

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ŞİDDETLİ AKUT SOLUNUM YOLU SENDROMU KORONAVİRÜSÜ-2'NİN
(SARS-COV-2) KLİNİK COVID-19 TANI YÖNTEMLERİNDE KANTİTATİF
RT-PCR (q-RT-PCR) ANALİZ METODUNUN TERS TRANSKRİPSİYON
DÖNGÜ ARACILI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (RT-LAMP) ANALİZ
METODUNA GÖRE EFFEKTİVESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yakup ARTİK

2000001067

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN

HAZİRAN 2022

T.C
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ŞİDDETLİ AKUT SOLUNUM YOLU SENDROMU KORONAVİRÜSÜ-2'NİN
(SARS-COV-2) KLİNİK COVID-19 TANI YÖNTEMLERİNDE KANTİTATİF
RT-PCR (q-RT-PCR) ANALİZ METODUNUN TERS TRANSKRİPSİYON
DÖNGÜ ARACILI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (RT-LAMP) ANALİZ
METODUNA GÖRE EFİEKTİVESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yakup ARTİK

2000001067

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN

Juri Üyeleri: Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Doç. Dr. Yavuz UYAR (Namık Kemal Üniversitesi)

HAZİRAN 2022

ÖNSÖZ

“Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü-2'nin (SARS-CoV-2) Klinik COVID-19 Tanı Yöntemlerinde Kantitatif RT-PCR (q-RT-PCR) Analiz Metodunun Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (RT-LAMP) Analiz Metoduna Göre Etkivesinin Karşılaştırılması” adlı yüksek lisans tez çalışmamda, danışmanlığımı üstlenen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN hocama ve bu çalışma kapsamında konu seçiminde desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özge ÇELİK hocama teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın konusundan şekillendirilmesine kadar her aşamasında bana katkı sunan ve destek veren Sayın Prof. Dr. Nedret HIZEL hocama ve Sayın Doç. Dr. Yavuz UYAR hocama vermiş olduğu tüm emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını destekleyen Sayın Prof. Dr. Haydar SUR hocama da ayrıca teşekkür ederim.

Akademik hayatımda ve bilimsel çalışmalarımda bana her zaman destek veren ve bu çalışmada büyük emeği olan bilim insanı Yüksek Moleküler Biyolog Sayın Nevra Pelin CESUR'a ve kıymetli dostum Sayın Bahadır Alp COŞĞUN'a vermiş olduğu tüm katkılarından dolayı minnet duyarım.

Bu proje kapsamında, çalışmayı hem destekleyen hem de projenin çalışma olanağı sağlayan ve çalışmanın tüm maddi giderini karşılayan “Özel VİROMED İstanbul Merkezi Laboratuvarı ve Görüntüleme Merkezi Şirketine” ve VİROMED AİLESİ bünyesinde çalışan tüm personellere sağladığı motivasyon için teşekkürümü borç bilirim.

Hayatım boyunca maddi manevi katkılarını esirgemeyen ve her daim yanımda olan sevgili aileme, bütün çalışmalarımda bana sağladığı sonsuz güç için şükranlarımı borç bilirim.

Çalışma ile ilgilenen tüm akademik camiaya,

KBRN TEHDİTLERİ AFET VE RİSK YÖNETİMİ PLANLARINIZ, BİR GÜN BELKİ TÜM İNSANLIĞI KURTARACAKTIR!

Saygı & Sevgilerimle...

Yakup ARTİK

İstanbul, Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü-2.....	4
2.2. Klinik COVID-19 Tanı Yöntemleri.....	9
2.3. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) Analiz Metodu.....	12
2.4. Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon Metodu..	13
3. MATERYAL VE METOD.....	16
3.1. Etik Kurul ve Bakanlık Onayı.....	16
3.2. Numune Toplama ve Taşıma.....	16
3.3. RT-PCR Testleri.....	17
3.4. Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus Kiti.....	17
3.5. CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR Kiti.....	17
3.6. QIAprep & amp Viral RNA UM Kiti.....	17
3.7. RT-LAMP-PCR testleri-SENSObiz COVID-19 RT PCR Kit.....	18
3.8. Test Yorumu.....	19
3.9. İstatistiksel Analiz.....	20
4. SONUÇLAR.....	21
4.1. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları.....	28
4.2. Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon Sonuçları.....	31
5. TARTIŞMA.....	36
KAYNAKÇA.....	40
EKLER.....	46

KISALTMALAR

µL	Mikrolitre
2019-NCOV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
B3	Geriye Doğru Primer
BIP	Geri İç Primer
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CLIA	Chemiluminescent İmmunoassay
Ct	C-Terminal Alanı (Cycle Treshold)
CY5	Karboksilik Asit
CXR	Göğüs Röntgeni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ED	Eşik Değer
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünoorbent Testi
F3	İleri Primer
FAM	6-Karboksi-Floresein
FIB	İleri İç Primer
FP	Füzyon Peptidi
GGO	Ground Glass Opacity
HE	Membran Glikoproteini
HEX	Fosforamidit
HR1	Heptad Repeat 1
HR2	Heptad Repeat 2
IFA	İmmünofloresan Testi
IGG	İmmünooglobulin G
KBRN	Kimyasal Biyolojik Radyolojik Nükleer
RT-LAMP	Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
LB	İleri İlmek Primeri
LF	İleri İlmek Primeri
LGM	İmmünooglobulin M
M	Ek Zar Glikoproteini
MERS-COV	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
N	Nükleokapsid Proteine
n	Örnek Sayısı
NM	Numara
NTD	N Terminal Alanı
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
ORF1B	İnsan RNA Polimeraz Proteini
P/N	Pozitif/Negatif
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POC	Bakım Noktası- Hasta Başı Testler
q-RT-PCR	Kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RATG13	Betakoronavirüs
RBD	Reseptör Bağlama Alanı
RDRP	RNA Bağımlı RNA Polimeraz
RDT	Hızlı Tanı Testleri
ROX	6-Karbosil-X-Rhoddamine
RT-LAMP	Ters Transkripsiyon Döngüsü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
RTR	Rotor-Gene Pcr Cihazı
S	Spike Proteini
S1	Amino Terminal Alt Birimi
S2	Karboksil Terminal Alt Birimi
SARS-COV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-COV-1	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-COV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2
SM	Küçük Zar Proteini
SPSS	Statistical Package For The Social Sciences Programı
STD	Standart
SY	Sayı
TM	Transmembran
TP	Toplam
VTM	Viral Taşıma Ortamı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 SARS-CoV-2'nin yapısı	3
Şekil 2.2 Küresel çapta en çok vaka görülen ilk 12 ülke.....	7
Şekil 2.3 Küresel çapta en çok ölüm görülen ilk 12 ülke.....	8
Şekil 2.4 Türkiye'deki vaka ve ölüm sayılarında güncel veriler.....	9
Şekil 2.5 BT görüntü oluşturmada tarama fazının gösterimi.....	12
Şekil 2.6 Bilgisayarlı tomografi görüntüsü.....	12
Şekil 3.1 Ters transkripsiyon döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) çalışma protokolü.....	18
Şekil 4.1 RT-LAMP cihazında numunelerin nitel gözlemleri.....	23
Şekil 4.2 RT-LAMP cihazında numunelerin nicel gözlemleri.....	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Deneylerde Kullanılan Kitler	16
Tablo 3.2 RT-LAMP Sonuç Değerlendirmesi	20
Tablo 4.1 Birinci Gün Sonuçları.....	27
Tablo 4.2 Beşinci Gün Sonuçları.....	28
Tablo 4.3 Birinci ve beşinci günde Rotor-Gene cihazı ve inovia cihazında çalışılan kitlerin Ct değerlerinin anlamlandırılması.....	29
Tablo 4.4 Birinci günde inovia cihazında kitlerin pozitif ve Negatif sonuçları.....	30
Tablo 4.5 Beşinci günde inovia cihazında kitlerin pozitif ve Negatif sonuçları	30
Tablo 4.6 Birinci günde rotor cihazında kitlerin pozitif ve Negatif sonuçları	31
Tablo 4.7 Beşinci günde rotor cihazında kitlerin pozitif ve Negatif sonuçları	31
Tablo 4.8 Birinci günde İnovia grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	32
Tablo 4.9 Birinci günde Rotor-Gene grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme.....	32
Tablo 4.10 Birinci günde İnovia grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	32
Tablo 4.11 Birinci günde Rotor-Gene grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	33
Tablo 4.12 Beşinci günde İnovia grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	33
Tablo 4.13 Beşinci günde Rotor grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	33
Tablo 4.14 Beşinci günde İnovia grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	34
Tablo 4.15 Beşinci günde Rotor grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme	34
Tablo 4.16 Birinci günde yer alan RT-LAMP grubu eşik değeri	34
Tablo 4.17 Beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu eşik değeri	35

ÖZET

Yeni koronavirüs/şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2'nin neden olduğu Coronavirus hastalığı-2019 veya COVID-19 (SARS-CoV-2 veya 2019-nCoV), küresel etkileri ile ortaya çıkan, hızlı ve güvenilir tanı testleri gerektiren ve günümüzde devam eden bir pandemidir. Kantitatif ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (q-RT-PCR), SARS-CoV-2 tespitleri için altın standart yöntemdir. Öte yandan, yeni yaklaşımlar tanı güçlüklerini yavaş yavaş gidermektedir. Bu yeni yaklaşımlardan biri olarak ters transkripsiyon döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) tekniği ile daha hızlı ve ucuz testlere katkıda bulunabilir. Bu çalışma, 30-45 dakikada sonuç verebilen hızlı tarama tanı testini değerlendirmek ve RT-LAMP'nin etkinliğini q-RT-PCR ile karşılaştırmak için tasarlanmıştır. Rastgele seçilen 30 pozitif hasta numunesi, SARS-CoV-2 nükleik dizisinin bir kısmı ile nazofaringeal sürüntülerle oluşturulmuştur. Kantifikasyon döngüsü (Ct) değerleri örneği, RT-LAMP ve ayrıca geleneksel q-RT-PCR kullanılarak test edildi. Hasta numuneleri dört farklı kit (SENSObiz COVID-19 [SARS-CoV-2] RT-LAMP Assay kiti, QIAprep & amp Viral RNA UM kiti, Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus kiti ve CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR kiti) ve iki farklı PCR cihazı (GDS Rotor-Gene Q Thermocycler PCR cihazı ve İnovia Technologies GenX series PCR cihazı) ile test edildi. Pozitif/Negatif (P/N) oranı rastgele seçilen 30 pozitif hasta numunesine dayalı olarak ilk gün yapılan deneylerde; İnovia cihazında çalışılan numuneler için Biospeedy kiti ve Covirion kiti % 100 (30/0) pozitifliği yakalarken, Qiagen Kiti ile %93,3 (28/2) pozitiflik yakalamıştır. Rotor-Gene cihazında ise Biospeedy kiti ve Covirion kiti %100 (30/0) pozitifliği yakalarken, Qiagen Kiti ile %96,7 (29/1) pozitiflik yakalamıştır. Aynı örnekler üzerinde beşinci günde yapılan deneylerde ise İnovia cihazında Biospeedy kiti %90 (27/3), Covirion kiti %93,3 (28/2), Qiagen kiti %53,3 (16/14) oranında pozitiflik yakalamıştır. Bu örnekler beşinci günde Rotor-Gene cihazında incelendiğinde ise Biospeedy kiti ve Covirion kiti %96,7 (29/1), Qiagen kiti %63,3 (19/11) oranında pozitiflik yakalamıştır. Aynı örnekler RT-LAMP yöntemi ile karşılaştırıldığında ilk gün %63,3 (19/11) pozitiflik elde edilirken beşinci günde ise %60 (18/12) pozitiflik bulundu. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile SARS-CoV-2 test çalışmaları RT-LAMP tekniği ile hızlı teşhis sistemlerinin geliştirilmesine yönelik proaktif bir yaklaşıma katkı sağlayacaktır.

ABSTRACT

The novel coronavirus called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2 or 2019-nCoV) causes the Coronavirus disease 2019 or COVID-19 an ongoing pandemic that has risen globally. For the reliable and rapid diagnosis, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (q-RT-PCR) has been chosen as a gold standard method. However, new approaches remedy the diagnosis difficulties step by step. The reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-RT-LAMP) is one of them and contributes to faster, effective, and cheaper field-based testing. In the presented thesis, the RT-LAMP technique, which is effective and can give the results in 30–45 min, is compared with q-RT-PCR. The nasopharyngeal swabs of 30 randomly chosen patients' were analyzed and quantification cycle (Ct) values were evaluated using RT-RT-LAMP as well as by conventional q-RT-PCR. The four different kits were utilized to test the patients' samples as; (SENSObiz COVID-19 [SARS-CoV-2] RT-LAMP Assay, the QIAprep & amp Viral RNA UM kit, Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus kit, and CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR kit) and two different PCR devices (GDS Rotor-Gene Q Thermocycler and Inovia Technologies GenX series). Based on 30 patient samples, the Pozitif/Negatif ratio (P/N) was 30/0 as Biospeedy and Covirion (positivity 100%), 28/2 as Qiagen kit (positivity 93.3%) for the samples studied on the Inovia device while the same samples on the Rotor-Gene device were 30/0 as Biospeedy and Covirion (positivity 100%), 29/1 as Qiagen kit at the first day (96.7%). On the fifth day, the samples were analyzed in the Inovia device and the respective results were obtained as; 27/3 as Biospeedy (positivity 90%), 16/14 as Qiagen (positivity 53.3%), 28/2 as Covirion kit (positivity 93.3%). When these samples were studied in the Rotor-Gene device, it was 29/1 in Biospeedy and Covirion (positivity 96.7%), 19/11 in the Qiagen kit (positivity 63.3%). When these samples were compared with the RT-LAMP method it was found to be 19/11 (positivity 63.3%) on the first day and 18/12 (positivity 60%) on the fifth day. With this thesis data, new proactive approaches will be generated to develop rapid diagnosis systems. Furthermore, RT-LAMP will be one of the novel methods that will present promising results to monitor exposed individuals and contributes to screening efforts in potential ports of entry.

1. GİRİŞ

Küresel pandemi, 11 Mart 2020 tarihinde ilan edildikten sonra, ülkemizde ilk görülen vaka da aynı tarihte belirlenmiş olup, SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmek amacı ile PCR testlerin sonuçları değerlendirilirken, COVID-19 klinik vakalarında hastalık tanısı için kullanılan uygulama metotlarında SARS-CoV-2 tanısı için yer alan q-RT-PCR analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Literatür incelendiğinde, bu analiz yöntemi ile klinik vakalar saptanmadan önce hızlı tarama testleri kullanılmaktadır [1]. Tarama test sayısının artırılmasına yönelik kullanılan hızlı testler ile şüpheli vakalar üzerine odaklanılmaktadır. Şüpheli vakaları tespit edebilmek adına hızlı taramaya ihtiyaç duyulan triaj bölgeleri, iş merkezleri, ulaşım yerleri, konaklama merkezleri, özel toplantılar ve sosyal-kültürel etkinlikler gibi insanların zorunlu olarak toplanacağı bölgelerde tarama testlerine yönelik çalışmalar dünya genelinde gelişmiş ülkelerde birçok metodolojiler ile kullanılmaktadır [2][3].

