan HPV genotiplerini (16, 18, 31, 33 ve 45) tanımlar ve ayrıca, bu virüslerin, doğrudan malign transformasyon ile ilişkili olan onkoprotein E6 ve E7'nin ekspresyonunun göstergesidir (99, 100). Viral mRNA'ların saptandığı bu kullanım örneği de SARS-CoV-2 izleminde bulaştırıcılığın bir göstergesi olarak hücre kültürü yöntemleri dışında bir yöntem olup olamayacağını düşündürmektedir.

2.7. sgRNA'ların Analiz Yöntemleri

Subgenomik RNA'yı tanımlamak için her biri farklı avantaj ve dezavantajlara sahip birkaç yöntem gösterilmiştir (Tablo 2.1). Örneğin, Northern blotlama, sgRNA boyutu ve numune bütünlüğü hakkında bilgi sağlayabilir, ancak zaman alıcıdır ve duyarlılığı düşüktür. Ek olarak, tüm hibridizasyon tabanlı yaklaşımlar gibi, Northern blot çapraz hibridizasyondan kaynaklanan yüksek bir arka plan (background) sunabilir ve bu, sinyallerin hem arka planı hem de saturasyonu nedeniyle sınırlı bir dinamik algılama aralığına katkıda bulunur. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR), Northern blot'a göre daha hızlı ve daha hassas bir semi-kantitatif alternatiftir. Gerçek zamanlı PCR daha az zaman yoğunluğu ve teknik desteğe gereksinimi olan, geniş bir dinamik aralığı sunan, tek-kopya sinyal tespit duyarlılığına sahip, amplifikasyon sonrası bir süreç gerektirmeyen ve görece yüksek verime sahip bir yöntemdir. Bununla birlikte, genomun farklı bölgelerine karşı tasarlanan primer çiftlerinden üretilen PCR

ürünlerinin sgRNA kantifikasyon sonuçlarının dikkatli bir şekilde yorumlanması gerekir. Ek olarak, Northern blot, RT-PCR ve gerçek zamanlı PCR, analiz edilecek RNA molekülleri hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmeleri ve dolayısıyla keşif potansiyelini sınırlandırmaları sebebiyle aynı önemli bir sınırlamayı paylaşmaktadır. Yeni nesil dizileme (Next-generation sequencing ; NGS) yöntemi, bilinen dizi bilgisi gerektirmeyen bir yaklaşımdır. Yeni genleri ve nadir varyantları tespit etmek için saptama ve transkriptleri yüksek verimle kantitatif analiz imkanı sağlar. NGS prosedürleri, gerçek zamanlı PCR'den önemli ölçüde daha karmaşıktır ve tekrarlanabilirlik, NGS deneylerinin karmaşıklığından dolayı bir sorun teşkil edebilir. NGS'nin önemli bir sınırlaması, düşük kopyalı kalıpların (düşük miktarda sgRNA türleri dahil) kantifiye edilememesidir. NGS'nin rastgele örnekleme doğası nedeniyle, duyarlılığını önemli ölçüde düşük seviyelerde ifade edilen transkriptlerin, okumaları sağlamak için gerekli derinliğe ulaşamayabileceği "sekanslama derinliği" belirler. Düşük kopyalı transkriptler için NGS ile gerçek zamanlı PCR arasındaki korelasyonun nispeten zayıf olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca, NGS/RNA-seq'de bazı bölgelerin (GC açısından zengin bölgeler gibi) işlenmesi daha zor olabilir ve daha sonra bu durum yetersiz kalabilir. Ek olarak, NGS/RNA-seq veri analizi sırasında, okuma eşleme algoritmalarındaki normalleştirme varsayımları ve parametreleri de sonuçları ciddi olarak etkileyebilir. Tüm bu durumlar nedeniyle sıklıkla, ilgilenilen molekülleri keşfetmek ve alanı daraltmak için NGS kullanılır ve daha sonra, özellikle kalıp kopya sayıları düşük olduğunda, gen ekspresyonunu doğrulamak için qPCR çalışılır (59, 101, 102).

Nazofaringeal sürüntüler gibi numune alma prosedürlerinden sınırlı hücre veya sıvı verimi ve klinik numunelerde kimyasal veya protein kontaminantlar gibi potansiyel inhibitörlerin varlığı gibi sebeplerden ötürü SARS-CoV-2 nükleik asit analiziesnasında PCR amplifikasyonu ve tespitinin son derece hassas ve güvenilir olmasını gerektirir. Dijital PCR mutlak niceleme yeteneği, inhibitörlere toleransı, düşük analit kopya sayılarında artan kesinliği ve yineleyen çalışmalardaki tekrarlanabilirliği sebebiyle hem SARS-CoV-2grNA hem de sgRNA çalışmalarında önemli avantajlar göstermiştir (82, 103-107). Dijital

PCR'ın ek bir avantajı da dizi uyumsuzluklarına karşı daha düşük duyarlılığıdır. Fakat potansiyel olarak baskın olabilecek ortaya çıkan mutasyonlar, PCR primer ve problemlerinin bulunduğu bölgelerde gerçekleşirse, gerçek zamanlı PCR tabanlı testlerin performansını etkileyebileceğinden özellikle önemlidir (108). Mesela Penarrubia ve ark., SARS-CoV-2 genomlarının %34,4'e kadarının, yayınlanmış gerçek zamanlı PCR deneylerinde PCR primer bağlanmasını etkileyebilen mutasyon(lar) içerdiğini göstermiştir (109).

Hücre dizilerinde ve hasta örneklerinde SARS-CoV-2 sgRNA'ların spektrumunu kapsamlı bir şekilde karakterize etmek için çeşitli dizileme stratejileri (derin dizileme ve doğrudan RNA dizilimi dahil) çeşitli yöntemler denenmiştir (46). Yaygın olarak kullanılan tam genom hedefli dizileme yöntemleri, akış aşağı dizilemesi için cDNA ampliconları oluşturmak üzere primer çiftlerini kullanır. Bu yaklaşım, primer konumları ve amplicon sayıları üzerinde kısıtlamalar getirir ve primer çiftleri tarafından kuşatılmamış RNA bağlantılarını çözemez. Yakın zamanda tarif edilen bir Tiled-ClickSeq yaklaşımında cDNA'nın bir ucu, cDNA sentezini rastgele sonlandıran azido nükleotidleri tarafından üretildiğinden, eşleştirilmiş primerlere olan ihtiyacı ortadan kaldırmak için tek bir ters transkripsiyon reaksiyonuna dayalı özel (tiled) bir primer kullanmıştır (110). Bu yaklaşım, sgRNA'ları ve diğer varyantları aynı anda karakterize etmek için virüs genomu boyunca yüzlerce primer kullanır ve basit olarak tüm RNA türlerini analiz eden sağlam bir platform sağlar. Ayrıca Doddapaneni ve ark., gRNA ve sgRNA'ların tek tip hedef kapsamını elde etmek için oligonükleotid yakalama zenginleştirmeyi ve ardından derin kısa okuma sekanslamayı (deep short-read sequencing) kullanmıştır. Bu yöntem ile amplicon tabanlı sekanslama yaklaşımlarına kıyasla, degrade olmuş materyal içeren klinik örneklerle iyi performans aldıklarını ifade etmişlerdir (59, 111).

Tablo 2.1. Avantaj ve dezavantajlarıyla sgRNA analiz yöntemleri özeti (59).

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Northern Blot	-sgRNA ölçüsü hakkında bilgi sağlama -Örnek bütünlüğü hakkında bilgi sağlama	-Zaman alıcı -Düşük hassasiyet -Sınırlı dinamik algılama aralığı -Farklı mikroorganizmaların tespiti için sınırlı potansiyel
Ters transkripsiyon PCR (RT-PCR)	-Northern blota göre daha hızlı ve daha duyarlı	-Sadece semi-kantitatif -Farklı mikroorganizmaların tespiti için sınırlı potansiyel
Gerçek Zamanlı PCR	-Geniş dinamik aralık -Tek kopya tespit hassasiyeti -Teknik olarak basit(amplifikasyon sonrası süreç yokluğu) -Görece yüksek verim -Zaman kaybı az -Yöntem panellerinin çeşitli lokuslarda sürekli olmayan transkripsiyon oranlarını ayırt edebilmesi	-Kantifikasyon sonuçlarının test tasarım bölgesine göre değişebilmesi -Farklı mikroorganizmaların tespiti için sınırlı potansiyel
Dijital PCR	-Kesin kantitasyon yeteneği -İnhibitörlere tolerans -Düşük analit kopya sayılarında artırılmış hassasiyet -Çalışmalar arası tekrarlanabilirlik -Sekans uyumsuzluklarına azalmış hassasiyet -Tekli yöntemlere göre sgRNA tespitinde daha yüksek duyarlılık	-Farklı mikroorganizmaların tespiti için sınırlı potansiyel
Yeni Jenerasyon Sekanslama (NGS)	-Transkript kantifikasyonunda yüksek verim -Yeni türleri keşfedebilme imkanı	-Karmaşık prosedür ve iş akışı -Tekrarlanabilirlik sorunu -Düşük miktardaki sgRNA tespitinde güçlük -Bazı dizilerin düzensiz gösterimi -Sonuçların analiz parametrelerine bağlı değişkenlik göstermesi -Amplikon tabanlı yaklaşımların belirli RNA bağlantılarını çözememesi -Amplikon tabanlı yaklaşımların degrade örneklerdeki sınırlı performansı

Birden fazla hedefi eş zamanlı olarak ölçmek için nispeten hızlı ve ucuz bir yöntem olan PCR tabanlı yöntemler, enfeksiyon seyri boyunca görülen karmaşık viral transkripsiyon dinamiklerini deşifre etmek için gereken bakışı sağlar. Birden fazla SARS-CoV-2 sgRNA'yı hedefleyen hassas, dijital PCR tabanlı bir analiz paneli açıklanmıştır. Penarrubia ve ark., tek yöntem analizinde yeni genomik varyantlarla ilişkili sinyal saptama kaybını azaltmak için gerçek

zamanlı PCR yöntemi kullandı (109). Çeşitli PCR yöntemleri, çeşitli lokuslarda sürekli olmayan transkripsiyon oranlarının ölçülmesini ve ayırt edilmesini sağlayabilir ve aynı numune içindeki farklı sgRNA'ların miktarı arasında ayırım yapabilir (82, 104). Bu tür sonuçlar, enfeksiyon seyri sırasında SARS-CoV-2 transkripsiyon kinetiğine ve düzenleyici mekanizmalara ışık tutarak, sgRNA seviyeleri ile hastalık şiddeti ve viral enfeksiyon/saçılım gibi parametreler arasındaki potansiyel korelasyonu değerlendirmek için kullanılabilir.

Kısaca, kanonik ve kanonik olmayan transkriptleri açıklayan çalışmaların sonuçları, deneysel sistemlerden ve örneklerin nasıl toplandığı, saklandığı gibi süreçlerden önemli ölçüde etkilenebilir. Örneğin, Vero gibi enfekte hücre kültürlerinde değerlendirilen viral RNA türlerinin, burun yıkamalarındakilerden farklı olması muhtemeldir. Benzer şekilde, numune tipi muhtemelen yukarıda açıklanan NHP modellerinde gerçekleştirilenler gibi klinik öncesi çalışmalar üzerinde de önemli bir etkiye sahip olabilir. Örnek vermek gerekirse sgRNA'ları ölçerken bir nazal yıkama örneği ile akciğer dokusu farklı sonuçlar verebilecektir. SARS-CoV-2 transkriptom veya epitranskriptomunun, bir maymun böbrek hücre hattında (Vero) akciğerdeki epitel hücrelerinde hatta kültürdeki insan primer hava yolu epitel hücrelerinde farklı olup olmadığı, Vero hücrelerindeki yüksek düzeyde replikasyon ile doğada nadir bulunan/hiç bulunmayan hassas ve güçlü dizileme teknikleriyle tespit edilebilecek nadir diziler meydana getirmesinin mümkün olup olmadığı sorulabilir. Ek olarak, farklı hesaplama yöntemleri, aynı veri setini kullanarak RNAseq analizinde farklı sonuçlar verme potansiyeline sahiptir. Tüm bu durumlardan ötürü, farklı numune türleri arasında kanonik olmayan sgRNA uyum verilerini yeniden incelemek önem arz edebilir (46, 59-63).

2.8. SARS-CoV-2'de Antijen Testinin Yeri

Laboratuvar kapasitesindeki yetersizlikler, çok sayıda RT-PCR'yi zamanında gerçekleştirmeye izin vermeyebilir. Bu durum mevcut halk sağlığı kısıtlama stratejilerinin önemli bir sınırlamasıdır. Bu nedenle, antikor testlerinin

aksine, solunum örneklerinde virüsün varlığını tespit edebilen antijen tespiti gibi alternatif testler için ciddi bir talep vardır. SARS-CoV-2'ye özgü antijeni saptayan testleri pandemi ilanından kısa süre sonra geliştirilmeye başlanmıştır ve çoğu artık ticari olarak mevcuttur. Ancak, bu testlerin gerçekteki performansı genel olarak belirsizdir ve bu nedenle validasyonları yüksek önceliğe sahiptir. Diğer seçenekler arasında anitkor saptamaya dayalı testler yer alır, ancak erken enfeksiyonlarda tanısal sınırlamaları nedeniyle bu testler şu anda vaka tespiti için önerilmemektedir. Olası test formatları arasında hızlı tanı testlerine (rapid diagnostic tests; RDT) öncelik verilmelidir, çünkü bunlar uygun zamanda, gerçekleştirmesi kolay ve bakım hizmetlerinde de işlevsel olabilir (111-114).

SARS-CoV-2 için çok sayıda AgT çeşitli ülke pazarlarında hem profesyonel hem de kişisel kullanım amaçlı olarak mevcuttur. Hızlı testler, solunum yolu örneklerinde bulunan SARS-CoV-2 proteinlerine karşı antikorlar kullanılan immünokromatografik kart test yöntemine dayanır. Çoğu AgT, viral nükleoproteini hedefler, yalnızca çok az sayıda yöntem spike protein tespiti ile çalışır. Endişe verici viral varyantlar (Viral variants of concern; VOC) esas olarak spike proteini kodlayan gendeki mutasyonları içerir ve SARS-CoV-2 AgT'nin büyük çoğunluğunu bu durumdan etkilenmez; ancak spike protein tespitine dayalı SARS-CoV-2 antijen testleri, potansiyel yetersizlikler için düzenli aralıklarla kontrol edilmelidir. PCR, virüs tespiti için hala altın standart olsa da, solunum salgılarının enfektivitesinin enfeksiyonun erken fazında, öncesinde ve semptom başlangıcından 0-10 gün sonrasında mevcut olan yüksek viral yük ile ilişkili olduğu gösteren kanıtlar artmaktadır. AgT, daha karmaşık ve zaman alıcı PCR sistemlerine ek olarak, akut olarak enfekte olmuş ve potansiyel olarak enfeksiyöz bireylerin hızlı bir şekilde tanımlanmasına izin vererek virüs yayılımının kontrol altına alınması, hasta bakımı, izolasyon ve temas takibi konusunda hızlı karar alınmasını sağlayabilir. Ayrıca Ag RDT, diğer tanı ihtiyaçlarına hizmet etmek için daha hassas moleküler testlerin sınırlı reaktiflerinin AgT reaktif sonuçlarının doğrulanması gibi uygun amaçla kullanılmasına imkan sağlayabilir (115-117).

Giderek artan sayıda antijen testi, akut COVID-19 teşhisi için acil kullanım izni (EUA) almıştır. Çoğu zaman, bu testler burun sürüntüsü gibi bir üst solunum yolu örneğinde SARS-CoV-2 nükleokapsit proteinini tespit etmek için tasarlanmıştır. Bu yöntemler 15 dakika gibi kısa bir sürede sonuç verecek kadar hızlı ve merkezi laboratuvar testlerinden daha kolay gerçekleştirilmesine rağmen, duyarlılıklarına ilişkin endişeler geniş ölçekli uygulamaları engellemiştir. En az bir COVID-19 semptomu bildiren hastalar arasında hızlı antijen testleri %64,2 ila %80,0 arasında bir duyarlılık göstermiştir. Ancak asemptomatik popülasyonda bir COVID-19 antijen testinin (BinaxNOW, Abbott Rapid Diagnostics, Lake Forest, IL) duyarlılığı Arizona'daki bir araştırmada %35.8 olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde, Sofia SARS antijen floresan immünolojik testi (FIA) (Quidel Corporation, San Diego, CA), Wisconsin'deki iki üniversite kampüsünde toplum taraması sırasında asemptomatik bireyler arasında duyarlılığı %41,2 tespit edilmiştir (118-120).

Moleküler testten daha düşük duyarlılıklarına rağmen, antijen testlerinin viral enfektivitenin daha iyi bir göstergesi olabileceği varsayılmıştır. Başka bir deyişle antijen testleri, enfekte bir kişi virüsü başkalarına bulaştırma açısından esas riski gösterdiği yeterli yüksek miktarda SARS-CoV-2 saçabildiğinde pozitif sonuçlanabilecektir. Bu noktaya kadar birçok çalışmada artan antijen pozitifliği ile daha düşük RT-PCR döngü eşiği (cycle threshold; Ct) değerleri arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Sofia SARS FIA'nın (fluorescent immunoassay) bir değerlendirmesi sırasında, hem antijen hem de gerçek zamanlı RT-PCR ile pozitif olan numuneler ortalama 23,7'lik bir Ct değerine sahipken, buna kıyaslandığında yalnızca gerçek zamanlı RT-PCR ile pozitif olan numunelerin ortalama Ct değeri 32,3 bulunmuştur (120). Başka bir çalışmada RT-PCR Ct değeri <29 olan örneklerde antijen testinin (Sofia FIA) duyarlılığının %96,3 olduğunu göstermiştir (121). Bu tür veriler, antijen testlerinin performansının nispeten yüksek viral yüklerde arttığını gösterirken, diğer veriler, negatif bir antijen sonucunun SARS-CoV-2 bulaşıcılığını ekarte etmek için kullanılamayacağını göstermektedir. COVID-19 antijen testinin (BinaxNOW) değerlendirildiği bir toplum taramasında, bir antijen testi ile negatif, viral kültür

ile pozitif olan 11 numune tanımlamıştır (119). Benzer şekilde, Pray ve ark. antijen testi (Sofia FIA) sonucu negatif, ancak gerçek zamanlı RT-PCR pozitif olan 18 örnek arasında, bu örneklerden ikisinden SARS CoV-2'nin viral kültürde üretilebildiğini gözlemlemiştir (120). Bu bulgular, viral kültür ile tespit edilebilen daha yüksek viral yüklerde bile hızlı antijen testlerinin hala negatif olabileceğini düşündürmektedir.

Farklı bir durum da yaygın kullanılan tek bir SARS-CoV-2 proteinini hedefleyen antijen testlerinin viral mutasyonlar nedeniyle yanlış negatif sonuç vermeye daha duyarlı olup olmadığıdır. Bourassa ve ark., >200.000 SARS-CoV-2 kopya/sürüntü çubuğu olan bir klinik numunenin, bir antijen testi (Sofia 2 SARS FIA) tarafından defalarca negatif raporlamışlardır. Tam genom dizilimi ile yapılan ileri araştırmalarda bu numunedeki virüsün nükleokapsit geninde, bu suşun antijen testi tarafından tespit edilmesini etkileyen iki kodlama mutasyonu içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Antijen testi performansını etkileyen viral mutasyonların insidansı bilinmemekle birlikte, bu örnekte verildiği üzere negatif antijen sonuçlarının yorumlanmasını zorlaştırabilecek ek bir sınırlamayı vurgulamaktadır (118, 122).

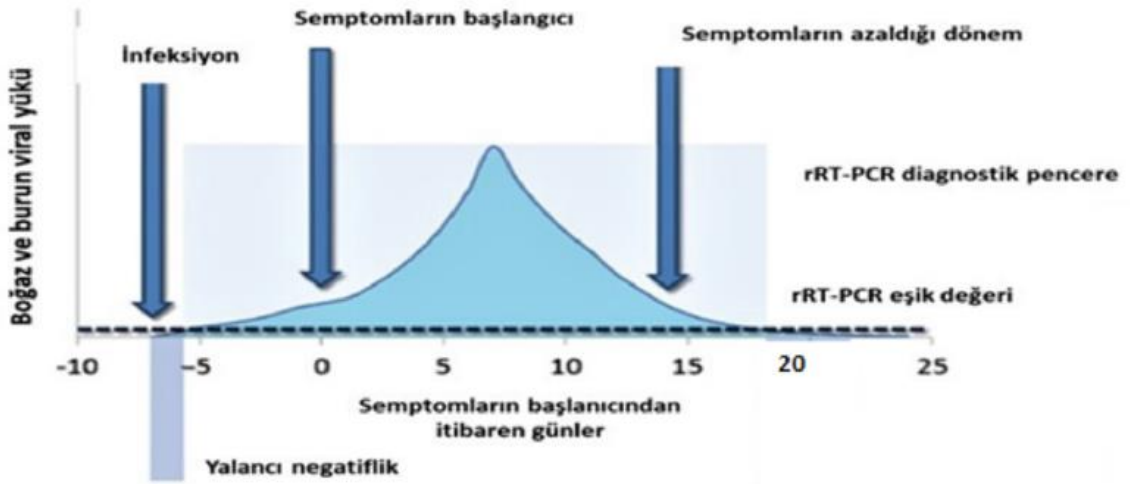
2.9. SARS-CoV-2'de Gerçek Zamanlı RT-PCR'nin (qPCR) Yeri

Amplifikasyon ve analizin eş zamanlı olarak yapılması ve ortamın amplifikasyon ürünü ile kontaminasyonuna ilişkin yanlış pozitif sonuçları en aza indirmek için kapalı bir sistem kullanılması qPCR testlerinin avantajlarından. COVID-19 semptomları olan şüpheli vakaları doğrulamak ve yatan hastalarda tanı koymak, doğrulanmış COVID-19 hastalarının karantinadan çıkarılmasına karar vermek, şüpheli/kesin COVID-19 hastası ile temas etmiş asemptomatik bireyleri taramak ve diğer hastalıklarla ayırıcı tanıya gidebilmek, qPCR test yapılması önerilen durumlardandır (123-124).

SARS-CoV-2'nin genomunda qPCR testlerinde kullanılan yapısal proteinleri kodlayan genlere ek olarak, türe özgü viral replikasyon için gerekli

RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) ve ORF1a, ORF1b b6lgelerini kapsayan aksesuar genler de mevcuttur (123). CDC hedef gen b6lgesi olarak qPCR testinde, viral n6kleokapsit proteinin iki gen b6lgesini (N1 ve N2) ve RNA ekstraksiyonu için internal kontrol olarak insan RNAaz P genini, DS6 is e ilk tarama için E ve ardından doğrulama testi için de RdRp gen b6lgesini hedef olarak 6nermektedir. Her ikisinin de analitik duyarlılık ve 6zg6ll6đ6 y6ksektir. Herhangi birinin kullanılması, klinik tanı testlerinde bir avantaj sağladığı g6sterilmemiştir. Endemik koronavir6slerle çapraz reaksiyonu ve SARS-CoV-2 olası mutasyonlarından etkilenmemek için testlerde en az iki molek6ler hedef 6nerilmektedir (7, 123).

