

DILAN ÇİN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARS-COV-2 ENFEKSİYONU VE AŞILANMA
SONRASINDA GELİŞEN ANTİKORLARIN NÖTRALİZAN
AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

DİLAN ÇİN

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVİM MEŞE

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



İTHAF

Bilim ve sanatla dünyayı güzelleştirecek çocuklara ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının yürütülmesi sırasında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, bana her zaman yol gösteren, öğrencisi olmaktan mutluluk ve gurur duyduğum tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sevim Meşe'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun çalışmalarına gösterdikleri sabır ve destek için aileme, tez çalışmalarımı yürütürken sağladığı destek ve imkanlar için bölüm başkanımız Prof. Dr. Ali Ağaçfidan'a, yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bana kattıkları bilgilerle yolumu aydınlatan bilgi, tecrübe ve destekleriyle tez sürecime katkıda bulunan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Meltem Uzun, Prof. Dr. Betigül Öngen, Prof. Dr. Özden Boral, Prof. Dr. Zayre Erturan, Prof. Dr. Dilek Şatana, Prof. Dr. Gülseren Aktaş, Prof. Dr. Zerrin Aktaş, Doç. Dr. Gonca Erköse Genç, Doç. Dr. Hayriye Kırkoyun Uysal, Doç. Dr. Lütfiye Öksüz, Doç. Dr. Yaşar Nakipoğlu, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Önel'e, tez çalışmamın istatistiklerinin yapılmasında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Nuray Özgülnar ve Dr. Öğr. Üyesi Meryem Merve Ören'e, bütün tez sürecim boyunca tecrübeleriyle bana yardımcı olan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanları Pınar Soğuksu, Nesrin Kartal, Ümit Çetin, Aydın Mutlu, Selma Önal, Serpil Can, Zeynep Demir'e, her zaman yanımda olup bu zorlu süreci güzelleştiren sevgili bölüm arkadaşlarım Damla Dönmez ve Şeyma Efe'ye teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2022-38565

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koronavirüslerin Tarihçe ve Kökeni	3
2.2. Koronavirüslerin Sınıflandırılması	4
2.3. Yeni Koronavirüs Hastalığı ve SARS-CoV-2	7
2.4. SARS-CoV-2'nin Yapısı	8
2.4.1. Gen Yapısı.....	9
2.4.2. Protein Yapısı.....	10
2.4.2.1. Yapısal Proteinler.....	11
2.4.2.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP'ler).....	14
2.4.2.3. Aksesuar Proteinler	16
2.5. Replikasyon.....	17
2.6. İmmünoloji.....	19
2.6.1. Doğal Bağışıklık	19
2.6.2. Adaptif immün Yanıt	20
2.6.2.1. Hücresel Bağışıklık	21
2.6.2.2. Hümorale Bağışıklık	22
2.6.3. Antikor Sınıfları ve Sınıf Değişimi	23
2.6.4. Antikor Yanıtının Kinetiği	25
2.6.5. Sitokin Fırtınası.....	28
2.7. Klinik Bulgular	29

2.8. Tanı	30
2.8.1. Moleküler Yöntemler	30
2.8.2. Serolojik Yöntemler	31
2.8.2.1. Hızlı Tanı Testleri (RDT'ler)	32
2.8.2.2. Platform Tabanlı Testler	33
2.9. Epidemiyoloji ve Korunma	34
2.10. COVID-19 Aşıları	36
2.10.1. BNT162b2 – Pfizer/Biontech	38
2.10.2. CoronaVac – SinoVac	38
2.11. Nötralizan Antikor	39
2.11.1. Nötralizasyon Testleri	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Hasta Popülasyonu	43
3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	44
3.3. Yapılan Testler	44
3.3.1. Sarf Malzemeler	44
3.3.2. Rotina 38 Santrifüj Cihazı	44
3.3.3. 100-1000 µl uyumlu mikropipetler	45
Serum örneklerinin ependorf tüplerine bölünmesi işlemi sırasında Isolab ve LP Italiana Spa marka pipetörler kullanılmıştır	45
3.3.4. Abbott Architech plus i2000 SR (Abbott, Amerika)	45
3.3.5. SARS-CoV-2 IgG II Quant Kiti (Abbott, Amerika)	47
3.3.6. ACE2-RBD Neutralizing Assay Kiti (Diapro, İtalya)	47
3.4. İstatistiksel Yöntem	52
4. BULGULAR	53
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri	53
4.2. Çalışma Sonuçları	54
4.3. SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2- RBD Korelasyon Analizi	55
5. TARTIŞMA	59
KAYNAKLAR	64
HAM VERİLER	76
FORMLAR	77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	78

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: İnsan koronavirüslerinin sınıflandırılması ve kaynağı

Tablo 2: NSP'ler ve işlevleri

Tablo 3: Endişe yaratan varyantlar

Tablo 4: DSÖ tarafından onay almış COVID-19 aşıları ve özellikleri

Tablo 5: Çalışma gruplarının yaş, cinsiyet ve antikor düzeylerine göre dağılımı

Tablo 6: Gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo 7: RBD Titrasyon Karşılaştırması

Tablo 8: Test sonuçlarının Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarına göre dağılımı

Tablo 9: SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2RBD tarama test düzeylerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 10: SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2RBD tarama test düzeylerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

Tablo 11: Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarında SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

Tablo 12: Tüm gruplarda SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile ACE2-RBD düzeyleri arasındaki korelasyon

Tablo 13: Cinsiyete göre SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

Tablo 14: Yaşa göre SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: SARS-CoV-2'nin elektron mikroskobu görüntüsü

Şekil 2: Koronavirüs virion yapısı yapısal proteinleri

Şekil 3: SARS-CoV-2 S proteinin kapalı ve açık hali

Şekil 4: SARS-CoV-2 N Proteini

Şekil 5: SARS-CoV-2 genomunun NSP'leri kodlaması

Şekil 6: SARS-CoV-2 hücreye girişi

Şekil 7: Konağın Doğuştan Bağışıklık Tepkisi Mekanizmaları ve Coronavirüs Antagonizmi

Şekil 8: SARS-CoV-2 enfeksiyonlarında IgM, IgG ve IgA antikorları için zaman çizelgeleri ve zirve seviyeleri

Şekil 10: Hızlı tanı testlerinin prensibi

Şekil 11: Dünya çapında SARS-CoV-2 epidemiyolojisi

Şekil 12: Nötralizan antikor etki mekanizma

Şekil 13: sVNT test prensibi

Şekil 14: Rotina 38 Santrifüj Cihazı

Şekil 15: Abbott Architect plus i2000 SR

Şekil 16: SARS-CoV-2 IgG II Quant kiti (Abbott, Amerika)

Şekil 17: ACE2-RBD Neutralizing Assay kiti (Diapro, İtalya)

Şekil 18: SARS-CoV-2'ye özgü rekombinant glikosile edilmiş RBD ile kaplı mikrolakalara serum örneklerinin eklenmesi

Şekil 19: Enzimatik reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 100 µl Sülfürik Asit pipetlenmiştir. Bu aşamada, negatif kontrol ve negatif numuneler maviden sarıya dönmüştür.

Şekil 20: Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarında Mann Withney ile SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD karşılaştırması

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**Semboller**

Cc	Santimetreküp
mL	Mililitre
μ l	Mikrolitre
RLU	reaksiyon bağıl ışık birimi (Relative Light Unit)

Kısaltmalar

ACE-2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2
APC	Antikor sunan hücreler
ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
BCR	B hücre reseptörleri
BT	Bilgisayarlı tomografi
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
cDNA	Komplementer DNA
CLIA	Kemilüminesans Enzim İmmünolojik Testler
CoV	Koronavirüs (Coronavirus)
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı-2019 (Coronavirus Disease-2019)
cVNT	Konvansiyonel Viral Nötralizasyon Testi

DILAS	Test Seyreltici
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E	Zarf (Envelope)
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testler
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
HE	Hemaglutinin-Esteraz
IBV	İnfeksiyöz Bronşit Virüsü
ICTV	Uluslararası Virus Taxonomi Komitesi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses)
IFA	İmmünofloresan Testler
IFN	Interferon
IFN-γ	İnterferon – gama
IgA	İmmünoglobülin A
IgD	İmmünoglobülin D
IgE	İmmünoglobülin E
IgG	İmmünoglobülin G
IgM	İmmünoglobülin M
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon düzenleyici etmen
LFA	Yanal akış testi (lateral flow analysis)