COVID-19 vakalarında taşınabilir RT-LAMP PCR sistemlerinin kolay uygulanabilirliği nedeni ile q-RT-PCR analizine göre hızlı tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için test sonuçlarının efektifitesinin karşılaştırılması ile moleküler biyoloji ve genetikte, tıbbi kimyasal, biyolojik, radyolojik ve nükleer (KBRN) ajanları içerisinde yer alan SARS-CoV-2 viral biyolojik ajanının halk sağlığını etkileyen parametrelerinde akademik donanımı artırmak amaçlanmıştır.

Araştırma ve geliştirmeye açık, kapsamlı, güncel ve SARS-CoV-2 bilimsel çalışmalarını takip etmek, katkı sunmak ve değerlendirmek SARS-CoV-2 test çalışmalarında hızlı tanı sistemlerinin geliştirilmesine yönelik proaktif yaklaşımlarına katkı sunulacağı düşünülmüştür.

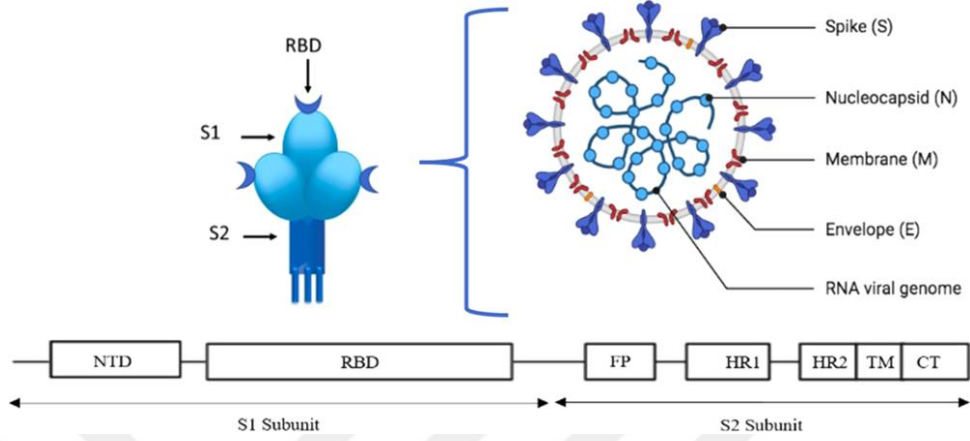
2. GENEL BİLGİLER

Korona virüs ailesi yüzyıllardır insanoğlu üzerinde etkilidir. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) Çin'in Guangdong kentinde, Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV/SARS-CoV-1) Suudi Arabistan'da ve son olarak aralık 2019'un sonlarında, Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan şehrinde şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2) (cins *Betacoronavirus*, subgenus *Sarbecoronavirus*) olarak adlandırılan, pnömoni olarak tanımlanan, bilinmeyen bir hastalık ortaya çıkmıştır [4]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından (WHO); 6.325.785 ölüm ve toplamında ise 540.923.532 onaylanmış COVID-19 vakası (27 Haziran 2022) bildirilmiştir. 20 Haziran 2022 tarihi itibarıyla toplam 11.912.594.538 doz aşı yapılmıştır [5]. Genel olarak kişiden kişiye damlacıklar, kontamine materyaller ve bireyin virüse doğrudan teması başlıca bulaş nedenleridir [6]. Hastalığın ilk semptomları ateş, tat ve/veya koku kaybı, öksürük, ishal ve sırt ağrısı olarak belirtilirken ciddi vakalarda vücutta oluşan sitokin fırtınası nedeniyle çoklu organ ve solunum yetmezliği de gözlemlenebilmektedir [7]. Bunun yanı sıra bir de hastalık semptomlarını göstermeyen bireyler vardır ki 'asemptomatik birey' (%8 ile %80 oran aralığında) olarak adlandırılırlar [8]. Bu bireyler ancak viral yüklerine bağlı olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tanımlanabilmektedirler [9]. Bu tanımlama da ve hastalık teşhisinde virüsün vücut içi kuluçka süresi oldukça önemlidir ve güncel veriler ile 6,4 gün olarak belirlenmiştir [10].

Koronavirüs aile üyeleri alfa, beta, gama ve delta koronavirüs olarak dört cinse ayrılan pozitif anlamda zarflı tek sarmallı RNA virüsleridir. SARS-CoV-2 beta Koronavirüsüdür ve Spike protein (S), nükleokapsid protein (N), küçük bir zar proteini (SM) ve ek bir zar glikoprotein (M) kodlanmış 14 açık okuma çerçevesine (ORF) sahip 30 kb'lik bir genomdan oluşur. Bunlar, Şekil 1'de gösterilmiştir [11]. Membran glikoproteini (HE), spike proteini spesifik konak reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2'nin (ACE2) bağlanması için fonksiyonel kısımdır [12]. Spike protein reseptöre bağlandığında iki ana alt birime bölünür. Konakçı furin benzeri proteazlar tarafından bölünen bir amino terminal alt birimi (S1) ve bir karboksil terminal alt birimidir (S2) [13].

SARS-CoV-2'nin genetik dizisi, SARS-CoV ile %79,5 ve CoV yarasalarından kaynaklanan kısa bir RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp) bölgesi olan RaTG13 ile %96,2 oranında benzerlik göstermektedir [14]. Türkiye'de ilk SARS-CoV-2 vakası ise

11 Mart 2020'de bildirilmiştir ve T.C. Sağlık Bakanlığı, SARS-CoV-2 virüsünün tanı ve teşhisi için kamu hastanelerinde ve özel tanı merkezlerinde COVID-19 laboratuvarları kurmuştur [15].



Şekil 2.1 SARS-CoV-2'nin yapısı: Ct, C-terminal; FP, füzyon peptidi; HR1 ve HR2, Heptad 1 ve 2'yi; NTD, N terminal alanı; RBD, reseptör bağlama alanı; S, spike proteini; TM, transmembran.

Son zamanlarda, çok sayıda SARS-CoV-2 varyantı tanımlanmıştır. Bu nedenle, şiddetli akut solunum yolu sendromu SARS-CoV-2'nin hızlı ve güvenilir tespiti, virüsün yayılma hızını kontrol etmek için son derece önemlidir. Virüsün bulaşmasını önlemek için virüse karşı yeterli farkındalığın ve hazırlığın oluşturulması da etkili unsurlardandır. Birçok hastanın asemptomatik enfeksiyon göstermesi enfeksiyonun yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Hastalığın teşhisinde q-RT-PCR, serolojik testler, Ters transkripsiyon döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) ve nokta teşhisi (POC) olmak üzere dört ana tercih edilen strateji vardır [16].

Dünya genelinde altın standart metod olarak q-RT-PCR kabul görmektedir ve kantitatif bir yöntemdir. Yöntem ile üç ana gen bölgesi hedef alınmaktadır bunlar; N geni (N proteini), Orf1b geni (insan RNA polimeraz proteini) ve E geni (E proteini) [17]. q-RT-PCR tekniğinde, doğrulayıcı testin özgüllüğü, prob ve hedef dizisine bağlıdır. Klinik örnekler, hastaların nazofaringeal veya orofaringeal örneklerinden elde edilir. Öte yandan immünolojik testler, alternatif olarak enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) kullanılan ve PCR'ye kıyasla daha ucuz ama aynı zamanda daha az duyarlı olan test türleridir. Ana tema da immüno globulin G (IgG) varlığında SARS-CoV-2'nin tespiti amaç edilmektedir. Serolojik testler ise kan bazlı testlerdir ve enfeksiyonun varlığının

belirlenmesinde kullanılır. Bu testlerde kullanılan antikorlar hastalığa özgüdür ve genellikle IgM ve IgG kullanılır [18]. Prensip olarak vücuda giren her türlü yabancı madde antijen olarak adlandırılır ve immün sistemin aktive olmasına neden olur. Aktivasyon sonucu vücut içinde antijene özgü spesifik antikor üretimi başlar. Bu nedenle aslında antikorlar vücut içinde hastalık için etiket görevi üstlenirler ve genellikle virüs enfeksiyonunun ikinci haftasından sonra üretilirler. IgM antikorları 10-20 gün sonra tespit edilirken IgG 20 günlük SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonra belirlenebilmektedir [19]. Diğer bir yandan POC testleri günden güne popülerlik kazanmaktadır. SARS-CoV-2 içinde hızlı tanı testi olmasına rağmen ancak testler yalnızca WHO tarafından önerilen araştırma ortamlarında kullanılabilir [20]. Oldukça hızlı sonuç veren testler yalnızca aktif olmuş virüsler üzerinde etkili olduğundan doğruluğu düşük olarak kabul edilmektedir. Günümüzde bilim dünyası, SARS-CoV-2 için yönünü RT-LAMP tekniği ile döngü aracılı izotermal amplifikasyona doğru değiştirmiştir.

Son zamanlarda RT-LAMP tekniği, SARS-CoV-2 tespitinde kullanılan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Kolorimetrik tahlil prensibine dayanan RT-LAMP tekniği yalnızca bir ısı kaynağı gerektirir [21]. RT-LAMP tekniği temelinde, hedef DNA'nın parçalarının birleştirilmesiyle seçilen dört primer ve belirli bir gen bölgesini büyütmek için kullanılan iki ek döngü primeri dahil olmak üzere altı primer kullanır. Bu bakış açısına göre RT-LAMP, SARS-CoV-2 gibi virüs enfeksiyonlarının teşhisinde önemli bir yer tutmuştur [22]. Bu nedenle sunulan bu tez çalışmasında COVID-19 teşhisinde RT-LAMP ile q-RT-PCR'nin karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, verilen sonuçlar ile hızlı bir teşhis sisteminin geliştirilmesine yönelik proaktif bir yaklaşım sunulmuş olacaktır.

2.1. Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü-2

Koronavirüsler geçmişten bugüne birçok canlı üzerinde etkili olan virüs ailesidir. Son yıllarda elde edilen veriler kapsamında insanlarda hafif ve şiddetli solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Sırasıyla 2002 ve 2012'de zoonotik kökenli iki yüksek patojenik koronavirüsü tanımlanmıştır. Bunlar; şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsüdür (MERS-CoV) [4]. 2019 sonunda, Çin'in Wuhan şehrinde SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs ortaya çıkmış ve olağandışı bir viral pnömoni salgınına sebep olmuştur. 2019 yılında Wuhan'da çeşitli sağlık tesisleri, Çin'deki Hubei eyaletinde, sebebi

bilinmeyen pnömoni hastası kümelerini bildirmiştir [4]. Bu hastalarda SARS ve MERS hastalarına benzer şekilde, ateş, öksürük ve göğüs rahatsızlığı gibi viral pnömoni semptomları ve ciddi vakalarda dispne ve bilateral akciğer infiltrasyonu görülmüştür. Hastaneye yatırılan ilk 27 hasta arasında, vakaların çoğu epidemiyolojik olarak Wuhan şehir merkezinde bulunan ve sadece deniz ürünleri ile sınırlı kalmayan, aynı zamanda kümes hayvanları ve yaban hayatı da dahil olmak üzere canlı hayvanlar satan Huanan Deniz Ürünleri Toptan Satış Pazarı ile bağlantılı bulunmuştur. Retrospektif bir araştırmaya göre, bilinen ilk vakanın başlangıcı 8 Aralık 2019'a uzanmaktadır [23]. 31 Aralık'ta Wuhan Belediye Sağlık Komisyonu, halkı tanımlanamayan bir pnömoni salgını hakkında bilgilendirmiştir [23]. Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak da bilinen son derece bulaşıcı bu yeni koronavirüs hastalığı, tüm dünyaya hızla yayılmıştır. Küresel olarak etkili olan SARS-CoV-2, salgın alanlarının dağılımı açısından SARS ve MERS'i geride bırakmıştır ve halk sağlığı için olağanüstü bir tehdit oluşturmuştur. Çinli bilim insanlarından oluşan bağımsız ekipler, şiddetli pnömonisi olan hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj sıvı örneklerinden metagenomik RNA dizilimi ve virüs izolasyonu yoluyla, ortaya çıkan bu hastalığın, daha önce hiç görülmemiş bir betakoronavirüs olduğunu belirlemiştir. 9 Ocak 2020'de bu etiyolojik tanımlamanın sonucu kamuoyuna duyurulmuştur. Yeni koronavirüsün ilk genom dizisi 10 Ocak 2020 de Viroloji web sitesinde yayınlanmış ve sonrasında farklı araştırma enstitüleri tarafından belirlenen daha eksiksiz genom dizileri 12 Ocak'ta Global Initiative for Sharing All Influenza Data (GISAID) veri tabanı aracılığıyla yayınlanmıştır. Daha sonra, Huanan Deniz Ürünleri Toptan Satış Pazarı'na maruz kalma öyküsü olmayan daha fazla hasta tespit edilmiştir. Birkaç ailesel enfeksiyon kümesi rapor edilmiş ve sağlık tesislerinde hastane enfeksiyonu da meydana gelmiştir. Tüm bu vakalar yeni virüsün insandan insana bulaştığına yönelik net kanıtlar sağlamıştır. Salgın, yeni yılın ilk ayının yaklaşmasıyla aynı zamana denk geldiğinden, festivalden önce yapılan şehirler arası seyahat, Çin'de virüs bulaşmasını kolaylaştırmıştır. Bu yeni koronavirüs pnömonisi kısa süre sonra Hubei eyaletindeki diğer şehirlere ve Çin'in diğer bölgelerine yayılmıştır. 1 ay içerisinde Çin'in 34 eyaletinin tümüne kitlesel olarak yayılmıştır. 15 Ocak tarihinde günlük teşhis edilen binlerce yeni vaka ile teyit edilen vakaların sayısı aniden artmıştır. 30 Ocak 2020'de yeni Koronavirüs salgını uluslararası önem taşıyan bir halk sağlığı acil durumu ilan edilerek 11 Şubat'ta

Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi yeni koronavirüsü "SARS-CoV-2" olarak, WHO ise "COVID-19" olarak adlandırmıştır [24].

COVID-19'un uluslararası yayılımı şubat ayının sonundan itibaren hızlanmıştır. SARS-CoV-2'nin yüksek bulaşma verimliliği ve uluslararası seyahatin bolluğu, COVID-19'un dünya çapında hızla yayılmasını sağlamıştır. 11 Mart 2020'de ise, COVID-19 salgınının bir pandemiye sebebiyet verdiğini tüm dünya kabul etmiştir. Johns Hopkins Üniversitesi Sistem Bilimi ve Mühendisliği Merkezi'nin COVID-19 panosuna göre, 11 Ağustos 2020 itibariyle, altı kıtadan 216 ülke ve bölge, 20 milyondan fazla COVID-19 vakası bildirmiştir. Yüksek ölüm oranları, özellikle sağlık hizmetleri kaynakları yetersiz olan bölgelerde gerçekleşse de, ABD en çok vaka görülen ülke olmuştur [25]. Küresel çapta en çok vaka ve en çok ölüm görülen, WHO tarafından 27.06.2022 tarihi ile açıklanan ilk 12 ülke Şekil 2.2 ve Şekil 2.3 de ayrıntılı olarak verilmiştir [5].