Kullanımdaki SARS-CoV-2 qPCR testlerinin tanıs al doğruluğu, sanıldığı kadar y6ksek olmayabilir. Bir alışmada SARS-CoV-2 için qPCR testi negatif, bilgisayarlı tomografisi pozitif olan hastalarda testler tekrarlandığında hepsinin kademeli olarak pozitifleştiği bildirilmiştir. 6zg6ll6đ6 >%95 olan qPCR testinin duyarlılığından (%70) y6ksektir. Bu nedenle pozitif qPCR testi negatiften daha anlamlıdır (125-127). Semptomatik COVID-19 hastasında, bir tek negatif qPCR testi, tanıyı dışlamamalıdır. Viral RNA testlerinin doğruluğu, 6rneğin alındığı yere (viral y6k6n miktarına) ve 6rneğin kalitesine, hastalığın evresine, vir6s6n çoğalma derecesine veya klirensine g6re değişir (şekil 2.10). Duyarlılık qPCR için, BAL da %93, balgamda %72, buruns6r6nt6s6nde %63, fibrobronkoskop fırça biyopsisinde %46 ve boğaz s6r6nt6s6nde %32 olarak rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada sekizinci g6nden 6nce toplanan solunum yolu 6rneklerinde RNA pozitifliği %66,7 iken, 8-14. g6nlerde %54 ve 15-39. g6nlerde ise %45,5'e d6řt6đ6 g6sterilmiştir (31, 128).



Şekil 2.10. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında viral yük dağılımı, klinik seyir ve qPCR testlerinin pozitifliği arasındaki ilişki. Lippi ve ark.'ndan alınmıştır (125).

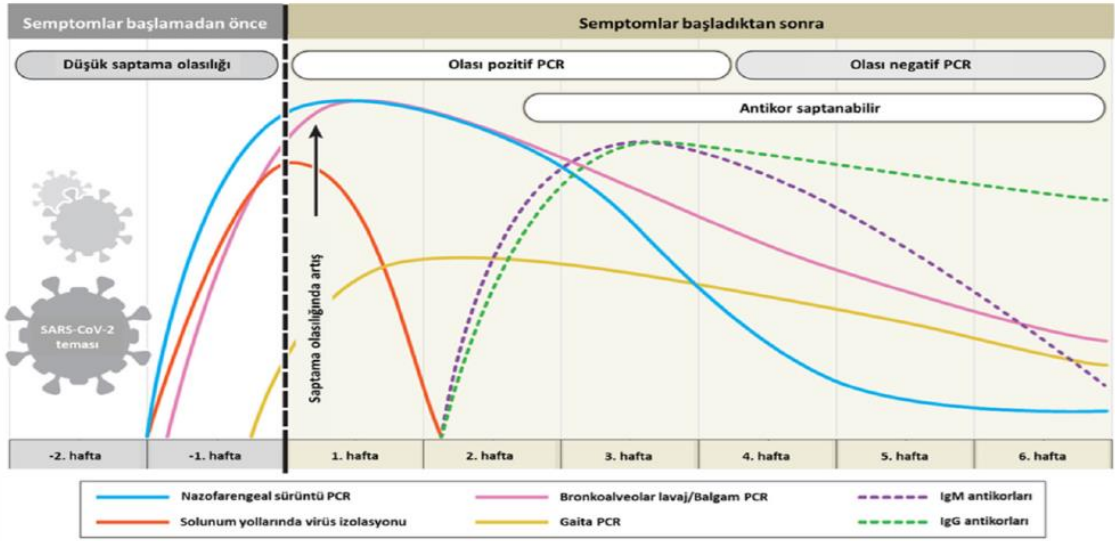
Gerçek zamanlı qPCR testi ile tanımlanan viral yük, COVID-19 hastalığının şiddetini veya terapötik cevabı izlemede kullanmak için tek başına yeterli görülmemektedir. Ancak yüksek viral yükü gösteren Ct değerleri bulaşıcılık göstergesi olarak kullanılabilir. Tedavi sonucunu izlemede, rektal sürüntüden ardarda iki qPCR testi ile negatif sonuç almak yararlı olabilir. Rektal sürüntü örneğinde qPCR ile pozitif sonuç alındığında, bu örnekten hücre kültüründe virüs üretilmesi hastanın bulaştırıcı olduğuna işaret eder. Ancak aynı örnekten dışkıda qPCR pozitifliği ile canlı virüs izolasyonu arasında ilişki tam olarak araştırılmamıştır (31, 114).

Klinik örnek kalitesinin yetersizliği, örneğin çok erken ya da çok geç dönemde alınması, uygun olmayan şekilde taşıma ve saklama koşulları, pipetleme ve işleme sırasındaki teknik hatalar, PCR inhibitörlerinin varlığı, test öncesi antiviral kullanılması gibi nedenlerden ötürü qPCR testlerinde yanlış negatiflikler görülebilir (124, 126).

2.10. SARS-CoV-2'de Diğer Saptama Yöntemlerinin Yeri

Klinik örneklerden SARS-CoV-2 ye karşı gelişen antikorları (IgG, IgM ve IgA) tespit eden serolojik testler, moleküler testlere göre uygulaması daha kolaydır. Hastalık belirtileri başladıktan sonra doğru zamanda yapılırsa, aktif ve pasif enfeksiyonu gösterebilen, moleküler testleri destekleyici testler olarak kullanılabilir. Surveyansta tek tanı yöntemi olarak qPCR kullanılması, geçirilmiş enfeksiyonları saptayamamaktadır (31, 129, 130).

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 IgM ve IgG'yi saptayabilmektedir. En belirgin IA'lar (immunoassay), SARS-CoV-2 enfeksiyonu için IgM ve IgG saptayabilen otomatize kemilüminesan IA (CLIA), manuel ELISA ve hızlı sonuç veren Lateral Flow IA (LFIA)'dır. Bunun yanında birkaç damla kan ve basit cihaz kullanımı ile 20 dakikadan daha kısa bir sürede yapılabilen Lateral flow IA esaslı hasta başı testler (POCT; point of care tests) de bulunmaktadır ve uygulamaya girmiştir. POC testlerinin kalitesi değişkenlik göstermekte, duyarlılıkları %73-100, özgüllükleri %99-100 arasında değişmektedir. 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 (Şekil 2.10) (123, 131-133).



Şekil 2.11. Hastalık sürecinde semptomların başlangıç zamanına göre SARS-CoV-2 tanı testi sonuçlarının değişimi. Sethuraman ve ark.'ndan alınmıştır (126).

SARS-CoV-2'nin varlığını doğrulamak için viral kültür materyalinin qPCR veya immün boyama yöntemi kullanılabilir. SARS-CoV-2'nin viral kültürde tespiti, COVID-19 pandemisi boyunca replike olan virüsü tespit etmek için referans standart olarak hizmet etmiştir. Ancak, bu yöntemin yaygın olarak kullanılmasını engelleyen birkaç önemli sınırlama vardır. İlk olarak, viral kültür duyarlılığı düşüktür ve solunum yolu enfeksiyonlarının tespiti için büyük ölçüde yerini moleküler testler almıştır. Bazı SARS-CoV-2 tespiti kör pasaj ile başarılmıştır. Bu nedenle viral kültürden negatif sonuç çıkması replikasyona yetkin virüsün olmadığı anlamına gelmez. İkincisi, özel altyapı ve uygun uzmanlığa sahip personel gereksinimleri nedeniyle birçok klinik laboratuvar rutin viral kültür yaygın değildir. Son olarak, SARS-CoV-2'nin ökaryotik hücre dizilerinde kültivasyonu, virüsün yayılması laboratuvar personeli için önemli bir güvenlik riski oluşturduğundan, biyogüvenlik düzey-3 önlemleri gerektirir. Bu sınırlamalar nedeniyle, COVID-19 hastalarının bulaşıcı bir virüs kaynağı olmaya devam edip etmediğini belirlemek için viral kültürün rutin kullanımı mümkün değildir. Bu nedenle, replikasyon yetkin SARS-CoV-2'nin varlığını veya

yokluğunu tahmin etmede bir yaklaşım olarak hizmet etme potansiyellerini belirlemek için farklı yöntemler üzerinde çalışılmıştır (118, 134-136).

Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) PCR ilk defa 2000 yılında kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı sebebiyle çeşitli viral hastalıkların tanısında artan popüler bir metot haline gelmektedir. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), Japon Ensefalit virüsü, Chikungunya virüsü, insan papillomavirüsü, Dengue virüsü, Batı Nil virüsü ve Kabakulak virüsü, SARS virüsü ve MERS virüsünde tanısıl olarak yeri vardır. Yüksek duyarlılığa sahip olması, konvansiyonel PCR'a göre daha hızlı olması ve maliyetinin daha az olmasıyla dikkat çekmektedir. COVID-19 pandemisinde de özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve sınırlı kaynaklara sahip laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntem olması yönüyle önem taşımaktadır. LAMP PCR metodunda temel olarak 4-6 primer kullanılarak, izotermal şartlarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Ayrıca ısıya dayanıklı bir ters transkriptaz enzimine de ihtiyaç vardır. Örnekler ve reaktifler tek bir reaksiyon tüpüne konup ısıtılarak gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. LAMP testi yaklaşık bir saat içinde amplifikasyon yapabilir ve 60-65 °C'de geleneksel PCR'dan 100 kat daha fazla kopya üretebilir. Ayrıca hedef dizilerin amplifikasyonu, başlangıç miktarına bağlı olarak, reaksiyonun bir yan ürünü olan magnezyum pirofosfatın beyaz çökmesinden kaynaklanan bulanıklığın basit bir görsel incelemesi ile değerlendirilebilir. LAMP teknolojisindeki son gelişmeler, COVID-19 gibi bir pandemide büyük bir hasta popülasyonunun hızlı tanısına yardımcı olacak, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip hedef dizilerin tespitinde önemli ilerleme kaydedildiğini göstermektedir. Yine de birtakım kısıtlamaları vardır. LAMP tabanlı yöntemler tüm reaksiyonun aynı sıcaklıkta gerçekleşmesi kolaylığını sağlamasına rağmen primer tasarımlarının yapılması oldukça karmaşıktır. Diğer bir kısıtlama da, özellikle otomatik bir platforma yükseltildiğinde yanlış pozitif sonuçlar üretebilmesidir. COVID-19 tanısında RT-LAMP temelli POCT'ler uygulanabilirse modern tanı imkanlarına erişimi olmayan büyük nüfuslar için uygun bir yöntem olacaktır. Bunun yanında gelişmiş ülkelerin hastalığın yayılmasını kontrol etme mücadelesine katkı verebilecektir (137-138).

Geniş kitleleri çabuk, etkin ve duyarlı bir şekilde taramak için geliştirilecek yeni SARS-CoV-2 testlerine olan gereksinim devam etmektedir. Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri (CRISPR; Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) sistemi, insan örneklerinde Dang virüsü, insan papilloma virüsü ve Zika virüsünün tespiti için moleküler tanı kitlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bununla birlikte, CRISPR-Cas/gRNA kompleksinin nükleik asitleri hassas bir şekilde tespit etmek için kullanımı son yıllarda yaygınlaşmaktadır (139).

2.12. Subgenomik RNA Tespitinde Farklı Yaklaşımlar

Subgenomik RNA'ların farklı yaklaşımlarla tespitine yönelik yaklaşımlar da mevcuttur. Daha uzun bir RNA'nın 5'-kesikli versiyonları olan ancak aynı 3' ucunu paylaşan RNA'lar, hücresel mRNA'ların transkripsiyonunda alternatif promotörler tarafından veya RNA virüslerinin kopyalanmasıyla üretilebilir. Bu kesilmiş RNA'lar, basit bir iki primerli RT-PCR ile daha uzun RNA'dan ayırt edilemez çünkü primerler hem daha küçük RNA'dan cDNA'ya bağlanabilir hem de daha uzun RNA'dan cDNA'ya bağlanıp amplifiye edilebilirler. Bu nedenle, daha kısa RNA'ları daha uzun RNA'lardan ayırt etmek için, Northern blot hibridizasyonu gibi zahmetli yöntemler kullanılır. Kanodia ve ark. bu kesilmiş RNA'ların hızlı, düşük maliyetli ve spesifik tespiti için, PCR ile daha küçük koterminal RNA'nın tespitini (Detection of Smaller Co-terminal RNA; DeSCo-PCR) tarif etmişlerdir. DeSCo-PCR uzatılmayan bir bloke edici primer (BP) kullanır; bu primer daha uzun RNA'dan köken alan cDNA'ya bağlanmak için ileri primer (FP) ile yarışırken, ileri primer de daha kısa RNA kökenli cDNA'ya bağlanmak için yarışır. BP, FP ve ters primer (RP) varlığında, her iki RNA'yı da içeren tek bir reaksiyonda yalnızca daha kısa RNA'dan gelen cDNA amplifiye edilir. Birçok pozitif iplikli RNA virüsü, viral gen ekspresyonu ve patojenitede anahtar rol oynayan sgRNA olarak adlandırılan, genomik RNA'nın (gRNA) 5'-kesik formlarını üretir. DeSCo-PCR'nin, her biri farklı miktarlarda sgRNA üreten viral suşlarla enfekte olan, bitkilerden alınan kırmızı yonca nekrotik mozaik virüsünün ve insan hücrelerinden izole edilen Zika virüsünün nispi miktarlarını

seçici olarak tespit etmek için kolayca optimize edildiğini göstermişlerdir. Bu tekniğin, diğer sgRNA üreten virüslere ve herhangi bir kesilmiş veya alternatif olarak eklenmiş RNA'nın kantitatif tespiti için kolaylıkla uyarlanabilir olabileceğini belirtmişlerdir (140).

İnsanlar dışında da koronavirüsler ciddi enfeksiyonlar yapabilmektedir ve sgRNA'ların tespitine yönelik yenilikçi yaklaşımlar burada da çalışılmaktadır. Örneğin kedi enfeksiyöz peritoniti, kedigillerin en ölümcül hastalıklarından biridir. Hem etken madde olan kedi koronavirüsünün (FCoV) varlığı hem de kedi enfeksiyöz peritonitinin tespiti için hızlı ve doğru teşhis oldukça önemlidir. Hornyák ve ark. çalışmalarında, FCoV'yi tespit edebilen ve aynı anda viral RNA miktarını belirleyebilen yeni bir qPCR yöntemi tarif edilmektedir. Yeni yöntem, M sgRNA saptamasını ve FCoV'nin genom kopyalarının nicelenmesini birleştirir. Potansiyel FCoV varyantlarının en geniş spektrumunu tespit etmek ve en doğru sonuçları elde etmek için yeni yöntem, primer-prob enerji transferi (PriProET) prensibini uygulamaktadır. Bu teknoloji, PriProET'in hedef bölgedeki nükleotid ikamelerini koruyabilecek kadar sağlam olması nedeniyle seçilmiştir. Bu nedenle, bu teknoloji hedef genomik bölgeler büyük ölçekli varyasyonlar gösterse bile, virüslerin birçok varyantını aynı anda tespit edebilen kapsamlı bir sistem sağlayabilir (141).

Sağlıklı genç kedilerin dışkı örnekleri, enfeksiyöz peritoniti olan kedilerin organları ve lökositleri de incelemeye tabi tutulmuştur. FCoV'un 10 kadar düşük genom kopyasını bile tespit edebildiğinden, P-sg-QPCR (Real-time Polymerase Chain Reaction Based on Primer-Probe Energy Transfer) yönteminin duyarlılığı yüksek bulunmuştur. Kantitatif sgRNA saptama yöntemi, normal, sağlıklı kedilerin dışkısında bulunan enterik FCoV varyantlarıyla karşılaştırıldığında, kedi enfeksiyöz peritonit vakalarının organ materyallerinde M geni sgRNA'sının 10-50.000 kattan fazla arttığını ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, yeni P-sg-QPCR testinin FCoV'nin daha iyi saptanması, miktar tayini için ve kedilerde ciddi ölümlere neden olan bu önemli Felidae hastalığı olan kedi enfeksiyöz

peritonitinin daha iyi teşhisi için güçlü ve yeni bir araç olarak uygulanabilirliğini göstermektedir (141).

Hücre hatlarından SARS-CoV-2 sgRNA biyogenezi ile ilgili bulguların, fizyolojik koşullar altında enfekte olmuş birincil hücrelerde veya hasta doku örneklerinde yeniden değerlendirilmesi ve biyoinformatik sonuçların deneylerle doğrulanması gerekir. SARS-CoV-2 sgRNA kodlama bölgeleri, ribozom ayak izlerini değerlendirmek ve alt genomların hangi bölümlerinin çevrildiğini belirlemek için polisom profili oluşturma (örneğin katı hal nanoporlarıyla) yoluyla incelenebilir. Ek olarak, nanopore DRS'deki modifiye edilmemiş sentetik kalıp ve viral transkriptler arasındaki iyonik akım farklılıklarına dayalı olarak kapsamlı SARS-CoV-2 sgRNA modifikasyonları tanımlanmıştır. Bu modifikasyonların kimyasal doğasını, düzenlenmesini ve biyolojik işlevlerini incelemek ilgi çekici olacaktır (46, 118).

Çözülmemiş önemli bir sorun, sgRNA'ların kalıcılığına izin veren mekanizma ile ilgilidir (75, 76). gRNA ve sgRNA'nın transkripsiyonu, enfekte hücrelerin sitoplazmasında hücreSEL ve viral materyaller içeren DMV'lerde (double membrane vesicle; çift zarlı veziküller) meydana gelir. gRNA'lar virionlar halinde paketlenirken, sgRNA'ların öyle olması pek olası görünmemektedir (70). Bu nedenle, sgRNA, muhtemelen gRNA'dan daha hızlı bozunduğu için aktif enfeksiyon tespiti için uygun bir belirteç olarak kabul edilir. Bununla birlikte, sgRNA'ların en azından bir bölümünün, replikasyon durduktan sonra bile DMV'lerde ve/veya hücre dışı veziküllerde enkapsülasyon yoluyla nükleaz bozunmasından korunma olasılığı vardır (71). "Kalan" sgRNA'nın toplam sgRNA sinyaline katkısının tanımlanması, hastalarda uzun süreli sgRNA saptamasını gösteren çeşitli raporların, örneğin enfektivite süresi gibi klinik öneminin yorumlanmasına ve NHP hayvan aşısı/kıyaslamasıyla ilgili etkinlik değerleri üzerinde önemli olabilecektir (74, 75, 76).

Diğer koronavirüslerdeki sgRNA'ların; viral genomun 3' bölgesinde kodlanan çeşitli yapısal ve yardımcı proteinlerin üretilmesindeki kritik rollerine ek

olarak, sgRNA'ların koronavirüslerin yaşam döngüsü ve patojenitesindeki rolü gösterilmiştir (142, 143). Subgenomik RNA'lar, pozitif zincir sentezinin önemli araçları olarak işlev görebilir. Ek olarak, *Nidovirales* takımının üyelerinde düzenleyici sekanslar mutasyona uğradığında devam eden protein sentezini tespit etme işlevi gören yüksek seviyelerde sgRNA miktarı tespit edilmiştir (144). İlginç bir şekilde, sgRNA'larda tanımlanan AAGAA tipi modifikasyon kümeleri, viral sağkalımı destekleyebilir ve immün kaçıışı kolaylaştırabilir (46). Diğer virüslerdeki sgRNA'ların viral replikasyon ve rekombinasyonda rol oynaması, SARS-CoV-2'de sgRNA'ların benzer rollerinin araştırılmasını gerektiğini göstermektedir (118). Li ve ark., yakın zamanda TRS motifinde bir nsp15 (nidoviral RNA uridilat-spesifik endoribonükleaz) bölünme (cleavage) bölgesinin varlığını gözlemlemiş ve sgRNA/gRNA oranını inceleyerek SARS-CoV-2 transkripsiyonunu ve replikasyonunu düzenleyen olası bir negatif geri besleme mekanizmasına işaret etmiştir (28).

2.11. COVID-19 Erişkin Hasta Yönetiminde Tedavi Açısından Sınıflama

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın COVID-19 Erişkin Hasta Tedavi Rehberi'ne göre erişkin COVID-19 hasta yönetimi ve tedavisi açısından olmak komplike olmamış, hafif/orta ve ağır seyirli, yoğun bakım ihtiyacı olmak üzere WHO'daki gibi dört farklı gruba ayrılmıştır (145).

2.11.1. Komplike Olmamış Hasta

a. Ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi bulguları olup solunum sıkıntısı olmayan (dakika solunum sayısı %93 oda havasında) ve

b. Akciğer filmi ve/veya akciğer tomografisi normal olan hastalar

Komplike olmamış hastalık tablosu olarak değerlendirilir.

2.11.2. Hafif-orta seyirli pnömoni

a. Ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi bulguları olup, solunum sayısı 90 üzerinde olan ve

b. Akciğer grafisinde veya tomografisinde hafif-orta pnömoni bulgusu olan hastalar

Hafif seyirli pnömoni (ağır pnömoni bulgusu olmayan) olarak değerlendirilir.

2.11.3. Ağır Pnömoni

a. Ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi belirtileri olup, takipnesi mevcut (≥ 30 /dakika) ve oda havasında SpO₂ düzeyi ≤ 90 'ın altında olan ve

b. Akciğer grafisi veya tomografisinde bilateral yaygın pnömoni bulgusu saptanan hastalar

Ağır pnömoni olarak değerlendirilir ve yoğun bakım ünitesine yatış açısından değerlendirilmek üzere yoğun bakım konsültasyonu istenir.

2.11.4. Yoğun Bakım İhtiyacı Açısından Değerlendirilmesi Gereken Hastalar

a. Dispne ve solunum distressi olan

b. Solunum sayısı ≥ 30 /dk

c. PaO₂/FiO₂ < 300 olan

d. İzlemede oksijen ihtiyacı artış gösteren

e. 5 L/dk oksijen tedavisine rağmen SpO₂ < 90 veya PaO₂ < 70 mmHg olan

f. Hipotansiyon (sistolik kan basıncı < 90 mmHg ve olağan SKB dan 40 mmHg dan fazla düşüş ve ortalama arter basıncı < 65 mmHg, taşikardi > 100 /dk

g. Akut böbrek hasarı, akut karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk, konfüzyon, akut kanama diyatezi gibi akut organ disfonksiyonu gelişimi ve immünsüpresyonu olan hastalar

h. Troponin yüksekliği ve aritmi

i. Laktat >2 mmol/L

j. Kapiller geri dönüş bozukluğu ve cutis marmoratus gibi cilt bozukluklarının varlığı



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (ÇOMÜ-BAP) tarafından TTU- 2021- 3637 nolu proje kodu ile desteklendi. COVID-19 için T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan bilimsel araştırma çalışmaları başvuru onayı alındı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2011-KAEK-27/2021-E.2100041082 nolu proje ve 04-05 nolu kararınca çalışma için etik kurul onayı alındı. Çalışmaya klinik tanı amacıyla laboratuara gönderilmiş ve SARS-CoV-2 RNA pozitif saptanmış, laboratuvarında -80 °C'de saklanmış örnekler ile etik kurul onayı alındıktan sonra numune sahiplerinden aydınlatılmış onamları alınmış çalışmaya uygun örnekler dahil edildi. Çalışma 109 klinik numune üzerinden yürütüldü.

Poliklinik ve kliniklerden solunum yolu örneklerinde viral nükleik asit ampifikasyon testi yapmaya uygun eküvyon çubuğu alınmış ve vNAT Viral Nükleik Asit Tamponu (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) ile nakledilmiş örnekler ile çalışmalar yürütüldü.

3.1 Araştırmanın Uygulanışı

COVID-19 PCR testi pozitif, 18 yaşından büyük, gerekli klinik bilgilerinin hastane sisteminde mevcut ve PCR testi pozitif sonuçları olan örnekler değerlendirmeye alındı. Onsekiz yaşın altındaki hastalar, kontrol amaçlı gerçekleştirilen E gen COVID-19 PCR çalışmasında negatif sonucu olan, laboratuvara gelip rutinde çalışıldığında Ct değeri 35 ve üzeri olan PCR pozitif numuneler, klinik verileri düzensiz veya yetersiz olan hasta numuneleri çalışmaya alınmadı. Çalışma için 100 vaka örneği hedeflenmiş olup, bunların yarısının Ct değeri ≤ 25 , diğer yarısının Ct > 25 değerine sahip hastalardan seçilmesi planlandı. Çalışılacak örnekler ekstraksiyon işlemi yapılarak örneklerdeki nükleik asitler saflaştırılıp ayrıldı. Daha sonra Biorad CFX96 gerçek zamanlı PCR cihazı (CFX96; Bio-Rad, ABD) ile kontrol ve doğrulama

amacıyla ikinci bir SARS-CoV-2 E gen RNA tespiti ile ayrıca E ve N sgRNA tespiti yapıldı. Bunun için gerekli master mix, reverse, forward diziler ve proplar ile termal döngü cihazındaki program DSÖ/Charité Protokolü ve mastermixin kılavuzuna uygun olarak optimize edilip kullanıldı.