M	Membran
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
MHV	Mouse Hepatit Virus
N	Nükleokapsid
NAb	Nötralizan Antikor (Neutralizing Antibodies)
NC	Negatif Kontrol
NK	Doğal Öldürücü (Natural Killer)
NSP	Yapısal Olmayan Protein (Non-Structural Protein)
OC	Organ kültürü
ORF	Açık okuma penceresi
PC	Pozitif Kontrol
pp	Poliprotein
PRR	Kalıp tanıma reseptörleri
pVNT	Psöдовirüs bazlı Viral Nötralizasyon Testi
RDT	Hızlı tanı testi
RT-qPCR	kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (quantative real-time polymerase chain reaction)
S	Spike
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü -2

sCOV	Mevsimsel koronavirüs
SD	Standart Sapma
sVNT	Subtitüsyonel Viral Nötralizasyon Testi
TCR	T hücre reseptörleri
Tfh	T foliküler yardımcı hücreler
Th	T yardımcı hücreler
TLR	Toll benzeri reseptör (Toll like reseptor)
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör - alfa
VNT	Viral Nötralizasyon Testi
VOC	Endişe Uyaran Varyantlar
VOI	Dikkate Alınması Gereken Varyantlar
VUM	İzleme Altındaki Varyantlar
YBU	Yoğun bakım ünitesi

ÖZET

Çin, D. (2023). SARS-CoV-2 Enfeksiyonu ve Aşılama Sonrası Gelişen Antikorların Nötralizan Aktivitesinin Ölçülmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

COVID-19 pandemisinde SARS-CoV-2'ye karşı gelişen antikorların tespitinde kullanılan mevcut serolojik testlerin halk sağlığı müdahaleleri üzerine önemi tam olarak belirlenememiştir. Bu tez çalışmasında SARS-CoV-2 enfeksiyonu veya aşılamaı takiben hüııoral immün yanıtın koruyuculuğunu karakterize etmek için SARS-CoV-2 S proteinine karşı oluşan IgG antikorlarının nötralizan etkilerinin değeriendirilmesi amaçlanmıştır.

Aşılanmış (n=60) ve hem SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmiş hem de aşılanmış (n=60) toplam 120 bireyden alınan serum örnekleri SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD testleriyle değeriendirilmiştir. Verilerin istatistiksel karşılaştırmasında sürekli veriler için normal dağılıma uygunluk kolmogorov simirnov analizi ile değeriendirilmiştir. Bağımsız gruplarda sürekli verilerin karşılaştırılmasında iki grup varlığında Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. Sürekli verilerin birlikte değeriimi Spearman Korelasyon analizi ile değeriendirilmiştir.

SARS-CoV-2 IgG II test sonucu 50 AU/mL'nin üzerinde olan 120 örneğın yapılan ACE-2 RBD Tarama test sonuçlarının tamamı pozitif bulunmuştur. SARS-CoV-2 IgG II test sonucu 5000 AU/mL üzerinde saptanan bireylerde gelişen antikorların yüksek nötralizan kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. Hem enfeksiyon geçirip hem de aşılanan grupta sadece aşılanan gruba göre daha güçlü nötralizan antikor yanıtı saptanmıştır.

Bu tez çalışmasının sonucunda SARS-CoV-2 IgG II testiyle saptanan antikorların yeterli nötralizan aktiviteye sahip olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, Nötralizan antikor, Subtitisyonel Nötralizasyon Testi, Serolojik Testler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2022-38565

ABSTRACT

Çin, D. SARS-CoV-2 Infection and After Vaccination Measurement of Neutralizing Activity of Antibodies. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. Master's Thesis. İstanbul.

The importance of existing serological tests used in the detection of antibodies to SARS-CoV-2 in the COVID-19 pandemic on public health interventions has not been fully determined. In this thesis, it was aimed to evaluate the neutralizing effects of IgG antibodies against SARS-CoV-2 S protein to characterize the protection of the humoral immune response following SARS-CoV-2 infection or vaccination.

Serum samples from a total of 120 vaccinated (n=60) and both SARS-CoV-2 infected and vaccinated (n=60) individuals were evaluated with SARS-CoV-2 IgG II and ACE2-RBD tests. In the statistical comparison of the data, the conformity to the normal distribution for continuous data was evaluated with the Kolmogorov Smirnov analysis. Comparison of continuous data in independent groups was made using the Mann Whitney U test in the presence of two groups. Coexistence of continuous data was evaluated by Spearman Correlation analysis.

All of the ACE-2 RBD Scan test results of 120 samples with SARS-CoV-2 IgG II test results above 50 AU/mL were found positive. Antibodies developed in individuals with SARS-CoV-2 IgG II test results above 5000 AU/mL were found to have high neutralizing capacity. A stronger neutralizing antibody response was detected in both the infected and vaccinated group compared to the vaccinated group alone.

As a result of this thesis, it was statistically determined that the antibodies detected by the SARS-CoV-2 IgG II test had sufficient neutralizing activity.

Key Words: SARS-CoV-2, COVID-19, Neutralizing antibody, Substitutional Neutralization Test, Serological Tests

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2022-38565

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aralık 2019'da Çin'de ortaya çıkarak kısa sürede bir pandemiye dönüşen SARS-CoV-2 virüsünün sebep olduğu COVID-19 hala küresel boyutlarda büyük bir sağlık hizmeti sorununu teşkil etmeye devam etmektedir (Abe ve ark., 2020; Kamps ve Hoffmann, 2020)

SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların çoğu, enfeksiyondan sonraki birkaç hafta içinde virüse karşı hücresel ve humoral bir bağışıklık yanıtı geliştirir (Dolscheid-Pommerich ve ark., 2022). Gelişen bağışıklık yanıtın değerlendirilmesinde serolojik testler, COVID-19 için tamamlayıcı bir tanı aracı olarak yardımcı olur (Meyer ve ark., 2020). SARS-CoV-2'ye karşı antikor kazanmış bireyleri belirlemek için serolojik testlerin faydası; SARS-CoV-2 enfeksiyonunun seroprevalansının, potansiyel olarak seropozitif bireylerde sağlanan bağışıklığın, SARS-CoV-2'nin klinik ve halk sağlığı yönetiminde tedavi yaklaşımları, aşılama stratejileri olarak kabul edilmektedir (Dolscheid-Pommerich ve ark., 2022; Riepler ve ark., 2020; Zhou ve Zhao, 2020). Bu immünolojik testler SARS-CoV-2'ye karşı gelişen immünoglobülinlerin varlığını ölçmekte ancak humoral yanıtın ortaya çıkardığı koruyuculuğu belirleyememektedir (Chvatal-Medina ve ark., 2021; Jiang ve ark., 2020). Viral partiküllerin yüzey epitoplarına bağlanarak virüsün enfekte bir hücreye girişini bloke eden ve virüsün inhibisyonunu sağlayan antikorlar, nötralize edici antikorlar (NAb'ler) olarak tanımlanır (Chvatal-Medina ve ark., 2021; Özçürümez ve ark., 2020; Zhiwei Ru, 2021). NAb'ler viral enfeksiyonlarda uzun süreli bağışıklık ile ilişkilidir (Galipeau ve ark., 2020). Enfeksiyon veya aşılamanın ardından SARS-CoV-2'ye karşı NAb'lerin geliştirilmesi, COVID-19 ile mücadelede yeterli toplum bağışıklığının geliştirilmesi için önemlidir ancak serolojik testlerin NAb düzeylerini nicel olarak ölçme kapasiteleri bilinmemektedir (Riepler ve ark., 2020). Viral nötralizasyon testleri aşılama veya doğal enfeksiyondan sonra uzun süreli koruyucu bağışıklığı ölçmek için kullanılan önemli testlerdir (Jiang ve ark., 2020). Bu yönleri ile nötralize edici antikor testleri, bir hastanın bağışıklığını değerlendirmek için altın bir standarttır (Chvatal-Medina ve ark., 2021). Hasta serumlarında nötralize edici aktivitenin belirlenmesi için konvansiyonel nötralizasyon testleri ve psödovirüs bazlı nötralizasyon testleri canlı viral partiküller ve hücre kültürü kullanmayı gerektirdiğinden kullanımı zor ve maliyetlidir (Jiang ve ark., 2020). Bu sebeplerle ticari olarak elde edilen, ELISA prensibine dayalı substitüsyonel

nötralizasyon testleri, SARS-CoV-2'ye karşı gelişen nötralizan aktiviteyi ölçmede oldukça önemli viral nötralizasyon testleridir (Zhou ve Zhao, 2020).