SARS-CoV-2'nin kaynak olarak nereden enfekte etmeye başladığı henüz tam olarak anlaşılmasa da literatürdeki genetik sekans verilerine göre, çeşitli hayvanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Wuhan'da ilk bildirilen vakaların bazı deniz ürünleri ile hiçbir epidemiyolojik bağlantısı olmadığı tespit edildiğinden, SARS-CoV-2'nin insanda görülen ilk kaynak olmayabileceği öne sürülmüştür. Fransa'da yapılan bir çalışma, 2019'un sonunda zatürree olan bir hastadan alınan ve saklanan bir örnekte PCR ile SARS-CoV-2'yi tespit etmiştir. Çalışmalar SARS-CoV-2'nin salgının genel olarak bilinen başlangıç zamanından çok daha erken yayılmış olabileceğini düşündürmüştür. Bu son derece tartışmalı konuyu ele almak için; hastalardan, hayvanlardan ve ortamlardan alınan çok sayıda banka örneğini içeren, daha fazla geriye dönük araştırmaların, dünya çapında iyi doğrulanmış tahlillerle yürütülmesi gerektiğini göstermektedir [27].



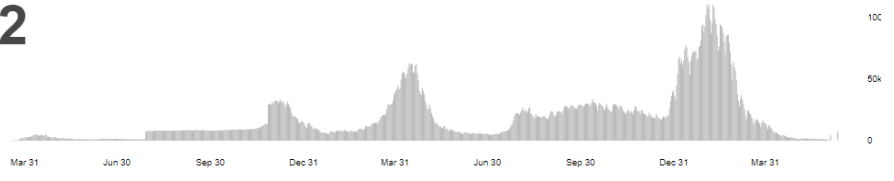
Şekil 2.2 Küresel çapta en çok vaka görülen ilk 12 ülke [26].



Şekil 2.3 Küresel çapta en çok ölüm görülen ilk 12 ülke [5].

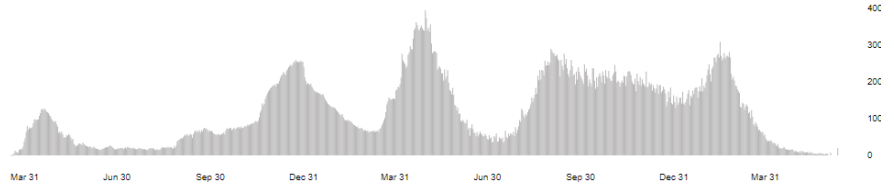
15.085.742

onaylanmış vakalar



98.996

ölümler



Şekil 2.4 Türkiye’deki vaka ve ölüm sayılarında güncel veriler (27.06.2022) [5].

2.2. Klinik COVID-19 Tanı Yöntemleri

Viral RNA dizisinin gerçek zamanlı ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (q-RT-PCR) yoluyla tanımlanması ve amplifikasyonuna dayanan moleküler tanı gibi çeşitli tanı yaklaşımları, hastalarda enfeksiyonu tanımlamak için antikor testini kullanan serolojik tanımlar, bakım (POC) cihazları, şüpheli hastalarda klinik değişiklikleri aramak için radyoloji tabanlı tespit ve viral hücre kültürü teknikleri COVID-19 hastalığının tanısında klinikte tercih edilen yöntemlerdir.

Moleküler teknikler yetersiz performans gösterdiğinde serolojik testler kullanılır. Antikor tespiti, laboratuvarlarda yapılan serolojik testlerin temelidir. SARS-CoV-2 ilk tanımlandığında, mevcut moleküler araçların ve hızlı antijen test kitlerinin eksikliği, serolojinin tamamlayıcı bir teşhis aracı olarak kullanılmasına izin vermiştir.

Antikor, bir enfeksiyona yanıt olarak konakçı hücre içinde üretilen spesifik bir proteindir. Bu nedenle, bir antikor testi, bir kişi daha önce viral patojene maruz kalmışsa, bağışıklık tepkisinin bir parçası olarak gelişebilecek numunede antikorların varlığını tanımlar. SARS-CoV-2 enfeksiyonunun saptanması için; nötralizasyon testi, enzim bağlantılı immünosorbent (ELISA) kalitatif tespit, kemilüminesan immünoassay kalitatif tespit ve hızlı teşhis tespitleri laboratuvarlarda en çok kullanılan antikor temelli serolojik testlerdir [28].

Nötralizasyon tekniğinde; SARS-CoV-2'nin Vero E6 hücre hatlarında replikasyonunu bloke etme yetenekleri temelinde hastanın serumunda antikorların varlığını ile tanımlar. Ancak; esas olarak replikasyonda yer almayan virüs proteinlerine özgü antikorların tespiti bu yaklaşımla gözden kaçabilir [29].

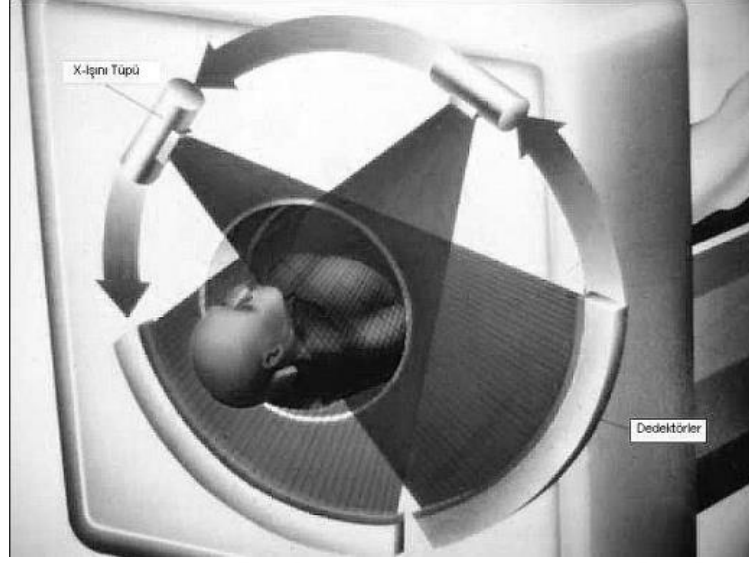
ELISA tekniği temelleri geçmişten günümüze kadar gelen köklü bir testtir. Prensipl olarak birincil antikorlar ve ikincil antikorlar kullanılır. SARS-CoV-2 gibi viral yükün tespitinde kullanılan ELISA tabanlar Spike gibi viral spesifik bir protein ile kaplanır ve daha sonrasında hastanın kan serumu ile plaka tamamlanır [30]. Kan serumunda bir antikor varlığında birincil antijen-antikor kompleksi oluşturulur. Daha sonra florokrom veya substratlarla etiketlenmiş ikincil antikor eklenir ve önceden oluşturulmuş antijen-antikor kompleksini tanır ve algılanabilir. Bu renk değişikliği üreten veya bir kimyasal reaksiyon yoluyla floresan özelliği gösteren bu plaka ile de ölçüm alınır[31].

Kemilminesan yöntemde ise ELISA yönteminde izlenen yollar izlenir ve birincil antijen-antikor kompleksinin oluşumundan sonra eklenen ikincil antikor ile bir lüminesans aktivitesi gerçekleşir ve bu antikorların varlığını ile tanınlanır [32]. Diğer bir yandan virüs replikasyonu için tam bir ifade kullanılamaz. Chemiluminescent immunoassay (CLIA) olarak da bilinen yöntem ELISA'nın değiştirilmiş versiyonudur. Burada lüminesans ikincil antikorunu kullanılır ve patojenlerin tespiti için ölçüm yapılır. Genellikle IgG, IgM ve IgA antikorlarının ölçümünde kullanılır. Bu testin diğer ELISA temelli testlerden en büyük farklı hasta numunelerinin viral spesifik proteinlerle karıştırılmasına izin verilmesidir. Aynı prensiple antijen-antikor kompleksi ikincil primer ile birleştirilir ve ışık üretmek için kimyasal bir reaksiyon oluşur. Yayılan ışığın kantitatif miktarı daha sonra numunede bulunan antikorların sayısını ölçmek için kullanılır [33].

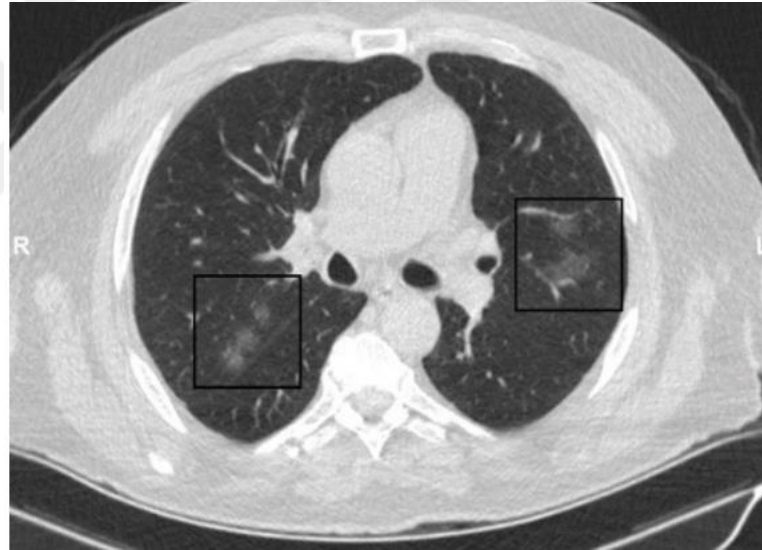
Hızlı antijen testlerinde (RDT) ise hastanın kan serumu örneklerinde virüse karşı antikorların oluşup oluşmadığının incelenmesidir. Antijen-antikor kompleksinin bir zar boyunca kılcal hareketle ilerlemesi ve bir renk değişikliği üreten yakalama antikorları tarafından hareketsiz hale getirilmesi lateral akış testi prensibi üzerinde çalışır. RDT oldukça portatif ve ucuz maliyetlidir. Nazal sürüntü, tükürük veya kan formundaki numunelerin pozitif veya negatif sonuçları belirlemek için renkli çizgiler gösterdiği lateral akış testi prensibi üzerinde çalışırlar [34]. Bir yanal akış tahlilinde, altın nanoparçacık etiketli antikorlar (Au-Ab) ve yakalama antikorları içeren bir zar iki farklı hatta bulunur. Hastanın numunesi zara yüklendiğinde, zar boyunca kılcal hareketle ilerler. İlk nce Au-Ab ile karşılaşır ve viral antijenler bir kompleks oluşturmak için bağlanır. Bu kompleks daha sonra ilerler ve ikinci hattaki yakalama antikorları tarafından yakalanır ve bu yüzey üzerinde immobilizasyonu testleri doğrulayan renkli çizgilerin üretilmesiyle sonuçlanır [35].

Nötralizasyon testi, hastanın serumunda, in vitro kültürde virüs replikasyonunu bloke eden antikorları tanımlar. Prosedür, şüpheli hastalardan serum örneklerinin toplanması ve Vero E6 hücrelerinde virüs kültürünün büyümesi ile başlar. Virüs replikasyon sürecine başladığında, hastanın antikor içeren serum örneği sırasıyla kültüre eklenir. Tespit edilebilir IgM ve IgG antikor titresi varsa, virüs parçacıklarına bağlanır ve replikasyon sürecini bloke ederek hastanın serum örneğinde SARS-CoV-2'ye maruz kaldığını doğrular [36].

Radyolojik tanı, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun birincil hedefi olduğundan hastanın solunum sistemindeki klinik değişikliklerin tanımlanmasına dayanır. Bu test, hastaya viral maruziyetin erken teşhisi için kullanılabilir. Göğüs bilgisayarlı tomografi (BT) taraması ve göğüs röntgeni (CXR) kullanarak iç organların, kemiklerin ve yumuşak dokuların daha büyük bir görünümünü veren tıbbi görüntüleme teknikleridir [37]. Ayrıca virüslerin patofizyolojisinin anlaşılması ve insan vücudundaki viral enfeksiyonun ilerlemesinin aydınlatılması için de gereklidir. Hedeflenen organlar ve klinik semptomları bu yaklaşımla kolayca incelenebilir. Hastalıktan etkilenen organların değerlendirilmesi üzerine daha ileri çalışmalar yürütmek için çeşitli tıbbi görüntüleme teknikleri kullanılmıştır [38]. Pnömoni hakkında bilgi sağlamada bilgisayarlı tomografi (BT) (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6) taramasının daha uygun olduğu bulunmuş, ancak sonuçlar, virüsün o sırada olabileceği farklı aşamaları vurgulayan farklı hastalarda değişkenlik göstermiştir. En sık gözlenen klinik özellikler buzlu cam görünümü (Ground Glass Opacity (GGO)) lezyonları (%56.4), lokal yamalı gölgelenme (%28.1), bilateral yamalı gölgelenme (%51.8) ve interstisyel anormalliklerdir (%4.4) [39]. Şiddetli vakalar, bu semptomların şiddetli olmayan vakalara göre daha belirgin olduğunu göstermiştir. Hastalığın ilerlemesi ile ilişkili klinik değişikliklerin analizi, enfeksiyonun erken evresinin bir GGO lezyonu ile işaretlendiğini ortaya çıkarmıştır. Hastalık ilerledikçe interlobüler ve intralobüler septal kalınlaşmaya uğramıştır. Sonunda, ciddi akciğer yaralanmalarına neden olan daha konsolide lezyonlar oluşmuştur [40].



Şekil 2.5 BT görüntü oluşturmada tarama fazının gösterimi [41].



Şekil 2.6 Bilgisayarlı tomografi görüntüsü: 64 yaşında erkek hastaya ait aksiyel kontrastsız toraks bilgisayarlı tomografi görüntüsünde her iki akciğerde buzlu cam opasitesinin izlenmesi [42].

2.3. Kantitatif RT-PCR (q-RT-PCR) Analiz Metodu

Moleküler teşhisin temeli, şüpheli bireylerin örneğinden viral genetik materyalin tanımlanmasına ve amplifikasyonuna bağlıdır. Bu tanımlama qRT-PCR ile yapılır. WHO tarafından, viral genomun belirli alanlarına bağlanan ve daha sonra bunların amplifikasyonunu sağlayan primerlerin tasarlanmasını içeren bir dizi protokol yayınlanmıştır [43]. Primerlerin tasarlanması için virüsün spesifik gen bölgelerinin

tanımlanması gerekmektedir. PCR işlemi ilk olarak RNA izolasyonunu ve saflaştırılması ile başlamaktadır [4]. Elde edilen RNA dizilerinin amplifiye edilebilmesi için c-DNA'ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu işlem, ileri ve geri primerlerin kullanılması ile sağlanır ve problemler bu iki primer bağlanma bölgesine arasında kalan alana bağlanması için uygun koşulları sağlar. Problemlerden kantitatif ölçüm alınabilmesi için PCR döngüsünün uzatma fazı sırasında Taq polimerazı ayıran raportör boya ve bir söndürücü boyanın 5' nükleaz aktivitesi gereklidir [44]. Oluşan ayırım ile floresan bir sinyal üretilir ve her bir döngüde daha fazla haberci boya bölünmesi meydana gelir ve böylece floresan yoğunluğunu arttırılmış olur. Oluşan floresan yoğunluk PCR spesifik cihazlar ile ölçülür ve SARS-CoV-2 tespiti için insan RNase P (RP) geni de bir kontrol olarak bir dizi primer ve prob tarafından hedeflenir.