Virüs çalışmaları için uygun bir ekstraksiyon kitiyle (High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) viral gRNA ve sgRNA'lar ayrıştırıldı. Primer ve prob sentezi için gerekli oligonükleotit sentezi HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi; High Performance Liquid Chromatography) ile saflaştırılmış şekilde kullanıldı (Microsynth, İsviçre).

Gerçekleştirilen qPCR testlerinde, forward diziler E ve N gen sgRNA için ortak olup lider spesifik primerin oligonükleotid sekansı sgLeadSARSCoV2-F CGATCTCTTGTAGATCTGTTCTC şeklindedir. E gen gRNA ve sgRNA için reverse primer sekansı sgE_SARS-CoV2_R 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3', prob sekansı ise sgE_SARS-CoV2_P 5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ-3' şeklindedir. N gen sgRNA tespiti için reverse primer sekansı sgN1_SARS-CoV2_R 5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3', prob sekansı ise sgN1_SARS-CoV2_P 5'-FAM ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1 şeklindedir (Tablo 3.1, Tablo 3.4)

Ayrıca SARS-CoV-2 spesifik antijen tarama testi (Humasis COVID-19 Antijen Testi, Humasis, Güney Kore) kullanıldı.

Hasta sonuçları, hastaların klinik ve radyolojik özellikleri de değerlendirilip T.C. Sağlık Bakanlığı Erişkin Hasta Tedavi Rehberinde belirtildiği üzere komplike olmayan-hafif/orta seyirli pnömonili- ağır pnömonili ve yoğun bakım ihtiyacı gerektiren hasta şeklinde kategorize edildi, özellikle semptom başlangıcından itibaren kaçınıcı günde sgRNA pozitif oldukları belirlendi, böylece hem yatan ve uzamış enfeksiyon belirtileri olan hastalarda, hem de

ayaktan başvuran hastalarda COVID-19 bulaşıcılığı açısından değerlendirme yapmak amaçlandı.

Hastalardan ek bir solunum yolu örneği ve laboratuvar tetkiki talep edilmedi ancak klinik seyir esnasında poliklinik ve kliniklerden tekrarlanan örnek olursa sgRNA testleri yeni örnekte de çalışıldı. Bunun dışındaki durumlarda ilk başvurudaki örnekler üzerinden işlem yapıldı.

3.2 İzolasyon/Ekstraksiyon:

SARS-CoV-2 PCR pozitif nazo/orofaringeal sürüntü örneklerinden RNA ve sgRNA ekstraksiyonu için 'High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit' (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Bunun için kit kılavuzunda belirtildiği gibi aşağıdaki algoritma izlendi:

1- Nükleik asitlerin izolasyonu için, elüsyon tamponu +70°C'ye önceden ısıtıldı.

2- Nükleaz içermeyen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne, 200 µl solunum yolu sıvı örneği, 200 µl taze hazırlanmış çalışma solüsyonu, 50 µl Proteinaz K solüsyonu eklenip hemen karıştırıldı. Ardından +72°C de 10 dakika inkübe edildi.

3- 100 µl bağlama tamponu eklenip iyice karıştırıldı.

4- Örnek uygun filtre tüpüne transfer edilip toplama tüpüne yerleştirilerek 8,000 × g de 1 dakika santrifüj edildi.

5- Santrifüj sonrası filtre tüpü, toplama tüpünden çıkarılarak koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Ardından filtre tüpü yeni bir toplama tüpüyle birleştirildi.

6- Filtre tüpüne 500 µl inhibitör çıkarma tamponu eklenerek 8,000 × g de 1 dakika santrifüj edildi.

7- Beşinci basamak tekrarlandı.

8- İnhibitörlerin çıkarılması için filtre tüpüne 450 µl yıkama tamponu eklenip 8,000 × g de 1 dakika santrifüj edilip sıvı uzaklaştırıldı.

9- Beşinci basamak tekrarlandı. Filtre tüpüne 450 µl yıkama tamponu eklenip 8,000 × g de 1 dakika santrifüj edilip sıvı uzaklaştırıldı. Ardından yıkama tamponu kalıntılarını çıkarmak için 10 saniyelik maksimum hızda (yaklaşık 13,000 × g de) santrifüj yapıldı.

10- Toplama tüpü çıkarıldı ve filtre tüpü nükleaz içermeyen 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.

11- Viral nükleik asitleri ayırtmak amacıyla 50 µl elüsyon tamponu filtre tüpüne eklenip 8,000 × g de 1 dakika santrifüj edildi.

12- Son olarak mikrosantrifüj tüpünde bulunan pürifiye edilmiş viral nükleik asitler RT-PCR'de kullanılmak üzere -80 °C'de saklamaya alındı.

3.3 Mastermiks:

Viral genomik RNA ve sgRNA'ların tespit edilebilmesi için 'Xpert One-Step Fast Probe' (Grisp, Porto, Portekiz) kullanıldı.

Xpert One-Step Fast Probe RTaz karışımı ve Fast qPCR Mastermiks (Probe) içermektedir. RTase karışımı, genetik olarak modifiye edilmiş, termostabil bir MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) ters transkriptaz ve RNA bozulmasını engellemek için gelişmiş bir RNaz inhibitörü içerir. Cihazımız Bio-Rad CFX96 ROX boyası gerektirmediği için mastermikse ROX eklenmedi.

Eksi 80°C'de saklanan örneklerle, kontrol amacıyla tekrar SARS-CoV-2 genomik PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu esnada eş zamanlı olarak antijen testi de uygulandı. SARS-CoV-2 E gen PCR işlemi için kullanılan, primer ve prob dizileri aşağıdaki gibidir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. SARS-CoV-2 E gen PCR işlemi için kullanılan protokol, primer ve prob dizileri.

Hedef	Oligonükleotit (WHO/Charité)	Sekans (5'-3') / Konsantrasyon/ Final Konsantrasyon
	E_Sarbeco_F (forward primer)	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT /10µM /400nM
E (genom)	E_Sarbeco_R (reverse primer)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA / 10µM /400nM
	E_Sarbeco_P1 (probe)	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 /10µM /200nM

DSÖ/Charité Protokolü esas alınarak gerçekleştirilen SARS-CoV-2 E gen PCR miks ve döngü bilgileri aşağıdadır (Tablo 3.2, Tablo 3.3)

Tablo 3.2. SARS-CoV-2 E gen PCR işlemi için her bir qPCR reaksiyonu bileşen bilgisi.

İçerik	Hacim
Fast qPCR Mastermix (Probe)	10 µl
Charité Primer F(E için)	1.6 µl
Charité Primer R(E için)	1.6 µl
Charité Probu (E için)	0.8 µl
RTaz karışımı	1 µl
Kalıp RNA	5 µl

Tablo 3.3. SARS-CoV-2 E gen, E ve N sgRNA için qPCR döngü bilgisi.

N° döngüleri	Sıcaklık	Süre
1x (cDNA sentezi)	45°C	20 dakika
1x (Hot-start)	95°C	3 dakika
40x (qPCR)	95°C	5 saniye
	58°C	30 saniye

SARS-CoV-2 genomik PCR pozitif bulunan örnekler SARS-CoV-2 sgRNA PCR çalışmasına alındı. Bunun için benzer çalışmalarda uygulanan protokoller esas alındı (45, 91). SARS-CoV-2 sgRNA PCR için kullanılan protokol, primer ve prob dizileri Tablo 3.4'teki gibidir.

Tablo 3.4. SARS-CoV-2 sgRNA PCR için kullanılan primer ve prob dizileri.

Hedef	Oligonükleotit	Sekans (5'-3') / Konsantrasyon/ Final Konsantrasyon
E mRNA	E_Sarbeco_R (reverse primer)	ATATTGCAGCAGTACGCACACA /10µM /400nM
	E_Sarbeco_P1 (probe)	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1 /10µM /200nM
N mRNA	2019-nCoV-N1 (reverse primer)	TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG /10µM /400nM
	2019-nCoV-N1 (probe)	FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1 /10µM /200nM
E ve N mRNA Ortak lider dizi	sgLeadSARSCoV2 (forward primer)	CGATCTCTTG TAGATCTGTTCTC /10µM /400nM

Görüldüğü üzere, örneğin SARS-CoV-2 E geninin reverse dizisi ve probu sgRNA'sı ile aynıdır. Saptamada kullanılan fark lider diziden kaynaklanmaktadır. Lider dizi de aynı şekilde genom üzerinde mevcuttur. Yani bu primerler genomik ve subgenomik RNA'ya bağlanabilir. Ancak, SARS-CoV-2'nin RNA'ya bağımlı RNA polimerazının sürekli olmayan transkripsiyonu nedeniyle, sgRNA ara ürünleri üretilirken sgRNA'larında lider dizi ile iç primer

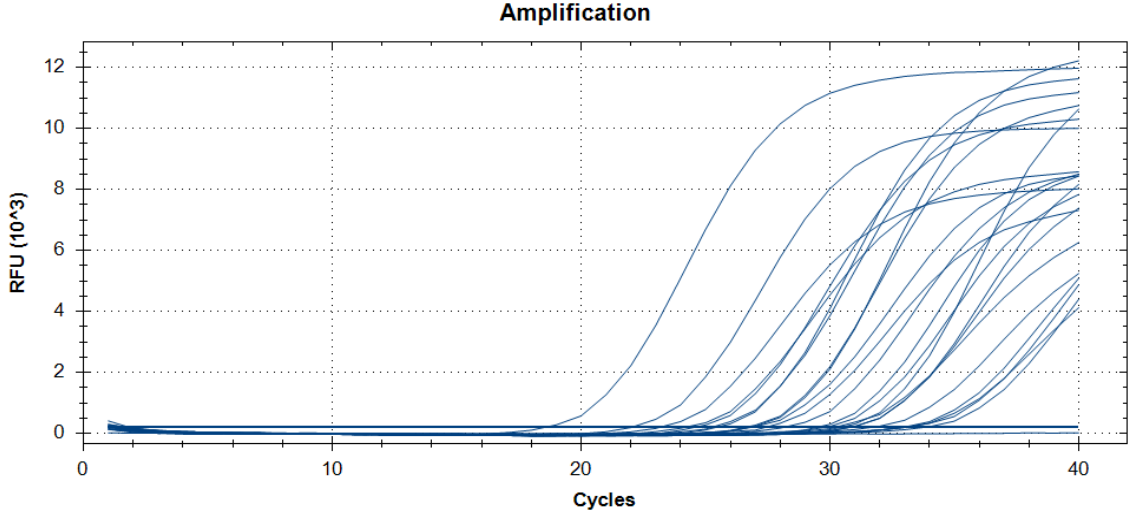
arasındaki mesafe, karşılık gelen gRNA dizininden (26337 baz çifti: 44 konumunda sgLeadSARSCoV2-F 5' uç yeri ve 26381 konumunda E_Sarbeco_R 5' uç yeri) daha kısadır (171 bç). 26381 baz çiftlik ürün bir PCR'de elde edilemez (79).

Tablo 3.5. SARS-CoV-2 E ve N sgRNA için her bir qPCR reaksiyonu bileşen bilgisi.

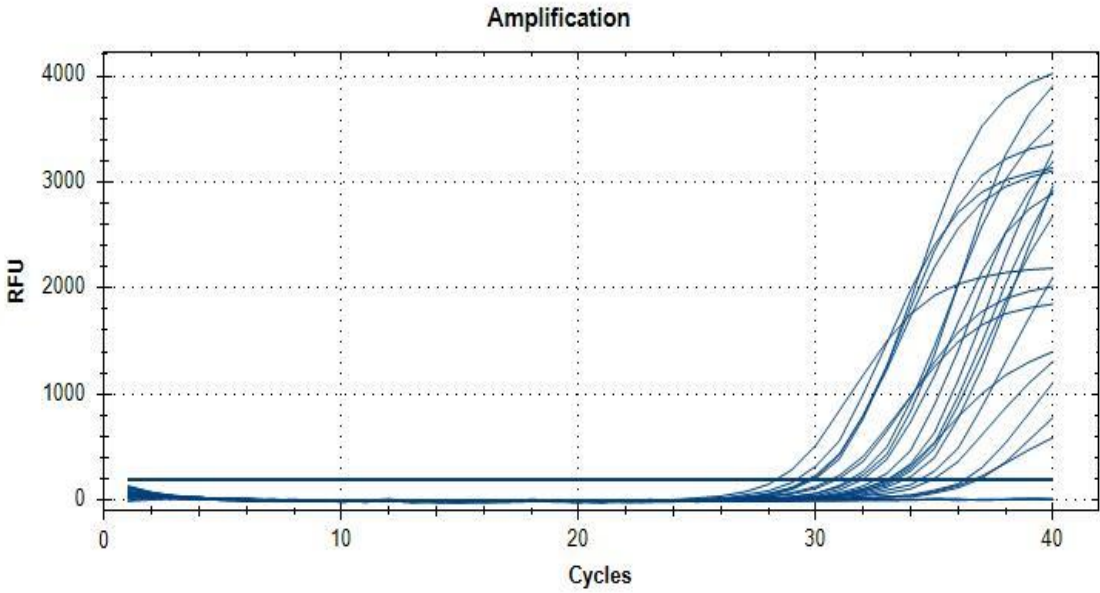
Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Fast qPCR Mastermix (Probe)	(10µM)	1X
Forward Primer (10µM)	0.8 µl	400nM
Reverse Primer (10µM)	0.8 µl	400nM
Prob (10µM)	0.4 µl	200nM
RTaz karışımı	0.2 µl	
Kalıp RNA	5µl	
PCR-grade su (RNaz içermeyen)	2.8 µl	

Primer ve problemlerin ürün raporunda yazan miktarlarda DNaz/RNaz free water ile sulandırılarak 100 mikromolarlık stokları hazırlandı. Bu stoklardan 10 mikrolitre alınıp 90 mikrolitre DNaz/RNaz free water eklenip vorteksenerek 10 mikromolarlık konsantrasyonda çalışma solüsyonları hazırlandı.

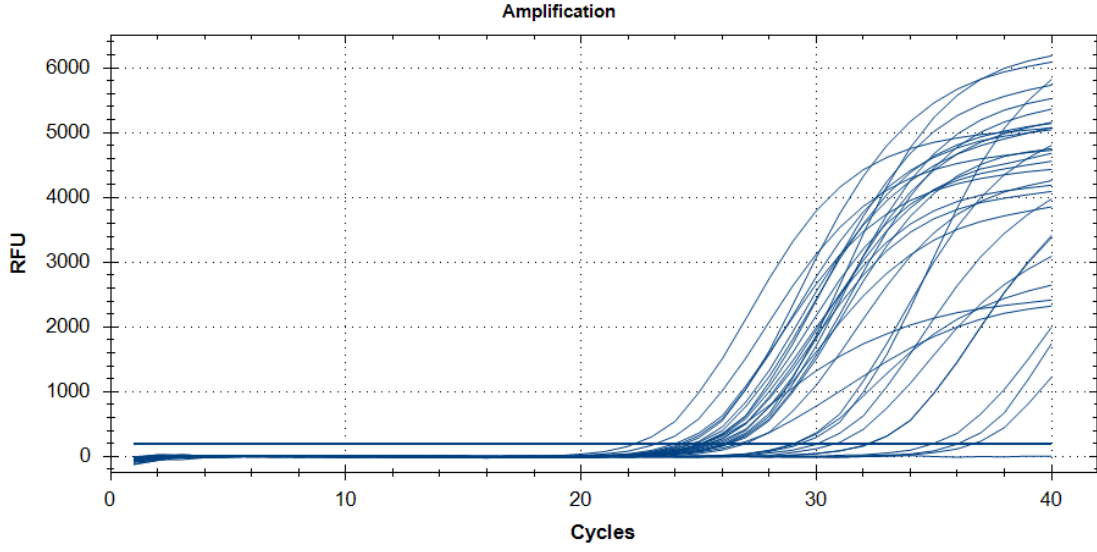
PCR veri analizlerinin incelendiği, E gen, E sgRNA ve N sgRNA çalışma rnekleri Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.1. SARS-CoV-2 E gen PCR alışması analiz rneği



Şekil 3.2. SARS-CoV-2 E sgRNA PCR alışması analiz rneği



Şekil 3.3. SARS-CoV-2 N sgRNA PCR çalışması analiz örneği

3.4. Antijen Testi

SARS-CoV-2 PCR pozitif numunelere sgRNA PCR tespiti ile birlikte COVID-19 antijen testi (AgT) yapıldı. Bunun için Humasis COVID-19 Antijen Testi (Humasis, Güney Kore) kullanıldı. Humasis COVID-19 Ag Testi, immünokromatografik yöntemeye dayalı tek aşamalı *in vitro* tanı testidir. Şüpheli hastaların nazofaringeal sürüntü örneğinde SARS-CoV-2 antijenlerinin kalitatif tespiti için tasarlanmıştır.

Kasetin içindeki nitroselüloz membran şeridi, bir test hattı ve bir kontrol hattı içerir. Test hattı, SARS-CoV-2 antijenlerinin saptanması için SARS-CoV-2 nükleokapsitine karşı anti-fare monoklonal antikoru ve spike proteininin reseptör bağlanma bölgesi (receptor binding domain; RBD) ile kaplanmıştır ve kontrol hattı, keçi anti-fare IgG'si ile kaplanmıştır.

3.4.1. Prosedür ve Metod

- 1) Test kasedini içeren alüminyum poşeti, örnek içeren tüp ve filtre kapağını hazırlandı.
- 2) Test kasedi alüminyum poşetten çıkarıp bir yüzeye yerleştirildi.
- 3) Eksi 80°C'de saklanan örnek içeren tüpler, dondurucudan çıkarılarak oda ısısına gelmesi beklendi.
- 3) Sızdırmaz kapağı açmadan önce örnek içeren tüp birkaç kez sallandı ve spin santrifüj yapıldı. Eküvyonun ucu test tüpüne yerleştirilerek ve yeterli örnek ekstraksiyonu yapmak için 10 kez çevirildi.
- 4) Çevirmeden sonra, çıkarılan sıvıyı sıkmak için eküvyon ucu test tüpünün duvarına bastırarak swabı çıkarıldı.
- 5) Filtre kapağı test tüpüne takıldı ve 6 damla örnek ekstraktını (190-200uL) cihazın numune kuyucuğuna dağıtıldı.
- 6) Örneği uyguladıktan 15 dakika sonra sonuçlar okundu. 15 dakikadan sonra sonuç okuması yapılmadı.

3.4.2 Sonuçların yorumlanması:

COVID-19 Negatif: Kontrol çizgisinde (C) renkli çizgi görülüp test çizgisinde (T) renkli çizgi görünmüyorsa SARS-CoV-2 antijeni için sonuç negatiftir (Şekil 3.4).

COVID-19 Pozitif: Hem kontrol çizgisinde (C) hem de test çizgisinde (T) renkli çizgi görünüyorsa SARS-CoV-2 antijeni için sonuç pozitifdir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Solda negatif, sağda pozitif COVID-19 antijen testi sonucu

Sonuç; yalnızca her iki sonuç penceresinde de kontrol çizgisinde (C) renkli çizgi görüldüğünde geçerli kabul edildi. Kontrol hattından herhangi biri (C) her iki pencerede de yok ise test geçersiz kabul edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Geçersiz COVID-19 antijen testi sonucu

Şekil 3.6'te çalışma kapsamındaki 10 hasta örneğinin değerlendirilmesi gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Çalışmaya alınan 10 hasta örneğinin antijen testi değerlendirmesi

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın verileri Excel programına girilmiş ve buradan SPSS 20.0 istatistik programına aktarılarak veri kontrolü ve analizi bu programda yapılmıştır. Tanımlayıcı verilerin gösterilmesinde ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerler ve yüzdeler kullanılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede Ki-Kare testi kullanıldı. Dört gözlü tablolarda beklenen değerin 5'in altında olduğu durumlarda Fisher'in Kesin Düzeltmesi (Fisher's Exact Test) kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılıkta $p < 0,05$ kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmamıza Şubat 2021 tarihinden itibaren laboratuvarımızda SARS-CoV-2 PCR çalışılıp pozitif çıkan 99 hastadan alınan 109 solunum yolu örneği dahil edildi. Beş hastanın iki farklı zamanda alınan numunesi çalışıldı. Eksi 80 °C'de saklanan örnekler saklamadan çıkarılınca kontrol amaçlı tekrar E gRNA çalışıldı ve pozitiflikleri doğrulandı. Ardından 109 hasta örneğinin, E ve N sgRNA'sı ve antijen testi çalışıldı.

Çalışma kapsamındaki hastalar 18-88 (Medyan=43) yaş aralığında ve yaş ortalaması $45,41 \pm 16,29$ (ortalama \pm SS) olup numunelerin 53'ü erkek, 56'sı kadın hastadan alınmıştır. 109 numunenin 79'u komplike olmamış, 15'i hafif pnömonili, üçü ağır pnömonili, üçü yoğun bakım ihtiyacı olan, dokuzu da asemptomatik hastadan alınmıştır. 109 numunenin yedisi COVID-19 servisi, biri yoğun bakım servisi, 101'i polikliniklerden gönderilmiştir. Semptomların varlığı açısından 0. gün (semptomların başladığı ilk gün) - 14. gün aralığında dağılmış hasta örnekleri mevcuttu.

SARS-COV-2 PCR pozitif 109 numunenin 83'ünde (%76,14) antijen testi pozitif, 88'inde (%80,73) E gen sgRNA'sı pozitif, 96'sında (%88,07) N gen sgRNA'sı pozitif, 97'sinde (%89) en az bir sgRNA bulunmuştur (Tablo 4.1). Toplam 109 numunenin 12'sinde hem E hem N sgRNA negatif, dokuzunda sadece E sgRNA negatif, birinde sadece N sgRNA negatifliği saptanmıştır.

Tablo 4.1. SARS-CoV-2 PCR pozitif örneklerde araştırılan yöntemlerin pozitiflik sayı ve yüzdeleri (n=109)

YÖNTEM	POZİTİF SAYISI	YÜZDE
Antijen testi	83	%76,14
N sgRNA	96	%88,07
E sgRNA	88	%80,73

E sgRNA pozitif örneklerin %98,9'unda, negatif örneklerin ise %42,9'unda N sgRNA pozitif bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,0001) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. SARS-CoV-2 E ve N sgRNA pozitifliğinin birbiriyle ilişkisini gösteren sayısal değerler

	N sgRNA pozitif n(%)	N sgRNA negatif n(%)	TOPLAM n(%)
E sgRNA pozitif	87 (%98,9)	1 (%1,1)	88 (%100,0)
E sgRNA negatif	9 (%42,9)	12 (%57,1)	21 (%100,0)
TOPLAM	96 (%88,1)	13 (%11,9)	109 (%100,0)
p*	0,0001		

p*: Ki-Kare testi (Fisher's Exact Test)

E sgRNA pozitif örneklerin %80,7'sinde, negatif olanların %57,1'inde antijen testi pozitif olarak bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,023$). N sgRNA ve an az bir sgRNA pozitifliği ile antijen testinin pozitif olma durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,295$; $p=0,475$) (Tablo 4.3, Tablo 4.4, Tablo 4.5).