Mevcut COVID-19 pandemisinde, enfeksiyon veya aşılamaı takiben koruyucu antiviral bağıııklığı karakterize etmek için yalnızca bağlayıcı ve işlevsel olarak nötraliz edici antikorlar arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılması gereklidir. Bu tez çalışmasında SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirenlerde ve aşılananlarda S proteinine karşı oluşan IgG antikorlarının nötralizan etkilerinin substitüsyonel bir viral nötralizasyon testi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslerin Tarihçe ve Kökeni

Koronavirüs (Coronavirus; CoV)'lerin tarihi Beaudette ve Hudson'ın 1937'de tavuklardan izole edilen bir solunum yolu hastalığını rapor etmeleriyle başladı (Hasöksüz ve ark., 2020). Baudette ve Hudson “nefes darlığı hastalığı” olarak tanımladıkları bu hastalığı ilk defa 1933'te bildirdiler. Günümüzde AvianCoV olarak bilinen bu ajan, enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV) olarak adlandırıldı ve CoV ailesinin ilk üyesi oldu. (Sofi ve ark., 2020). Daha sonra, 1946 yılında domuzlarda bulaşıcı gastroenterite ilk kez rastlandı. Hayvan virüsleri grubundan bir başka virüs olan Mouse hepatit virüsü (MHV), 1949 yılında ilk olarak Cheever ve ark tarafından tanımlandı (Hasöksüz ve ark., 2020). MHV'nin 1951'de Gledhill ve Andrewes tarafından izolasyonu, hastalığın çalışma alanını genişletti (Sofi ve ark., 2020).

Koronavirüs enfeksiyonlarının, 1960'ların sonlarına kadar insanlar için zararsız olduğu düşünülüyordu. Ancak insan CoV 229E ve OC43'ün tanımlanmasıyla insanların da CoV enfeksiyonları için risk grubunda olabileceğine tanık olundu (Yesudhas ve ark., 2021).

Tyrrell ve Bynoe, 1965 yılında soğuk algınlığı geçiren bir yetişkinin solunum yolundan alınan insan embriyonik trakeal organ kültürlerinin pasajlanmasıyla B814 ismini verdikleri bir virüsü keşfettiler. Böylece ilk insan koronavirüsü tanımlanmış oldu. Bu enfeksiyöz ajanın varlığı, kültürlerden elde edilen mikroorganizmanın sağlıklı insan gönüllülere intranazal olarak verilmesiyle gösterildi. Gönüllülerin önemli bir kısmı soğuk algınlığı geçirdi. Ama Tyrrell ve Bynoe bu ajanı doku kültüründe büyütemedi.

Bu sırada Hamre ve Procknow, soğuk algınlığı olan tıp öğrencilerinden örnekler alarak doku kültüründe bir virüs üretmeyi başardılar. Bu araştırmacıların, 229E olarak da adlandırdıkları Hamre virüsü, B814 gibi etere duyarlıydı ve bu sebeple enfeksiyon

için lipid içeren bir tabakaya ihtiyaç duyuyordu. Bu iki virüs, bir mikso- veya paramiksovirus ile ilişkili değildi.

McIntosh ve ark, Ulusal Sağlık Enstitüleri'nde Tyrrell ve Bynoe'nun kullandığı pasajlama yöntemine benzer bir teknik kullanarak insan solunum yolundan etere duyarlı çok sayıda suşun elde edildiğini bildirdi. Bu virüsler, organ kültürlerinde üretildiği için "OC" olarak adlandırıldı (Kahn ve McIntosh, 2005).

Almeida ve Tyrrell, B814 virüsüyle enfekte edilen organ kültürlerinden sıvılar alarak elektron mikroskobu ile incelediler. Bu mikroorganizmanın tavuklarda gözlenen infeksiyöz bronşit virüsüne morfolojik olarak benzediğini gözlemlediler. Aynı zamanda Hamre ve Procknow'un bildirdiği 229E ile McIntosh ve arkadaşlarının elde ettiği OC virüsleri de benzer yapılar içeriyordu (Kahn ve McIntosh, 2005).

Keşfedilen insan solunum yolu virüslerinin, MHV, IBV gibi virüslerle benzer yapılara sahip olduğunun anlaşılması üzerine 1968 yılında yayınlanan bir yayınlı bu tür virüsler CoV olarak sınıflandırıldı. Tyrrell, Almeida, McIntosh, Hamre ve daha bir grup insan tarafından yayınlanan bu makale, virüsleri Tyrrell'in karakterizasyonu ile “dini sanatta dikenler tacı gibi bir tacı andıran geniş, belirgin, taç yapraklı sivri uçlardan oluşan karakteristik bir saçak” şeklinde ifade etti. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV), 1975'te aileye köpek koronavirüsü, Transmissible-gastroenterit virüsü, kedi peritonit virüsü, insan enterik koronavirüsü gibi virüsleri ekleyerek Coronaviridae adını verdi. (Sofı ve ark., 2020)

2.2. Koronavirüslerin Sınıflandırılması

Koronavirüsler başlangıçta viral spike proteinin serolojik reaktiviteleri göz önüne alınarak sınıflandırılıyordu. Ancak günümüzde CoV'lerin sınıflandırılması replikatif proteinlerin karşılaştırmalı dizi analizlerine dayanır. Proteinlerin seçimi ve proteinlerin analizi için kullanılan teknikler bu yüzyılın başından beri gelişim göstermektedir. CoV'ler ve diğer nidovirüsler, 2011'den bu yana taksonları ve sıralamaları tanımlayan hiyerarşik kümeleme yazılımı ile desteklenmektedir. Analizde, mevcut tüm CoV'lerin genom dizileri izlenerek tüm türler için aile bazında sınır kriterleri belirlenebilir.

CoV'lerdeki homolog rekombinasyonun, sınıflandırmada kullanılan temel proteinleri kodlayan genom bölgelerinde olduğu ve aynı virüs türlerinin üyeleriyle sınırlı kaldığı düşünülmektedir. Bu sınırlama, türler arası çeşitliliğe ve tür ayırımına katkıda bulunur. (of the International, 2020).

Tablo1: İnsan koronavirüslerinin sınıflandırılması ve kaynağı (Cui ve ark., 2019)

	Virüs	Doğal Konak	Ara Konak	Hastalık	Reseptör
ALFAKORONAVİRÜS	Hcov-NL63	Yarasalar	?	Hafif Solunum Yolu Enfeksiyonları	Alfakoronavirüs
	Hcov-229E	Yarasalar	Develer	Hafif Solunum Yolu Enfeksiyonları	İnsan Aminopeptidaz
BETAKORONAVİRÜS	Hcov-OC43	Kemirgenler	Sığır	Hafif Solunum Yolu Enfeksiyonları	9-O-Asetilsialik Asitler
	Hcov-HKU1	Kemirgenler	?	Hafif Solunum Yolu Enfeksiyonları Ve Pnömoni	9-O-Asetilsialik Asitler
	SARS-CoV	Yarasalar	Misk Kedileri	Ağır Akut Solunum Sendromu	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
	MERS-CoV	Yarasalar	Develer	Ağır Akut Solunum Sendromu	Dipeptidil Peptidaz-4
	SARS-CoV-2	Yarasalar	Muhtemelen Pangolin	Ağır Akut Solunum Sendromu	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2

Koronavirüslerdeki yapısal proteinlerin şekli, sayısı Nidovirales takımı üyeleri arasındaki temel farklılıkları oluşturur. Bu farklılıklar nükleokapsidlerin ve viryonların morfolojisinde önemli değişiklikler meydana getirir (Sofi ve ark., 2020).

Koronaviridae familyası, ICTV'ne göre Nidovirales takımında yer alıp Koronavirinea ve Torivirinea olmak üzere iki subfamilya içermektedir (Meşe ve Ağaçfıdan, 2020). CoV'ler, Coronavirinae subfamilyasının üyeleridir. Coronavirinae subfamilyası, filogenetik ilişkileri ve genomik yapıları temel alındığında dört cinsten oluşur: AlfaCoV, BetaCoV, GamaCoV ve DeltaCoV. AlfaCoV'ler ve BetaCoV'lerin konak olduğu canlılar esas olarak memelilerdir (Tablo 1). GamaCoV ve DeltaCoV'ler ise kuşlara özgü olmakla beraber memelileri de enfekte edebilir. AlfaCoV'ler ve BetaCoV'ler insanlarda genellikle solunum yolu hastalıklarına, hayvanlarda ise gastroenterite neden olur (Cui ve ark., 2019).

BetaCoV cinsinde yer alan “Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü” (SARS-CoV) ile ilişkili bilinen ilk atipik pnömoni vakası 2002'de Çin'in Guangdong şehrinde ortaya çıktı. (Machhi ve ark., 2020). Birkaç ay içinde kişilerin seyahat etmesiyle, hastalık Hong Kong, Vietnam, Kanada ve daha pek çok ülkeye hızla yayılmaya başladı ve bu da Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) hastalığı “dünya çapında bir sağlık tehdidi” ilan etmesine neden oldu. Dünya çapında 8096 kişiye bulaşan ve 27 ülkede 774 ölüme neden olan SARS-CoV pandemisi Temmuz 2003'te sona erdi. SARS-CoV'un himalaya maskeli palmiye misk kedisi gibi rezervuar konaklardan insanlara bulaşan bir zoonotik patojen olabileceğine dair kanıtlar bulunmuştur (Khan ve ark., 2020). Hastalık klinik olarak nefes darlığı, öksürük ve göğüs ağrısı ile birlikte şiddetli akut solunum sıkıntısı sendromu gibi solunum yollarını tutan semptomlarla kendini gösterir (Machhi ve ark., 2020). SARS-CoV pandemisi sadece bir halk sağlığı sorununa neden olmadı, aynı zamanda özellikle Çin'de sosyo-ekonomik krizleri de başlattı. Ancak şüphelilerin izole edilmesi, temaslı takibi ve karantina önlemleri gibi sıkı tedbirler sayesinde pandeminin küresel olarak yayılmasının ve ciddi ekonomik gerilemelerin önüne geçildi (Khan ve ark., 2020).