SARS-CoV-2'nin tespiti için ülkeler farklı hedef gen bölgeleri seçmiştir. Örneğin, Çin esas olarak ORF1ab ve N geninin tanımlanmasına güvenmiştir [3]; ABD, virüsün N geninde üç hedef belirlemiştir; Almanya, tespit için RdRP, E ve N genine odaklanmıştır; Paris Pasteur Enstitüsü RdRP geni içinde 2 bölgeyi hedeflemektedir; Tayland ağırlıklı olarak N geni kullanmıştır; Hong Kong, ORF1b-nsp14 ve N geninin tanımlanmasına dayalı bir tanı testi geliştirmiştir; başak proteini (S proteini) Japonya Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü tarafından hedef alınmıştır [29]. Ülkemizde ise genellikle kamu hastanelerinde ve özel sektörde kullanılan kitlerin tasarımında, SARS-CoV-2 genomunda bulunan ORF1ab, N ve E genlerini hedefler ve Real Time PCR cihazının FAM kanalında okunur. İnternal kontrol olarak hedeflenen RNase P geni ise HEX kanalında okunur [44].

2.4. Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (RT-LAMP) Metodu

Kolorimetrik algılamalı döngü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) yöntemi ilk olarak Zhang ve ekibi (2020) tarafından önerilmiştir [45]. Genel anlamda virüs tespiti için kullanılan yöntemler oldukça karmaşık, pahalı ve spesifik ekipman ve uzman personel gerektirmektedir. Ancak RT-LAMP metodunun seçilimi ile neredeyse eşit sonuçlar sağlanırken karmaşık olan tüm altyapı gereksinimin önüne geçilmesini sağlamıştır. RT-LAMP'ye ek olarak Jinzhao Song ve arkadaşları (2021), tek bir tüpte iki aşamalı bir amplifikasyon için rekombinaz polimeraz amplifikasyonunu (RPA) geliştirmiştir [46]. Sunduğu tek tüp teknoloji ile POC temelli bir sistem önermiş ve aslında insanların da

evde tek başlarına hiçbir klinik kurulum olmadan da hastalık teşhisinin olabileceğini öne sürmüştür. POC temelli cihazların en vazgeçilmez özelliği kendini izole eden bireylerin tek başlarına hassas, güvenilir ve hızlı sonuçları alabileceği bir akıllı telefon ile entegre olma potansiyelidir [47]. Hastanın nazal sürüntüleri bir RT-LAMP ve reaktiflerinin olduğu sisteme damlatılacak ve bir renk değişikliğinin görselleştirilmesi ile sonuçlar elde edilmiş olacaktır. Bu sayede hastanelere kontrol amaçlı gidilmeler azalmış olacak ve enfeksiyonun yayılma şansı da önemli ölçüde azalmış olacaktır [48].

Nükleik asit saptamaları bir saatin üzerinde gerçekleşir ve izotermal bir ortamda gerçekleştirilen güçlü bir amplifikasyon yöntemi olan RT-LAMP geleneksel PCR tekniğinin aksine tipik olarak gereken sıcaklık değerleri gerekli değildir. Nükleik asit numunesinin, özel olarak tasarlanmış 4 (veya 6) primerin ve Bst DNA polimerazın aynı test tüpünde yaklaşık 60- 65 °C'de inkübe edilmesiyle, aynı anda, tek bir adımda, nükleik asidin amplifikasyonu ve tespiti tamamlanabilmektedir. Prensipte primer seti hedef DNA dizisinin altı farklı bölgesini tanıyan iki iç ve iki dış primerden oluşur. İleri iç astar (FIP), F2 bölgesinden ve F1 (F1c) bölgesinin tamamlayıcı bir dizisinden oluşurken, geriye doğru iç astar (BIP), B2 bölgesinden ve B1 (B1c) bölgesinin tamamlayıcı bir dizisinden oluşur. İleri dış primer (F3) ve geri dış primer (B3), sırasıyla F3c ve B3c bölgelerinin sekanslarını tamamlar [49]. Bu bölgeler istenen amplifiye edilmiş diziyi çevreler. Herhangi bir RT-LAMP tahlili için kullanılan primerler, nükleotid baz çifti konsantrasyonu ve konumları, DNA bölgeleri arasındaki mesafe, primerlerin termodinamiği vb. gibi bir dizi faktör tarafından optimize edilmelidir.

RT-LAMP'nin ilk aşaması olan amplifikasyon çift sarmallı DNA oluşturulması için FIP'nin F2 bölgesinde hedef DNA ile kompleks oluşturmasıyla başlar. FIP'den DNA sentezi DNA polimeraz aktivitesi ile başlar ve eğer varsa tek bir DNA sarmalını eş zamanlı olarak eşler. Aynı zamanda F3 primeri F3c bölgesine bağlanır ve FIP-tamamlayıcı sarmalın yerini alır. FIP'deki F1c dizisi FIP'nin kendi kendine tanınmasını sağlar ve bir saç tokası yapısı oluşturulmasını tetikler. Bu saç tokası yapısı daha sonra BIP ile başlatılan DNA sentezi ve ardından B3 ile hazırlanmış DNA sentezinden tek sarmal yer değiştirmesi için hedef görevi görür. Böylece dambıl benzeri bir DNA yapısı ile sonuçlanır ve bir sonraki amplifikasyon için şablon görevi görür [50]. Dambıl yapısının üstel amplifikasyonu başlatılır ve F1 bölgesinde DNA sentezi DNA polimeraz tarafından başlatılır. FIP ayrıca F2 bölgesi tanır ve tek ilmekli yapı formuna hibritleşir ve

bu primerin DNA sentezi, F1 ile hazırlanmış ipliğin yer değiştirmesine ve bir ilmek yapısına kendi kendine bağlanmasına neden olur. Son olarak, yeni halkadaki B1 bölgesinden, mevcut şablonu g¼çlendirerek aynı zamanda FIP-tamamlayıcı ipliğin yer değiştirmesinden yeni bir tane yaratarak kendi kendine hazırlanan DNA sentezi yeniden başlatılır [51].

RT-LAMP tekniği ile çoklu amplifiye (yaklaşık 1 saat içinde 109 kez) uygulamak mümkündür. Amplifikasyon verimliliğini daha da artırmak için altı primerli (loop primer) RT-LAMP da geliştirilmiştir. Döngü primerli RT-LAMP'ta dört primer yerine altı primer kullanılır, ileri ve geri döngü primerleri (LF ve LB) sırasıyla F1/F2 ve B1/B2 bölgeleri arasındaki bölgelere tavllanır. Amplifikasyon, DNA sentezi için artan başlangıç noktalarından sabitlendiğinden, döngü primerlerinin RT-LAMP sürecini geliştirdiği kanıtlanmıştır. RT-LAMP'de DNA yerine RNA dizileri saptanır. Viral RNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüřtür¼lmesi RT-LAMP karışımına ters transkriptaz eklenmesi ile sağlanır [52]. Bu prosedür, çok sayıda RNA vir¼s¼n¼n teşhisinde büyük yardım sağlamıştır. Aynı test tüp¼nde birden fazla patojeni tespit etmek için, daha fazla primer veya benzersiz floresan sinyalleri ile çoklu RT-LAMP testleri geliştirilmiştir. Tüm bu yenilemelerin aslında RT-LAMP metodunun SARS-CoV-2 tespitinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir [53].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul ve Bakanlık Onayı

Bu araştırma, Helsinki Dünya Tabipler Birliği Bildirgesi'ne uygun olarak yürütülmüştür. Çalışma protokolü, Üsküdar Üniversitesi Etik Kurulu tarafından gözden geçirilmiş ve onaylanmıştır (Tarih: 31.05.2021-Konu No: 61351342/Mayıs-2020-61). Ayrıca, T.C. Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu tarafından, COVID-19 Bilimsel Araştırma Çalışmaları için onay alınmıştır (Onay No: YakupArtık-2021-05-22T01_36_00).

3.2. Numune Toplama ve Taşıma

SARS-CoV-2 hastalarının nazofaringeal sürüntü örnekleri eğitimli personel tarafından toplandı ve bir viral taşıma ortamı (VTM) solüsyon tüpü içinde İstanbul'daki Özel VİROMED İstanbul Merkez Laboratuvar ve Görüntüleme Merkezi'ne transfer edildi. Rastgele seçilen otuz hasta numunesi dört farklı kit ile test edildi. Kitler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Deneylerde Kullanılan Kitler

RT-LAMP Kiti	q-RT-PCR Kiti
SENSObiz COVID-19 (SARS-CoV-2) Reverse Transcriptase PCR (izotermal) Assay (RT-LAMP) (NANOBIZ Technologies A.Ş.)	QIAprep & amp Viral RNA UM kit
	Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus kiti (BIOEKSEN R&D Technologies)
	CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR kiti (MEDAMET Medical ITH. IHR. SAN. TIC. LTD, Türkiye)

Ek olarak, bu kitlerden üçü (QIAprep & amp Viral RNA UM kiti, Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus kiti ve CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR kiti) GDS Rotor- Gene Q Thermocyclers (QIAGEN) ve İnovia Technologies GenX serisi (INOVIA) RT-PCR sistemleri analiz edildi. Çalışma birinci ve beşinci gün sonuçlarının pozitif ve negatif olması ile günlük pozitif değişen örneklerin Ct sonuçları baz alınarak yapıldı.

3.3. q-RT-PCR Testleri

q-RT-PCR için viral taşıma tamponu (VTM) kullanılmıştır. Nüklesik asit ekstraksiyon özelliğine sahip VTM solüsyonu ile ek bir RNA ekstraksiyon adımı gerçekleştirilmemiştir. VTM solüsyonu sayesinde örneklerin RNA ekstraksiyonu için vorteks yeterli olmaktadır. RT-PCR için, QIAprep & amp Viral RNA UM kiti, Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus kiti ve CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR kiti olmak üzere üç farklı kit sistemi kullanıldı.

3.4. Biospeedy SARS-CoV-2 Variant Plus Kiti

Kit içerisinde bulunan ORF1ab geni için 6-karboksi-floresein (FAM), RNaseP geni için fosforamidit (Hex), Spike (S) geni için 6-karbosil-X-Rhoddamine (ROX) ve nükleokapsid (N) geni için karboksilik asit (Cy5) kanalları kullanıldı. Kit protokolüne göre toplamda 10 µl PCR karışımı elde etmek için 7,5 µL hazır kit (mix) karışımına VTM'li 2,5 µL hasta numuneleri eklendi. RT-PCR amplifikasyonunun termal döngü parametreleri: ~~bu şekilde baz alındı~~: ters transkripsiyon için 3 dakika 52°C, bekletme için 95°C 10 saniye, daha sonra denatürasyon için 35 döngü 85°C 1 saniye ve 60°C 1 saniye sırasıyla tavlama ve uzatma şeklinde baz alındı.

3.5. CoVirion-CV19-2 SARS-CoV-2 OneStep RT-PCR Kiti

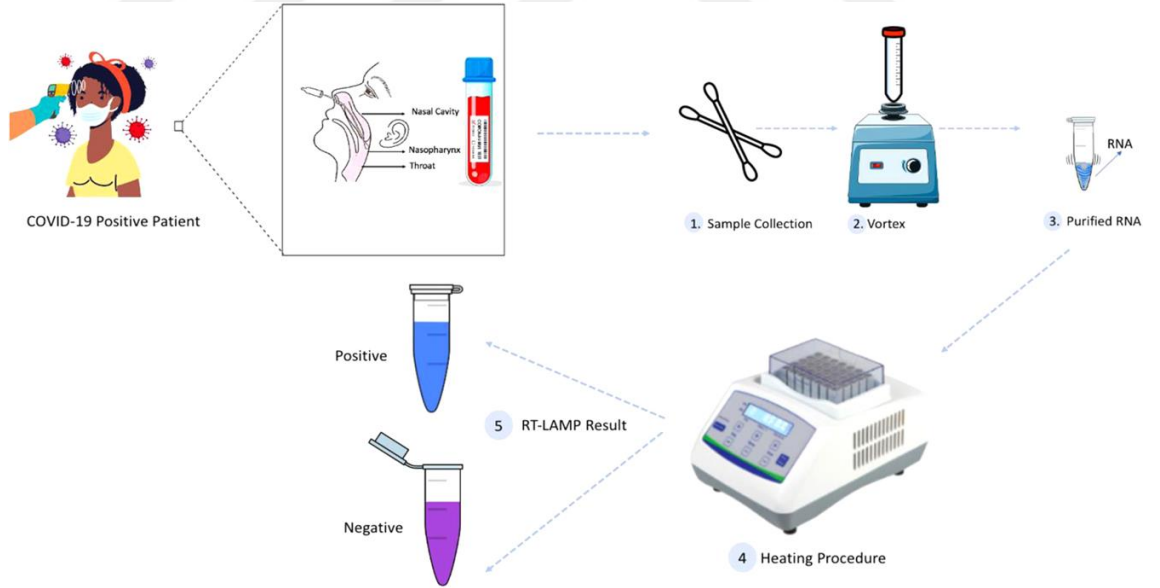
Kitte S, Orflab ve RNaseP geni için sırasıyla FAM, HEX ve Texas Red kanalları kullanıldı. Kit protokolüne göre toplamda 20 µL PCR karışımı elde etmek için 15 µL hazır kit karışımına VTM'li 5 µL hasta numunesi ilave edildi. RT-PCR amplifikasyonunun termal döngü parametreleri: 55°C ters transkripsiyon için 10 dakika, 95°C 10 saniye bekletme, ardından 40 döngü ve denatürasyon, tavlama ve uzatma için sırasıyla 30 saniye için 60°C şeklindedir.

3.6. QIAprep & amp Viral RNA UM Kiti

Bu kitte, toplamda 20 µl PCR karışımı elde etmek için 10 µl hazır kit karışımına VTM'li 10 µl hasta numunesi eklenmiştir. q-RT-PCR amplifikasyonunun termal döngü parametreleri: 50 °C ters transkripsiyon için 10 dakika, 95 °C 2 dakika bekletme, ardından 40 döngü ve 58 °C denatürasyon ve uzatma için 30 saniyedir.

3.7. RT-LAMP-PCR testleri—SENSObiz COVID-19 RT PCR Kiti

RT-LAMP prosedüründe kit, VTM solüsyonunun kullanılması nedeniyle herhangi bir ekstra RNA ekstraksiyonu adımı gerektirmez ve ek bir avantaj olarak örneklerinin hastadan alındıktan hemen sonra kullanılabilmesine olanak sağlar. Bu nedenle RT-LAMP4U cihazı (NANOBIZ Technologies A.Ş.) kullanılarak SENSObiz COVID-19 (SARS-CoV-2) Reverse Transcriptase PCR (izotermal) Assay kullanıldı. Karışım buz üzerinde tamamen çözdürüldü ve birkaç kez alt üst edilerek iyice karıştırıldı. Örneklerin RNA izolatu (minimum 0,5 ng/μl) reaksiyon karışımına (23 μL) ilave edildi. Hazırlanan tüpler parmakla birkaç kez hafifçe vurularak iki saniye kadar karıştırılarak üç-beş saniye kadar santrifüjlendi ve termal döngüleyiciye yerleştirildi. 45 dk sonunda sonuçlar elde edildi. Amplifikasyon ve uzatma sıcaklıkları sırasıyla 63°C ve 4°C idi. Ayrıca, Şekil 3.1'de gösterildiği gibi, negatif kontrol tüpleri mor ve pozitif kontrol tüpleri mavi olduğundan, her hasta numunesi iki kopya olarak çalışıldı ve çıplak gözle gözlemlenebilme özelliği sayesinde örneklerin pozitiflik ve negatiflik durumları kayıt altına alındı.