Tablo 4.3. SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

E sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	71 (%80,7)	17 (%19,3)	88 (%100,0)
Yok	12 (%57,1)	9 (%42,9)	21 (%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	26 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,023		

p*: Ki-Kare testi

Tablo 4.4. SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

N sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	75 (%78,1)	21 (21,9)	96 (%100,0)
Yok	8 (%61,5)	5 (%38,5)	13 (%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	26 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,295		

p*: Ki-Kare testi (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.5. SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

sgRNA varlığı (E veya N)	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	75 (%77,3)	22 (22,7)	97 (%100,0)
Yok	8 (%66,7)	4 (%33,3)	12 (%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	26 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,475		

p*: Ki-Kare testi (Fisher's Exact Test)

E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 için en az bir sgRNA pozitifliği ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=1,0$; $p=0,112$) (Tablo 4.6, Tablo 4.7).

Tablo 4.6. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

sgRNA varlığı (E veya N)	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	48 (%98,0)	1 (%2,0)	49 (%100,0)
Yok	5 (%100,0)	0 (%0,0)	5 (%100,0)
TOPLAM	53 (%98,1)	1 (%1,9)	54 (%100,0)
p*	1,0		

p*: Ki-Kare Testi (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.7. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve en az bir sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

sgRNA varlığı (E veya N)	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	24 (%50,0)	24 (%50,0)	48 (%100,0)
Yok	6 (%85,7)	1 (%14,3)	7 (%100,0)
TOPLAM	30 (%54,5)	25 (%45,5)	55 (%100,0)
p*	0,112		

p*: Ki-Kare testi (Fisher's Exact Test)

E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 için E sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1,0$; $p=0,303$) (Tablo 4.8, Tablo 4.9).

E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 için N sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=1,0$; $p=0,484$) (Tablo 4.10, Tablo 4.11).

Tablo 4.8. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

E sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	48 (%98,0)	1 (%2,0)	49 (%100,0)
Yok	5 (%100,0)	0 (%0,0)	5 (%100,0)
TOPLAM	53 (%98,1)	1 (%1,9)	54 (%100,0)
p*	1,0		

p*: Ki-Kare Testi (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.9. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve E sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

E sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	23 (%59,0)	16 (%41,0)	49 (%100,0)
Yok	7 (%43,8)	9 (%56,3)	5 (%100,0)
TOPLAM	30 (%54,5)	25 (%45,5)	55 (%100,0)
p*	0,303		

p*: Ki-Kare Testi

Tablo 4.10. E gRNA Ct değeri ≤ 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

N sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	49 (%98,0)	1 (%2,0)	50 (%100,0)
Yok	4 (%100,0)	0 (%0,0)	4 (%100,0)
TOPLAM	53 (%98,1)	1 (%1,9)	54 (%100,0)
p*	1,0		

p*: Ki-Kare Testi (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.11. E gRNA Ct değeri > 25 için SARS-CoV-2 antijen testi ve N sgRNA pozitifliğini gösteren sayısal değerler

N sgRNA varlığı	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Var	26 (%57,8)	19 (%42,2)	45 (%100,0)
Yok	4 (%40,0)	6 (%60,0)	10 (%100,0)
TOPLAM	30 (%54,5)	25 (%45,5)	55 (%100,0)
p*	0,484		

p*: Ki-Kare Testi (Fisher's Exact Test)

Asemptomatik dokuz hastanın beşinde her iki sgRNA da pozitif, bu beş hastanın sadece birinde antijen testi pozitif bulunmuştur. Bu dokuz hastanın sadece ikisinde antijen testi pozitif, üçünde de her üç test de negatif bulunmuştur.

Semptomatik 100 hasta örneğinin 81'inde antijen testi, 83'ünde E sgRNA, 91'inde N sgRNA pozitif olup en az bir sgRNA'nın pozitif olduğu 92

numune tespit edilmiştir. Semptomatik hasta örneklerinin ortalama semptom süresi $2,99 \pm 2,83$ gündür.

Komplike olmamış 79 hasta numunesinden 67'sinde (%84,81) antijen testi, 69'unda (%87,34) E sgRNA, 74'ünde (%93,67) N sgRNA, 75'inde (%94,94) en az bir sgRNA pozitif bulunmuştur.

Ağır pnömonili üç hastanın antijen testi pozitif, ikisinde N sgRNA pozitif, birinde E sgRNA pozitif tespit edilmiştir.

Hafif pnömonili 15 hasta numunesinin yedisinde (%46,67) sgRNA'lar ve antijen testi pozitif, 11'inde (%73,34) en az bir sgRNA pozitif, dördünde sgRNA'lar negatifken antijen testleri pozitif, birinde sadece N sgRNA pozitif, üçünde sgRNA'lar pozitifken antijen testleri negatif bulunmuştur.

Yoğun bakım ihtiyacı olan üç hastadan ikisinin örneği COVID-19 servisinde takipteyken alınmış olup, kliniklerinin bozulması ve ek hastalıkları nedeniyle yoğun bakıma yatırışı beklenmekteydi. Üçüncü örnek ise ağır pnömonili olarak sınıflandırılan hastanın ikinci örneğiydi. Bu üç numunenin ikisinde sgRNA'lar ve antijen testi pozitif, birinde sadece N sgRNA pozitif tespit edilmiştir.

E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 , ≤ 29 ve > 29 , < 30 ve ≥ 30 arasında antijen testi pozitifliğinde bulunan fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0001$) (Tablo 4.12, Tablo 4.13, Tablo 4.14)

Tablo 4.12. E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler

Ct değeri	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
≤ 25	53 (%98,1)	1 (%1,9)	54 (%100,0)
> 25	30 (%54,5)	25 (%45,5)	55 (%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	26 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,0001		

p*: Ki-Kare Testi

Tablo 4.13. E gRNA Ct değeri ≤ 29 ve > 29 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler

Ct değeri	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
≤ 29	62 (%88,6)	8 (%11,4)	70 (%100,0)
> 29	21 (%53,8)	18 (%46,2)	39(%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	25 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,0001		

p*: Ki-Kare Testi

Tablo 4.14. E gRNA Ct değeri <30 ve ≥30 arasında antijen testi pozitifliğiyle ilişkisini gösteren sayısal değerler

Ct değeri	Antijen Testi		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
<30	65 (%86,7)	10 (%13,3)	75 (%100,0)
≥30	18 (%52,9)	16 (%47,1)	34 (%100,0)
TOPLAM	83 (%76,1)	26 (%23,9)	109 (%100,0)
p*	0,0001		

p*: Ki-Kare Testi

Antijen testi pozitif 83 örneğin 53'ünde (%63,85) Ct ≤25, 12'sinde (%14,46) Ct 25-30, 18'inde (%21,69) Ct ≥30 bulunmuştur. Antijen testi pozitifliği Ct <29 için %88,57 (62/70), Ct ≥29 için %53,85 (21/39) bulunmuştur. SARS-CoV-2 E gRNA pozitif Ct değeri ≤25 için antijen testi pozitifliği oranı %98,15 (53/54), Ct 25-30 için %57,14 (12/21), Ct ≥30 için %52,94 (18/34) bulunmuştur.

SARS-CoV-2 E gen PCR pozitif 109 örneğin 54'ünde (%49,54) Ct ≤25 olup, bunların 53'ünde (%98,15) antijen testi pozitif, 75'inde Ct <30 olup 65'inde (%86,67) antijen testi pozitif, 55'inde Ct >25 olup 30'unda (%54,55) antijen testi pozitif bulunmuştur.

Antijen testi pozitif tespit edilen 83 hasta örneğinin E gRNA ortalama Ct değeri $24,80 \pm 5,09$; bunların 71 tanesi (%85,54) E sgRNA pozitif olup ortalama Ct değeri $30,32 \pm 3,36$; 75 tanesi (%90,36) N sgRNA pozitif olup ortalama Ct değeri $29,33 \pm 3,72$ bulunmuştur.

Antijen testi negatif tespit edilen 26 hasta örneğinin E gRNA ortalama Ct değeri $32,05 \pm 4,24$, E sgRNA ortalama Ct değeri $34,28 \pm 3,62$, N sgRNA ortalama Ct değeri $33,89 \pm 4,27$ bulunmuştur. Bu 26 örneğin 17'sinde (%65,38) E sgRNA pozitif, 21'inde (%80,77) N sgRNA pozitif saptanmıştır. Antijen testi negatif 26 örneğin 22'sinde (%84,61) en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır.

Laboratuvarımıza numunesi gelip rutinde çalışılan 109 SARS-CoV-2 PCR örneğinin ortalama Ct değeri $24,62 \pm 4,50$, saklamadan çıkarıldıktan sonra doğrulama amaçlı E gRNA çalışılan örneklerin ortalama Ct değeri $26,53 \pm 5,78$ (medyan Ct değeri=5,3) bulunmuştur. E sgRNA ortalama Ct değeri $31,09 \pm 3,74$, N sgRNA ortalama Ct değeri $30,33 \pm 4,27$ bulunmuştur. ΔCt (sgE-sgN) $1,39 \pm 2,06$, ΔCt (sgE-gE) $5,27 \pm 5,01$ bulunmuştur. Rutinde çalışılan 109 gRNA örneğinin 61 tanesinde Ct $\leq 25,48$ tanesinde Ct >25 idi. Saklamadan çıkarıldıktan sonra kontrol amaçlı çalışılan E gRNA'ların 54'ü Ct ≤ 25 , 55'i Ct >25 idi. En küçük ve en büyük Ct değerleri E gRNA için 16,44 - 40,00; E sgRNA için 23,06 - 40,00; N sgRNA için 22,29 - 39,63 saptanmıştır.

SARS-CoV-2 E gRNA'sı pozitif Ct <29 olan 70 örneğin 62'sinde (%88,57), Ct ≥ 29 olan 39 örneğin 21'inde ise (%53,85) antijen testinde pozitiflik saptanmıştır. Bu 70 örnekte E ve N sgRNA için Ct <29 ' da pozitiflik saptanma sayıları sırasıyla 61 (%87,14) ve 63 (%90), Ct ≥ 29 için sırasıyla 27 (%69,23) ve 33 (%84,62) bulunmuştur.

Subgenomik RNA pozitifliğinin semptom başlangıcından en az 10 gün sonra tespit edilebildiği çalışmamızda gösterilmiştir. Semptom süresi 10 gün olan altı hasta ve 14 gün olan bir hasta çalışmamızda vardır. Semptomları 10 gündür olan SARS-CoV-2 PCR pozitif altı hastanın ikisinde E sgRNA, dördünde N sgRNA, üçünde antijen testi pozitifliği saptanmıştır. Bu altı örnekte her üç testin de pozitif ve negatif olduğu birer hasta mevcuttu. Semptom süresi en uzun süreli (14 gün) olan komplike olmamış hastada sgRNA'lar negatif, antijen testi ise pozitif tespit edilmiştir. Komplike olmamış hasta sınıflamasında yer alan bu hasta yaygın kas ağrısı, terleme, ses kısıklığı mevcutken bu tabloya son üç gündür öksürük ve baş ağrısı eklenmiştir.

5. TARTIŞMA

SARS-CoV-2'nin doğru tespiti, hasta yönetimi ve enfeksiyon kontrolü için kritik öneme sahiptir (146). Moleküler tanının duyarlılığı COVID-19'un akut fazında oldukça yüksektir. Ancak viral RNA, replike olan virüs solunum örneklerinden izole edilebildikten çok sonra bile saptanabilir durumda kalır (70, 72, 73, 78). Antijen tespit yöntemlerinin duyarlılığı daha düşük olsa da, enfektivitenin yüksek olduğu zamanlarda doğru tespit sağladığı ve böylece SARS-CoV-2 bulaştırma olasılığı yüksek olan kişileri belirlediği düşünülmektedir (147). Uzun süreli SARS-CoV-2 RNA pozitifliği saptanabildiğinden, aktif viral replikasyon sırasında üretilen sgRNA veya negatif iplikli RNA'yı tespit etmek için moleküler yöntemler değerlendirilmiştir (70, 72, 73, 78). Subgenomik RNA tespiti ağırlıklı olarak COVID-19'u olan hastanede yatan yetişkinlerde çalışılmıştır (70, 73, 78).

Kesin olarak COVID-19 teşhisi konmuş bir hastada SARS-CoV-2 PCR testinde pozitiflik saptamak, kişinin gerçekte ne kadar bulaşıcı olduğu hakkında net bilgi vermez. Her bir konakçıdaki viral replikasyonun kinetiğini aydınlatmak ve bazı bireylerin neden ve nasıl asemptomatik kaldığı ve diğerlerinin ciddi bir klinik tablo gösterdiğini aydınlatılabilmek önemlidir. Daha da önemlisi viral dinamikleri anlamak bireysel izolasyon süresinin optimize edilmesi, sosyal mesafenin yanı sıra hastaneden taburcu olma kriterlerinin temelini oluşturacağından COVID-19'un yönetimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilecektir (4).

SARS-CoV-2 küresel bir salgına neden olarak küresel sağlığı ve dünya ekonomisini etkilemektedir. SARS'ta da 2003 yılında benzer bulgular görüldüğü gibi SARS-CoV-2 RNA'sı, klinik iyileşmeden haftalar sonra hastaların izolasyon süresini de belirleyen ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) ile saptanabilir (148). Bulaşmanın büyük bir kısmı, hastalığın başlangıcından önce ve hemen sonrasında meydana gelir (149). Bununla birlikte, klinik semptomların başlangıcından sonraki bulaşıcılığın süresi tam olarak anlaşılammıştır. Bu

süre, hastaların hastanelerdeki karantinadan taburcu edilmesine ilişkin politikanın belirlenmesiyle ilgilidir (72).

Nazofaringeal sürüntüden çalışılan RT-PCR sonuçları, hastalığın başlangıcından günler sonra bile, artık semptomları olmamasına rağmen pozitif kalan birçok vaka tarif edilmiştir. Daha da ilginç, tekrar tekrar negatif RT-PCR sonuçları ile taburcu edilen hastaların rastgele kontrol sürüntü örneklerinde yeniden pozitif RT-PCR sonuçları görülmesi rastlanabilen bir durumdur, bu da solunum sisteminden “viral klirensi” olan kişilerden bulaş riskten kaçınmak için izolasyon önlemlerinin yeniden alınmasının olası ihtiyacı hakkında endişe uyandırmaktadır (4).

Enfekte olmuş hamsterler üzerinde yapılan bir çalışmada, temasın birinci gününde hamsterlarda virüs kültürü sonuçlarının nazal yıkamalarda pozitif olduğu zaman etkin bir bulaşın olduğu, ancak nazal yıkamaların kültür negatif olduğu temas sonrası altıncı günde RT-PCR ile belirlenen viral yükün hala yüksek olduğu ancak etkin bir bulaşın olmadığı gösterilmiştir (>6 log₁₀ RNA kopya/mL) (150). Bu nedenle, virüs kültürü bulaşıcılık için iyi bir göstergeç olabilir (72).

SARS-CoV-2 enfektivitesinin, akut olarak enfekte olmuş kişilerin solunum örneklerindeki yüksek viral yükü doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle birçok ülkede, klinik tanı amacıyla ziyade potansiyel enfektiviteyi saptamak ve enfeksiyonun yayılmasını kontrol etmeye yardımcı olmak için antijen testlerinin kullanılması önerilmiştir. Böylece AgT, 2020 sonbaharından bu yana test stratejilerinin önemli bir parçası haline gelmiştir (115, 151).

Oldukça bulaşıcı SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte olmuş bireylerin tanımlanması ve izolasyonu önemli bir halk sağlığı stratejisidir. Antijen testleri, yerinde test için zamanında sonuçlar ve fizibilite nedeniyle büyük ölçekli taramalar için umut verici araçlardır. Bununla birlikte, antijen testlerinin bulaşıcı

bireyleri tespit etmedeki tanısal performansı henüz tam olarak belirlenmemiştir. Antijen bazlı testler hali hazırda mevcut, düşük maliyetli ve hızlı bir şekilde sonuç verdiklerinden COVID-19'a neden olan virüs olan SARS-CoV-2'yi test etmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Sonuçların çabuk alınması, bulaşa neden olabilecek kişilerin hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlayabilir ve verimli izolasyon ve temas takibini mümkün kılabilir. Bu nedenle antijen testleri, özellikle toplu ortamlarda oldukça faydalı tarama testleridir. Ancak asemptomatik bireylerde bazı antijen testlerinin duyarlılığı, qPCR ile karşılaştırıldığında düşük bulunmaktadır (120, 152-156).

Korenkov ve ark., Standard Q COVID-19 Ag testinin (SD Biosensor Inc., Güney Kore) SARS-CoV-2 ile enfekte ve muhtemelen bulaştırıcı bireyleri tespit etmedeki performansını değerlendirmek ve karşılaştırmak için 2028 nazo/orogaringeal sürüntü örneği araştırmış, qPCR ve virüs kültürü çalışmışlardır. Numunelerin 210 tanesinde qPCR pozitif saptanmışlardır. Antijen testi 92 (%4,54) numunede pozitif sonuç vermiş ve sırasıyla %42,86 ve %99,89 genel duyarlılık ve özgüllük bulmuşlardır. Belirlenen Ct değerleri; <20 (n=14), <25 (n=57) ve <30 (n=88) için antijen testi sırasıyla %100, %98,25 ve %88,64 duyarlılıkta saptamışlardır (156). Bizim çalışmamızda pozitif SARS-CoV-2 PCR sonuçlu hastalarda antijen testi pozitifliği %76,14 saptanmıştır. Çalışmamızda ise pozitif PCR sonuçlu hastalarda Ct \leq 25 için %98,15 (n=54), Ct <30 için %86,67 (n=75) bulunmuş olup Korenkov ve ark.'nın sonuçlarıyla benzer görünmektedir. Korenkov ve ark., kültür pozitif 29 örneğin tamamı AgT tarafından tespit edilmiştir. Genel duyarlılığın düşük olmasına rağmen AgT'nin SARS-CoV-2 bulaştırması muhtemel yüksek RNA yüklerine sahip bireylerin tespiti için değerli bir araç olabileceği çıkarımında bulunmuşlardır (156).

SARS-CoV-2 antijen testlerinin klinik duyarlılığı genel olarak RT-PCR testlerinden (%72,6-%97,6) daha düşüktür (157). Bizim çalışmamızda, 109 pozitif numunede antijen testinin saptama oranı %76,14 olup bu aralıkta yer almaktadır. Başka bir antijen testini değerlendiren bir çalışmada, 106 SARS-

CoV-2 RT-PCR pozitif numune için genel duyarlılık oranı %30,2 bulunmuştur (158).

Porte ve ark., floresan immünokromatografik SARS-CoV-2 antijen testi ile yaptıkları çalışmada 127 hastadan 82'sinde RT-PCR pozitif, antijen testinin genel duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %93,9 ve %100 olarak saptamışlardır. Yüksek viral yüke sahip numunelerde duyarlılık önemli ölçüde daha yüksek gözlemlenmiştir. Porte ve ark., %64,57 antijen testi pozitifliği saptamışken bu oran bizim çalışmamızda %76,14 olarak saptanmıştır. Ayrıca antijen testi pozitif örneklerin %63,85'i nispeten yüksek viral yükü gösteren Ct \leq 25 değerindedir ve bu Porte ve ark.'nın sonucuyla uyumlu görünmektedir. Antijen testi, özellikle moleküler yöntemlere sınırlı erişimin olduğu durumlarda SARS-CoV-2'nin erken teşhisi için önemli bir araç olma potansiyeline sahiptir. Ek olarak Porte ve ark., değerlendirdikleri antijen bazlı immünofloresan testlerinin, esas olarak COVID-19'un ilk haftasında başvuran hastalardan elde edilen solunum örneklerinde yüksek bir duyarlılık ve özgüllük gösterdiğini ifade etmişlerdir (159).

Ford ve ark., antijen FIA (Fluorescent Immunoassay) duyarlılığı semptomatik ve asemptomatik hastalar arasında sırasıyla %78,9 ve %43,8 tespit etmişlerdir (160). Çalışmamızda ise pozitif saptama oranı bu hastalar arasında sırasıyla %81 ve %44,45 bulunmuştur ve Ford ve ark. ile oldukça örtüşmektedir. Ct değerleri $<$ 29 olan örneklerde antijen testi pozitifliği $>$ %90 bulunmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki Ct $<$ 29 için bu oran %88,57 bulunmuş olup benzer sonuç alınmıştır. Pozitif viral kültür için antijen testinin pozitif prediktif değerini (%57,7) qPCR'ye (%59,3) benzer gözlemlenmiştir (121).

Scheiblaue ve ark.'nın, CE sertifikalı 122 antijen testinin duyarlılığını değerlendirdikleri çalışmada, SARS-CoV-2 AgT duyarlılığının oldukça değiştiğini belirtmişlerdir. Ct \leq 25 değeri için %75'lik duyarlılık sınırı, değerlendirilen 122 testin 96'sı tarafından karşılanmış; 26 test daha düşük hassasiyet göstermiş ve bunlardan birkaçı tamamen başarısız olmuştur. Bazı AgT'ler yüksek hassasiyet sergilemiştir (örn. Ct $<$ 30 için %97,5). Değerlendirdikleri AgT'nin çoğunu, yüksek

viral yük ile ilişkili akut enfeksiyonların hızlı tanımlanması için uygun görmüşler, SARS-CoV-2 AgT'nin piyasaya erişimi, duyarlılık ve özgüllük için minimum gereksinimlere dayanması gerektiğini ifade etmişlerdir. Scheiblaue ve ark., bu çalışmada da kullandığımız test olan Humasis COVID-19 antijen testinin duyarlılığını Ct \leq 25, Ct >25–30 arası, Ct \geq 30, Ct 17–36 arası için sırasıyla %88,2, %21,7, %0, %40 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda SARS-CoV-2 E gen pozitif 109 örneğin 54'ünde Ct \leq 25, bunların 53'ünde (%98,15) antijen testi pozitif, 55'inde Ct >25 olup 30'unda (%54,55) antijen testi pozitif bulunmuş olup yüksek viral yük ile antijen testi pozitifliği arasındaki ilişkiyle uyumlu görünmektedir. İlginç bir şekilde Scheiblaue ve ark.'nın 122 antijen testini değerlendirdikleri çalışmada, Ct \geq 30 eşik değerinde Humasis antijen testi dahil 105 antijen testinde hiç pozitiflik saptayamamışlarken, bizim çalışmamızdaki antijen testinde ise 109 örnekten 18 tanesinde saptanmıştır. Avrupa'da mevcut çoğu Doğu-Asya menşeli testlerin neredeyse tamamında, kullanma talimatı (instructions for use; IFU) duyarlılık değerlerinin >%90 olduğunu belirtilmiştir. Bu tür ifadeler, Scheiblaue ve ark.'nın sonuçlarıyla ve diğer bazı çalışmalarla zıtlık göstermekte olup, düşük Ct değerindeki PCR pozitifliği olan örneklerin önceden seçilmesi ve/veya az sayıda örnek içeren çalışmaların verdiği yanıltıcı sonuçlar ile açıklanabilir (115,150).

Tariq ve ark.'nın 150 numunede yaptıkları araştırmada, SARS-CoV-2 qPCR pozitif numunelerinde (n=51) iki farklı antijen testinde duyarlılıkları %74,5 ve %53,49, özgüllükleri %100 olarak saptamışlardır. Düşük analitik duyarlılığa rağmen, her iki AgT de hücre kültürü pozitif numunelerde (n=15) %100 pozitiflik tespit etmişler ve enfeksiyöz virüsü sgRNA pozitif olanlardan ayırt etmede etkili (10/15) bulmuşlardır. Verilerinin, AgT'lerin kültürde saptanabilir SARS-CoV-2'yi güvenilir bir şekilde tespit ettiğini; bu nedenle, potansiyel olarak bulaştırıcı bireylerin hızlı tespiti için önemli bir araç olarak hizmet edebileceği çıkarımında bulunmuşlardır (160).