SARS-CoV'nin ortaya çıkmasından on yıl sonra, Haziran 2012'de Suudi Arabistan'da rapor edilen bir akut pnömoni ve böbrek yetmezliği vakası yeni CoV

formu olan “Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü” (MERS-CoV) ile ilişkilendirildi. DSÖ verilerine göre, Kasım 2019 itibarıyla 27 ülkede toplam 2494 MERS-CoV vakası doğrulanmış ve 858 ölüm bildirilmiştir. Bu hastalıkta ateş, öksürük, nefes darlığı, pnömoni gibi solunum sıkıntıları ve ishal dahil olmak üzere gastrointestinal semptomlar bildirilmiştir. Tek hörgüçlü develerin, MERS-CoV için rezervuar konak olarak rolü olduğunu kanıtlayan bazı çalışmalar mevcut olmasına rağmen virüsün bulaşmasında tek hörgüçlü hayvanların kesin rolü ve bulaşmanın kesin yolu bilinmemektedir (Khan ve ark., 2020).

SARS-CoV ve MERS-CoV, pandemik CoV’ler olarak bilinirler ve yüksek patojenik virüsler olduklarından insanlarda ciddi solunum sendromlarına sebep olur (Cui ve ark., 2019). Diğer insan CoV’leri (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HKU1) ise, insanlarda yaygın olarak soğuk algınlığının üçte birinden sorumludur. Yalnız ciddi vakalarda, çocuklarda ve immün baskın kişilerde bronşiyolite ve pnömoniyeye sebep olabilir, enterik ve nörolojik hastalıklarla ilişkili olabilirler. (Kirtipal ve ark., 2020). Aralık 2019’da Çin’in Wuhan kentinde etiyolojisi bilinmeyen pnömonisi olan toplam 44 hastanın DSÖ’ye bildirilmesiyle yeni bir CoV türü izole edildi ve tanımlandı. Koronavirüs Çalışma Grubu tarafından filogenetik ağaç, sınıflandırma ve yerleşik uygulamaya dayalı olarak, bu virüs resmi olarak “Şiddetli Akut Solunum Sendromu CoV-2” (SARS-CoV-2) olarak tanımlandı ve mevcut CoV ile ilişkili akut solunum yolu hastalığı salgını, Koronavirüs Hastalığı-19 (Coronavirus Disease-19; COVID-19) olarak adlandırıldı (Hasöksüz ve ark., 2020).

2.3. Yeni Koronavirüs Hastalığı ve SARS-CoV-2

Çin'deki Hastalık Kontrol Merkezi, Aralık 2019'un son haftasında, Orta Çin'in Hubei eyaletinin başkenti Wuhan'da birkaç atipik pnömoni vakalarının görüldüğünü bildirdi (Ortiz-Prado ve ark., 2020). Çinli bilim insanlarından oluşan ekipler, şiddetli pnömonisi olan hastalardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvısı örneklerinden metagenomik RNA dizilimi ve virüs izolasyonu yoluyla ortaya çıkan bu hastalığın etken maddesinin 2002’de SARS ve 2012 yılında MERS pandemisine neden olan CoV ailesiyle ilişkili bir RNA virüsü olduğunu belirledi (Ben Hu ve ark., 2021; Ortiz-Prado ve ark., 2020). ICTV Koronaviridae Çalışma Grubu, 11 Şubat 2020’de filogenetik

testlere dayalı olarak yeni koronavirüsü SARS-CoV-2 olarak ve yeni koronavirüsün sebep olduğu hastalığı Yeni Koronavirüs Hastalığı-2019 (Coronavirus Disease-2019; COVID-19) olarak adlandırdı. (Machhi ve ark., 2020). SARS-CoV-2, filogenetik olarak SARS-CoV ve MERS-CoV'ü de içeren BetaCoV cinsinin Sarbecovirus alt cinsi içerisinde konumlanmıştır (Bakhiet ve Taurin, 2021).

Yeni pandeminin spesifik kökeni tam olarak anlaşılamamış ve muhtemelen Kasım 2019'da Çin'in Wuhan kentindeki en kalabalık hayvan pazarlardan birinde vahşi bir hayvandan köken alarak aracı bir konak yoluyla bir insana viral bir bulaş meydana geldiği düşünülmüştür (Ortiz-Prado ve ark., 2020). Şu anda hastalık kökeni hala belirsizliğini korumakla birlikte, yarasaların SARS-CoV-2'nin muhtemel rezervuar konakları olduğu ve bir ara memeli konak, muhtemelen Malaya pangolin yoluyla insanlara bulaştığı düşünülmektedir (Kadam ve ark., 2021). Kanıtlar SARS-CoV-2'nin hayvanlardan kaynaklanan bir virüs olduğunu gösterse de, virüsün insanlara ilk olarak ne zaman ve nerede yerleştiği konusunda henüz bir sonuç yoktur (Ben Hu ve ark., 2021).

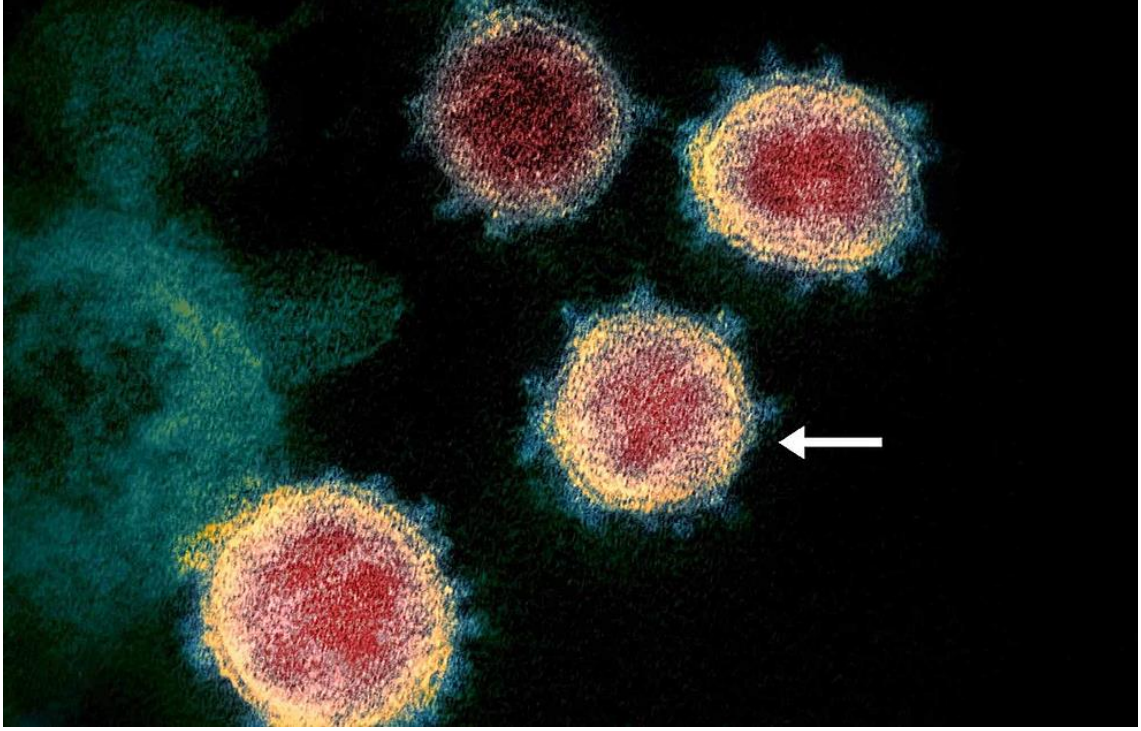
Oldukça geniş bir coğrafi alana yayılması ve dünya nüfusunun büyük bir oranını etkisi altına alması sebebiyle DSÖ COVID-19'u küresel bir halk sağlığı salgını olarak bildirmiş ve "21. yüzyılın ilk pandemisi" olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyonun, damlacık yoluyla insandan insana kolayca yayıldığı bilinmektedir. COVID-19 pandemisi daha önce gözlenen CoV bağlantılı hastalıklardan farklı olarak, daha yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlanmıştır. Asemptomatik ve presemptomatik taşıyıcılar aracılığıyla viral yayılımın artması, SARS-CoV-2'nin toplumsal penetrasyonun daha yüksek olmasına sebep olmuştur (Machhi ve ark., 2020).

