

### 3. COVID-19'da mikrobiyolojik tanı testleri

*Prof. Dr. Arzu Sayiner, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Viroloji BD, İzmir, arzusayiner@yahoo.com, [arzu.sayiner@deu.edu.tr](mailto:arzu.sayiner@deu.edu.tr)*

COVID-19'un kesin tanısı, solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 virüsünün RNA'sının veya antijenlerinin saptanması ile yapılmaktadır.

#### **SARS-CoV-2 RNA'sı nasıl saptanır?**

En yaygın kullanılan yöntem gerçek zamanlı ters transkripsiyonlu polimeraz zincir reaksiyonudur (real time reverse-transcriptase PCR, RT-qPCR). Virüsün yaklaşık 30 kb'lik RNA'sının küçük bir parçası (~ 100 bp) çoğaltılarak saptanır. Hedef bölge olarak virüsün nükleokapsid (N), zarf (E), dikensi glikoprotein (S), polimeraz (RdRp) veya ORF1 gen bölgelerinden bir veya ikisi kullanılmaktadır<sup>[1]</sup>. Testte ayrıca insan genine ait bir bölüm de çoğaltılarak iç kalite kontrol olarak kullanılır. Test bugün için, kalitatif olup, sonuç pozitif / negatif olarak raporlanır. Testte elde edilen Ct değeri, örnek içindeki virus miktarı ile ilişkili olmakla birlikte, testler arası standardizasyon olmadığı için klinikte kullanımı önerilmez. İlk tercih edilecek örnek türü nazofarenjyal sürüntü olup, hastalığın ilk haftası içinde örnek alınması önerilir.

#### **SARS-CoV-2 RNA testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü nedir?**

Testlerin analitik duyarlılığı, yöntemine göre değişkenlik göstermekle birlikte ortalama 1-100 kopya/reaksiyondur<sup>[2]</sup>. Analitik özgüllük %100'e yakındır. Klinik duyarlılık ve özgüllüğün belirlenmesi ise, değişkenlerin varlığı ve referans bir yöntemin bulunmaması nedeniyle güçtür.

#### **Pozitif ve negatif RT-qPCR test sonucu ne anlama gelir?**

Pozitif sonuç, COVID-19 enfeksiyonu tanısı koydurur. Pozitiflik, semptomların saptanmasından sonra, haftalarca sürebilir; dalgalanmalar gösterebilir, negatiflik sonrası tekrar pozitiflik saptanabilir. PCR pozitifliği, her zaman canlı virus varlığı anlamına gelmez. Hafif-orta ağırlıkta kliniği olan erişkin hastalarda semptomların başlangıcından yaklaşık 10 gün sonra, canlı (replike olabilen) virus izolasyonu sonlanır, ağır kliniği olanlarda veya immünsüprese hastalarda süre daha uzun olabilir<sup>[3]</sup>. Yalancı pozitiflik olabilir ancak nadirdir.

Negatif sonuç, genellikle kişinin enfekte olmadığı anlamına gelir. Ancak, klinik şüphe varsa, ilk negatif testten 24-48 saat sonra testin tekrar edilmesi ve kişide alt solunum yolu (ASY) enfeksiyonu varsa test tekrarının ASY numunesi ile yapılması önerilir<sup>[4]</sup>.

Yalancı negatiflik (%5-35), test yönteminin özelliklerine (RNA ekstraksiyonu, hedef gen bölgesi, analitik duyarlılık, vb), örneğin alım zamanına (semptomların ilk haftası önerilir), yeri ve kalitesine (kullanılan

çubuğun niteliği, işlemde nazofarinkse ulaşılması vb), taşınma koşullarına, hastadaki viral dinamiklere (virüsün hangi anatomik bölgede, ne miktarda bulunduğu) göre değişkenlik göstermektedir<sup>[1,5]</sup>. Mükemmel bir referans tanı yöntemi olmadığı için klinik duyarlılığın belirlenmesi güçtür. Asemptomatik kişilerde testin duyarlılığı konusunda henüz yeterli veri bulunmamaktadır<sup>[1]</sup>.

İlk enfeksiyondan uzun süre sonra ( $\geq 90$  gün) viral RNA'nın yeniden saptanması ile karakterize az sayıda re-enfeksiyon olguları bildirilmiştir. Bu tür olguların tanısı için kullanılacak kriterler, "Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)" tarafından tanımlanmıştır<sup>[6]</sup>.

### **SARS-CoV-2 virüsünde mutasyonlar oluyor mu? Tanıyı etkiler mi?**

Virusta, diğer RNA viruslarına kıyasla daha az olmakla birlikte, mutasyonlar gelişmektedir. Bunlardan S proteinindeki D614G değişimi, Haziran sonunda tüm dünyada hemen tüm izolatlarda görülen en yaygın mutasyon olmuştur<sup>[7]</sup>. Bu mutasyonun virüsün yayılımını kolaylaştırabileceğine ilişkin bazı çalışmalar olmakla birlikte henüz klinik açıdan anlamlı olduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Mutasyonların, özellikle de immün yanıt baskısı altında ortaya çıkabilecek ve yanıtta kaçışa yol açabilecek değişikliklerin izlenmesi önemlidir. Bu tür mutasyonlar antijen / antikor testlerinde sorun yaratabilir. Mutasyonlar, PCR testinde kullanılan primer - problemlerin bağlanma bölgesini etkilemediği sürece PCR testlerini etkilemez. Mutasyonlar sekanslama çalışmaları ile izlenmeli ve gerektiğinde testlerde değişiklikler yapılmalıdır.