Dinnes ve ark.'nın meta-analiz çalışmasında antijen testi açısından 943 örnek üzerinde beş çalışmayı değerlendirmişler ve duyarlılığın çalışmalar

arasında önemli ölçüde değiştiğini göstermişlerdir (%0'dan %94'e). Ortalama duyarlılık %56,2 ve ortalama özgüllük %99,5 olarak tespit etmişlerdir. Toplam 2255 örnek üzerinde yapılan 11 çalışmada moleküler yöntemleri inceledikleri meta-analiz çalışmasında moleküler yöntemlerin duyarlılığını antijen testlerine kıyasla daha az değişiklik gösterdiğini saptamışlar (%68'den %100'e), ortalama duyarlılığı %95,2 ve ortalama özgüllüğü %98,9 olarak bulmuşlardır. Yüksek doğruluğa sahip hızlı testlerin, RT PCR testi için kişileri seçme veya RT-PCR'nin bulunmadığı yerlerde kullanılma potansiyeline sahip olduğunu, bununla birlikte mevcut durumda kanıtların yeterince güçlü olmadığı için bu testlerin pratikte kullanılabilir kadar iyi olup olmadığını söyleyebilmek için acilen daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (161).

Çalışmamızda kullanılan Humasis antijen testi kitinin içeriğinde hem N hem de S proteinine özgü monoklonal antikorların olması, antijen testindeki tespit oranının yüksekliğini (%76,14), E ve N sgRNA tespit oranına yaklaşan yüksekliğini açıklayabilir. Ancak antijen testi negatif 26 örneğin 22'sinde (%84,61) en az bir sgRNA pozitif saptanması dikkat çekicidir.

Subgenomik RNA tespitine yönelik yaklaşımlar yeni sayılmasa da bu konudaki sınırlı çalışma mevcuttur. Viral kültür ve subgenomik RNA tespiti ile belirlenen replikatif virüsün, hafif hastalığı olan hastalarda semptomların başlamasından sekiz veya dokuz gün sonra bulunmadığı bildirilmiştir (45, 72). Bununla birlikte, şiddetli hastalığı olan hastalarda viral saçılma daha uzun süre gözlenmiştir (162, 163). Van Kampen ve ark. orta-şiddetli hastalığı olan hastalarda semptom başlangıcından 22 gün sonrasına kadar kültürlenebilir virüs saptamıştır (70). Çalışmamızdaki örneklerde, semptomların başlamasından 10 gün sonrasındaki hastalarda da sgRNA ve antijen testi pozitifliği saptanmıştır. Semptom süresi en uzun süreli (14 gün) olan hastada sgRNA'lar negatif, antijen testi ise pozitif tespit edilmiştir. Bu durum PCR testinin alt saptama limitinin altında viral RNA miktarı olması ile de açıklanabilir.

Hasta örneklerinden kültürde virüs tespitinin, aktif enfeksiyonu ve yüksek bulaştırıcılığı gösterdiği varsayılmaktadır (164, 165). Bununla birlikte, düşük qPCR Ct değerlerine sahip örnekler için bile viral kültürün duyarlılığı düşüktür (135). Ayrıca, kültürlenebilir virüsün yokluğu, bulaşıcı virüsün bulunmadığını göstermemekte olup çoğu tanı veya tarama ortamında viral kültür uygulanabilir değildir (12). Daha düşük Ct değerleri ve sgRNA saptanması, daha yüksek viral yük ve bir numuneden daha yüksek pozitif viral kültür olasılığı ile ilişkiliklen bu ek analizler tanı amacıyla kullanılmamaktadır (45, 72, 134, 135, 166-169). Çalışmamızdaki gibi PCR ile sgRNA tespiti ile replikasyon olarak aktif virüsü tespit ederek bulaşıcılığı, dolayısıyla varlığı birlikte tespit edilebilir.

Sonuçlar değişkenlik gösterse de, Ct değeri (aynı kişinin numunesindeki bir RT-PCR testinde) düşük olduğunda (<25) antijen testlerinin pozitif olma olasılığı daha yüksektir (24). RT-PCR testleri gibi nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT), hasta örneklerinde bulaşıcı olabilecek çok küçük miktarlarda viral genomik materyali tespit edebilir. Her iki test türünün de kişilerin en yüksek viral yüke sahip oldukları COVID-19 semptomlarının gelişmesinden hemen önceki veya hemen sonraki dönemde pozitif olması muhtemeldir; ancak pozitif antijen testlerinin viral kültür sonuçlarıyla daha iyi korele olduğu ve dolayısıyla bulaşıcılığı göstermede daha faydalı olabileceği bildirilmiştir. Viral yükün asemptomatik ve semptomatik enfeksiyonlar arasında farklılık gösterip göstermediği henüz doğrulanmamıştır (147, 170).

Kim ve ark., 20 COVID-19 hastasından alınan toplam 189 numunede genomik ve subgenomik RNA PCR'ı ve virüs kültürlerini çalışmıştır. Bu 189 örneğin 62'si (%33) pozitif kültür sonucu, 93'ü (%49) negatif, kalan 34'ü (%18) belirsiz sonuç vermiştir. Hücre kültürü sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, N ve S genlerinin gRNA ve sgRNA'sının duyarlılıkları %100, ancak sgRNA'nın (N %65 ve S %68) özgüllüğü, gRNA'ninkinden daha yüksek tespit etmişlerdir (N, %23 ve S, %17). Pozitif kültür ve sgRNA'nın ortalama tespit edildiği süreler semptom başlangıcından sonra sırasıyla $11,39 \pm 10,34$ ve $13,75 \pm 11,22$ gün iken, gRNA'nın süresi semptom başlangıcından sonra $22,85 \pm 11,83$ günken, immün

sistemi baskılanmış hastalar hariç tutulduğunda, pozitif kültür, sgRNA ve gRNA'nın ortalama süreleri $8,47 \pm 3,93$, $10,65 \pm 5,70$ ve $20,35 \pm 8,44$ olarak saptanmışlardır. Sonuç olarak Kim ve ark., çalışmalarında sgRNA'nın viral kültür negatife döndükten birkaç gün sonra tespit edilebildiğini, ancak sgRNA tespiti ile değerlendirilen ortalama viral yayılım süresinin, gRNA'ya göre orta/kritik seyirli hastalarda virüs kültürününkine çok daha benzer olduğunu gözlemlemişlerdir (171). Çalışmamızda en uzun semptomatik süresi olan hasta 14 gün olup bu hastada sgRNA'lar negatiftir, 10 gündür semptomu olan örneklerde ise sgRNA pozitifliği tespit edilmiş olup bu durum Kim ve ark. ile uyumlu görünmektedir. Ek olarak çalışmamızda ilk semptomundan sonraki üçüncü günde hastaneye başvurup pozitif SARS-CoV-2 PCR sonucu olan bir hastada antijen testi ve sgRNA'lar pozitif saptanmış olup, iyileştikten sonra tekrar verdiği örnek incelendiğinde (ilk semptomunda sonra 15 gün geçmiştir) gRNA pozitif, E ve N sgRNA'larda hala pozitiflik edilmişken antijen testi negatif saptanmıştır. Bu durum antijen testinin duyarlılığı kaynaklı olabilir. Kim ve ark.'nın sonuçlarıyla uyumlu olarak sgRNA'ların 14. ve 15. günde de tespit edilebileceği çalışmamızda da gösterilmiştir. Kim ve ark., sgRNA saptamasının, farklı hastalık şiddeti olan hastalardan alınan çeşitli solunum örneklerini kullanarak canlı virüsü yansıtmadığını kapsamlı bir şekilde araştırmışlardır. Subgenomik RNA tespitinin, süresi virüs kültüründekine benzer olduğu ve semptom başlangıcından itibaren en erken dönemde en yüksek pozitif oranı verebildiği için, enfektif viral saçılma süresini doğru bir şekilde tahmin ettiğini gösterebileceği çıkarımında bulunmuşlardır. Subgenomik RNA tespitini semptom süresi ve SARS-CoV-2 kültür pozitifliği ile karşılaştırmalarının, SARS-CoV-2 genomik RNA tespitinin ötesinde bulaşıcılığa dayalı yaklaşımda önemli bir ilerleme sağlayabileceğini ve daha iyi teşhis stratejisinin geliştirilmesine yönelik daha fazla çalışma yapılmasına dikkat çekmişlerdir (171).

Bununla birlikte, membran yapılarıyla sıkı bir şekilde ilişkili SARS-CoV-2 sgRNA'sı, hücrel RNazlardan korunabilir, bu nedenle enfekte hastalardan subgenomik RNA'ların tespiti her zaman aktif replike olan virüsün göstergesi olmayabilir (71). Ek olarak, aynı numunedeki viral subgenomik RNA/viral

genomik RNA'lara oranının incelendiği bir çalışmada, COVID-19'un geç seyri olan hastalarda bu oranın azaldığı gösterilmiştir (45). Dolayısıyla, viral sgRNA'ların viral gRNA'lara oranının belirli bir eşik değerinin (cut-off), canlı viral saçılımı daha kesin olarak yansıtip yansıtmadığını tespit etmede daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür (171).

Immergluck ve ark., SARS-CoV-2 ile enfekte hücrelerde en çok bulunan sgRNA olan nükleokapsit (N) sgRNA'nın qPCR saptamasını, SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan semptomatik ayakta tedavi gören hastalarda N antijen tespiti ile karşılaştırmışlardır (73, 172). Semptomatik ayaktan hastalar arasında, nazal sürüntü örneklerinden SARS-CoV-2'nin sgRNA tespiti antijen testi ile uyumlu bulmuşlar, ancak antijen testi negatif kişilerden alınan 16 nazofaringeal sürüntü örneğinin 13'ünde (%82,1) sgRNA saptamışlardır. SARS-CoV-2 sgRNA'sını, antijen pozitif hastalardan alınan tüm numunelerde (toplam 28/28) tespit etmişlerdir. Ancak antijen testi negatif kişilerde sgRNA tespiti, SARS-CoV-2 RNA-pozitif nazal (0/4) ve nazofaringeal (13/16) sürüntü örnekleri arasında değişiklik göstermiştir. Bu durumun sadece nazofaringeal örneklerde daha yüksek insan selüler materyalinden kaynaklanmadığını, burun deliği civarında yetersiz viral replikasyona bağlı düşük düzeyde sgRNA ve nükleokapsit antijeni üretimine bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Nazal sürüntü örneklerindeki sgRNA'nın, aktif virüs replikasyonunu tanımlamak için rutin teşhis için faydalı olabileceği belirtmişlerdir. Sonuç olarak, nazal sürüntü örneklerinde sgRNA tespitinin, nükleokapsit antijeni ile ilişkili olduğunu ve enfektiviteyi değerlendirmek için moleküler bir test olarak uygulanabileceğini vurgulayarak sgRNA, nükleokapsit antijeni ve toplam SARS-CoV-2 RNA arasındaki güçlü korelasyon göz önüne alındığında, verilerinin aktif replikasyon belirteçleri olarak antijen testinin kullanımını veya qPCR Ct eşik değerlerinin oluşturulmasını da destekleyebileceği çıkarımında bulunmuşlardır (172). Çalışmamızda 100 semptomatik hasta örneğinin 81'inde antijen testi pozitifken, 91'inde N sgRNA pozitifliği tespit edilmiştir. Antijen testi negatif tespit edilen 26 hasta örneğinin 21'inde (%80,77) N sgRNA tespit edilmiştir. Bu 26 örneğin 17'sinde (%65,38) E sgRNA pozitif, 22'sinde (%84,61) en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır.

Immergluck ve ark.'nın antijen testi negatif örneklerdeki N sgRNA tespit oranları bizim çalışmamızdaki oranlara benzer bulunmuştur (172).

Perera ve ark., Hong Kong'da 32'si hafif seyirli olan 35 SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçiren hastalardan alınan 68 solunum örneğini araştırmışlar, SARS-CoV-2 N sgRNA'sının, hastalığın başlangıcından sekiz gün sonra nadiren saptanabildiğini, bununla birlikte virüs RNA'sının, RT-PCR ile haftalarca saptanabildiğini belirtmişlerdir (72). Çalışmamızda semptom başlangıcından 10 gün sonraki örneklerde de sgRNA tespiti yapılabildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda da hafif seyirli ve komplike olmamış hastalarda da 10 gün sonra antijen testi pozitifliği görülmüş olması örnek sayısı artırıldığında sgRNA'ların daha geç sürelerde de tespit edilebileceğini düşündürmektedir. Perera ve ark., virüs kültürü ve sgRNA'sı çalışılan 33 örnekte, her iki test pozitifliği 12 örnek (%36,4), sgRNA pozitif ve kültür negatif 7 örnek (%21,2), kültür pozitif ve sgRNA negatif 2 örnek (%6.1) tespit etmişlerdir ki bu durum istatistik olarak virüs kültürü ile sgRNA tespitini orta derecede uyumlu göstermiştir (72). Dünya Sağlık Örgütü, Haziran 2020'de COVID-19 hastalarını izolasyondan çıkarmak için yönergelerini değiştirmiştir (yani, semptomların başlamasından 10 gün sonra ve semptomsuz >3 ek gün), ancak bu kılavuzlar hafif ve ağır hasta hastalar arasında ayırım yapmamaktadır (10). Perera ve ark.'na göre, hafif veya orta derecede hastalığı olan hastaların semptomların başlamasından sekiz gün sonra daha az bulaşıcı olabileceğini düşündürmektedir. Klinik olarak iyileşen ve bağışıklığı baskılanmayan hafif derecede hastalar, diğer son derece hassas kişilerin bulunduğu ortamlara (örneğin yaşlı bakım evleri) taburcu edilmedikleri sürece semptomların başlamasından >9 günlük izolasyondan sonra taburcu edilebilebileceği önerisini sunmuşlardır. Ek olarak ağır seyirli ve bağışıklığı baskılanmış hastaların enfeksiyöz virüsü çok daha uzun süreler boyunca yayabileceğini ve bu saçılmanın kortikosteroid tedavisi ile de uzayabileceğini belirtmişlerdir (72).

COVID-19 geçirip iyileştikten sonra negatif SARS-CoV-2 PCR sonucu olan bazı hastalarda, bu sonuçtan sonra yeni enfeksiyonu düşündüren herhangi

bir semptomu olmayıp tekrar alınan örneklerde pozitif RT-PCR test sonuçları olmuştur (173, 174). Bu tür hastaların bulaşıcılığının olup olmadığı ve karantinaya alınması gerekip gerekmediği bilinmemektedir. RT-PCR viral kültürün aksine virüsün canlı ve bulaşıcı olup olmadığına belirlenmesine izin vermez (45). Liotti ve ark., hastalardaki PCR pozitifliğinin mutlak bir yansıması olmasa da viral taşıyıcılığın göstergesi olarak, kültürde virüs replikasyonu yerine geçebilecek bir yöntem olarak SARS-CoV-2 sgRNA'sını kullanmışlardır. Bu amaçla, replikatif SARS-CoV-2 RNA varlığı için önceden negatif sonuçları olan COVID-19'lu iyileşmiş hastalardan RT-PCR yeniden test edilip pozitif bulunmuş 176 hastada nazal/orofaringeal sürüntü (NOS) örneklerini araştırmışlar, 176 NOS örneğinden 32'si (%18,2) toplam SARS-CoV-2 RNA için pozitif, $1,6 \times 10^1$ - $1,3 \times 10^4$ SARS-CoV-2 RNA kopya/ml arasında değişen viral yük tespit etmişlerdir. COVID 19 teşhisi sırasında 32 hastadan alınan örnekler de test edildiğinde tümünde replikatif SARS CoV-2 RNA'sı (sgRNA) saptamışlardır (175). Diğer raporlara benzer şekilde, kurumlarında COVID-19 olan hastaların %18'i, klinik iyileşme ve önceki negatif sonuçların ardından SARS-CoV-2 RNA için RT-PCR pozitif tespit etmişlerdir (175, 176). Tekrar pozitif test edilen 32 hastadan sadece birinde (%3,1) (hipertansiyon, diyabet ve kardiyovasküler hastalığı olan daha yaşlı bir yetişkinmiş) sgRNA tespit etmişlerdir ki bu da tekrarlayan enfeksiyon veya reenfeksiyon olduğunu düşündürmüştü ancak hiçbir tam genom dizilimi ve filogenetik analiz yapılmadığı için bu ayrımın mümkün olmadığını belirtmişlerdir (175). Çalışmamızda ilk semptomundan üç gün sonra COVID-19 tanısı konup bundan 12 gün sonra iyileşip örnek vererek tekrar pozitif SARS-CoV-2 PCR sonucu çıkan bir hastada E ve N sgRNA'da hala pozitiflik tespit edilmiştir. İyileşip tekrar solunum yolu örneği veren sadece bir hasta numunesi çalışmamızda mevcut olup COVID-19 geçirip iyileşmiş hastalar odaklı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Yüksek viral yük ve erken dönemde boğazdan alınan sürüntüler, üst solunum yollarının dokularında potansiyel virüs replikasyonunu göstermektedir. Viral sgRNA, sadece enfekte olmuş hücrelerde kopyalanır ve virionlara paketlenmez ve bu nedenle numunelerde aktif olarak enfekte olmuş hücrelerin

varlığını gösterdiği kabul edilmektedir. Bu nedenle Wölfel ve ark. histopatolojinin yokluğunda aktif virüs replikasyonunun kanıtını olarak viral sgRNA'ların tespiti için klinik örneklerden RT-PCR testleri gerçekleştirmişlerdir (45). Üst solunum yolu dokularında aktif virüs replikasyonu kanıtı sağlayan dokuz COVID-19 vakasının ayrıntılı bir virolojik analizini sunmuşlardır. Bu analize göre faringeal virüs saçılımı semptomların ilk haftasında çok yüksek olup ve 4. günde boğaz sürüntüsü başına $7,11 \times 10^8$ RNA kopyası ile zirve yapmıştır. Enfeksiyöz virüs, yüksek konsantrasyonlarda virüs RNA'sına rağmen, boğazdan veya akciğerden alınan numunelerden kolaylıkla izole edilmiş, ancak dışkı numunelerinden izole edilmemiştir. Kan ve idrar örneklerinde virüs saptanmamıştır. Boğazdaki aktif replikasyon, boğaz numunelerinde sgRNA mevcudiyeti ile desteklenmiştir. Viral RNA'nın balgamdan saçılımı, semptom bitişinden sonra da devam etmiştir. Serokonversiyon, hastaların %50'sinde (ve tüm hastalarda 14. günde) yedi gün sonra meydana gelmiş, ancak bunu viral yükte hızlı bir düşüş takip etmemiştir (45).

Wölfel ve ark. viral sgRNA seviyelerini aynı numunedeki viral gRNA ile karşılaştırmışlardır. Boğaz sürüntülerinde, 5. günden sonraki sürüntülerde hiçbir sgRNA saptamamışlardır. Balgamdan alınan aktif replikasyonun olduğu 4. ve 9. gün arasında alınan numunelerde, genom başına sgRNA oranını yaklaşık %0,4 olarak hesaplamışlardır. Bu durum bizim ve diğer çalışmalarda olduğu gibi sgRNA'ların daha yüksek Ct değerlerinde tespitini de nispeten açıklayabilir. Bu verilere dayanarak, semptomların başlamasından sonraki ilk beş gün boyunca boğazda SARS-CoV-2'nin aktif replikasyonunun olduğunu, dışkıda replikasyon belirtisi bulamadıklarını belirtmişlerdir (45). Bulaşıcılığın solunum yollarından başka şekillerle de olabileceğini sgRNA'lar ile kapsamlı olarak araştırmak önemli veriler sunabilir.

Rodríguez-Grande ve ark., nazofaringeal örneklerden E gen sgRNA analiz ettikleri ilk tanısal RT-PCR'den itibaren uzun süreli viral SARS-CoV-2 saçılımı (24-101 gün) olan 60 RT-PCR pozitif vakanın numunelerini değerlendirmişlerdir. COVID-19 klinikleri %40 hafif, %40 ağır, %20 orta seyirli

olan persistan vakaların 12/60'ında (%20) viral sgRNA, semptomların başlamasından 28 ila 79 gün sonra tespit etmişlerdir. Uzun süreli SARS-CoV-2 PCR pozitif vakaların bir kısmında, aktif olarak replike olan virüsün varlığı teşhisin ötesinde olabileceğini, uzun süreli viral saçılımı olan COVID-19 vakaları için de bulaşıcılığın söz konusu olabileceğini vurgulamışlardır (79). Çalışmamızdaki 14 gündür semptomu olan tek hastada sgRNA'lar negatif, 10 gün olan altı hastanın ikisinde her iki sgRNA pozitif, ikisinde N sgRNA pozitif bulunmuştur. Dolayısıyla uzun süreli semptomatik vakalarda viral sgRNA'ların da pozitif olabileceği gösterilmiş olup, bulaşıcılık açısından bu durumun ayrıca irdelenmesi gerekmektedir.

Bazı yazarlar, hücre kültüründeki örneklerin analizine dayalı olarak uzun süreli RT-PCR pozitif sonuçları olan vakalarda canlı virüsün varlığını dışlamıştır. Pozitif RT-PCR sonuçları 21 güne kadar uzayan bir dizi vakada, başlangıçtan sekiz günden sonra alınan numunelerde hücre kültüründe tespit yapılmamıştır. Dokuz vaka ile sınırlı bir çalışmada başlangıçtan yedi günden sonra hiçbir virüs hücre kültüründe tespit edilmemiş, persistan RT-PCR pozitif vakalardan alınan 108 örnekte semptom başlangıcından ortalama 44 gün sonra hücre kültüründen virüs tespit edilmemiştir (45, 167, 176).

Hücre kültürü yöntemlerinin duyarlılığı sınırlıdır ve replikasyonu veya sitopatik bir etkinin saptanması için numunelerde asgari bir virüs yükü gereklidir. RT-PCR pozitif numunenin Ct değeri >30 veya viral yük $<10^6$ kopya/ml olduğunda, numuneler aktif enfeksiyonu olan vakalardan olsa bile hücre kültürlerinden virüs geri kazanımı olmayabileceğini gösteren çalışmalar da vardır (45, 176). SARS-CoV-2'nin zirve viral yükü, semptomların başlangıcına yakın görünür ve buradan ilerleyici bir düşüş başlar (134, 167). Uzun süreli pozitif RT-PCR sonuçları olan birçok vaka, kültürde replikatif virüslerin tespitini sınırlayan düşük viral yüke sahip olabilir (79). Dolayısıyla sgRNA'ların PCR tespiti ve hücre kültürü kıyaslamalarında bu duruma dikkat etmek gerekir. Düşük miktardaki sgRNA'ları PCR ile saptayabilmek, bu durumda hücre kültürüne göre avantajlı olabilir. O yüzden bu kıyaslamayı farklı Ct değerlerinde

değerlendirmek bu durumu aydınlatıcı olabilir. Ayrıca, farklı cihaz ve kitlerde Ct değerinin değişebileceği akılda tutulmalıdır.