2.4. SARS-CoV-2'nin Yapısı

SARS-CoV-2 segmentsiz, zarflı, pozitif polariteli, tek sarmallı bir RNA genomu içerir. Küresel zarf üzerinde, yüzey glikoproteinin sivri uçlu çıkıntıları bulunur. Kriyo-elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere 29.8 kb ile 29.9 kb

arasında değişen genoma ve yaklaşık 65-125 nm çapa sahiptir (Astuti, 2020; Kadam ve ark., 2021).

Elektron mikroskopundaki talı görünümleri (şekil 1) isimlendirilmelerine temel oluşturmuştur. Latince'deki "corona", yani "ta" anlamından yola çıkılarak bu virüslere Koronavirüs (Coronavirus; talı virüs) ismi verilmiştir (Hosseini ve ark., 2020).



şekil 1: SARS-CoV-2'nin elektron mikroskobu görüntüsü (Valencia, 2020)

Bir virion, temel olarak iki bileşenden oluşur: genomik RNA ve nükleokapsidi oluşturan paketlenmiş bir protein kapsid (Hosseini ve ark., 2020). Helikal simetrik nükleokapsid, peplomer çıkıntıları olan hemagglutinin-esterazdan (HE) oluşan fosfolipid yapıda geniş bir zarf ile çevrilidir (Fehr ve Perlman, 2015; Meşe ve Aafıdan, 2020).

2.4.1. Gen Yapısı

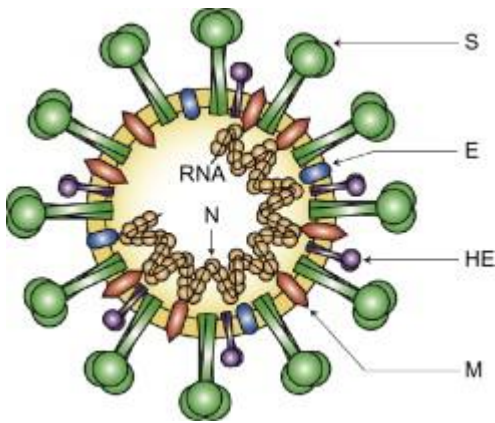
SARS-CoV-2 pozitif polariteli tek sarmallı bir RNA genomuna sahip zarflı virüslerdir. SARS-CoV-2 genomu 29.8-29.9 kb arasında değişir ve SARS-CoV ile %79.6, MERS-CoV ile %50, diğer CoV'lerle yaklaşık % 89 homolojiyi paylaşmaktadır (Bakhiet ve Taurin, 2021). SARS-CoV-2'nin genetik yapısı, ~30.000 nükleotid içeren 13-15 (12 işlevsel) açık okuma erevesi (ORF)'nden oluşur (Naqvi ve ark., 2020). Genomik RNA, %38 guanin sitozin oranına sahiptir. Bu oran diğer CoV'lerle

karşılaştırıldığında çok düşüktür. RNA, 5'-başlık ve 3'-poli-A kuyruk yapısından oluşur; 12 eksprese edilmiş protein ile 11 protein kodlayan gen içerir. ORF'lerin genetik düzenlemesi, SARS-CoV ve MERS-CoV'a oldukça benzer (Kadam ve ark., 2021; Naqvi ve ark., 2020).

SARS-CoV-2'de ORF1a en uzun ORF'dir ve genomun yaklaşık üçte ikisini kaplar. ORF1b, ORF1a ile örtüşür ve yapısal proteinleri kodlayan daha kısa tek kılavuz RNA (single guide RNA; sgRNA)'lar ve diğer yardımcı proteinleri kodlayan sekanslar oluşur (Kadam ve ark., 2021).

2.4.2. Protein Yapısı

SARS-CoV-2, dört yapısal proteine sahiptir: Nükleokapsid (N), Spike (S), Zarf (E) ve Membran (M) ((Şekil 2). Bunun yanı sıra, yapısal olmayan proteinlere (non-structural; NSP) ve aksesuar proteinlere de sahiptirler. Membran (M) proteini ve zarf (E) proteini, virüs kapsidindeki S proteinleri arasına yerleşir (Hosseini ve ark., 2020). Genom, N proteinleri tarafından büyük bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi olarak paketlenir ve lipidler ve viral proteinleri (S, M, E proteinleri) içeren bir zar ile kapatılır (Brant ve ark., 2021). Bu gen ürünleri, konak hücrelerde viral giriş, füzyon ve hayatta kalmada önemli roller oynamaktadır (Naqvi ve ark., 2020).



Şekil 2: Koronavirüs virion yapısı (Weiss ve Leibowitz, 2011)

SARS-CoV-2 genomu 16 yapısal olmayan, 4 yapısal ve 6 aksesuar proteinden oluşan yaklaşık 7096 amino asit uzunluğundaki poliproteini kodlar (Brant ve ark., 2021; Naqvi

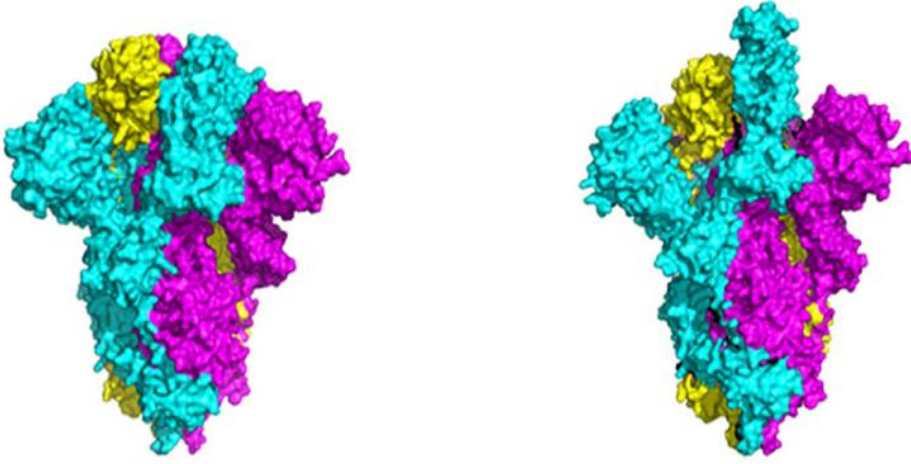
ve ark., 2020). Virion oluşumu için SARS-CoV-2 genomunun 3' ucunda yer alan %30'luk viral genom yapısal proteinleri ve fonksiyonu bilinmeyen aksesuar proteinleri birlikte kodlar (Brant ve ark., 2021). Kapsid oluşturan yapısal proteinlere ek olarak, viral genom, replikasyon ve virüs montaj işlemlerinde sayısız rol oynayan birçok NSP'i kodlar. Bu proteinler; erken transkripsiyon regülasyonunu, immünomodülasyonu, helikaz aktivitesini, gen transaktivasyonunu modüle ederek ve antiviral yanıtı karşı koyarak viral patogeneze katılırlar. Viral genomun nükleotid içeriği esas olarak iki NSP, ORF1a ve ORF1ab, ve ardından yapısal proteinler tarafından tutulur. ORF1a ve ORF1b, pp1a ve pp1ab poliproteinlerini kodlar. Poliprotein pp1ab'nin kodlanmasında ORF1b geninin ribozomal çerçeve kaydırma mekanizması etkilidir. Bu poliproteinler viral olarak kodlanmış proteinazlar tarafından işlenerek 16 NSP üretir (Naqvi ve ark., 2020).

2.4.2.1. Yapısal Proteinler

Spike S Proteinini

Spike (S) proteini, viral yüzeyden çıkıntı yapan ve virüsün konak hücrelere girişine aracılık eden aynı zamanda SARS-CoV-2'nin taç görünümünü veren homotrimerik bir transmembran glikoproteinidir (Jackson ve ark., 2022; M.-Y. Wang ve ark., 2020). SARS-CoV-2, trimerik spike proteinini, konak hücrede anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2)'ye bağlanmak ve hücre girişi elde etmek amacıyla hücre zarı ile kaynaştırmak için kullanır (Arya ve ark., 2021).

S proteini, iki fonksiyonel alt birimden (Şekil 3) oluşur: S1 ve S2 alt birimleri (M.-Y. Wang ve ark., 2020). S1 alt birimini dört alan oluşturur: amino terminal (N-terminal) alanı (NTD), RBD ve iki karboksi terminali (C-terminali) alanı (CTD1 ve CTD2). S1 alt birimi, heptad tekrar 1 (HR1) ile merkezi bir helikal demet oluşturan S2 alt biriminin etrafına sarılır (Jackson ve ark., 2022).