Şekil 3.1 Ters transkripsiyon döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) çalışma protokolü

3.8. Test Yorumu

Rotor-Gene Q'nun özel döner tasarımı sayesinde mevcut olan en hassas ve çok yönlü gerçek zamanlı PCR döngüleyicilerden bir tanesidir. Her tüp bir hazne içinde döner ve hızlı termal döngü sırasında tüm numuneleri tam olarak aynı sıcaklıkta tutar. Rotor-Gene Q'da Ct değeri otomatik olarak 200 olarak düzenlenmiştir. HEX değerlerinden bağımsız olarak FAM kanalı için Ct değerleri 37'nin altındadır. FAM kanalında Ct değeri 37'nin üzerinde olan sigmoidal olmayan sinyaller veya sigmoidal sinyaller ve HEX kanalında Ct değeri 37'nin altında olan sigmoidal sinyaller negatif olarak yorumlanmaktadır.

İnovia Technologies GenX serisinde, pozitif değerler, HEX değerlerinden bağımsız olarak FAM kanalı için Ct değerleri 37'nin altında olan sigmoidler olarak yorumlanmaktadır. FAM kanalında Ct değeri 37'nin üzerinde olan sigmoidal olmayan sinyaller veya sigmoidal sinyaller ve HEX kanalında Ct değeri 37'nin altında olan sigmoidal sinyaller negatif olarak yorumlanmaktadır. Hem FAM hem de HEX kanallarında 37 Ct'nin altındaki sigmoidal olmayan sinyaller ve sigmoidler, kit protokolüne göre geçersiz sonuçlar olarak yorumlanmaktadır. Öte yandan kit protokolüne göre eşik değeri İnovia Technologies GenX serisi için otomatik 200 olarak ayarlanmıştır.

RT-LAMP tekniğini gerçekleştirmek için RT-LAMP4U cihazı kullanılmıştır. SARS-CoV-2 için RT-LAMP kiti primer setleri, RdRP, E ve N genlerinin korunmuş bölgelerinden tasarlanmıştır. İki dış primer (ileri primer F3 ve geriye doğru primer B3), iki iç primer (ileri iç primer FIP ve geri iç primer BIP) ve iki döngü primeri (ileri ilmek primeri LF ve geri ilmek primeri LB) dahil olmak üzere RT-LAMP primerleri boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Kit, tamamen kullanıma hazır COVID-19 Reaksiyon Karışım tüpleri içerir ve çıplak gözle görülebilen kalitatif (evet/hayır) sonuçlar vermektedir. Test sonuçları için çıplak göz yeterlidir ve negatif kontrol tüpleri mor, pozitif kontrol tüpleri mavi olarak gözlemlenir. Her hasta numunesi çift olarak çalışılmış olmasına rağmen, her iki numune tüpündeki mor, SARS-CoV-2 negatif sonuç anlamına gelir ve her iki numune tüpündeki mavi, SARS-CoV-2 pozitif sonuç anlamına gelir. Numune tüplerinden biri mor diğeri mavi ise test Tablo 3.2'de özetlendiği şekilde tekrarlanır.

Tablo 3.2 RT-LAMP sonuç değerlendirmesi

Değerlendirmeden Önce				Değerlendirmeden Sonra	
Negatif Kontrol	Pozitif Kontrol	Her İki Numune Tüpü Aynı Renkte	Sonuç Değerlendirmesi	Her İki Numune Tüpünün Rengi	Sonuç
Mor	Mavi	Evet	Evet	Mor	SARS-CoV-2 Negatif
				Mavi	SARS-CoV-2 Pozitif
Mor	Mavi	Hayır	Hayır	Yeniden test önerilir	

3.9. İstatistiksel Analiz

SPSS 25.0 paket programı verilerin analizinde kullanılmıştır. Dağılım analizleri Kolmogorov Smirnov testi kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma veya frekans) yanısıra Parametrik veriler için t- testi, One Way Anova, Ki kare ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. Çalışma değerlendirilirken %95 güven aralığında hesaplanmıştır.


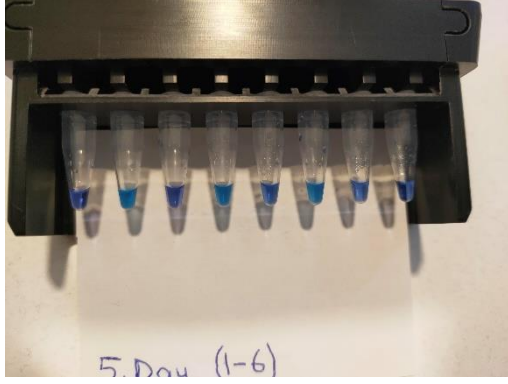


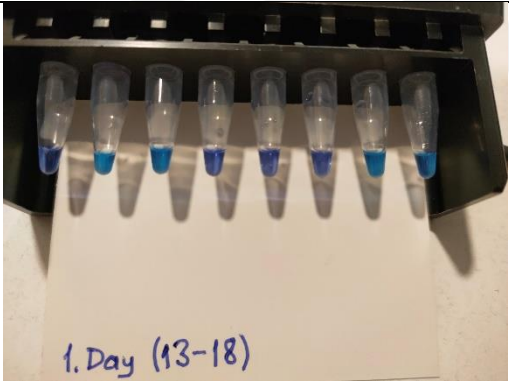
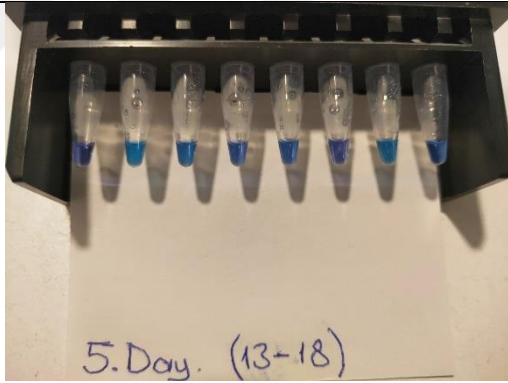
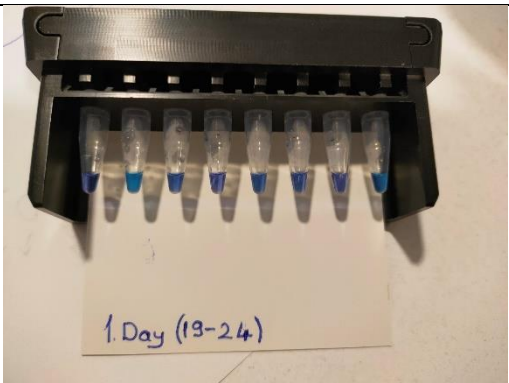
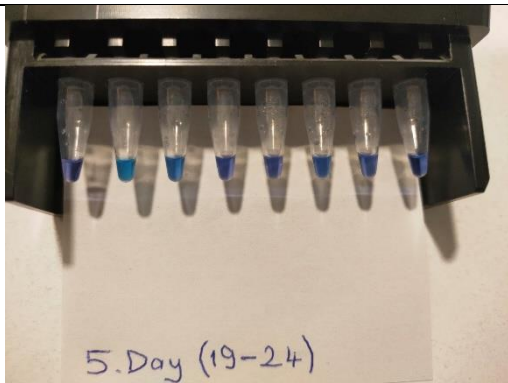
4. SONUÇLAR

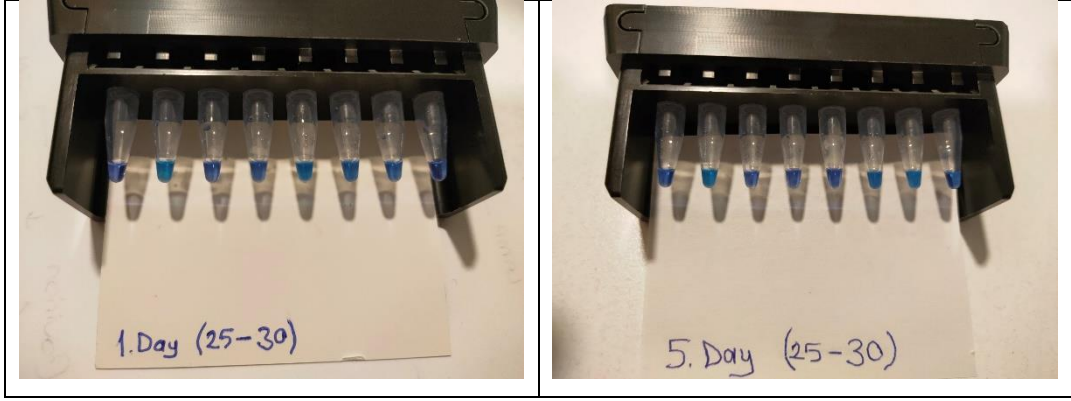
COVID-19 pozitif olduğu bilinen 30 farklı hasta numune örnekleri alınarak deneyin 1. günü ve 5. günü, 2 farklı qRT-PCR cihazında 3 farklı kit ile çalışılmıştır. Aynı örnekler RT-LAMP-PCR cihazında yine 1. gün ve 5. Günde çalışılmıştır. RT-LAMP cihazının eşik değeri her çalışma için o çalışmaya özgü olarak otomatik belirlenerek negatif ve pozitif sonuç vermiştir (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2.)

Birinci gözlem sonucu: örneklerin 1. ve 5. günlerindeki pozitiflik ve negatiflik sonuçları ile pozitif çıkan numunelerin Ct sonuçlarının gün bazında nasıl değiştiğinin kit hassasiyetini ölçmek adına; Bioeksen, Qiagen ve Covirion kitlerinde karşılaştırılması yapıldı. Bu karşılaştırma 2 farklı cihaz üzerinde yapılarak ortak bir bulgu ve sonuç elde edildi.

İkinci gözlem sonucu: Birinci gözlem de elde edilen bulguların, RT-LAMP-PCR cihazında elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması kit, cihaz ve gün bakımından değerlendirilerek 1. ve 5. gün sonuçları için qRT-PCR'a göre güven aralığı hesaplandı.

LAMP cihazı altı numune örneği ile bir negatif ve bir pozitif kontrol olmak üzere toplamda 8 kuyucuk bulunan mini-demo bir cihazdır. Bu nedenle 30 örnek için, sırasıyla örnekler (1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30) şeklinde cihaza konularak çalışılmıştır. Sol sütundaki fotoğraflar (Şekil 4.1, Şekil 4.2) birinci günde yapılan deneylere, sağ sütundaki fotoğraflar (Şekil 4.1, Şekil 4.2) beşinci günde yapılan deneylere aittir. LAMP tekniğine ait sonuçlar (Tablo 4.1 birinci gün sonuçları ile Tablo 4.2 beşinci gün sonuçları) bu fotoğraflarda elde edilen veriler sonucunda oluşturulmuştur. Şekil 4.1 incelenen nitel olarak elde edilen görüntülerde pozitif numuneler ve pozitif kontrol mavi rengi alırken, negatif kontrol ve negatif numuneler mor rengine dönüşmüştür. Bu numunelerin nicel olarak eşik değerlerine göre negatif ve pozitifliğinin değerlendirilmesi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

1. Gün (Numune Sıralaması)	5. Gün (Numune Sıralaması)
 <p>1. Day (1-6)</p>	 <p>5. Day (1-6)</p>
 <p>1. Day (7-12)</p>	 <p>5. Day (7-12)</p>
 <p>1. Day (13-18)</p>	 <p>5. Day (13-18)</p>
 <p>1. Day (19-24)</p>	 <p>5. Day (19-24)</p>



Şekil 4.1 RT-LAMP cihazında numunelerin nitel gözlemleri



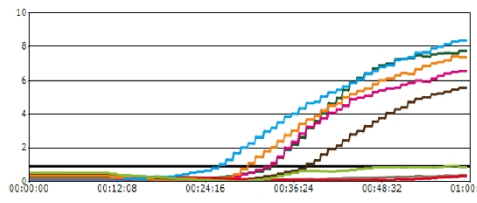
LAMP 4U®

TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 02:41:42

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:1



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	1	NEGATİF -
4	Turuncu	2	POZİTİF +
5	Kahverengi	3	NEGATİF -
6	Çiğdem	4	POZİTİF +
7	Pembe	5	POZİTİF +
8	Yeşil	6	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

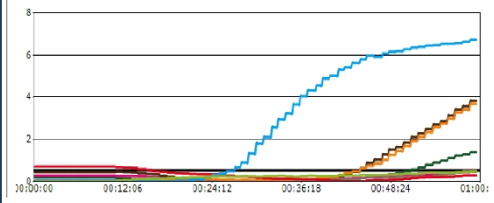
LAMP 4U®

TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 18:38:27

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:0,6



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	1	POZİTİF +
4	Turuncu	2	POZİTİF +
5	Kahverengi	3	NEGATİF -
6	Çiğdem	4	POZİTİF +
7	Pembe	5	NEGATİF -
8	Yeşil	6	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

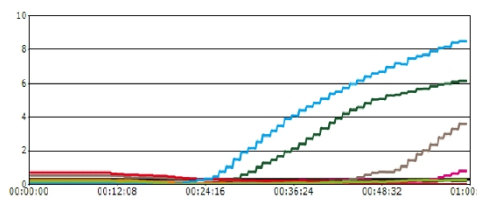
LAMP 4U®

TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 04:09:15

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:0,4



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	7	POZİTİF +
4	Turuncu	8	NEGATİF -
5	Kahverengi	9	POZİTİF +
6	Çiğdem	10	NEGATİF -
7	Pembe	11	POZİTİF +
8	Yeşil	12	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

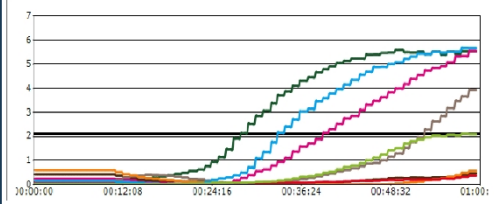
LAMP 4U®

TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 20:01:09

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:2,16



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	7	NEGATİF -
4	Turuncu	8	NEGATİF -
5	Kahverengi	9	POZİTİF +
6	Çiğdem	10	NEGATİF -
7	Pembe	11	POZİTİF +
8	Yeşil	12	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

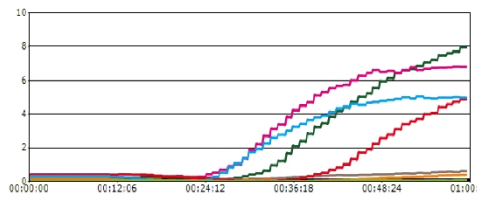


TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 05:42:09

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:0,2



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	13	POZİTİF +
4	Turuncu	14	POZİTİF +
5	Kahverengi	15	POZİTİF +
6	Çok Kahverengi	16	POZİTİF +
7	Pembe	17	POZİTİF +
8	Koyu Yeşil	18	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