Moreira ve ark., São Paulo Üniversite Hastanesi'nde yatan nazo/orofarengeal sürüntü örnekleri SARS-CoV-2 PCR negatif olan 74 hastanın dışkı örneklerini incelemişler, burada gRNA, E/N gen sgRNA incelemesi yapmışlardır. Viral RNA, ortalama Ct değeri $27,4 \pm 6,0$ (ortalama \pm SD) ile dışkı örneklerinin %23'ünde (17/74) tespit etmişlerdir. Bu pozitif numunelerde, N ve E sgRNA'ları sırasıyla %94,11 (16/17) ve %58,82 (10/17) oranında tespit etmişlerdir. E sgRNA ortalama Ct değeri $31,20 \pm 4,66$, N sgRNA ortalama Ct değeri $30,54 \pm 6,17$, E ve N sgRNA'lar arasındaki ortalama Ct farkı (Δ Ct) değeri $4,43 \pm 0,61$, E ve N sgRNA'lar ile gRNA Ct farkı değerleri sırasıyla ortalama $7,22 \pm 1,42$ ve $2,93 \pm 1,83$ bulunmuşlardır (91). Çalışmamızda dışkı numunesi değil solunum yolu örnekleri kullanılmış olup; E gRNA çalışılan örneklerin ortalama Ct değeri $26,53 \pm 5,78$ bulunmuştur. E sgRNA ortalama Ct değeri $31,09 \pm 3,74$, N sgRNA ortalama Ct değeri $30,33 \pm 4,27$ bulunmuştur. Δ Ct (sgE-sgN) $1,39 \pm 2,06$, Δ Ct (sgE-gE) $5,27 \pm 5,01$ bulunmuştur. Çalışmamızda N ve E sgRNA'ları sırasıyla %88,07 (96/109) ve %80,73 (88/109) oranında tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda E sgRNA pozitif örneklerin %98,9'unda, negatif örneklerin ise % 42,9'unda N sgRNA pozitif bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0001$). Dolayısıyla N sgRNA tespitinin, E'ye kıyasla daha avantajlı olabileceği düşünülmüştür. Bu iki çalışmaya göre N sgRNA, E sgRNA'ya göre daha erken Ct değeri vermektedir ki bu durum, N sgRNA'nın viral replikasyon sırasında en çok eksprese edilen transkript olabileceğiyle açıklanabilir (177, 178). Wölfel ve ark., yatan hastalarda dışkıda E gen sgRNA hiç saptayamamışken Moreira ve ark. saptamışlardır (45, 91). Moreira ve ark., birden fazla sgRNA'nın tespiti, viral replikasyonun bir belirteci olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, dışkıda viral tespit, özellikle enfekte olduğundan şüphelenilen ancak ÜSY örneklerinde negatif sonuç veren hastalarda COVID-19 tanısına yardımcı olabileceğini vurgulamışlardır (91). Dolayısıyla bulaşıcılığı değerlendirmede

sgRNA'ları solunum yolu örnekleri dışında da tespit etmek mümkündür ve bu konuda ileri araştırmalar gereklidir.

Santos Bravo ve ark., sgRNA ve viral kültür sonuçlarında, 99/105 vakada (%94) uyum gözlemlemişlerdir. sgRNA RT-PCR, replike olan virüsü tespit etmek için %97'lik bir duyarlılık ve %94'lk bir pozitif prediktif değer göstermiş ve sgRNA'nın SARS-CoV-2 enfektivitesinin bir belirteci olarak destekleyebileceğini belirtmişlerdir (179). Çalışmamızda ise SARS-COV-2 PCR pozitif 109 numunenin 88'inde (%80,73) E gen sgRNA'sı pozitif, 96'sında (%88,07) N gen sgRNA'sı pozitif, 97'sinde (%89) en az bir sgRNA bulunmuştur. Bu oranlar Santos Bravo ve ark.'nın çalışmasıyla uyumlu görünmektedir.

Davies ve ark., çalışmalarında E sgRNA'ların E gRNA'larından önce kaybolduğunu, bazı kişilerin sgRNA pozitifliğinin 68 güne kadar uzadığını, potansiyel olarak aktif olan virüsün 10 günlük bir srenin ötesinde de varlığını sürdürebileceğini, böylece potansiyel olarak ileri zamanlarda da bulaşma riski oluşturabileceğini yorumlamışlardır (180).

Deming ve ark., çalışmalarında SARS-CoV-2'nin tanısıl RT-PCR ile tespiti viral RNA için oldukça hassas olsa da viral replikasyon ürünü olan sgRNA tespitinin replikasyonu daha doğru bir şekilde tanımlayabileceğini belirtmiştir. alışmalarında RT-PCR pozitif olan 1932 sürüntü örneğinin 767'sinde (%40) sgRNA tespit etmişlerdir. Tanısıl PCR viral yük eşiğinin 5,1 log₁₀ kopya/mL'nin üzerindeyken, örneklerin %96'sının saptanabilir sgRNA'ya sahip olduğunu belirtmişlerdir. Tanısıl amaçlı gerçekleştirilen gRNA ile sgRNA viral yük eğrisinde %80 aynı gün pik yaptıklarını ancak gRNA saptama süresinin 14 günken sgRNA'nın sekiz gün olduğunu belirterek farklılıklar olabileceğini göstermişlerdir (181).

Persistan olarak asemptomatik kişiler için, antijen testleri bulaştırıcılığın olduğu zamanı tespit edebilir, ancak asemptomatik kişiler için test duyarlılığı tam olarak belirlenmemiştir (120). Schulte ve ark. tarafından yapılan kapsamlı

bir çalışmada, bir toplulukta SARS-CoV-2 tarama programına katılan 3419 kişi için bir antijen testi, RT-PCR ve viral kültür sonuçları karşılaştırılmıştır. Antijen testi performansının duyarlılık ve özgüllüğü RT-PCR ile kıyaslandığında sırasıyla, semptomatik kişiler için %64,2 ve %100, asemptomatik kişiler için %35,8 ve %99,8 olarak ölçülmüştür (182). Çalışmamızda SARS-CoV-2 PCR pozitif hastalarda %76,14 (83/109) olarak, semptomatik hastalarda %81 (81/100), asemptomatik hastalarda %44,45 (4/9) antijen testi pozitifliği saptanmıştır. Viral kültür ile kıyaslandığında antijen testinin duyarlılığı, semptomatik kişiler için %92,6 ve asemptomatik kişiler için %78,6 saptanmıştır. Dolayısıyla, semptomatik hastalıkta ve kültürlenebilir virüs varlığında antijen testi duyarlılığının RT-PCR'dan daha yüksek olup; özgüllüğün ise hem semptomatik hem de asemptomatik kişiler için yüksek olduğu çıkarımına varmışlardır (119).

Antijen testi kullanımı, çalışan eğitimi ve özellikle diğer önleme ve kontrol önlemleri ile birleştiğinde ve toplum yükünün orta veya yüksek olduğu durumlarda, enfekte olmuş çalışanların erkenden tespit edilerek SARS-CoV-2'yi işyerinde yayma riskini azaltabilir. Tanı amaçlı semptomatik veya maruz kalan kişilerin tanı testlerinin aksine; asemptomatik, maruz kalmayan çalışanların tarama testlerinin amacı işyerinde viral bulaşmayı önlemektir. Bu tür testleri başlatmak için önemli bir durum, iş gücünün ciddi anlamda azaldığı bir toplulukta yüksek COVID-19 yükünün olmasıdır. Diğer durumlar arasında iş gücünü oluşturan bireyler arasında bir salgın olması, ciddi COVID-19 hastalığı riski yüksek çalışanların olması veya işyerine gelen diğer bireylerin güvenliğini sağlama isteği yer alabilir (182).

Manzulli ve ark., nazofarengeal RT-PCR örneği pozitif olan ancak klinik olarak iyileşmiş 84 hastada hücre kültürü çalışması yapmışlar ve 83'ünde kültür negatif olarak bulmuşlar, hücre kültürü süpernatantlarını RT-PCR ile çalıştırdıklarında da negatif sonuç tespit etmişlerdir. Klinik olarak iyileştikten üç gün sonra incelenen bu örneklerde hücre kültüründeki negatif sonuca bağlı olarak muhtemelen hastaların bulaştırıcılıkları olmadığı sonucuna varmışlardır.

Çalışmalarında, semptomların başlamasından yaklaşık 20 gün sonra iyileşen COVID-19 hastalarında bir takip kontrolü sırasında yapılan nazofaringeal sürüntü örneklerinde RT-PCR pozitifliğinin, virüs kültürü ile oluşturulan enfeksiyöz virüsün varlığı ile örtüşmediğini göstermişlerdir. Bu bulguların ana anlamı, RT-PCR ile saptanan rezidü virüs bileşenlerinin varlığına rağmen, vakaların >%98'inde klinik olarak iyileşen hastaların artık bulaştırıcı olmadığıdır (4). Bullard ve ark., replikasyonu değerlendirme amacıyla SARS-CoV-2'nin varlığını incelemek için 90 PCR pozitif örneğin viral kültürde incelendiği retrospektif, kesitsel bir çalışma gerçekleştirmiş, 90 RT-PCR pozitif numuneden 26'sında (%28,9) viral kültürde SARS-CoV-2 üremesini göstermişlerdir. RT-PCR Ct değeri >24 olan ve sekiz günden fazla süredir semptomu olan COVID-19 hastalarının bulaşıcı olma olasılığının düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Ayrıca Ct değerindeki her bir birim artışın pozitif kültür olasılığını %32 azalttığını belirtmişlerdir (167). Bullard ve ark.'nın 90 PCR pozitif numunesinde Ct medyan değeri 23, bizim çalışmamızda ise 25,3 bulunmuştur. Enfeksiyöziteyi sgRNA ile değerlendirdiğimiz çalışmamızda SARS-CoV-2 pozitif 109 numunenin 97'sinde (%89) en az bir sgRNA pozitif tespit edilmiş olup Bullard ve ark.'nın hücre kültürüne dayalı sonucuna göre farklılık göstermektedir (167). Bu durum hücre kültürde replikatif virüslerin tespitini sınırlayan düşük viral yüke sahip olabilir. Hasta grubu net olarak belirtilmese de, semptom başlangıcından 21 güne kadar olan SARS-CoV-2 PCR pozitif hastaların bir kısmında uzamış saçılıma bağlı virüs düşüklüğünden dolayı hücre kültüründe görece düşük bir tespit oranı saptanmış olabilir. Çalışmamızda semptom başlangıcından 14 güne kadar değişen aralık da replikatif virüs tespiti açısından Bullard ve ark.'na göre yüksek saptama değerini açıklayabilir.

La Scola ve ark., Ct değerleri ile virüsü *in vitro* izole etme olasılığı arasında korelasyon olduğunu belirtmişler; çalışmalarında 183 numunelik bir gruptan, virüs izolasyonu her zaman (%100) Ct'si 13 ile 17 arasında olan sürüntülerde meydana gelmiş ve Ct >34'te viral kültürde üreme gözlenmemiştir (134). Ancak, Singanayagam ve ark.'nın Ct değeri >35 olan örneklerde düşük oranda (%8,3) kültür pozitifliği gözlemledikleri bulgularının aksine, Ct değeri \geq 34

olan örneklerde virüs saptamamışlardır (134, 183). Bu durum farklı içerik ve hedeflerle hazırlanmış olan SARS-CoV-2 PCR kitlerindeki Ct sonuçlarının birbirleri ile uyumlu ve kıyaslanabilir olmadığına göstergesi olabilir. Kantitatif PCR testlerinde Ct değerlerinden öte, örneklerle birlikte çalışılan yükü bilinen referans materyalle kıyaslanarak elde edilen kantitatif sonuçlar kullanılmaktadır. Farklı testlerin Ct değerlerinin birbirleri ile uyumu zayıf olabilecektir.

Van Kampen ve ark., şiddetli/kritik COVID-19'u olan 129 hastadan alınan numunelerle yaptıkları çalışmalarında, hafif ve orta dereceli vakalara kıyasla olası daha uzun bir enfeksiyöz viral bulaşma olduğunu göstermiştir. Viral yük ile virüsü *in vitro* izole etme olasılığı arasında bir korelasyon gözlemlemişlerdir. 10 kopyadan az viral yüklerde veya semptomların başlamasından 15,2 gün sonra bu olasılığın %5'ten daha az bir azalma gözlemlemişlerdir. Viral yük $>7 \log_{10}$ RNA kopya/ml olduğunda, kültürde SARS-CoV-2'nin geri kazanımı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, viral yükü $<6,63 \log_{10}$ RNA kopya/ml olan örneklerin sadece %5'i kültürlenebilir virüs vermiştir (70). Wölfel ve ark., hastaneye yatırılan 9 COVID-19 hastasını değerlendirirken benzer bir eğilim gözlemlemiştir. Hasta numuneleri kantitatif qPCR ve viral kültür ile test edilerek ve sonuçlar viral geri kazanımın ve viral yüklerin semptomların ilk haftasında zirveye ulaştığını göstermiştir. Sekiz günlük semptomların ötesinde toplanan hiçbir örnekte viral kültür pozitif saptanmamış olup ve viral yükü $\leq 5,4 \log_{10}$ RNA kopyası/ml olan örneklerin $<5\%$ inde replikatif virüs saptanmıştır (46).

Singanayagam ve ark., RT-PCR Ct değerleri ile viral kültürde SARS-CoV-2'yi geri kazanma yeteneği arasındaki olası ilişkiyi araştırmışlardır. RT-PCR ile pozitif olan ve ardından Vero E6 hücrelerine aşılana 324 üst solunum yolu örneğini incelemişlerdir. Toplam 324 örnek arasında medyan Ct değeri 31,2 tespit etmişler, asemptomatik, hafif-orta veya şiddetli hastalığı olan hastalar arasında Ct değerlerinde istatistiksel bir fark gözlemlememişlerdir. En az 10 gün semptomları olan hastaların üst solunum yolu örneklerinden, vakaların sadece %6'sında SARS-CoV-2 tespit etmişlerdir. Ancak RT-PCR Ct

değeri >35 olan 60 örneğin beşinde (%8,3) viral kültürde SARS-CoV-2 saptamışlardır (183). Benzer bir çalışmada La Scola ve ark., viral kültürde SARS-CoV-2'nin geri kazanımı ile RT-PCR Ct değerleri arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. Toplam 183 RT-PCR pozitif numuneden, Ct değeri 13 ile 17 arasında olan örneklerin %100'ünde kültürlenebilir virüs varlığını göstermişlerdir. Artan Ct değerleriyle kültür pozitifliği oranında kademeli bir düşüş gözlemişlerdir. Ancak, Singanayagam ve ark.'nın Ct değeri >35 olan örneklerde düşük oranda (%8,3) kültür pozitifliği gözlemledikleri bulgularının aksine, Ct değeri ≥ 34 olan örneklerde virüs saptamamışlardır (134, 183). Bu durum farklı içerik ve hedeflerle hazırlanmış olan SARS-CoV-2 PCR kitlerindeki Ct sonuçlarının birbirleri ile uyumlu ve kıyaslanabilir olmadığını gösterebilir. Kantitatif PCR testlerinde Ct değerlerinden öte, örneklerle birlikte çalışılan yükü bilinen referans materyalle kıyaslanarak elde edilen kantitatif sonuçlar kullanılmaktadır. Farklı testlerin Ct değerlerinin birbirleri ile uyumu zayıf olabilecektir.

Solunum yolu ve dışkı örnekleri dışında da çeşitli sgRNA araştırmaları gerçekleştirilmiştir. Casagrande ve ark., SARS-CoV-2 RNA'yı retinal biyopsilerin 7/14'ünde ve optik sinir biyopsilerinin 10/13'ünde tespit etmiştir. SARS-CoV-2 spike proteininin immünohistokimyası negatif ve virüs izolasyonu başarısızken, sgRNA saptayabilmişlerdir. Pozitif SARS-CoV-2 sonuçlu örneklerde retinal biyopsilerde 2/5 (%40); optik sinir biyopsilerinde 6/10 (%60) sgRNA tespit etmişlerdir. Çalışmamızda SARS-CoV-2 PCR pozitif solunum yolu örneklerinde 97/109 (%89) en az bir sgRNA pozitifliği saptanmıştır. Replikasyon tipik olarak solunum yollarında tariflense de retinal sinir ve optik sinirdeki bu replikatif virüs pozitifliği dikkat çekicidir. Ancak Casagrande ve ark.'nın çalışmasında COVID-19 nedeniyle ölmüş 14 hastadan alınan 14 göze otopsi yapılmıştır. Dolayısıyla bu yükseklik olağan karşılanabilir. Subgenomik RNA varlığı, nöronal dokuda SARS-CoV-2 enfeksiyonuna işaret edebilir, ancak virüs izolasyonu başarısız olduğundan ve SARS-CoV-2 spike proteininin immünohistokimyası negatif olduğundan, aktif bir enfeksiyonu olası görmemişlerdir (184). SARS-CoV-2 aktif enfeksiyonun tespitinde, sgRNA tespitini bu çalışmada yapıldığı gibi hücre

kültürü ve immünohistokimya gibi ek bir yöntem kullanmak, daha doğru bir analiz sağlayabilecektir.

Çeşitli çalışmalarda sgRNA varlığının virüs replikasyon/transkripsiyonu ile korele olduğunu belirtmiş ancak bu varsayım, koronavirüs RNA'sının zarla ilişkili doğası ve bunların konak hücre yanıtından ve RNazlarda stabilitesi/korunması ile ilgili durumlar dikkate alındığında doğru olmayabilir (45, 71). Tam olarak anlaşılmasa da, virüsün hem replikasyon hem de transkripsiyonun, enfekte olmuş hücrelerin sitoplazmasındaki çift zarlı veziküllerde gerçekleştiği düşünülmektedir. Alexandersen ve ark. çalışmalarında, enfeksiyonun ilk tespitinden sonraki 17 güne kadar olan numunelerde SARS-CoV-2 sgRNA'larının tespitini ve sadece bu tür numunelerin PCR pozitifliği için değil, aynı zamanda farklı yayınlardaki PCR yöntemlerinin sonuçlarındaki tutarsızlıklar için de olası bir açıklama sunmuşlardır. Genel olarak, subgenomik RNA'ların aktif koronavirüs replikasyonu/enfeksiyonunun bir göstergesi olmayabileceğine, ancak virüs genomu RNA'sına benzer şekilde bu RNA'ların oldukça kararlı olabileceğine, hücre zarları ile yakın ilişkisi nedeniyle uzun bir süre için saptanabilir olduğuna dair bulgular sunmuşlardır. Aktif enfeksiyondan sonra sgRNA'ların önemli bir süre boyunca mevcut olabileceğini anlamının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Alexandersen ve ark., çalışmalarında rutin tanısal orofaringeal/nazofaringeal sürüntülerde SARS-CoV-2 subgenomik RNA'larının, ilk tespitten sonraki NGS ve PCR ile sırasıyla 17. ve 11. günde saptayabilmişlerdir (71).

Alexandersen ve ark.'nın çalışmalarına uyumlu olarak hastanede yatan hastalardan alınan sürüntü örneklerinde van Kampen ve ark., klinik semptomların başlamasından 22 gün sonrasına kadar E sgRNA saptamıştır (70, 71). Bu nedenle tanısal numunelerde SARS-CoV-2 sgRNA'larının varlığının ve dolayısıyla tespitinin oldukça uzun bir aralıkta olduğu ve sonuç olarak aktif virüs replikasyonu/transkripsiyon veya aktif/persistan enfeksiyon için iyi bir belirteç/gösterge olmadığını ifade etmişlerdir (71). Yine de birtakım çalışmada,

aktif enfeksiyon göstergesi olarak sgRNA tespiti kullanılmaya devam etmiştir (72, 89, 90). Alexandersen ve ark.'nın çalışmalarındaki sonuçlara göre, SARS-CoV-2 genomik ve subgenomik RNA'ların teşhis örneklerinde geç enfeksiyonda/aktif enfeksiyondan sonra bile bulunduğunu desteklemektedir. Virion RNA'sı gibi sgRNA'lar oldukça stabildir ve muhtemelen nükleazlardan koronavirüs RNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu desteklediği bilinen çift membranlı veziküller hücresel membranlar tarafından korunurlar (10, 47). Wölfel ve ark. tarafından yapılan çalışmanın aksine, klinik semptomların başlamasından sonraki ilk günden 22 gün sonrasına kadar solunum sürüntülerinde PCR ile E geni sgRNA'sını saptayan van Kampen ve ark. tarafından açıklanan bulgularla tutarlı olarak, Alexandersen ve ark. tarafından PCR ve NGS ile geç enfeksiyonda sgRNA'ların saptanması ilk saptamadan sonra sırasıyla 11 ve 17 güne kadar uzayabildiğini göstermiştir. Bu iki çalışma ciddi semptomları olan, yatan hastalara odaklansa da Alexandersen ve ark. çalışmalarında hafif semptomları olan ayaktan hastaları incelemiştir. Ancak Alexandersen ve ark., tüm sgRNA'ların tespitinde PCR ve NGS kullanırken diğer iki çalışma sadece E sgRNA'sına PCR uygulanmıştır. Virion genomik RNA'sından daha düşük seviyelerde sgRNA tespiti, NGS gibi bir yöntem kullanılmadıkça aktif enfeksiyonun doğrudan kanıtı olamayabileceği çıkarımına varılmıştır (10, 47, 71).

Çalışmamızda çeşitli kısıtlamalar mevcuttur. Enfeksiyöziteyi değerlendirmede hücre kültürü gibi ek bir yöntem kullanılmamıştır. Hastaların kliniği uzun süreli takip edilmemiştir. Antijen testlerindeki geniş aralıkta olan duyarlılık farkından dolayı tek bir antijen testi seçilerek gerçekleştirilen kıyaslama çalışmaları da değişken sonuç verebilecektir. Viral yük, semikantitatif bir yöntem olan Ct eşik değeri ile değerlendirilmiştir.

Çoğu yayında sgRNA'ların direkt olarak enfeksiyözite göstergesi olarak kabul edilip bunun üzerinden çıkarım yapılmaya çalışılsa da tek başına sgRNA ile enfeksiyözite değerlendirmesi yapmak kesin bir sonuç vermeyebilir. Dolayısıyla hücre kültürü gibi bir yöntem eklenerek yapılan çalışmalar ile

bulaşıcılığı değerlendirmede sgRNA'nın rolü ve enfektivite tespit imkanı daha çok aydınlatılabilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SARS-CoV-2 sgRNA'ların klinik etkilerine ilişkin sınırlı veriler göz önüne alındığında; patojenitede oynadıkları rolün, işledikleri mekanizmaların ve terapötik hedeflerin potansiyellerini ortaya çıkarmak için üzerinde çalışılması gereken pek çok konu mevcuttur.

SARS-COV-2 pozitif 109 numunenin 83'ünde (%76,14) antijen testi pozitif (26 negatif), 88'inde (%80,73) E gen sgRNA'sı pozitif (21 negatif), 96'sında (%88,07) N gen sgRNA'sı pozitif (13 negatif) bulunmuştur. En az bir sgRNA'nın pozitif olduğu örneklerin %77,3'ünde, negatif olanların %66,7'sinde antijen testi pozitif bulunmuş olup bu fark istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,475$).

N sgRNA, E sgRNA'dan pozitiflik oranı ve daha düşük Ct'de pozitiflik vermesi açısından daha önplanda görülmektedir. Antijen testi ve sgRNA'ların pozitiflik oranı benzer görülmektedir, bu açıdan antijen testleri enfektiviteyi değerlendirmeye elverişli olabilir. E sgRNA pozitif örneklerin %80,7'sinde, N sgRNA pozitif örneklerin %78,1'inde antijen testi pozitif saptanmıştır. E sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,023$). E sgRNA pozitif örneklerin %98,9'unda, negatif örneklerin ise %42,9'unda N sgRNA pozitif bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,0001$).

E gRNA Ct değeri ≤ 25 ve > 25 , ≤ 29 ve > 29 , < 30 ve ≥ 30 arasında antijen testi pozitifliğinde bulunan fark istatistik olarak anlamlıdır ($p=0,0001$). Antijen testinin yüksek Ct değerlerinde tespit oranında üç değer için de anlamlı düşme gösterilmiştir.

Antijen testi kitinin içeriğinde hem N hem de S proteinine özgü monoklonal antikorların olması, antijen testindeki tespit oranının yüksekliğini açıklayabilir.

Sadece etkeni değil; bulaştırıcılığı da tespit edebilmek pandemi gibi koşullarda karantina süresini ve karantinaya kimin alınacağı gibi izolasyon kapsamalarını, sağlık politikalarını, tedavi protokollerini önemli ölçüde değiştirebilir ve toplumların sosyo-ekonomik işleyişinin sürdürülebilirliğine katkı sunabilir. Daha kısa iyileşme süresi olan, hastanede yatış süresi nispeten daha az olan hastaları içeren hücre kültürü ve sgRNA tabanlı ileri çalışmalar, hastanede kalış süresini ve sosyal izolasyon süresini kısaltabilecektir.