Şekil 3: SARS-CoV-2 S proteinin kapalı ve açık hali (M.-Y. Wang ve ark., 2020)

Distal S1 alt birimi, S1- alt biriminde bulunan reseptör bağlama alanı (RBD) yoluyla konak hücre yüzeyi reseptörü ACE2'yi tanıma ve bağlanmadan sorumludur.

S2 alt biriminin korunmuş dört yapısal bölgesi vardır: bir füzyon peptidi (FP), iki heptad tekrarı (HR1, HR2) ve bir transmembran bölgesi (Arya ve ark., 2021). Membrana implante S2 alt biriminin işlevi ise viral zarf ve konak hücre membranının füzyonuna aracılık etmektir (M.-Y. Wang ve ark., 2020).

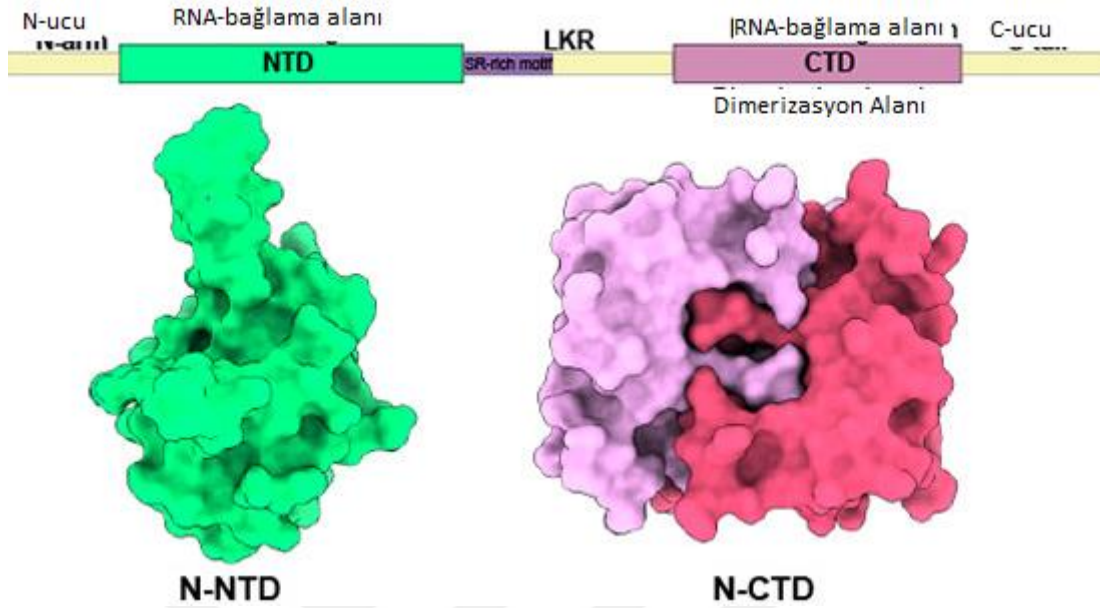
Bu özellikler, S proteininin konağın immün yanıtı için bir hedef ve ayrıca aşı ve terapötik müdahaleler için önemli bir aday olmasını sağlar (Mahalingam ve ark., 2021).

Nükleokapsid (N) Proteinini

Nükleokapsid (N) proteini, viral RNA'yı paketleyen, helikal ribonükleokapsid (RNP) oluşturan, replikasyon sırasında RNA sentezinin düzenlenmesi, transkripsiyon gibi virüs yaşam döngüsünün çeşitli yönlerinde yer alan, diğer yapısal proteinlerle etkileşime giren önemli bir yapısal proteindir. N proteini enfeksiyon sırasında bol miktarda üretilir ve oldukça immünojeniktir. Bu özellikleri ile N proteini de aşı geliştirmesinde güçlü bir hedeftir (Arya ve ark., 2021). N proteini 43 ila 50 kDa arasında değişir ve gRNA'ya bağlanır (Kadam ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 N proteini, yüksek oranda korunmuş iki alandan oluşur: N-terminal RNA bağlama alanı (N-NTD) ve C-terminal dimerizasyon alanı (N-CTD) (Şekil 4) (Arya ve ark., 2021). Proteinin N- ve C- terminal uçları serin / arginin

bakımından zengin, düzensiz ve yüksek fosforile edilmiş bir bağlayıcı bölge ile ayrılmıştır (Arya ve ark., 2021).



Şekil 4: SARS-CoV-2 N Protein (Peng ve ark., 2020)

Zarf (E) Protein

SARS-CoV-2'nin E proteini, üç alandan oluşan 75 amino asidin en küçük transmembran yapısal proteinidir (Arya ve ark., 2021). E proteini, 8.4 ila 12 kDa arasında değişen küçük bir polipeptittir ve SARS-CoV-2 yapısında, viryonların üretimini, olgunlaşmasını ve salınımını kolaylaştıran en küçük bileşendir (Kadam ve ark., 2021; Mohamadian ve ark., 2021). E proteini, CoV yapısal proteinleri arasında en korunmuş proteindir ve bu nedenle ortak karakteristik özellikler gösterir (Kadam ve ark., 2021).

Envelope (E) proteini üç alandan oluşur: bir N-terminal hidrofilik ekto-alan, bir hidrofobik transmembran alanı (TMD) ve ardından uzun bir hidrofilik C-terminal endo-alanı. E proteininin son dört amino asidi, viral yayılımı kolaylaştırmak üzere konak hücrelerinin birleşme bölgeleri ile bağlantılı proteinlerin (PALs1 ve sintenin) etkileşiminde rol alır. Bu etkileşimin, E proteininin viroporin aktivitesi ile birlikte sitokin fırtınasını indükleyebileceği düşünülmektedir (Arya ve ark., 2021) (Arya ve ark., 2021).

Membran (M) proteini

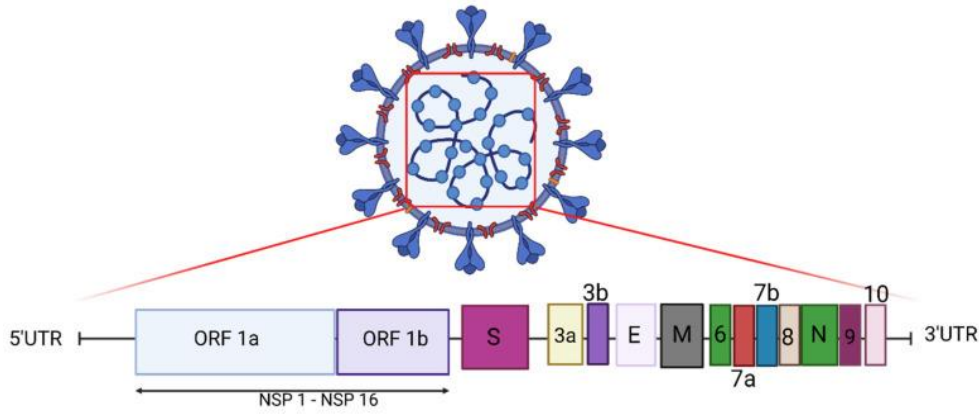
Membran (M) proteini, üç transmembran alanı ile karakterize edilen çok yayımlı bir glikoproteindir (Kadam ve ark., 2021). M glikoproteini, virion yapısında en bol miktarda bulunan ve çok iyi korunan bir proteindir. Bu protein, Nükleokapsid ve aksesuar proteinleri 3a ve 7a ile etkileşim yoluyla viral parçacıkların toplanmasını ve tomurcuklanmasını teşvik eder (Mohamadian ve ark., 2021). M proteininin S ve E proteinleri ile etkileşimi, viron zarfına karakteristik şeklini verir (Kadam ve ark., 2021).

Membran (M) proteininin üç ana alanı vardır: N-terminal ekto-alanı, ardından üç transmembran helis (TMH1-TMH3) ve C-terminal endo-alanı. M proteini kendisiyle homotipik, diğer yapısal proteinlerle ise (S, E ve N) heterotip etkileşime girer. Bu etkileşimler, tomurcuklanma adı verilen membran bükülmesini indüklemek için gereklidir ve yeni viryonların oluşumunda bir kontrol noktası olarak görev görür.

Antijenik epitopları, TM1 ve TM2 bölgelerinde tanımlanan M proteini güçlü bir humoral yanıt oluşturur. Böylece, M proteini terapötik uygulamalarda potansiyel bir immünojen olabilir (Arya ve ark., 2021).

2.4.2.2. Yapısal Olmayan Proteinler (NSP'ler)

Viral genom, replikasyon ve virüs montaj işlemleri sırasında sayısız rol oynayan birçok NSP'i kodlar (Şekil 5). Bu proteinler, erken transkripsiyon regülasyonunu, helikaz aktivitesini, immünomodülasyonu, gen transaktivasyonu modüle ederek ve antiviral yanıtı karşı koyarak viral patogeneze katılırlar. SARS-CoV-2'nin yapısında toplam 16 adet NSP bulunur. Viral yaşam döngüsünde çeşitli işlevlere (Tablo 2) sahip olan NSP'lerin birbirleriyle örtüşen rolleri de vardır (Kadam ve ark., 2021; Naqvi ve ark., 2020) .