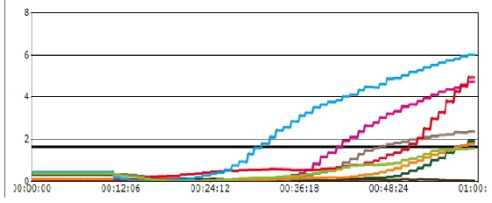


TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 21:07:44

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:1,72



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	13	POZİTİF +
4	Turuncu	14	POZİTİF +
5	Kahverengi	15	POZİTİF +
6	Çok Kahverengi	16	NEGATİF -
7	Pembe	17	POZİTİF +
8	Koyu Yeşil	18	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

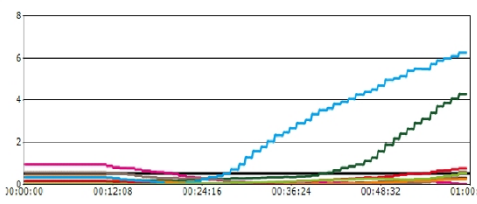


TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 07:02:45

Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:0,6



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	19	POZİTİF +
4	Turuncu	20	NEGATİF -
5	Kahverengi	21	POZİTİF +
6	Çok Kahverengi	22	NEGATİF -
7	Pembe	23	POZİTİF +
8	Koyu Yeşil	24	POZİTİF +

Sayfa 1 / 1

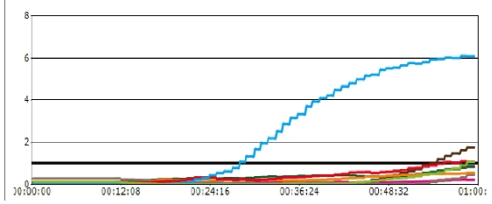


TEŞHİS RAPORU

Analiz Tamamlanma Zamanı
06.06.2020 22:11:55

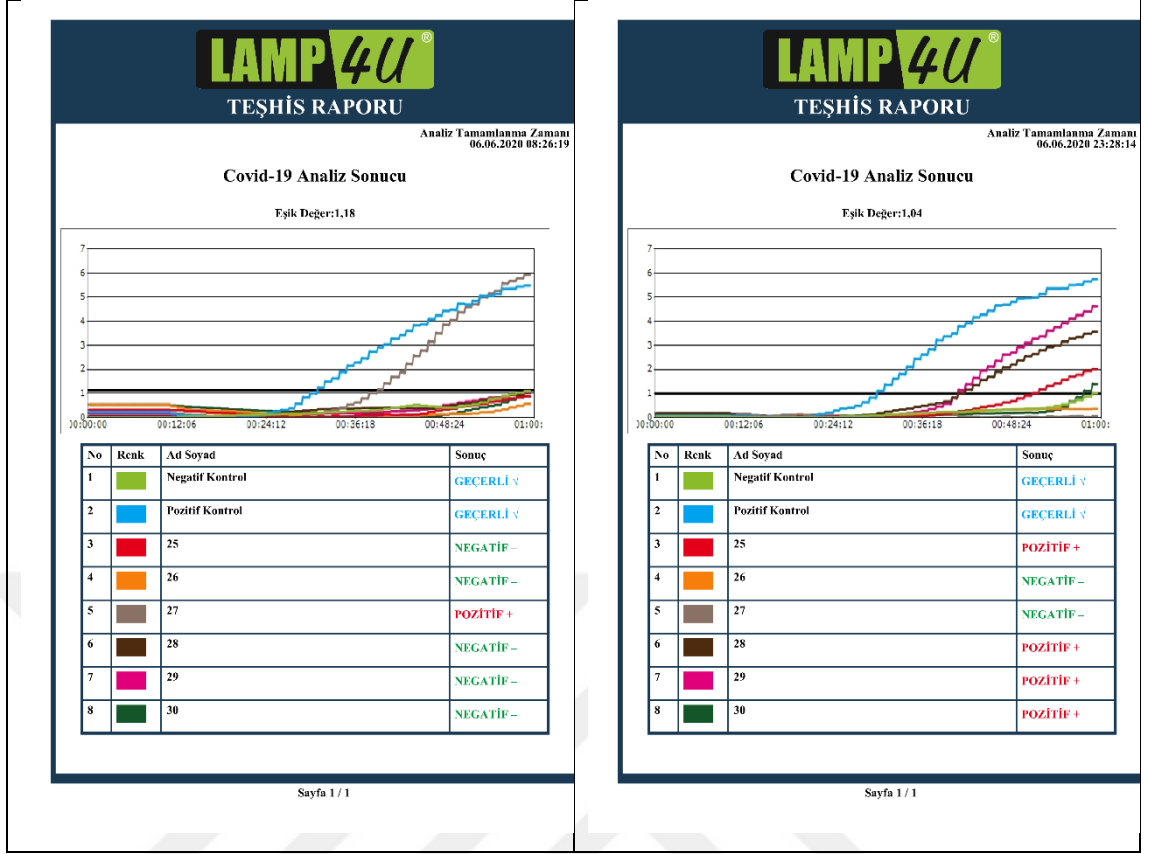
Covid-19 Analiz Sonucu

Eşik Değer:1,08



No	Renk	Ad Soyad	Sonuç
1	Yeşil	Negatif Kontrol	GEÇERLİ ✓
2	Mavi	Pozitif Kontrol	GEÇERLİ ✓
3	Kırmızı	19	POZİTİF +
4	Turuncu	20	NEGATİF -
5	Kahverengi	21	NEGATİF -
6	Çok Kahverengi	22	POZİTİF +
7	Pembe	23	NEGATİF -
8	Koyu Yeşil	24	NEGATİF -

Sayfa 1 / 1



Şekil 4.2 RT-LAMP cihazında numunelerin nicel gözlemleri

Tablo 4.1 Birinci gün sonuçları

1. Gün (08.06.2021)														
Nm	RT-LAMP		BİOEKSEN				QİAGEN				COVİRİON			
Sy.	ED	PCR	İnovia		Rtr		İnovia		Rtr		İnovia		Rtr	
1	1	N	26	P	23	P	31	P	26	P	27	P	29	P
2	1	P	14	P	14	P	20	P	21	P	19	P	20	P
3	1	N	27	P	23	P	30	P	33	P	27	P	32	P
4	1	P	16	P	15	P	21	P	21	P	17	P	19	P
5	1	P	16	P	15	P	24	P	24	P	23	P	24	P
6	1	P	19	P	19	P	23	P	25	P	22	P	24	P
7	0,4	P	16	P	17	P	26	P	28	P	24	P	25	P
8	0,4	N	26	P	24	P	40	N	40	N	31	P	31	P
9	0,4	P	20	P	19	P	25	P	26	P	25	P	25	P
10	0,4	N	16	P	15	P	24	P	25	P	20	P	23	P
11	0,4	P	18	P	16	P	20	P	20	P	18	P	21	P
12	0,4	P	22	P	22	P	40	N	29	P	24	P	29	P
13	0,2	P	16	P	15	P	24	P	24	P	22	P	22	P
14	0,2	P	21	P	18	P	24	P	25	P	22	P	23	P
15	0,2	P	18	P	19	P	27	P	28	P	25	P	26	P
16	0,2	P	17	P	17	P	27	P	27	P	23	P	25	P
17	0,2	P	11	P	11	P	16	P	17	P	16	P	18	P
18	0,2	P	15	P	13	P	21	P	22	P	18	P	35	P
19	0,6	P	20	P	21	P	26	P	27	P	22	P	24	P
20	0,6	N	17	P	17	P	23	P	26	P	21	P	23	P
21	0,6	P	18	P	16	P	27	P	29	P	23	P	25	P
22	0,6	N	22	P	21	P	29	P	30	P	26	P	29	P
23	0,6	P	17	P	16	P	24	P	25	P	22	P	24	P
24	0,6	P	13	P	13	P	23	P	25	P	20	P	20	P
25	1,18	N	21	P	20	P	28	P	29	P	25	P	28	P
26	1,18	N	15	P	15	P	23	P	24	P	20	P	22	P
27	1,18	P	16	P	16	P	25	P	26	P	21	P	23	P
28	1,18	N	17	P	15	P	24	P	25	P	19	P	23	P
29	1,18	N	24	P	23	P	30	P	29	P	28	P	32	P
30	1,18	N	19	P	18	P	25	P	26	P	24	P	26	P
Tp.	0,7	19 P	18,4	30 P	17,5	30 P	25,6	28 P	26,0	29 P	22,4	30 P	25,0	30 P

Tablo 4.2 Beşinci gün sonuçları

5. Gün (12.06.2021)														
Nm	RT-LAMP		BİOEKSEN				QIAGEN				COVİRION			
Sy.	ED	PCR	İnovia		Rtr		İnovia		Rtr		İnovia		Rtr	
1	0,6	P	20	P	19	P	32	P	40	N	26	P	27	P
2	0,6	P	15	P	15	P	23	P	40	N	23	P	24	P
3	0,6	N	23	P	23	P	40	N	31	P	31	P	30	P
4	0,6	P	14	P	14	P	26	P	23	P	19	P	19	P
5	0,6	N	18	P	17	P	30	P	30	P	27	P	24	P
6	0,6	P	22	P	23	P	40	N	40	N	27	P	28	P
7	2,16	N	20	P	20	P	40	N	35	P	32	P	30	P
8	2,16	N	35	N	26	P	40	N	40	N	40	N	40	N
9	2,16	P	20	P	19	P	27	P	29	P	28	P	26	P
10	2,16	N	19	P	18	P	29	P	33	P	27	P	27	P
11	2,16	P	15	P	14	P	24	P	22	P	20	P	20	P
12	2,16	P	23	P	22	P	40	N	35	P	27	P	28	P
13	1,72	P	16	P	15	P	25	P	40	N	24	P	24	P
14	1,72	P	20	P	18	P	40	N	26	P	23	P	23	P
15	1,72	P	19	P	19	P	40	N	34	P	27	P	28	P
16	1,72	N	19	P	18	P	40	N	40	N	28	P	28	P
17	1,72	P	12	P	11	P	19	P	19	P	17	P	18	P
18	1,72	P	14	P	14	P	23	P	23	P	22	P	21	P
19	1,08	P	23	P	22	P	27	P	33	P	26	P	26	P
20	1,08	N	19	P	19	P	26	P	27	P	26	P	26	P
21	1,08	N	35	N	35	N	40	N	40	N	40	N	28	P
22	1,08	P	23	P	25	P	40	N	40	N	31	P	32	P
23	1,08	N	21	P	21	P	40	N	32	P	26	P	27	P
24	1,08	N	17	P	15	P	40	N	31	P	24	P	26	P
25	1,04	P	23	P	22	P	40	N	40	N	28	P	29	P
26	1,04	N	18	P	23	P	32	P	33	P	28	P	30	P
27	1,04	N	20	P	21	P	31	P	32	P	27	P	28	P
28	1,04	P	17	P	16	P	24	P	40	N	21	P	23	P
29	1,04	P	25	P	25	P	40	N	40	N	29	P	28	P
30	1,04	P	35	N	24	P	32	P	33	P	28	P	29	P
	1,32	18 P	20,6	27 P	19,7	29 P	33,0	16 P	33,3	19 P	26,7	28 P	26,5	

4.1. Kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) Analiz Sonuçları

Ct değerleri açısından kit hassasiyeti ele alındığında; 1. gün Rotor-Gene grubunda sadece Quagen ile Covirion ikilileri arasında fark bulunamamıştır. Diğer tüm ikililer arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. Biospeedy kiti 1. ve 5. günde hem İnovia cihazında hemde rotor cihazında Covirion ve Qiagene göre daha iyi çalışmıştır. Covirion kiti ise hem 1. hem de 5. günde İnovia ve Rotor cihazında Qiagen kitinden daha iyi çalışıldığı sonucuna ulaşılmıştır (Table 4.3).

Tablo 4.3 Birinci ve beşinci günde Rotor-Gene cihazı ve İnovia cihazında çalışılan kitlerin Ct değerlerinin anlamlandırılması

		n	Ortalama	Std. Sapma	95% Güven Aralığı		P
					Ortalama		
					Alt Sınır	Üst Sınır	
Ct 1.Gün İnovia	Biospeedy	30	18,4333	3,87462	16,9865	19,8801	0,000
	Qiagen	30	25,6667	5,07416	23,7719	27,5614	
	Covirion	30	22,4667	3,44146	21,1816	23,7517	
	Total	90	22,1889	5,09879	21,1210	23,2568	
Ct 5. Gün İnovia	Biospeedy	30	20,6667	5,77947	18,5086	22,8248	0,000
	Qiagen	30	33,0000	7,21588	30,3055	35,6945	
	Covirion	30	26,7333	5,01675	24,8600	28,6066	
	Total	90	26,8000	7,85429	25,1550	28,4450	
Ct 1. Gün Rotor - Gene	Biospeedy	30	17,5333	3,39100	16,2671	18,7996	0,000
	Qiagen	30	26,0667	4,18481	24,5040	27,6293	
	Covirion	30	25,0000	4,09373	23,4714	26,5286	
	Total	90	22,8667	5,43025	21,7293	24,0040	
Ct 5. Gün Rotor- Gene	Biospeedy	30	19,7667	4,81150	17,9700	21,5633	0,000
	Qiagen	30	33,3667	6,38146	30,9838	35,7495	
	Covirion	30	26,5667	4,24819	24,9804	28,1530	
	Total	90	26,5667	7,60699	24,9734	28,1599	

*One Way Anova Testi yapılmıştır.

İnovia cihazında numunelerin pozitiflik ve negatiflik değerleri açısından kit kullanımını ele alındığında; 1. günde Biospeedy kiti ve Covirion kiti arasında herhangi bir farklılık bulunmamakta, anlamlılık derecesi açısından Qiagen kiti de Biospeedy ve Covirion'a

göre %93,3 güven aralığında yer almaktadır. Bu güven aralığı kit hassasiyeti açısından önemsizdir ve herhangi bir anlamlılık ortaya koymamaktadır (Tablo 4.4)

Tablo 4.4 Birinci günde İnovia cihazında kitlerin pozitif ve negatif sonuçları

			Kit Grupları			p
			Biospeedy	Qiagen	Covirion	
PN 1.Gün İnovia	Pozitif	n	30	28	30	0,326
		%	100,0%	93,3%	100,0%	
	Negatif	n	0	2	0	
		%	0,0%	6,7%	0,0%	

*Fisher ExaCt Testi yapılmıştır.