Pek çok yayında sgRNA'ların direkt olarak enfeksiyözite göstergesi olarak kabul edilip bunun üzerinden yorum yapılmıştır, ancak sgRNA'ların enfeksiyözite göstergesi olarak kullanılabilmesini göstermek için ileri ve geniş kapsamlı çalışmalar (örn. NGS, sonuçların viral kültürle desteklenmesi gibi) gerekli görünmektedir. Subgenomik RNA'ların oldukça değişken aralıkta tespit edilebilmesi enfeksiyonun akut mu yoksa uzamış, persistan veya tekrarlayan bir enfeksiyon olup olmadığının araştırılmasını gerekli kılmakta, bu konudaki araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Membran yapılarıyla ilişkili SARS-CoV-2 sgRNA'larının hücresel RNazlardan korunabildiği, bu nedenle enfekte hastalardan sgRNA tespitinin her zaman aktif replike olan virüsün göstergesi olmayabileceği akılda tutulmalıdır.

Hücre kültürüne dayalı yöntemler ile replike olabilen virüsü göstermek önemli bir göstergeç olsa da pandemi koşullarında sürekli uygulayabilir değildir. COVID-19 tanısında PCR yöntemi yaygın olarak kullanıldığından, yine PCR'a dayalı enfeksiyözite tespit veya yorumu yapabilmek önemli olacaktır. Viral yükün bir göstergesi olmasına rağmen Ct değerleri kullanılan kitler arasındaki ve aynı kitle tekrarlanan örnekler arasındaki değişkenlik sebebi ile bu konuda da kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü: COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi. Bilim Kurulu Çalışması, T.C. Sağlık Bakanlığı. 29 Haziran 2020, Ankara.
2. World Health Organization (2020) Novel coronavirus (2019-nCoV) Situation Report 11, 31 January 2020 [Online].
Erişim: [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330776>]
Erişim Tarihi: 10.04.2021
3. World Health Organization (2020). Novel coronavirus (2019-nCoV) Situation Report, 11 March 2020 [Online].
Erişim: [<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>].
Erişim Tarihi: 10.04.2020
4. Manzulli V, Scioscia G, Giganti G, Capobianchi MR, Lacedonia D, Pace L, Cipolletta D, Tondo P, De Nittis R, Rondinone V, Serrecchia L, Parisi A, Galante D, Lo Caputo S, Santantonio TA, Moschetta D, Dattoli V, Fasanella A, Foschino Barbaro MP. Real Time PCR and Culture-Based Virus Isolation Test in Clinically Recovered Patients: Is the Subject Still Infectious for SARS-CoV2? J Clin Med. 2021 Jan 15;10(2):309.
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DG, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MP, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020 Jan;25(3):2000045.
6. Demirhan R, Çimenoğlu B, Yılmaz E. The Effects of Hospital Organization on Treatment During COVID-19 Pandemic. SCIE 2020;31:89–95.
7. World Health Organization (2020). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020 [Online].
Erişim: [<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>].
Erişim Tarihi: 10.09.2020
8. Pan Y, Guan H. Imaging changes in patients with 2019-nCov. Eur Radiol. 2020 Jul;30(7):3612-3613.
9. Shah N, Davariya V, Gupta SK, Gajjar P, Parmar J, D'Cruz L. Review: An insight into coronaviruses: Challenges, security and scope. Rev Med Virol. 2020 Nov;30(6):1-8.

10. Snijder EJ, Bredenbeek PJ, Dobbe JC, Thiel V, Ziebuhr J, Poon LL, Guan Y, Rozanov M, Spaan WJ, Gorbalenya AE. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol.* 2003 Aug 29;331(5):991-1004.
11. Memikoğlu O, Genç V. COVID-19. E-Kitap, Ankara Üniversitesi Basımevi (Ed). 2020.
12. Berghella V, Hughes BL. (2020) COVID-19: Pregnancy issues [Online]. Erişim:[<https://www.uptodate.com/contents/covid-19-overview-of-pregnancy-issues>]. Erişim Tarihi 10.01.2021
13. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193-292.
14. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Mar;17(3):181-192.
15. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, Zhu H, Zhao W, Han Y, Qin C. From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses.* 2019 Jan 14;11(1):59.
16. Tatar B, Adar P. SARS-CoV-2: Mikrobiyoloji ve Epidemiyoloji. *İzmir Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi.* 2020;30:27-35.
17. Pascarella G, Strumia A, Pilięo C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, Scarlata S, Agrò FE. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. *J Intern Med.* 2020 Aug;288(2):192-206.
18. Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct;20(4):660-94.
19. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology.* 2019 May 27;16(1):69.
20. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, He S, Zhou Z, Zhou Z, Chen Q, Yan Y, Zhang C, Shan H, Chen S. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jul;10(7):1228-1238.
21. Tanriverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlu B. COVID-19 etkeninin özellikleri. Çiçek C, editör. *Mikrobiyoloji ve COVID-19.* 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.7-14.
22. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020 Jun;215:108427.

23. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.
24. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CA, Rottier PJ. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*. 2003 Aug;77(16):8801-11.
25. Mancía G, Rea F, Ludergnani M, Apolone G, Corrao G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockers and the Risk of Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Jun 18;382(25):2431-2440.
26. Fosbøl EL, Butt JH, Østergaard L, Andersson C, Selmer C, Kragholm K, Schou M, Phelps M, Gislason GH, Gerds TA, Torp-Pedersen C, Køber L. Association of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor or Angiotensin Receptor Blocker Use With COVID-19 Diagnosis and Mortality. *JAMA*. 2020 Jul 14;324(2):168-177.
27. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020 Aug 25;324(8):782-793.
28. Li X, Cheng Z, Wang F, Chang J, Zhao Q, Zhou H, Liu C, Ruan J, Duan G, Gao S. A Negative Feedback Model to Explain Regulation of SARS-CoV-2 Replication and Transcription. *Front Genet*. 2021 Feb 26;12:641445.
29. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, Song Y, Xia J, Guo Q, Song T, He J, Yen HL, Peiris M, Wu J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med*. 2020 Mar 19;382(12):1177-1179.
30. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, Vavricka CJ, Iwamoto A, Li T, Gao GF. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol*. 2010 Nov;84(22):11849-57.
31. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, Wang X, Yuan J, Li T, Li J, Qian S, Hong C, Wang F, Liu Y, Wang Z, He Q, Li Z, He B, Zhang T, Fu Y, Ge S, Liu L, Zhang J, Xia N, Zhang Z. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19;71(16):2027-2034.
32. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol*. 2020 Jun;92(6):568-576.

33. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai AC, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in microbiology*. 2016;24(6):490-502.
34. Tok TT, Tatar G. Structures and functions of coronavirus proteins: Molecular modeling of viral nucleoprotein. *Int J Virol Infect Dis*. 2017;2(1):001-7.
35. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B, Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):270-273.
36. Qian Z, Travanty EA, Oko L, Edeen K, Berglund A, Wang J, Ito Y, Holmes KV, Mason RJ. Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Jun;48(6):742-8.
37. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*. 2020 Mar 13;7(1):11.
38. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020 Apr;5(4):562-569.
39. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). 2021 Jul 30. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-.
40. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARSCoV- 2 proteins. *Journal of Molecular Biology*. 2020.
41. Yuan F, Wang L, Fang Y, Wang L. Global SNP analysis of 11,183 SARSCoV-2 strains reveals high genetic diversity. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2020.
42. Khailany AR, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* 2020: 1-6.
43. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020;92(4):418-23.
44. Tatar B, Adar P. SARS-CoV-2: Mikrobiyoloji ve epidemiyoloji. *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi*. 2020;30(Ek sayı):27-35.
45. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink

- S, Schneider J, Ehmann R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May;581(7809):465-469.
46. Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914-921.e10.
47. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015 Nov;2(1):265-88.
48. Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002433.
49. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol*. 1995;380:499-506.
50. Zúñiga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L. Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol*. 2004 Jan;78(2):980-94.
51. Parker MD, Lindsey BB, Leary S, Gaudieri S, Chopra A, Wyles M, Angyal A, Green LR, Parsons P, Tucker RM, Brown R, Groves D, Johnson K, Carrilero L, Heffer J, Partridge DG, Evans C, Raza M, Keeley AJ, Smith N, Filipe ADS, Shepherd JG, Davis C, Bennett S, Sreenu VB, Kohl A, Aranday-Cortes E, Tong L, Nichols J, Thomson EC; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Wang D, Mallal S, de Silva TI. Subgenomic RNA identification in SARS-CoV-2 genomic sequencing data. *Genome Res*. 2021 Apr;31(4):645-658.
52. Wang D, Jiang A, Feng J, Li G, Guo D, Sajid M, Wu K, Zhang Q, Ponty Y, Will S, Liu F, Yu X, Li S, Liu Q, Yang XL, Guo M, Li X, Chen M, Shi ZL, Lan K, Chen Y, Zhou Y. The SARS-CoV-2 subgenome landscape and its novel regulatory features. *Mol Cell*. 2021 May 20;81(10):2135-2147.e5.
53. Stern DF, Kennedy SI. Coronavirus multiplication strategy. I. Identification and characterization of virus-specified RNA. *J Virol*. 1980 Jun;34(3):665-74.
54. Patel RK, Burnham AJ, Gebhart NN, Sokoloski KJ, Hardy RW. Role for subgenomic mRNA in host translation inhibition during Sindbis virus infection of mammalian cells. *Virology*. 2013 Jul 5;441(2):171-81.
55. Wu HY, Brian DA. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 6;107(27):12257-62.
56. Simon-Loriere E, Holmes EC. Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jul 4;9(8):617-26.

57. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol.* 1995;380:499-506.
58. Viehweger A, Krautwurst S, Lamkiewicz K, Madhugiri R, Ziebuhr J, Hölzer M, Marz M. Direct RNA nanopore sequencing of full-length coronavirus genomes provides novel insights into structural variants and enables modification analysis. *Genome Res.* 2019 Sep;29(9):1545-1554.
59. Long S. SARS-CoV-2 Subgenomic RNAs: Characterization, Utility, and Perspectives. *Viruses.* 2021 Sep 24;13(10):1923.
60. Davidson AD, Williamson MK, Lewis S, Shoemark D, Carroll MW, Heesom KJ, Zambon M, Ellis J, Lewis PA, Hiscox JA, Matthews DA. Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein. *Genome Med.* 2020 Jul 28;12(1):68.
61. Taiaroa G, Rawlinson D, Featherstone L, Pitt M, Caly L, Druce J, Purcell D, Harty L, Tran T, Roberts J, Scott N, Catton M, Williamson D, Coin L, Duchene S. Direct RNA sequencing and early evolution of SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020
62. Nomburg J, Meyerson M, DeCaprio JA. Pervasive generation of non-canonical subgenomic RNAs by SARS-CoV-2. *Genome Med.* 2020 Dec 1;12(1):108.
63. Irigoyen N, Firth AE, Jones JD, Chung BY, Siddell SG, Brierley I. High-Resolution Analysis of Coronavirus Gene Expression by RNA Sequencing and Ribosome Profiling. *PLoS Pathog.* 2016 Feb 26;12(2):e1005473.
64. Zhang Y, Guo R, Kim SH, Shah H, Zhang S, Liang JH, Fang Y, Gentili M, Leary CNO, Elledge SJ, Hung DT, Mootha VK, Gewurz BE. SARS-CoV-2 hijacks folate and one-carbon metabolism for viral replication. *Nat Commun.* 2021 Mar 15;12(1):1676.
65. Wu KE, Fazal FM, Parker KR, Zou J, Chang HY. RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Residency to Host Mitochondria and Nucleolus. *Cell Syst.* 2020 Jul 22;11(1):102-108.e3.
66. Cortese M, Lee JY, Cerikan B, Neufeldt CJ, Oorschot VMJ, Köhrer S, Hennies J, Schieber NL, Ronchi P, Mizzon G, Romero-Brey I, Santarella-Mellwig R, Schorb M, Boermel M, Mocaer K, Beckwith MS, Templin RM, Gross V, Pape C, Tischer C, Frankish J, Horvat NK, Laketa V, Stanifer M, Boulant S, Ruggieri A, Chatel-Chaix L, Schwab Y, Bartenschlager R. Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. *Cell Host Microbe.* 2020 Dec 9;28(6):853-866.e5.

67. Burtscher J, Cappellano G, Omori A, Koshiba T, Millet GP. Mitochondria: In the Cross Fire of SARS-CoV-2 and Immunity. *iScience*. 2020 Oct 23;23(10):101631.
68. Ganji R, Reddy PH. Impact of COVID-19 on Mitochondrial-Based Immunity in Aging and Age-Related Diseases. *Front Aging Neurosci*. 2021 Jan 12;12:614650.
69. Chow RD, Majety M, Chen S. The aging transcriptome and cellular landscape of the human lung in relation to SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2021 Jan 4;12(1):4.
70. van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, van den Akker JPC, Endeman H, Gommers DAMPJ, Cornelissen JJ, Hoek RAS, van der Eerden MM, Hesselink DA, Metselaar HJ, Verbon A, de Steenwinkel JEM, Aron GI, van Gorp ECM, van Boheemen S, Voermans JC, Boucher CAB, Molenkamp R, Koopmans MPG, Geurtsvankessel C, van der Eijk AA. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun*. 2021 Jan 11;12(1):267.
71. Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun*. 2020 Nov 27;11(1):6059.
72. Perera RAPM, Tso E, Tsang OTY, Tsang DNC, Fung K, Leung YWY, Chin AWH, Chu DKW, Cheng SMS, Poon LLM, Chuang VWM, Peiris M. SARS-CoV-2 Virus Culture and Subgenomic RNA for Respiratory Specimens from Patients with Mild Coronavirus Disease. *Emerg Infect Dis*. 2020 Nov;26(11):2701-2704.
73. Dimcheff DE, Valesano AL, Rumfelt KE, Fitzsimmons WJ, Blair C, Mirabelli C, Petrie JG, Martin ET, Bhambhani C, Tewari M, Lauring AS. SARS-CoV-2 Total and Subgenomic RNA Viral Load in Hospitalized Patients. *medRxiv [Preprint]*. 2021 Mar 1:2021.02.25.21252493.
74. Baang JH, Smith C, Mirabelli C, Valesano AL, Manthei DM, Bachman MA, Wobus CE, Adams M, Washer L, Martin ET, Lauring AS. Prolonged Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication in an Immunocompromised Patient. *J Infect Dis*. 2021 Jan 4;223(1):23-27.
75. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL, Barbian K, Judson SD, Fischer ER, Martens C, Bowden TA, de Wit E, Riedo FX, Munster VJ. Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer. *Cell*. 2020 Dec 23;183(7):1901-1912.e9.
76. Truong TT, Ryutov A, Pandey U, Yee R, Goldberg L, Bhojwani D, Aguayo-Hiraldo P, Pinsky BA, Pekosz A, Shen L, Boyd SD, Wirz OF, Röltgen K,

Bootwalla M, Maglente DT, Ostrow D, Ruble D, Han JH, Biegel JA, Li M, Huang C, Sahoo MK, Pannaraj PS, O'Gorman M, Judkins AR, Gai X, Dien Bard J. Increased viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection: A consecutive case series. *EBioMedicine*. 2021 May;67:103355.

77. Bhatnagar J, Gary J, Reagan-Steiner S, Estetter LB, Tong S, Tao Y, Denison AM, Lee E, DeLeon-Carnes M, Li Y, Uehara A, Paden CR, Leitgeb B, Uyeki TM, Martines RB, Ritter JM, Paddock CD, Shieh WJ, Zaki SR. Evidence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication and Tropism in the Lungs, Airways, and Vascular Endothelium of Patients With Fatal Coronavirus Disease 2019: An Autopsy Case Series. *J Infect Dis*. 2021 Mar 3;223(5):752-764.

78. Hogan CA, Huang C, Sahoo MK, Wang H, Jiang B, Sibai M, Holubar M, Mathew R, Zehnder J, Pinsky BA. Strand-Specific Reverse Transcription PCR for Detection of Replicating SARS-CoV-2. *Emerg Infect Dis*. 2021 Feb;27(2):632-635.

79. Rodríguez-Grande C, Adán-Jiménez J, Catalán P, Alcalá L, Estévez A, Muñoz P, Pérez-Lago L, García de Viedma D. Inference of Active Viral Replication in Cases with Sustained Positive Reverse Transcription-PCR Results for SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2021 Jan 21;59(2):e02277-20.

80. Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Achdout H, Stein D, Israeli O, Beth-Din A, Melamed S, Weiss S, Israely T, Paran N, Schwartz M, Stern-Ginossar N. The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*. 2021 Jan;589(7840):125-130.

81. Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, White KM, Rezelj VV, Correa Marrero M, Polacco BJ, Melnyk JE, Ulferts S, Kaake RM, Batra J, Richards AL, Stevenson E, Gordon DE, Rojc A, Obernier K, Fabius JM, Soucheray M, Miorin L, Moreno E, Koh C, Tran QD, Hardy A, Robinot R, Vallet T, Nilsson-Payant BE, Hernandez-Armenta C, Dunham A, Weigang S, Knerr J, Modak M, Quintero D, Zhou Y, Dugourd A, Valdeolivas A, Patil T, Li Q, Hüttenhain R, Cakir M, Muralidharan M, Kim M, Jang G, Tutuncuoglu B, Hiatt J, Guo JZ, Xu J, Bouhaddou S, Mathy CJP, Gaulton A, Manners EJ, Félix E, Shi Y, Goff M, Lim JK, McBride T, O'Neal MC, Cai Y, Chang JCJ, Broadhurst DJ, Klippsten S, De Wit E, Leach AR, Kortemme T, Shoichet B, Ott M, Saez-Rodriguez J, tenOever BR, Mullins RD, Fischer ER, Kochs G, Grosse R, García-Sastre A, Vignuzzi M, Johnson JR, Shokat KM, Swaney DL, Beltrao P, Krogan NJ. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*. 2020 Aug 6;182(3):685-712.e19.

82. Telwatte S, Martin HA, Marczak R, Fozouni P, Vallejo-Gracia A, Kumar GR, Murray V, Lee S, Ott M, Wong JK, Yukl SA. Novel RT-ddPCR assays for

measuring the levels of subgenomic and genomic SARS-CoV-2 transcripts. *Methods*. 2021 Apr 18;S1046-2023(21)00103-1.

83. Zhou B, Thao TTN, Hoffmann D, Taddeo A, Ebert N, Labroussaa F, Pohlmann A, King J, Steiner S, Kelly JN, Portmann J, Halwe NJ, Ulrich L, Trüeb BS, Fan X, Hoffmann B, Wang L, Thomann L, Lin X, Stalder H, Pozzi B, de Brot S, Jiang N, Cui D, Hossain J, Wilson MM, Keller MW, Stark TJ, Barnes JR, Dijkman R, Jores J, Benarafa C, Wentworth DE, Thiel V, Beer M. SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature*. 2021 Apr;592(7852):122-127.

84. Yount B, Roberts RS, Sims AC, Deming D, Frieman MB, Sparks J, Denison MR, Davis N, Baric RS. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J Virol*. 2005 Dec;79(23):14909-22.

85. Genoyer E, López CB. The Impact of Defective Viruses on Infection and Immunity. *Annu Rev Virol*. 2019 Sep 29;6(1):547-566.

86. Sun Y, Jain D, Koziol-White CJ, Genoyer E, Gilbert M, Tapia K, Panettieri RA Jr, Hodinka RL, López CB. Immunostimulatory Defective Viral Genomes from Respiratory Syncytial Virus Promote a Strong Innate Antiviral Response during Infection in Mice and Humans. *PLoS Pathog*. 2015 Sep 3;11(9):e1005122.

87. Strahle L, Garcin D, Kolakofsky D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology*. 2006 Jul 20;351(1):101-11.

88. Sethna PB, Hung SL, Brian DA. Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(14):5626-30.

89. Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, Flach B, O'Connell S, Bock KW, Minai M, Nagata BM, Andersen H, Martinez DR, Noe AT, Douek N, Donaldson MM, Nji NN, Alvarado GS, Edwards DK, Flebbe DR, Lamb E, Doria-Rose NA, Lin BC, Louder MK, O'Dell S, Schmidt SD, Phung E, Chang LA, Yap C, Todd JM, Pessaint L, Van Ry A, Browne S, Greenhouse J, Putman-Taylor T, Strasbaugh A, Campbell TA, Cook A, Dodson A, Steingrebe K, Shi W, Zhang Y, Abiona OM, Wang L, Pegu A, Yang ES, Leung K, Zhou T, Teng IT, Widge A, Gordon I, Novik L, Gillespie RA, Loomis RJ, Moliva JI, Stewart-Jones G, Himansu S, Kong WP, Nason MC, Morabito KM, Ruckwardt TJ, Ledgerwood JE, Gaudinski MR, Kwong PD, Mascola JR, Carfi A, Lewis MG, Baric RS, McDermott A, Moore IN, Sullivan NJ, Roederer M, Seder RA, Graham BS. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *N Engl J Med*. 2020 Oct 15;383(16):1544-1555.

90. van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, Avanzato VA, Bushmaker T, Flaxman A, Ulaszewska M, Feldmann F, Allen ER, Sharpe H, Schulz J, Holbrook M, Okumura A, Meade-White K, Pérez-Pérez L, Edwards NJ, Wright D, Bissett C, Gilbride C, Williamson BN, Rosenke R, Long D, Ishwarbhai A, Kailath R, Rose L, Morris S, Powers C, Lovaglio J, Hanley PW, Scott D, Saturday G, de Wit E, Gilbert SC, Munster VJ. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*. 2020 Oct;586(7830):578-582.
91. Moreira LVL, de Souza Luna LK, Barbosa GR, Perosa AH, Chaves APC, Conte DD, Carvalho JMA, Bellei N. Test on stool samples improves the diagnosis of hospitalized patients: Detection of SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNA. *J Infect*. 2021 May;82(5):186-230.
92. Rambaut A, Loman N, Pybus O, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, Connor T, Peacock T, Volz E, on behalf of COVID-19 Genomics Consortium UK. Preliminary Genomic Characterisation of an Emergent SARS CoV-2 Lineage in the UK Defined by a Novel Set of Spike Mutations. 2020.
93. Meng B, Kemp SA, Papa G, Datir R, Ferreira IATM, Marelli S, Harvey WT, Lytras S, Mohamed A, Gallo G, Thakur N, Collier DA, Mlcochova P; COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Duncan LM, Carabelli AM, Kenyon JC, Lever AM, De Marco A, Saliba C, Culap K, Cameroni E, Matheson NJ, Piccoli L, Corti D, James LC, Robertson DL, Bailey D, Gupta RK. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. *Cell Rep*. 2021 Jun 29;35(13):109292.
94. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, Robinson-McCarthy LR, Bain WG, Haidar G, Duprex WP. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. *Science*. 2021 Mar 12;371(6534):1139-1142.
95. Weisblum Y, Schmidt F, Zhang F, DaSilva J, Poston D, Lorenzi JC, Muecksch F, Rutkowska M, Hoffmann HH, Michailidis E, Gaebler C, Agudelo M, Cho A, Wang Z, Gazumyan A, Cipolla M, Luchsinger L, Hillyer CD, Caskey M, Robbiani DF, Rice CM, Nussenzweig MC, Hatzioannou T, Bieniasz PD. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife*. 2020 Oct 28;9:e61312.
96. Speranza E, Williamson BN, Feldmann F, Sturdevant GL, Pérez-Pérez L, Meade-White K, Smith BJ, Lovaglio J, Martens C, Munster VJ, Okumura A, Shaia C, Feldmann H, Best SM, de Wit E. Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. *Sci Transl Med*. 2021 Jan 27;13(578):eabe8146.
97. Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J, Liu J, Peter L, McMahan K, Tostanoski LH, He X, Martinez DR, Rutten L, Bos R, van Manen D, Vellinga J, Custers J, Langedijk JP, Kwaks T, Bakkers MJG,

Zuijdggeest D, Rosendahl Huber SK, Atyeo C, Fischinger S, Burke JS, Feldman J, Hauser BM, Caradonna TM, Bondzie EA, Dagotto G, Gebre MS, Hoffman E, Jacob-Dolan C, Kirilova M, Li Z, Lin Z, Mahrokhian SH, Maxfield LF, Nampanya F, Nityanandam R, Nkolola JP, Patel S, Ventura JD, Verrington K, Wan H, Pessaint L, Van Ry A, Blade K, Strasbaugh A, Cabus M, Brown R, Cook A, Zouantchangadou S, Teow E, Andersen H, Lewis MG, Cai Y, Chen B, Schmidt AG, Reeves RK, Baric RS, Lauffenburger DA, Alter G, Stoffels P, Mammen M, Van Hoof J, Schuitemaker H, Barouch DH. Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. 2020 Oct;586(7830):583-588.