Şekil 5: SARS-CoV-2 genomunun NSP'leri kodlaması (Torbati ve ark., 2021)

Tablo 2: NSP'ler ve işlevleri (Arya ve ark., 2021; M.-Y. Wang ve ark., 2020).

NSP	İşlevleri
NSP 1	RNA replikasyonuna aracılık eder. Konak hücrede protein sentezine müdahale eder ve virüsün, konağın doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından temizlenmesini önler
NSP 2	Konak hücre döngüsünde yer alan sinyallerle etkileşime girer.
NSP 3	Viral genom tarafından kodlanan çok işlevli, en büyük proteindir. Viral replikasyon-transkripsiyon kompleksini oluşturmak için diğer NSP'ler ve konak proteinleriyle etkileşime girer.
NSP 5	Replikasyon sırasında poliprotein sürecine katılır. NSP 5 aktivitesini ve stabilitesini modüle etmek, terapötiklerin geliştirilmesi için umut verici bir strateji olabilir.

NSP 9	Virüsün virülansında rol oynayan tek sarmallı bir RNA bağlayıcı proteindir. Virüs amplifikasyonu için gerekli proteinlerden biridir. RNA replikasyonunda yer aldığı düşünülmektedir.
NSP 10	NSP14 ve NSP16 ile birlikte viral mRNA başlık metilasyon kompleksini oluşturmak için kritik öneme sahiptir.
NSP 12	Viral replikasyon/transkripsiyonunun kritik bir bileşimi olan RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) içerir. NSP7 ve NSP8 ile birlikte, bir replikasyon kompleksi oluşturur.
NSP13	Viral replikasyon ve korumadaki temel rolü nedeniyle, antiviral ilaç gelişimi için önemli bir hedeftir.
NSP 14	İki işlevli bir proteindir. Redaksiyon aktivitesinin, viral genomun evriminden ve korunmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. mRNA başlık aktivitesi, konak immün tepkisinden kaçınarak viral mRNA'nın stabilitesi için önemlidir. Bu özellikleriyle, antiviral ilaç geliştirmek için önemli bir hedeftir.
NSP16	Viral mRNA'nın 5'-metil başlığını katalize eder. Virüsün 5' ucundaki-metil başlık, viral RNA'yı konak 5'-ekzoribonükleazlara karşı korur ve doğuştan gelen immün yanıtın indüksiyonundan kaçınmaya hizmet eder. NSP16'nın genetik bozulması, viral RNA sentezinde on kat azalmaya yol açar. Bu nedenle, COVID-19 için bir başka çekici ilaç hedefidir.

2.4.2.3. Aksesuar Proteinler

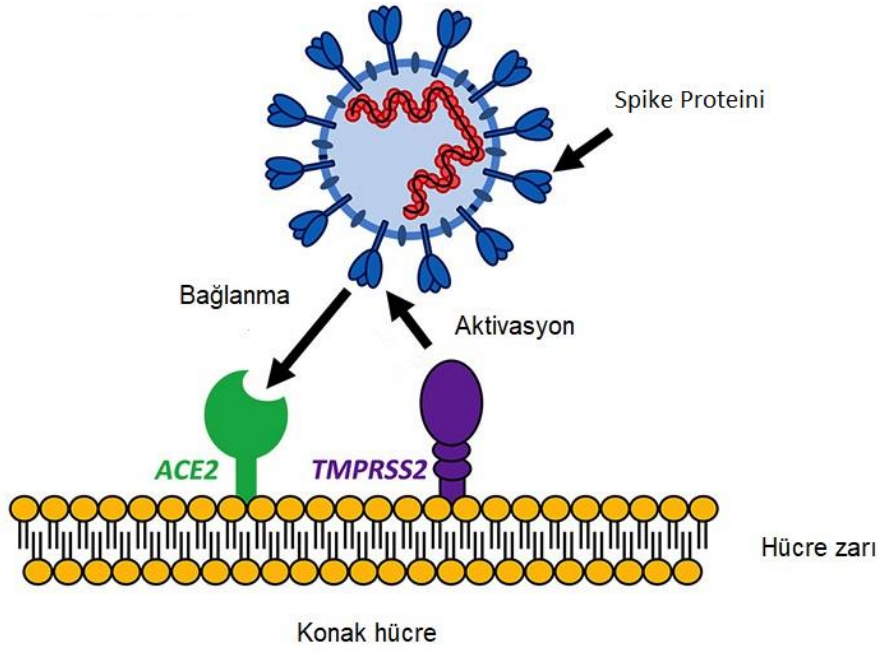
SARS-CoV-2'nin aksesuar genlerinin tam sayısı hala tartışılmaktadır (V'kovski ve ark., 2021). Aksesuar protein kodlayan genler, yoğun olarak genomun 3' ucunda kümelenir ve yapısal genler arasında bulunur. (Kadam ve ark., 2021). SARS-CoV-2 aksesuar proteinlerini kodlayan en az beş ORF bildirilmiştir: ORF3a, ORF6, ORF7a,

ORF7b ve ORF8. Ayrıca ORF3b, ORF9b ve ORF10 da aksesuar proteinlerini kodladığı düşünülmektedir ancak henüz deneysel olarak doğrulanmamıştır (V'kovski ve ark., 2021).

Aksesuar proteinleri, virüs içinde çok iyi korunmaları sebebiyle viral replikasyon için elzem olmamalarına rağmen önemli rollere sahip oldukları düşünülmektedir. SARS-CoV'da, ORF3b, ORF6 ve ORF9b'nin interferon antagonistleri olarak işlev görmesi bu duruma kanıt oluşturmaktadır (V'kovski ve ark., 2021). Bazı aksesuar proteinlerin spesifik fonksiyonları deneysel olarak bildirilmiştir ve konak immün yanıtına karşı koymadaki olası rolleri daha geniş kabul görmektedir. Bu nedenle, daha ileri çalışmalar, aksesuar proteinlerdeki varyasyonlar ile SARS-CoV-2 tarafından gösterilen yüksek virülans derecesi arasında bir bağlantı sağlayabilir (Kadam ve ark., 2021).

2.5. Replikasyon

SARS-CoV-2'nin konak hücredeki replikasyon aşamaları; bağlanma ve hücre içine giriş, viral replikazın transkripsiyonu, genomik transkripsiyon ve replikasyon, yapısal proteinlerin translasyonu, virion birleşimi ve salınımdır (Akdoğan ve Karslıgil, 2021). SARS-CoV-2, S1 alt birimi ucunda bulunan RBD aracılığı ile anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2)'ye bağlanır ve S2 alt birimi S proteinini zara sabitler. SARS-CoV-2 hücreye girişini tamamlamak için, transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) proteazını kullanır (Şekil 6) (Jackson ve ark., 2022). Viral giriş glikoproteinleri tarafından reseptör etkileşimi, tipik olarak diğer tetikleyicilerle birlikte, viral ve hücre zarları bir araya getiren her iki alt birimde konformasyonel değişiklikleri indükler ve sonuçta viral genomun hücre sitoplazmasına ulaşmasına izin veren bir füzyon gözenek oluşturur (Jackson ve ark., 2022). Membran füzyonunun yanı sıra klatrin bağımlı ve bağımsız endositoz da virüsün hücreye girişinde rol oynar (Tekol, 2020).



Şekil 6: SARS-CoV-2 hücreye girişi (Mousavizadeh ve Ghasemi, 2021)

Virüsün hücreye girmesinin ardından, viral genom replikasyon ve subgenomik mRNA sentezi için gerekli enzim ve proteinleri kodlar (Tekol, 2020). Viral RNA iki büyük ORF; ORF1 ve ORF2'yi kodlar (V'kovski ve ark., 2021). SARS-CoV-2 genomunda viral replikasyon için NSP'ler, S, E, M ve N gibi yapısal proteinler ve aksesuar proteinleri kodlayan 14 ORF vardır. Elde edilen ORF'ler pp1a ve pp1ab poliproteinlerini sentezler (Mohamadian ve ark., 2021). Bu proteinlerin sentezinden sonra pp1a ve pp1b viral proteazlar yardımıyla viral replikasyon ve transkripsiyon kompleksini oluşturan 16 tane NSP'e dönüştürülmektedir. NSP'nin ekspresyonu ile, karakteristik perinükleer çift membranlı kesecikler (DMV'ler), kıvrımlı zarlar (CM'ler) ve küçük açık çift zarlı kürelerden (DMS'ler) oluşan viral replikasyon organellerinin biyogenezi, viral genomik RNA replikasyonu ve SARS-CoV-2 mRNA'larının transkripsiyonu için koruyucu bir mikro-ortam oluşturur (V'kovski ve ark., 2021). Ardından viral genom çoğalmaya başlar. Sentezlenen ilk ürün RNA polimerazdır, RNA'nın bölünmesi ile negatif polariteli yeni RNA'lar üretilir. Transkripsiyon sonucu mRNA oluşur (Tekol, 2020). Replikasyon ve alt genomik RNA sentezi sonrasında yapısal proteinler, translasyona uğrar (Akdoğan ve Karslıgil, 2021). Sentezlenen zarf glikoproteinleri, Endoplazmik Retikulum- Golgi membranına yerleşir. Nükleokapsid proteininin, genomik RNA ile etkileşimi sonucunda nükleokapsid meydana gelir.