### **COVID-19 antikor testleri ne zaman kullanılmalı, sonuçları nasıl değerlendirilmelidir?**

Virüsa özgü antikorların saptanması, etkenle karşılaşmayı gösterir. Antijen olarak sıklıkla N veya S proteini kullanılmakta, anti-S antikorlarının daha özgül, anti-N antikorlarının daha duyarlı olduğuna ilişkin bazı çalışmalar bulunmaktadır. Antikorlar, genellikle 1 - 2. haftadan sonra saptanabilir oldukları için akut enfeksiyon tanısında kullanılması uygun değildir<sup>[8]</sup>. ELISA veya CLIA esaslı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri hızlı kart testlerden (immünokromatografik test) daha iyidir. IgG veya total antikor bakan testler daha doğru sonuç vermektedir<sup>[9]</sup>. Antikor yanıtı, enfeksiyonun şiddeti ve karşılaşmadan itibaren geçen gün sayısı ile doğru orantılıdır. Antikor testinin negatif olması enfeksiyonu dışlamaz. Diğer koronavirüsler ve bazı viral enfeksiyonlar ile çapraz reaksiyon saptanabilmekte, bu nedenle özgüllüğü yüksek ( $\geq 99.5$ ) olan testlerin seçilmesi önerilmektedir.

Antikor testleri, temel olarak serolojik sürveyans çalışmalarında, immün plazma donörlerini belirlemede ve çocuklarda "çoklu sistem enflamasyonu sendromu" tanısında kullanılmaktadır. Yüksek klinik şüpheye rağmen viral RNA testleri negatif çıkan ve semptomların başlangıcından itibaren en az 14 gün geçmiş kişilerde tanıya yardımcı ikinci bir test olarak kullanılabilir<sup>[9]</sup>.

Rutinde kullanılan testlerle saptanan antikörlerin, ne süre ile kalıcı oldukları ve re-enfeksiyondan korunmada etkili olan nötralizan antikörler ile korelasyonu konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Antikör testlerinin bağışıklık göstergesi olarak veya korunma önlemlerinin gevşetilmesi amacıyla kullanılmaları doğru değildir<sup>[10]</sup>.

### **COVID-19 antijen testleri nedir?**

Antijen testlerinde, virüsün proteinleri aranır, amplifikasyon yoktur, duyarlılık ve özgüllük viral RNA (PCR) testlerinden daha düşüktür. Ancak yüksek viral yüke (yaklaşık  $\geq 10^6$  kopya/ml) sahip enfekte kişileri saptayabildiği için, virüs miktarının fazla olduğu semptomların başlamasından önceki bir iki gün ve sonrasındaki 5-7 günlük dönemde başarılı olması beklenir<sup>[9]</sup>. Antijen testleri için solunum yolu örnekleri gereklidir. PCR testine ulaşılamayan veya hızlı bir ön değerlendirme gerektiren durumlarda kullanılabilir. Genellikle virüsün nükleokapsid antijeni aranmaktadır. Farklı özelliklere sahip testler bulunmaktadır. Negatif olması enfeksiyonu dışlamaz, hastanın daha duyarlı bir test olan PCR yöntemi ile değerlendirilmesi gereklidir. Yalancı pozitiflikler de olabilir. Bunu azaltabilmek için özgüllüğü yüksek ( $\geq 99\%$ ) testlerin kullanılması önemlidir<sup>[11]</sup>.

***☑ Sonuçların güvenilirliği açısından, mikrobiyolojik tanıda kullanılacak testlerin seçilmesi, kalitenin sağlanması, uygulanması, yorumu önemlidir ve Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanı kontrolünde yürütülmelidir. Test sayısının artırılması ve ticari nedenlerle bu basamaktan ödün verilmesinin sonuçları etkilemesi kaçınılmazdır. Klinisyenlerin, laboratuvar sorumlusu Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlarına ulaşarak bilgi almaları, sonuçların yorumlanması ve kısıtlılıkların anlaşılması açısından yararlı olacaktır. Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanları testlere ilişkin her türlü soru ve sorununuzda yardıma hazırdır ve işbirliği kurmaktan mutlu olacaklardır.***

### **Kaynaklar**

1. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. Erişim tarihi: 5 Kasım 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
2. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND). Erişim tarihi: 5 Kasım 2020. Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>
3. Centers for Disease Control and Prevention. Duration of isolation and precautions for adults with COVID-19. Erişim tarihi: 5 Kasım 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>

4. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19. Clin Infect Dis. 2020 Jun 16:ciaa760.
5. Long DR, Gombar S, Hogan CA, et al. Occurrence and Timing of Subsequent SARS-CoV-2 RT-PCR Positivity Among Initially Negative Patients. medRxiv [Preprint]. 2020 May 8:2020.05.03.20089151.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Investigative criteria for suspected cases of SARS-CoV-2 reinfection (ICR). Erişim tarihi: 5 Kasım 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/invest-criteria.html>
7. Callaway E. The coronavirus is mutating - does it matter? Nature. 2020;585:174-177
8. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing. Erişim tarihi: 5 Kasım 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
9. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing. Clin Infect Dis. 2020 Sep 12:ciaa1343.
10. Klimud.org. COVID-19 tanı ve taramasında mikrobiyolojik testlerin kullanımı. Erişim tarihi: 7 Kasım 2020. Available from: [https://www.klimud.org/public/uploads/content/files/COVID19\\_tani\\_ve\\_tarama\\_testleri\\_09112020.pdf](https://www.klimud.org/public/uploads/content/files/COVID19_tani_ve_tarama_testleri_09112020.pdf)
11. World Health Organization (2020). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays: interim guidance, 11 September 2020.