İnovia cihazında numunelerin pozitiflik ve negatiflik değerleri açısından kit kullanımı ele alındığında; PN 5 gün İnovia pozitif-negatif grupları oranları kitin alt gruplarına göre anlamlı derecede farklılık göstermektedir. Biospeedy ve Covirion kiti arasında herhangi bir farklılık bulunmamakta, anlamlılık derecesi açısından Qiagen kiti de Biospeedy ve Coviriona göre hassasiyetinin düştüğü gözlenmektedir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Beşinci günde inovia cihazında kitlerin pozitif ve negatif sonuçları

			Kit Grupları			p
			Biospeedy	Qiagen	Covirion	
PN 5 Gün İnovia	Pozitif	n	27	16	28	0,000
		%	90,0%	53,3%	93,3%	
	Negatif	n	3	14	2	
		%	10,0%	46,7%	6,7%	

Rotor-Gene cihazında numunelerin pozitiflik ve negatiflik değerleri açısından kit kullanımını ele alındığında; 1. günde Biospeedy ve Covirion kiti arasında herhangi bir farklılık bulunmamakta, anlamlılık derecesi açısından Qiagen kiti de Biospeedy ve Coviriona göre %96,7 güven aralığında yer almaktadır. Bu güven aralığı kit hassasiyeti açısından önemsizdir ve herhangi bir anlamlılık ortaya koymamaktadır (Tablo 4.6)

Tablo 4.6 Birinci günde rotor cihazında kitlerin pozitif ve negatif sonuçları

			Kit Grupları			p
			Biospedy	Qiagen	Covirion	
PN 1.Gün Rotor-Gene	Pozitif	n	30	29	30	1,000
		%	100,0%	96,7%	100,0%	
	Negatif	n	0	1	0	
		%	0,0%	3,3%	0,0%	

Rotor-Gene cihazında numunelerin pozitiflik ve negatiflik değerleri açısından kit kullanımını ele alındığında; PN 5. gün Rotor-Gene pozitif-negatif grupların oranları kitin alt gruplarına göre anlamlı derecede farklılık göstermektedir. Biospedy ve Covirion kiti arasında herhangi bir farklılık bulunmamakta, anlamlılık derecesi açısından Qiagen kiti de Biospedy ve Coviriona kitlerine göre hassasiyetinin düştüğü hesaplanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7 Beşinci günde rotor cihazında kitlerin pozitif ve negatif sonuçları

			Kit Grupları			p
			Biospedy	Qiagen	Covirion	
PN 5 Gün Rotor- Gene	Pozitif	n	29	19	29	0,000
		%	96,7%	63,3%	96,7%	
	Negatif	n	1	11	1	
		%	3,3%	36,7%	3,3%	

4.2. Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon Sonuçları

Birinci günde İnovia cihazı ve Rotor-Gene cihazına göre RT-LAMP grubu karşılaştırıldığında 63,3% oranda bir anlamlılık tespit edilmiş ve hızlı tanı sistemlerinde kullanılan maliyet ve laboratuvar gereksinimi ele alındığında bu sonuçların ideal bir güven aralığında olduğunu göstermiştir (Tablo 4.8 ve Tablo 4.9).

Tablo 4.8 Birinci günde İnovia grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_1.Gün		
			Pozitif	Negatif	Total
PN 1.Gün İnovia	Pozitif	n	19	11	30
		%	63,3%	36,7%	100,0%

Tablo 4.9 Birinci günde Rotor-Gene grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_1.Gün		
			Pozitif	Negatif	Total
PN 1.Gün Rotor- Gene	Pozitif	n	19	11	30
		%	63,3%	36,7%	100,0%

Beşinci günde Rotor-Gene cihazı ve İnovia cihazına göre RT-LAMP grubu karşılaştırıldığında 60% oranda bir anlamlılık tespit edilmektedir. Numunelerin pozitiflik değerleri 5 gün sonra birinci gün yapılan deneye benzer çıkması ve istatistiksel olarak anlamsız olması, RT-LAMP sisteminin uzun süreli numune taramalarında ve numunelerin saklandığı durumda dahi kullanılabilceği sonucunu ortaya koymaktadır (Tablo 4.10 ve Tablo 4.11)

Tablo 4.10 Birinci günde İnovia grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_5.Gün		
			Pozitif	Negatif	Total
PN 1.Gün İnovia	Pozitif	n	18	12	30
		%	60,0%	40,0%	100,0%

Tablo 4.11 Birinci günde Rotor-Gene grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_5 Gün		
			Pozitif	Negatif	Total
PN 1. Gün Rotor- Gene	Pozitif	n	18	12	30
		%	60,0%	40,0%	100,0%

Tablo 4.12 (p: 0,266) ve Tablo 4.13 (p: 1,00) incelendiğinde istatistiksel açıdan çalışılan numunelerde günler açısından, RT-LAMP sisteminin İnovia cihazında kullanılan kit grubundaki bulgulara göre herhangi bir farklılaşma gözlenmemektedir. Bu sonuç RT-LAMP sistemi ile q-RT-PCR sistemi arasındaki güven aralığını doğrulamaktadır.

Tablo 4.12 Beşinci günde İnovia grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_1.Gün		p
			Pozitif	Negatif	
PN 5. Gün İnovia	Pozitif	n	18	9	0,266
		%	94,7%	81,8%	
	Negatif	n	1	2	
		%	5,3%	18,2%	

Tablo 4.13 Beşinci günde Rotor grubu ile birinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

			RT-LAMP_Grup_1.Gün		p
			Pozitif	Negatif	
PN 5 Gün Rotor- Gene	Pozitif	n	18	11	1,000
		%	94,7%	100,0%	
	Negatif	n	1	0	
		%	5,3%	0,0%	

Tablo 4.14 (p: 1.000) ve Tablo 4.15 (p: 0,170) istatistiksel açıdan çalışılan numunelerin günler bakımından incelendiğinde, RT-LAMP sisteminin İnovia cihazında kullanılan kit grubundaki bulgulara göre herhangi bir farklılaşma göstermediği belirlenmiştir. Bu

sonuçlarda yine Tablo 4.16 ve Tablo 4.17’de yer alan sonuçlar ile birlikte değerlendirildiğinde RT-LAMP sistemi ile qRT-PCR sistemi arasındaki güven aralığını doğrulamaktadır.

Tablo 4.14 Beşinci günde İnovia grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

		RT-LAMP_Grup_5. Gün			
			Pozitif	Negatif	p
PN 5 Gün İnovia	Pozitif	n	17	10	1,000
		%	94,4%	83,3%	
	Negatif	n	1	2	
		%	5,6%	16,7%	

Tablo 4.15 Beşinci günde Rotor grubu ile beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu arasında yapılan değerlendirme

		RT-LAMP_Grup_5. Gün			
			Pozitif	Negatif	p
PN 5 Rotor-Gene	Pozitif	n	18	11	0,170
		%	100,0%	91,7%	
	Negatif	n	0	1	
		%	0,0%	8,3%	

1. gün pozitif ve negatif gruplar arasında eşik değeri ortalamaları anlamlı derecede farklı bulunmuştur (Tablo 4.16), ancak eşik değeri beşinci günde anlamlı bir fark sergilememiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.16 Birinci günde yer alan RT-LAMP grubu eşik değeri

Grup İstatistikleri					
	RT-LAMP_Grup_1.Gün	n	Ortalama	Std. Sapma	p
Threshold Değeri_1.Gün	Pozitif	19	0,5463	0,33679	0,009
	Negatif	11	0,9000	0,33045	

*Student T Testi yapılmıştır.

Tablo 4.17 Beşinci günde yer alan RT-LAMP grubu eşik değeri

Grup İstatistikleri					
	RT- LAMP_Grup_5.Gün	n	Ortalama	Std. Sapma	
Threshold	Pozitif	18	1,3222	0,56460	0,979
Değeri_5.Gün	Negatif	12	1,3167	0,58002	

*Student T Testi yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Tarihte bugün SARS-CoV-2 biyolojik afet olarak kimyasal, biyolojik, radyolojik ve nükleer savunma (KBRN savunması) üyesi olarak da tanımlanmaktadır [3]. Afet, ani gelişen, kontrol edilebilirliği sistematik bir yaklaşım gerektiren, sosyal yaşamı kesintiye uğratan veya durduran, can, mal kaybına neden olan ve çoğu zaman yerel kapasite ile üstesinden gelinemeyen doğal veya insan kaynaklı olayların bütünsel durumu olarak tanımlanmaktadır [54]. Biyolojik afetler, insan kaynaklı olabileceği gibi, doğal olarak bulaşıcı hastalıklar ve epidemiyolojik olarak da ortaya çıkabilmektedir. Bundan dolayı iş yerlerinde bilgilendirme amaçlı pratik eylemleri içeren bir planın hazırlanması önem kazanmıştır [2]. Özellikle, COVID-19 hastalığının nasıl yayıldığını anlamak önemlidir. Hastalar semptomatik ve semptomsuz olarak ikiye ayrılır. Semptomları olan hastalar çeşitli tanı yöntemleri ile tespit edilebilse de semptom göstermeyen veya asemptomatik olarak adlandırılan hastalar hastalığın yayılmasının temel nedenidir. Bu nedenle gelişmiş ülkeler yönünü daha hızlı testlere çevirmiştir. Bu sayede sürekli bir tarama gerçekleştirecekleri düşünülmektedir. Taramalar için genellikle RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır ancak yöntem viral yük mantığına dayandığından yeteri kuluçka süresi gerçekleşmeyen hastalarda yanlış negatif sonuçlar verilebilmektedir. Bu nedenle bilgisayarlı toraks tomografi (BT) taraması RT-PCR ile kombine olarak taraması önerilmektedir [55]. Hatalı sonuçlarla RT-PCR sorunu giderek daha fazla ortaya çıkmaktadır [56]. RT-PCR'nin diğer bir dezavantajı da uzman personel, teçhizatlı cihaz ve pahalı kimyasallara ihtiyaç duymasıdır. Bunun yanı sıra antikor temelli kan bazlı serolojik testlerin doğruluğu da SARS-CoV-2 enfeksiyonunu saptamak için yeterli değildir [57].

Ancak, son zamanlarda popülerlik kazanmış RT-LAMP tekniği, maliyetinin ucuz olması ve cihaza gereksinim duymaması ile geleneksel kantitatif yöntemlerine bir alternatif olmuştur. Klinik numunelerde RT-LAMP RT-PCR'ye göre daha yüksek hassasiyet sağlayabilir [58]. Catarina Amaral ve arkadaşları (2021), 30 dakika içinde SARS-CoV-2'nin az bir viral yük ile görsel olarak saptanmasına izin veren RT-LAMP'ye dayalı bir çalışma oluşturdu [59][60]. Çalışma kapsamında 177 nazofaringeal COVID-19 RNA örneği hem RT-LAMP hem de RT-PCR ile karşılaştırıldı. Duyarlılık 100 kopya için %100 iken özgüllüğü %96,1 olarak tanımlanmıştır. Sunulan tez çalışması ile doğrudan

faringeal sürüntü örneklerinden SARS-CoV-2'nin ORF8 ve N genlerinin hedefi ile RT-LAMP tabanlı bir yöntemin geliştirilmesini hedefliyoruz. Bunun yanı sıra literatüre ek olarak çalışma 45 dakikanın altında gerçekleştirilmiştir ve herhangi bir RNA ekstraksiyon adımına da ihtiyaç duyulmamıştır. Sunulan tez çalışmasının amacı RT-LAMP tekniğinin klinik bir ortama ve uzmana gereksinim duymadan kullanılabilir kadar hassas olduğunu göstermektedir. Ayrıca, RT-LAMP tekniğinin sahada hızlı testler için kullanılabilirliğini ve RT-LAMP'ın ilk günlük pozitiflik tespit oranının %63 olduğu, bu tez çalışmasında literatürle eşleştirilerek gösterilmektedir [54]. Mautner ve arkadaşları (2020), RT-LAMP tekniğini 20 solunum yolu patojeni üzerinde test etmiş ve çapraz reaktivite göstermediğini incelemiştir. Bundan olayı rutin RT-PCR'den 12 kat daha hızlı ve 10 kat daha ucuz olduğunu belirtmişlerdir [61]. Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak bu tez çalışmasında RT-PCR çalışmalarında kullanılan çeşitli kit ve cihazlar karşılaştırılmıştır. 30 hasta örneğine dayalı olarak, İnovia cihazında çalışılan numuneler için Biospeedy ve Covirion olarak %100, Qiagen kiti %93,3 pozitiflik yakalarken, Rotor-Gene cihazında aynı numuneler Biospeedy ve Covirion kitine göre %100, %96,7'dir. Beşinci gün İnovia cihazında çalışılan numuneler Biospeedy için %90, Qiagen için %53,3 Covirion kiti için %93,3 olarak bulunmuştur. Bu örnekler Rotor-Gene cihazında incelendiğinde pozitiflik Biospeedy ve Covirion'da %96,7, Qiagen kitinde %63,3'tü. Qiagen kiti, beşinci günde pozitiflikte önemli bir düşüş gösterdi. Covirion ve Biospeedy kiti hem İnovia'da hem de Rotor-Gene cihazında Qiagen kiti kadar azalma göstermedi. Bunun nedeni, beklenen numunelerde viral yükte azalmaya karşı duyarlılık olabilir. Bu sonuç yine RT-LAMP tekniğinde de değişiklik göstermedi. Böylelikle bazı kitlerle bekleyen numuneler üzerinde çalışılma yapıldığında RT-LAMP metodu daha güvenilir hale geldiği açıkça gözlenmiş oldu. Qiagen kitinin ise bekleyen numunelerde Covirion ve Biospeedy kitine göre daha düşük pozitif sonuç vermesinin bir nedeni, Türkiye'de üretilen kitlerin, Türkiye'de toplanan örneklerdeki genomik dizilemeden kaynaklı spesifik etkiler olarak değerlendirilebilir. Bu durumu 30 örnek üzerinde doğru bir şekilde değerlendirmek mümkün değildir. Daha kapsamlı bir çalışmada popülasyonun genişletilmesi sonucunda bu değerlendirmeler daha iyi netleştirilebilir. Ayrıca Qiagen kitinin beşinci günde pozitiflik yakalamamasının bir başka nedeni de donma-çözülme sürecinde kite zarar vermesi olabilir ve kit problemi veya kullanılan kit (QIAPrep & amp Viral RNA UM kit, GTIN 04053228039679, LOT-166044095, Date: 2021-03-21 REF 221415) olarak

değerlendirilebilir. Kit protokolleri ilk SARS-CoV-2'in genomik yapısına göre üretilmiştir, kiti yeni varyantlarla veya yeni örnekler üzerinden yeniden dizayn etmek ve revize primerler kullanmak ile bu sorun çözebilir. Böyle bir durumda, çalışma QIAgen kitinin yeni sürüm kitleri ile tekrar edilebilir. Bu örnekler RT-LAMP yöntemi ile karşılaştırıldığında birinci gün %63,3, beşinci gün %60 pozitiflik saptandı. Ayrıca tüm sonuçlar RT-LAMP yöntemi ile karşılaştırıldı ve bu da RT-LAMP'in güven aralığının RT-PCR'ye duyarlılığını ortaya koydu. Ek olarak sonuçlar renk değişimine bağlı olarak çıplak göz ile de anlaşılabilirdiğinden diğer yöntemlere nazaran önemli bir avantaj sağlamış olmaktadır.