98. Salguero FJ, White AD, Slack GS, Fotheringham SA, Bewley KR, Gooch KE, Longet S, Humphries HE, Watson RJ, Hunter L, Ryan KA, Hall Y, Sibley L, Sarfas C, Allen L, Aram M, Brunt E, Brown P, Buttigieg KR, Cavell BE, Cobb R, Coombes NS, Darby A, Daykin-Pont O, Elmore MJ, Garcia-Dorival I, Gkolfinos K, Godwin KJ, Gouriet J, Halkerston R, Harris DJ, Hender T, Ho CMK, Kennard CL, Knott D, Leung S, Lucas V, Mabbutt A, Morrison AL, Nelson C, Ngabo D, Paterson J, Penn EJ, Pullan S, Taylor I, Tipton T, Thomas S, Tree JA, Turner C, Vamos E, Wand N, Wiblin NR, Charlton S, Dong X, Hallis B, Pearson G, Rayner EL, Nicholson AG, Funnell SG, Hiscox JA, Dennis MJ, Gleeson FV, Sharpe S, Carroll MW. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nat Commun*. 2021 Feb 24;12(1):1260.

99. Zhang SK, Guo Z, Wang P, Kang LN, Jia MM, Wu ZN, Chen Q, Cao XQ, Zhao DM, Guo PP, Sun XB, Zhang JG, Qiao YL. The Potential Benefits of HPV E6/E7 mRNA Test in Cervical Cancer Screening in China. *Front Oncol*. 2020 Oct 2;10:533253.

100. Rose BR, Thompson CH, Jiang XM, Tattersall MH, Elliott PM, Dalrymple C, Cossart YE. Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 transcripts in histologically cancer-free pelvic lymph nodes of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1994 Feb;52(2):212-7.

101. Mandelbaum S, Manber Z, Elroy-Stein O, Elkon R. Recurrent functional misinterpretation of RNA-seq data caused by sample-specific gene length bias.

102. Fischer N, Indenbirken D, Meyer T, Lütgehetmann M, Lellek H, Spohn M, Aepfelbacher M, Alawi M, Grundhoff A. Evaluation of Unbiased Next-Generation Sequencing of RNA (RNA-seq) as a Diagnostic Method in Influenza Virus-Positive Respiratory Samples. *J Clin Microbiol*. 2015 Jul;53(7):2238-50.

103. Dong L, Zhou J, Niu C, Wang Q, Pan Y, Sheng S, Wang X, Zhang Y, Yang J, Liu M, Zhao Y, Zhang X, Zhu T, Peng T, Xie J, Gao Y, Wang D, Dai X, Fang X. Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta*. 2021 Mar 1;224:121726.

104. Telwatte S, Kumar N, Vallejo-Gracia A, Kumar GR, Lu CM, Ott M, Wong JK, Yukl SA. Novel RT-ddPCR assays for simultaneous quantification of

multiple noncoding and coding regions of SARS-CoV-2 RNA. *J Virol Methods*. 2021 Jun;292:114115.

105. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):1003-5.

106. Long S, Berkemeier B. Maximizing viral detection with SIV droplet digital PCR (ddPCR) assays. *PLoS One*. 2020 May 14;15(5):e0233085.

107. Piermatteo L, Scutari R, Chirichiello R, Alkhatib M, Malagnino V, Bertoli A, Iapadre N, Ciotti M, Sarmati L, Andreoni M, Ceccherini-Silberstein F, Salpini R, Svicher V. Droplet digital PCR assay as an innovative and promising highly sensitive assay to unveil residual and cryptic HBV replication in peripheral compartment. *Methods*. 2021 May 14:S1046-2023(21)00137-7.

108. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Catherine Muenker M, Moore AJ, Klein J, Lu P, Lu-Culligan A, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Tokuyama M, Venkataraman A, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Cheemarla NR, White EB, Lapidus S, Earnest R, Geng B, Vijayakumar P, Odio C, Fournier J, Bermejo S, Farhadian S, Dela Cruz CS, Iwasaki A, Ko AI, Landry ML, Foxman EF, Grubaugh ND. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol*. 2020 Oct;5(10):1299-1305.

109. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao SN, Juanola-Falgarona M, Manissero D, López-Fontanals M, Pareja J. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis*. 2020 Aug;97:225-229.

110. Jaworski E, Langsjoen RM, Mitchell B, Judy B, Newman P, Plante JA, Plante KS, Miller AL, Zhou Y, Swetnam D, Sotcheff S, Morris V, Saada N, Machado RR, McConnell A, Widen SG, Thompson J, Dong J, Ren P, Pyles RB, Ksiazek TG, Menachery VD, Weaver SC, Routh AL. Tiled-ClickSeq for targeted sequencing of complete coronavirus genomes with simultaneous capture of RNA recombination and minority variants. *Elife*. 2021 Sep 28;10:e68479.

111. World Health Organisation (2020) Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19. Interim guidance [Online].

Erişim:[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf].

Erişim Tarihi: 15.05.2021

112. Foundation for Innovative New Diagnostics (2020). SARS-CoV-2 diagnostic pipeline [Online].

Erişim:[<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline>]

Erişim Tarihi: 15.05.2021

113. ECDC (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – seventh update [Online]. Erişim:[<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-coronavirus-disease-2019-covid-19-pandemic>]
Erişim Tarihi: 15.05.2021
114. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St George K. 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 pii:e00722-20.
115. Scheiblauer H, Filomena A, Nitsche A, Puyskens A, Corman VM, Drosten C, Zwirgmaier K, Lange C, Emmerich P, Müller M, Knauer O, Nübling CM. Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021. *Euro Surveill*. 2021 Nov;26(44):2100441.
116. Wagenhäuser I, Knies K, Rauschenberger V, Eisenmann M, McDonogh M, Petri N, Andres O, Flemming S, Gawlik M, Papsdorf M, Taurines R, Böhm H, Forster J, Weismann D, Weißbrich B, Dölken L, Liese J, Kurzai O, Vogel U, Krone M. Clinical performance evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen testing in point of care usage in comparison to RT-qPCR. *EBioMedicine*. 2021 Jul;69:103455.
117. Brümmer LE, Katzenschlager S, Gaeddert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, Grilli M, Larmann J, Weigand MA, Pollock NR, Macé A, Carmona S, Ongarello S, Sacks JA, Denkinge CM. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2021 Aug 12;18(8):e1003735.
118. Binnicker MJ. Can Testing Predict SARS-CoV-2 Infectivity? The Potential for Certain Methods To Be Surrogates for Replication-Competent Virus. *J Clin Microbiol*. 2021 Oct 19;59(11):e0046921.
119. Prince-Guerra JL, Almendares O, Nolen LD, Gunn JKL, Dale AP, Buono SA, Deutsch-Feldman M, Suppiah S, Hao L, Zeng Y, Stevens VA, Knipe K, Pompey J, Atherstone C, Bui DP, Powell T, Tamin A, Harcourt JL, Shewmaker PL, Medrzycki M, Wong P, Jain S, Tejada-Strop A, Rogers S, Emery B, Wang H, Petway M, Bohannon C, Folster JM, MacNeil A, Salerno R, Kuhnert-Tallman W, Tate JE, Thornburg NJ, Kirking HL, Sheiban K, Kudrna J, Cullen T, Komatsu KK, Villanueva JM, Rose DA, Neatherlin JC, Anderson M, Rota PA, Honein MA, Bower WA. Evaluation of Abbott BinaxNOW Rapid Antigen Test for SARS-CoV-2 Infection at Two Community-Based Testing Sites - Pima County, Arizona, November 3-17, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021 Jan 22;70(3):100-105.

120. Pray IW, Ford L, Cole D, Lee C, Bigouette JP, Abedi GR, Bushman D, Delahoy MJ, Currie D, Cherney B, Kirby M, Fajardo G, Caudill M, Langolf K, Kahrs J, Kelly P, Pitts C, Lim A, Aulik N, Tamin A, Harcourt JL, Queen K, Zhang J, Whitaker B, Browne H, Medrzycki M, Shewmaker P, Folster J, Bankamp B, Bowen MD, Thornburg NJ, Goffard K, Limbago B, Bateman A, Tate JE, Gieryn D, Kirking HL, Westergaard R, Killerby M; CDC COVID-19 Surge Laboratory Group. Performance of an Antigen-Based Test for Asymptomatic and Symptomatic SARS-CoV-2 Testing at Two University Campuses - Wisconsin, September-October 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2021 Jan 1;69(5152):1642-1647.
121. Ford L, Lee C, Pray IW, Cole D, Bigouette JP, Abedi GR, Bushman D, Delahoy MJ, Currie DW, Cherney B, Kirby MK, Fajardo GC, Caudill M, Langolf K, Kahrs J, Zochert T, Kelly P, Pitts C, Lim A, Aulik N, Tamin A, Harcourt JL, Queen K, Zhang J, Whitaker B, Browne H, Medrzycki M, Shewmaker PL, Bonenfant G, Zhou B, Folster JM, Bankamp B, Bowen MD, Thornburg NJ, Goffard K, Limbago B, Bateman A, Tate JE, Gieryn D, Kirking HL, Westergaard RP, Killerby ME; CDC COVID-19 Surge Laboratory Group. Epidemiologic Characteristics Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Antigen-Based Test Results, Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR) Cycle Threshold Values, Subgenomic RNA, and Viral Culture Results From University Testing. *Clin Infect Dis.* 2021 Sep 15;73(6):e1348-e1355.
122. Bourassa L, Perchetti GA, Phung Q, Lin MJ, Mills MG, Roychoudhury P, Harmon KG, Reed JC, Greninger AL. A SARS-CoV-2 Nucleocapsid Variant that Affects Antigen Test Performance. *J Clin Virol.* 2021 Aug;141:104900.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020 Jun 9;323(22):2249-2251.
127. Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a covid-19 test result. *BMJ.* 2020 May 12;369:m1808.

128. 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.
129. Winter AK, Hegde ST. The important role of serology for COVID-19 control. *Lancet Infect Dis*. 2020 Jul;20(7):758-759.
130. Lu H, Stratton CW, Tang YW. An evolving approach to the laboratory assessment of COVID-19. *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):1812-1817.
131. Vashist SK. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Apr 5;10(4):202.
132. 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.
133. Stowell SR, Guarner J. Role of Serology in the Coronavirus Disease 2019 Pandemic. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 5;71(8):1935-1936.
134. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, Gautret P, Raoult D. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jun;39(6):1059-1061.
135. Gniazdowski V, Paul Morris C, Wohl S, Mehoke T, Ramakrishnan S, Thielen P, Powell H, Smith B, Armstrong DT, Herrera M, Reifsnnyder C, Sevdali M, Carroll KC, Pekosz A, Mostafa HH. Repeated Coronavirus Disease 2019 Molecular Testing: Correlation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Culture With Molecular Assays and Cycle Thresholds. *Clin Infect Dis*. 2021 Aug 16;73(4):e860-e869.
136. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J, Queen K, Tao Y, Paden CR, Zhang J, Li Y, Uehara A, Wang H, Goldsmith C, Bullock HA, Wang L, Whitaker B, Lynch B, Gautam R, Schindewolf C, Lokugamage KG, Scharon D, Plante JA, Mirchandani D, Widen SG, Narayanan K, Makino S, Ksiazek TG, Plante KS, Weaver SC, Lindstrom S, Tong S, Menachery VD, Thornburg NJ. 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis* 26:1266–1273.
137. Zhang SQ, Tan B, Li P, Wang FX, Guo L, Yang Y, Sun N, Zhu HW, Wen YJ, Cheng SP. Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhoea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches. *J Virol Methods*. 2014 Oct;207:204-9.

138. Tanrıverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlı B. COVID-19 Tanısı: Serolojik ve Moleküler Testler. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2020;29(Özel Sayı 1):31-37.
139. Chertow DS. Next-generation diagnostics with CRISPR. Science. 2018;360(6387):381-382.
140. Kanodia P, Prasanth KR, Roa-Linares VC, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA, Miller WA. A rapid and simple quantitative method for specific detection of smaller coterminal RNA by PCR (DeSCo-PCR): application to the detection of viral subgenomic RNAs. RNA. 2020 Jul;26(7):888-901.
141. Hornyák A, Bálint A, Farsang A, Balka G, Hakhverdyan M, Rasmussen TB, Blomberg J, Belák S. Detection of subgenomic mRNA of feline coronavirus by real-time polymerase chain reaction based on primer-probe energy transfer (P-sg-QPCR). J Virol Methods. 2012 May;181(2):155-63.
142. Frieman M, Yount B, Heise M, Kopecky-Bromberg SA, Palese P, Baric RS. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. J Virol. 2007 Sep;81(18):9812-24.
143. Menachery VD, Mitchell HD, Cockrell AS, Gralinski LE, Yount BL Jr, Graham RL, McAnarney ET, Douglas MG, Scobey T, Beall A, Dinnon K 3rd, Kocher JF, Hale AE, Stratton KG, Waters KM, Baric RS. MERS-CoV Accessory ORFs Play Key Role for Infection and Pathogenesis. mBio. 2017 Aug 22;8(4):e00665-17.
144. Di H, Madden JC Jr, Morantz EK, Tang HY, Graham RL, Baric RS, Brinton MA. Expanded subgenomic mRNA transcriptome and coding capacity of a nidovirus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Oct 17;114(42):E8895-E8904.
145. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü: COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Erişkin Hasta Tedavisi Rehberi. Bilim Kurulu Çalışması, T.C. Sağlık Bakanlığı 20 Aralık 2021, Ankara.
146. Centers for Disease Control and Prevention (2021) Healthcare workers: information on COVID-19. March 31, 2021 [Online].
Erişim: [<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp>]
Erişim Tarihi:10.04.2021
147. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking Covid-19 Test Sensitivity - A Strategy for Containment. N Engl J Med. 2020 Nov 26;383(22):e120.
148. Xiao AT, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang YJ, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. J Clin Virol. 2020 Jun;127:104346.
149. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y,

Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. 2020 May;26(5):672-675.

150. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, Kaewpreedee P, Perera RAPM, Poon LLM, Nicholls JM, Peiris M, Yen HL. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020 Jul;583(7818):834-838.

151. Michel J, Neumann M, Krause E, Rinner T, Muzeniek T, Grossegese M, Hille G, Schwarz F, Puyskens A, Förster S, Biere B, Bourquain D, Domingo C, Brinkmann A, Schaade L, Schrick L, Nitsche A. Resource-efficient internally controlled in-house real-time PCR detection of SARS-CoV-2. *Virology*. 2021 Jun 2;18(1):110.

152. CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): interim guidance for rapid antigen testing for SARS-CoV-2. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2020 [Online].

Erişim: [<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-testguidelines.html>]

Erişim Tarihi: 20.12.2020

153. CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): guidance for testing, screening and outbreak response for institutes of higher education (IHEs). Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2020 [Online].

Erişim:[<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019ncov/community/collegesuniversities/ihetesting.html>]

Erişim Tarihi: 20.12.2020

154. CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): testing guidelines for nursing homes. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2020 [Online].

Erişim: [<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/nursing-homes-testing.html>]

Erişim Tarihi: 20.12.2020

155. CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): interim considerations for SARS-CoV-2 Testing in Correctional and Detention Facilities. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2020 [Online].

Erişim: [<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/correction-detention/testing.html>]

Erişim Tarihi: 20.12.2020

156. Korenkov M, Poopalasingam N, Madler M, Vanshylla K, Eggeling R, Wirtz M, Fish I, Dewald F, Gieselmann L, Lehmann C, Fätkenheuer G, Gruell H, Pfeifer N, Heger E, Klein F. Evaluation of a Rapid Antigen Test To Detect SARS-CoV-2 Infection and Identify Potentially Infectious Individuals. *J Clin Microbiol*. 2021 Aug 18;59(9):e0089621.

157. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. December 16, 2020 [Online].

Erişim: [<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>]

Erişim Tarihi: 20.12.2020

158. Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol.* 2020 Aug;129:104455.

159. Porte L, Legarraga P, Vollrath V, Aguilera X, Munita JM, Araos R, Pizarro G, Vial P, Iruretagoyena M, Dittrich S, Weitzel T. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis.* 2020 Oct;99:328-333.

160. Tariq M, Kim DM, Kim CM, Bang MS, Lee YM, Seo JW, Kim DY, Yun NR. Viable Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Isolates Exhibit Higher Correlation With Rapid Antigen Assays Than Subgenomic RNA or Genomic RNA. *Front Microbiol.* 2021 Nov 12;12:718497.

161. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, Emperador D, Takwoingi Y, Cunningham J, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Taylor-Phillips S, Hooft L, Leeflang MM, Spijker R, Van den Bruel A; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Aug 26;8(8):CD013705.

162. Huang JT, Ran RX, Lv ZH, Feng LN, Ran CY, Tong YQ, Li D, Su HW, Zhu CL, Qiu SL, Yang J, Xiao MY, Liu MJ, Yang YT, Liu SM, Li Y. Chronological Changes of Viral Shedding in Adult Inpatients With COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19;71(16):2158-2166.

163. Han J, Shi LX, Xie Y, Zhang YJ, Huang SP, Li JG, Wang HR, Shao SF. Analysis of factors affecting the prognosis of COVID-19 patients and viral shedding duration. *Epidemiol Infect.* 2020 Jun 25;148:e125.

164. Atkinson B, Petersen E. SARS-CoV-2 shedding and infectivity. *Lancet.* 2020 Apr 25;395(10233):1339-1340.

165. Cevik M, Tate M, Lloyd O, Maraolo AE, Schafers J, Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021 Jan;2(1):e13-e22.

166. Huang CG, Lee KM, Hsiao MJ, Yang SL, Huang PN, Gong YN, Hsieh TH, Huang PW, Lin YJ, Liu YC, Tsao KC, Shih SR. Culture-Based Virus Isolation To Evaluate Potential Infectivity of Clinical Specimens Tested for COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020 Jul 23;58(8):e01068-20.

167. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, Boodman C, Bello A, Hedley A, Schiffman Z, Doan K, Bastien N, Li Y, Van Caesele PG, Poliquin G. Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis*. 2020 Dec 17;71(10):2663-2666.
168. Salvatore PP, Dawson P, Wadhwa A, Rabold EM, Buono S, Dietrich EA, Reses HE, Vuong J, Pawloski L, Dasu T, Bhattacharyya S, Pevzner E, Hall AJ, Tate JE, Kirking HL. Epidemiological Correlates of Polymerase Chain Reaction Cycle Threshold Values in the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*. 2021 Jun 1;72(11):e761-e767.
169. Manabe YC, Reuland C, Yu T, Azamfirei R, Church T, Brown DM, Sewell TT, Hardick JP, Blair PW, Heaney CD, Pekosz A, Thomas DL. Variability of Salivary and Nasal Specimens for SARS-CoV-2 Detection. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Oct 12:2020.10.07.20208520.
170. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, Jo WK, Tscheak P, Möncke-Buchner E, Müller MA, Krumbholz A, Drexler JF, Drosten C. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe*. 2021 Jul;2(7):e311-e319.
171. Kim JY, Bae JY, Bae S, Cha HH, Kwon JS, Suh MH, Lee HJ, Jung J, Kim MJ, Cui C, Park H, Lee J, Park MS, Kim SH. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Jan;28(1):101-106.
172. Immergluck K, Gonzalez MD, Frediani JK, Levy JM, Figueroa J, Wood A, Rogers BB, O'Neal J, Elias-Marcellin R, Suessmith A, Sullivan J, Schinazi RF, Babiker A, Piantadosi A, Vos MB, Martin GS, Lam WA, Waggoner JJ. Correlation of SARS-CoV-2 Subgenomic RNA with Antigen Detection in Nasal Midturbinate Swab Specimens. *Emerg Infect Dis*. 2021 Nov;27(11):2887-2891.
173. Kang H, Wang Y, Tong Z, Liu X. Retest positive for SARS-CoV-2 RNA of "recovered" patients with COVID-19: Persistence, sampling issues, or re-infection? *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2263-2265.
174. Alvarez-Moreno CA, Rodríguez-Morales AJ. Testing Dilemmas: Post negative, positive SARS-CoV-2 RT-PCR - is it a reinfection? *Travel Med Infect Dis*. 2020 May-Jun;35:101743.
175. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Posteraro B, Landi F, Sanguinetti M, Cattani P. Assessment of SARS-CoV-2 RNA Test Results Among Patients Who Recovered From COVID-19 With Prior Negative Results. *JAMA Intern Med*. 2021 May 1;181(5):702-704.

176. KDCA. 2020. Finding from investigation and analysis of re-positive cases. KDCA, Cheongju, South Korea.
177. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020 May;158(6):1831-1833.e3.
178. Foladori P, Cutrupi F, Segata N, Manara S, Pinto F, Malpei F, Bruni L, La Rosa G. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci Total Environ*. 2020 Nov 15;743:140444.
179. Santos Bravo M, Berengua C, Marín P, Esteban M, Rodriguez C, Del Cuerpo M, Miró E, Cuesta G, Mosquera M, Sánchez-Palomino S, Vila J, Rabella N, Marcos MÁ. Viral Culture Confirmed SARS-CoV-2 Subgenomic RNA Value as a Good Surrogate Marker of Infectivity. *J Clin Microbiol*. 2022 Jan 19;60(1):e0160921.
180. Davies M, Bramwell LR, Jeffery N, Bunce B, Lee BP, Knight B, Auckland C, Masoli JA, Harries LW. Persistence of clinically relevant levels of SARS-CoV2 envelope gene subgenomic RNAs in non-immunocompromised individuals. *Int J Infect Dis*. 2021 Dec 7:S1201-9712(21)01206-6.
181. Deming ME, Dong TQ, Agrawal V, Mills MG, Huang MW, Greninger AL, Jerome KR, Wener MH, Paasche-Orlow MK, Kissinger P, Luk A, Hoffman RM, Stewart J, Kottkamp AC, Bershteyn A, Chu HY, Stankiewicz Karita HC, Johnston CM, Wald A, Barnabas R, Brown E, Neuzil K. Detection and kinetics of subgenomic SARS-CoV-2 RNA viral load in longitudinal diagnostic RNA positive samples. *J Infect Dis*. 2022 Feb 12:jjac048.
182. Schulte PA, Piacentino JD, Weissman DN, de Perio MA, Chiu SK, Radonovich LJ, Trout D, Beezhold D, Hearl FJ, Howard J. Proposed Framework for Considering SARS-CoV-2 Antigen Testing of Unexposed Asymptomatic Workers in Selected Workplaces. *J Occup Environ Med*. 2021 Aug 1;63(8):646-656.
- 183- Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, Ladhani S, Zambon M, Gopal R. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*. 2020 Aug;25(32):2001483.
- 184- Casagrande M, Fitzek A, Spitzer M, Püschel K, Glatzel M, Krasemann S, Aepfelbacher M, Nörz D, Lütgehetmann M, Pfefferle S, Schultheiss M. Detection of SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNA in retina and optic nerve of patients with COVID-19. *Br J Ophthalmol*. 2021 Apr 9:bjophthalmol-2020-318618.