Hastalığın kuluçka süresinin 14 güne kadar uzadığı ve semptomlara maruz kaldıktan sonra ortalama 4-5 günlük bir süre olduğu düşünülmektedir. Bir çalışma, semptomları olan COVID-19'lu kişilerin %97,5'inin SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonraki 11,5 gün içinde yapacağını bildirdi [55]. İlk oluşum için kuluçka süresi 4-5 gün olduğundan, deneyler birinci ve beşinci günlerde yapılmıştır [56]. Elde edilen sonuçlara göre (Tablo 4.1 ve 4.2 de gösterildiği gibi) pozitiflik tüm kitler için Innovia ve Rotor-Gene cihazları tarafından ilk gün ideal olarak yakalandı. Ancak beşinci günde, Qiagen kiti, Innovia cihazı için %53,3 ve Rotor-Gene için %63,3 olan pozitiflik oranında ilk güne göre önemli bir düşüş gösterdi. Öte yandan RT-LAMP incelendiğinde ilk gün pozitiflik oranı %63,3, beşinci gün pozitiflik oranı %60 idi. Deneyler pozitifliği onaylanmış 30 hasta üzerinde incelenmiştir. Özellikle RT-LAMP için kullanılan cihazın taşınabilir olması ve tüm reaksiyon adımlarının (denatürasyon, tavlama ve uzatma adımları) sabit sıcaklıkta (54°C) gerçekleştirilmesi RT-LAMP sisteminin kullanımını desteklemektedir. Sabit sıcaklık kullanılması mantalitesi sayesinde sadece bir su banyosu kullanarak bile bu adımları gerçekleştirmenin mümkündür [50]. Çok güncel bir teknik olan RT-LAMP metodunun SARS-CoV-2 tanı ve teşhisinde kullanımı çok yeni olduğu için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır [62]. Ayrıca Chaouch ve arkadaşları da (2021), tam olarak bu yeniliği değerlendirmek adına RT-RT-LAMP yöntemini SARS-CoV-2'nin teşhisi için güven aralığının belirlenmesinde kullanmışlardır [50][63].

Bu strateji hızla uygulanabilir ve mevcut zamanlarda toplu tanı testleri için kullanıma sunulmadan önce klinik örneklerle yaşayabilirliği doğrulanabilir. RT-LAMP tekniği saha taramalarında ve potansiyel giriş limanlarında hızlı tanının sağlanması için tercih edilebilir [50]. Sonuçta hem nicel hem de nitel olarak okuyabilen bir analiz sistemidir.

Bu çalışma ile gelecekte birçok KBRN etkeninde salgın veya pandemi durumlarında ve hastanelerin acil servislerinin triyaj aşamalarında sıklıkla kullanılacağını öngörüyoruz. Ayrıca sunulan tez çalışmasında, pozitif/negatif sonuçları arasında farklılıklar gösterebilen tanı kitleri ve cihazlara alternatif olacak ve çalışmanın sonuçları daha büyük örneklerle yapılacak ileri çalışmalara ışık tutacaktır.



KAYNAKÇA

- [1] C. Taştan *et al.*, “SARS-CoV-2 isolation and propagation from turkish COVID-19 patients,” *Turkish J. Biol.*, vol. 44, no. Special issue 1, pp. 192–202, 2020, doi: 10.3906/BIY-2004-113.
- [2] Y. Artik, N. Cesur, L. Kenar, and M. Ortatatlı, “Biological Disasters: In The First Quarter Of 2021 Covid-19 Overview,” *Afet ve Risk Derg.*, Nov. 2021, doi: 10.35341/AFET.977488.
- [3] Y. Artik, N. P. Cesur, M. S. Kurtulmus, S. Z. Mart Komurcu, C. Kazezoglu, and A. Kocatas, “Clinic Evaluation of The Destrovir Spray Effectiveness in SARS-CoV-2 Disease. *Electron J Gen Med.* 2022; 19 (2): em357.” 2022, doi: 10.29333/ejgm/11578.
- [4] E. Yilmaz Gulec, N. P. Cesur, G. Yesilyurt Fazlioğlu, and C. Kazezoğlu, “Effect of different storage conditions on COVID-19 RT-PCR results,” *J. Med. Virol.*, doi: 10.1002/jmv.27204.
- [5] Who, “World Health Organization.” <https://covid19.who.int/>.
- [6] J. Zheng, “SARS-coV-2: An emerging coronavirus that causes a global threat,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 16, no. 10, pp. 1678–1685, 2020, doi: 10.7150/IJBS.45053.
- [7] Artik Yakup, Cesur Nevra Pelin, Laçın Nelisa Türkoğlu, “SARS-CoV-2 Mutations, Diagnosis and Their Concern,” *Arch. Mol. Biol. Genet.*, vol. 1, no. 2, pp. 57–65, 2022, [Online]. Available: <https://www.scientificarchives.com/article/sars-cov-2-mutations-diagnosis-and-their-concern>.
- [8] Y. Artik, “Hospital Disaster and Emergency Plan in Biological Disasters (HDEP): Coronavirus (SARS-CoV-2) COVID-19 Pandemic System Model Example,” *J. Contemp. Stud. Epidemiol. Public Heal.*, vol. 2022;3(1):, 2022, doi: 10.29333/jconseph/11975.
- [9] Artik Yakup, Cesur Nevra Pelin, “General Evaluation of Covid-19 Diagnosis Methods,” *Cohesive J. Microbiol. Infect. Dis.*, 2022, doi: 10.31031/CJMI.2022.05.000621.
- [10] P. Zhai, Y. Ding, X. Wu, J. Long, Y. Zhong, and Y. Li, “The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 55, no. 5, p. 105955, 2020.

- [11] S. Woloshin and L. M. Schwartz, “US food and drug administration approval of flibanserin: even the score does not add up,” *JAMA Intern. Med.*, vol. 176, no. 4, pp. 439–442, 2016.
- [12] E. L. Hatcher *et al.*, “Virus Variation Resource—improved response to emergent viral outbreaks,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. D1, pp. D482–D490, 2017.
- [13] S. Z. M. Komurcu *et al.*, “The evaluation of potential global impact of the N501Y mutation in SARS-COV-2 positive patients,” *J. Med. Virol.*, 2021, doi: 10.1002/JMV.27413.
- [14] J.-C. Ehrhart *et al.*, “A new immunosensor for breast cancer cell detection using antibody-coated long alkylsilane self-assembled monolayers in a parallel plate flow chamber,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 3, pp. 467–474, 2008.
- [15] Y. Shu and J. McCauley, “GISAID: Global initiative on sharing all influenza data—from vision to reality,” *Eurosurveillance*, vol. 22, no. 13, p. 30494, 2017, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494.
- [16] R. Singh, D. P. Singh, D. Savargaonkar, O. P. Singh, R. M. Bhatt, and N. Valecha, “Evaluation of SYBR green I based visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for genus and species-specific diagnosis of malaria in *P. vivax* and *P. falciparum* endemic regions,” *J. Vector Borne Dis.*, vol. 54, no. 1, p. 54, 2017.
- [17] S. Taylor, C. A. Landry, M. M. Paluszczek, T. A. Fergus, D. McKay, and G. J. G. Asmundson, “COVID stress syndrome: Concept, structure, and correlates,” *Depress. Anxiety*, vol. 37, no. 8, pp. 706–714, Aug. 2020, doi: 10.1002/DA.23071.
- [18] H. Hou *et al.*, “Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019,” *Clin. Transl. Immunol.*, vol. 9, no. 5, p. e1136, 2020.
- [19] K. G. Andersen, A. Rambaut, W. I. Lipkin, E. C. Holmes, and R. F. Garry, “A origem proximal do SARS-CoV-2,” *Nat Med*, vol. 26, no. 4, pp. 450–452, 2020.
- [20] Ö. Erdem, E. Derin, K. Sagdic, E. G. Yilmaz, and F. Inci, “Smart materials-integrated sensor technologies for COVID-19 diagnosis,” *Emergent Mater.*, pp. 1–17, 2021.
- [21] N. A. Tasrip *et al.*, “Rapid porcine detection in gelatin-based highly processed products using loop mediated isothermal amplification,” *J. Food Sci. Technol.*, pp. 1–10, 2021.
- [22] V. M. Corman *et al.*, “Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-

- time RT-PCR,” *Eurosurveillance*, vol. 25, no. 3, p. 2000045, 2020.
- [23] Z. Wu and J. M. McGoogan, “Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention,” *Jama*, vol. 323, no. 13, pp. 1239–1242, 2020, doi: 10.1001/jama.2020.2648.
- [24] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z.-L. Shi, “Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 3, pp. 141–154, 2021, doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- [25] E. Dong, H. Du, and L. Gardner, “An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 20, p. doi.org/10.1016/S1473-3099(20)3012, 2020, doi: doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1.
- [26] Who, “Coronavirus (COVID-19) Dashboard,” 2022. <https://covid19.who.int/> (accessed Feb. 26, 2022).
- [27] Q. Li *et al.*, “Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia,” *N. Engl. J. Med.*, 2020.
- [28] N. Subbaraman, “Coronavirus tests: researchers chase new diagnostics to fight the pandemic.,” *Nature*, 2020.
- [29] W. H. Organization, “Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: Laboratory testing for 2019-nCoV in humans. Geneva, Switzerland: WHO; 2020.” 2020.
- [30] W. Zhang *et al.*, “Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes,” *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 9, no. 1, pp. 386–389, 2020.
- [31] T. G. Ksiazek *et al.*, “A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 20, pp. 1953–1966, 2003.
- [32] J. S. M. Peiris *et al.*, “Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome,” *Lancet*, vol. 361, no. 9366, pp. 1319–1325, 2003.
- [33] X. Cai *et al.*, “A peptide-based magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay for serological diagnosis of coronavirus disease 2019,” *J. Infect. Dis.*, vol. 222, no. 2, pp. 189–193, 2020.
- [34] J. Xiang *et al.*, “Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold-immunochromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-

- 2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19),” *MedRxiv*, 2020.
- [35] W. H. Organization, “Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19: scientific brief, 8 April 2020,” World Health Organization, 2020.
- [36] B. Diao *et al.*, “Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein,” *MedRxiv*, 2020.
- [37] R. Han, L. Huang, H. Jiang, J. Dong, H. Peng, and D. Zhang, “Early clinical and CT manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia,” *Am. J. Roentgenol.*, vol. 215, no. 2, pp. 338–343, 2020.
- [38] Z. Y. Zu *et al.*, “Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a perspective from China,” *Radiology*, vol. 296, no. 2, pp. E15–E25, 2020.
- [39] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, and S. Lu, “Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no. 2, pp. 102–108, 2020.
- [40] H. Y. F. Wong *et al.*, “Frequency and distribution of chest radiographic findings in patients positive for COVID-19,” *Radiology*, vol. 296, no. 2, pp. E72–E78, 2020.
- [41] B. Arslan, “Bilgisayarlı tomografi ile görüntüleme yöntemleri.” Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.
- [42] M. Özdemir, O. Taydaş, and M. H. ÖZTÜRK, “COVID-19 Enfeksiyonunda Toraks Bilgisayarlı Tomografi Bulguları,” *J. Biotechnol. Strateg. Heal. Res.*, vol. 4, pp. 91–96, 2020.
- [43] J. F.-W. Chan *et al.*, “Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 58, no. 5, pp. e00310-20, 2020.
- [44] Y. Artik *et al.*, “Comparison of COVID-19 laboratory diagnosis by commercial kits: Effectivity of RT-PCR to the RT-LAMP,” *J. Med. Virol.*, Jan. 2022, doi: 10.1002/JMV.27559.
- [45] Y. Zhang *et al.*, “Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP,” *MedRxiv*, 2020.
- [46] J. Song *et al.*, “Single- And Two-Stage, Closed-Tube, Point-of-Care, Molecular Detection of SARS-CoV-2,” *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 38, pp. 13063–13071, Sep. 2021, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.1C03016.

- [47] T. Yang, Y.-C. Wang, C.-F. Shen, and C.-M. Cheng, “Point-of-care RNA-based diagnostic device for COVID-19,” *Diagnostics*, vol. 10, no. 3. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 165, 2020.
- [48] F. Song *et al.*, “Emerging 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) pneumonia,” *Radiology*, vol. 295, no. 1, pp. 210–217, 2020.
- [49] W. E. Huang *et al.*, “RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 950–961, 2020.
- [50] M. Chaouch, “Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2,” *Rev. Med. Virol.*, vol. 31, no. 6, Nov. 2021, doi: 10.1002/RMV.2215.
- [51] P. R. Sahoo, K. Sethy, S. Mohapatra, and D. Panda, “Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases,” *Vet. world*, vol. 9, no. 5, p. 465, 2016.
- [52] P. C. Foo, Y. Y. Chan, M. Mohamed, W. K. Wong, A. B. N. Najian, and B. H. Lim, “Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp.,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 966, pp. 71–80, 2017.
- [53] J. Mahony, S. Chong, D. Bulir, A. Ruyter, K. Mwawasi, and D. Waltho, “Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity,” *J. Clin. Virol.*, vol. 58, no. 1, pp. 127–131, 2013.
- [54] N. VAROL and E. BULUŞ KIRIKKAYA, “Afetler Karşısında Toplum Dirençliliği,” *Resilience*, vol. 1, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2017, doi: 10.32569/RESILIENCE.344784.
- [55] Y. Bai *et al.*, “Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19,” *JAMA*, vol. 323, no. 14, pp. 1406–1407, Apr. 2020, doi: 10.1001/jama.2020.2565.
- [56] X. Xie and Z. Zhong, “W Zhao, C Zheng, F Wang, J Liu. Chest CT for Typical 2019-nCoV Pneumonia: Relationship to Negative RT-PCR Testing,” *Radiology*, vol. 200343, 2020.
- [57] J. M. Gonzalez *et al.*, “Immunological assays for SARS-CoV-2: an analysis of available commercial tests to measure antigen and antibodies,” *MedRxiv*, 2020.

- [58] J. Song *et al.*, “Single-and Two-Stage, Closed-Tube, Point-of-Care, Molecular Detection of SARS-CoV-2,” *Anal. Chem.*, 2021.
- [59] C. Amaral *et al.*, “A molecular test based on RT-LAMP for rapid, sensitive and inexpensive colorimetric detection of SARS-CoV-2 in clinical samples,” 2021.
- [60] M. K. Durbin *et al.*, “Quantification of retinal microvascular density in optical coherence tomographic angiography images in diabetic retinopathy,” *JAMA Ophthalmol.*, vol. 135, no. 4, pp. 370–376, Apr. 2017, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.0080.
- [61] L. Mautner *et al.*, “Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP),” *Virol. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–14, 2020.
- [62] M. Altındaş, B. Elmas, Ü. Kılıç, F. G. Aslan, G. Küçükpara, and M. Köroğlu, “Grup A Streptokokların hızlı moleküler tanısında loop-mediated isothermal amplification PCR (LAMP-PCR),” *J. Biotechnol. Strateg. Heal. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–16, 2017.
- [63] J. Kashir and A. Yaqinuddin, “Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19,” *Med. Hypotheses*, vol. 141, p. 109786, 2020.

EKLER

EK:1 FON SAĞLAYICI(LAR)

Bu araştırmayı, “Özel Viromed İstanbul Merkez Laboratuvar ve Görüntüleme Merkezi, 34381, Şişli, İstanbul” desteklemiştir. Bu nedenle, “Özel Viromed İstanbul Merkez Laboratuvarı’na” teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca bu çalışmanın kapsamında, fon verenlerin çalışma tasarımı, veri toplama ve yorumlamada ya da çalışmayı yayına sunma kararında hiçbir rolü yoktur.

EK:2 TEZDEN ÜRETİLEN YAYIN(LAR)

Artık Y, Coşğun AB, Cesur NP, et al. Comparison of COVID-19 laboratory diagnosis by commercial kits: EffeCtivity of RT-PCR to the RT-RT-LAMP. J Med Virol. 2022; 1-10. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.27559>