(Tekol, 2020). Viral partiküller golgi veziküllerinden tomurcuklandıktan sonra olgun SARS-CoV-2 virionları ekzositoz ile konak hücreden salınır (Erensoy, 2020).

2.6. İmmünoloji

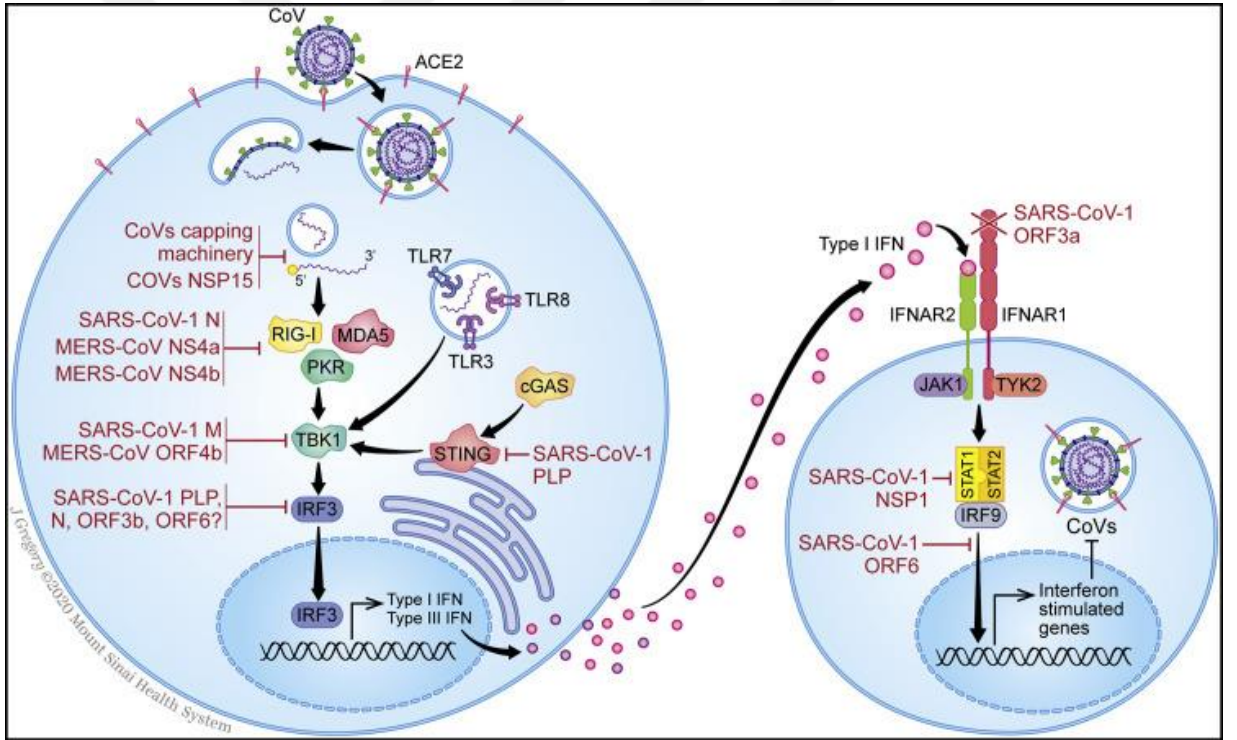
Bağışıklık sistemi, organizmanın patojenlere karşı savunma mekanizmasını destekleyen ve enfeksiyonlara direnç sağlayan güçlü bir savunma sistemidir. Çeşitli hücre ve proteinlerin etkileşimi ile çalışır. İki tip immün yanıt türü vardır: doğuştan gelen (doğal) immün yanıt ve adaptif (edinsel) immün yanıt (Chowdhury ve ark., 2020).

Bir SARS-CoV-2 enfeksiyonu esnasında, konak hücrenin hem doğuştan gelen hem de adaptif immün yanıt sistemleri enfeksiyona yanıt verir. Doğal immün yanıt ilk ve hızlı bir savunma mekanizması görevini üstlenirken, adaptif immün yanıt antijene özgül olarak zaman alan bir süreç içerisinde gelişir. Adaptif immün yanıt, özellikle konağı SARS-CoV-2 reenfeksiyonundan korumak için viral klirens ve uzun süreli immünolojik belleğin sağlanmasında önemlidir (Torbatı ve ark., 2021).

2.6.1. Doğal Bağışıklık

Doğuştan gelen bağışıklık, antiviral savunmanın ilk adımıdır. SARS-CoV-2'nin, diğer CoV'lerle paylaştığı dizi homolojisi ve doğal immün yanıtın korunan mekanizmaları (Şekil 7) göz önüne alındığında, virüs-konak etkileşimlerinin diğer CoV'ler ile benzer olması beklenmektedir (Vabret ve ark., 2020). Virüslere karşı doğal bağışıklık; kompleman ve pıhtılaşma-fibrinoliz sistemlerinin bileşenleri, hücre yüzeylerindeki glikanları tanıyan çözünür proteinler, interferonlar (IFN), kemokinler ve doğal olarak oluşan antikorlar dahil olmak üzere çeşitli hümmoral bileşenlere sahiptir. Doğal öldürücü hücreler (NK); hedef hücreler üzerinde sitotoksik etki, sitokin üretimi ve adaptif bir yanıtın indüklenmesi yoluyla viral enfeksiyonun yayılmasını sınırlaması yönleriyle doğal immün yanıtta önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda lenfoid hücreler (ILCs) ve gama delta T hücreleri gibi çeşitli hüccresel bileşenlere de sahiptir (Boechat ve ark., 2021).

SARS-CoV-2 gibi RNA virüslerinde, sitozolik RIG-I benzeri reseptörler (RLRs), ektozomal ve endozomal Toll benzeri reseptörler (TLRs), özellikle TLR3 ve TLR7, gibi kalıp tanıma reseptörleri (PRRs) viral tek sarmallı RNA (ssRNA) tarafından bağlanırlar. Bu etkileşim sonrasında doğal bağışıklık yolu başlatılır. PRRs aktivasyonu sonrasında interferon düzenleyici etmen (IRF), NF-kappa B, IRF3 ve AP1 gibi transkripsiyon faktörleri etkinleştirilir. Bu sinyal yollarının aktivasyonu özellikle doğal bağışıklıkla ilişkili sitokinlerin üretimini indükler. Bunlar arasında tip I/III interferonlar (IFN'ler) antiviral savunma için en önemli sitokinler olarak kabul edilir, ancak proinflamatuar tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-18 (IL-18) gibi diğer sitokinler de serbest bırakılır. Bu sitokinler ile birlikte, hedef hücrelerde antiviral basamakları indüklenir ve adaptif immün yanıt güçlendirilir (Vabret ve ark., 2020).



Şekil 7: Konağın Doğuştan Bağışıklık Tepkisi Mekanizmaları ve Coronavirüs Antagonizmi (Vabret ve ark., 2020)

2.6.2. Adaptif immün Yanıt

Adaptif immün sistemin hücreleri, hücresel ve humoral immün yanıtın efektörleri olan, timusta olgunlaşan T lenfositlerini ve kemik iliğinde ortaya çıkan antikör üreten B lenfositlerini içerir. Adaptif immün yanıt, patojene özgü immünolojik efektör yolları,

immünolojik hafızanın oluşumunu ve konağın immün homeostazının düzenlenmesini kolaylaştıran antijen sunan hücreler (APC) ile T ve B lenfositleri arasında sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir etkileşimi içerir (Bonilla ve Oettgen, 2010). Adaptif bağışık yanıtların ortaya çıkabilmesi için APC'ler tarafından yakalanan antijenlerin lenfositlerin yüzeyinde bulunan B hücre reseptörleri (BCR) ve T hücre reseptörlerinin (TCR) antijeni tanınması gerekir.

Adaptif bağışıklık temel olarak T lenfositlerden oluşan hücresel bağışıklık ve B lenfositlerin meydana getirdiği humoral bağışıklık olarak incelenir (Levinson, 2004). Adaptif immün yanıtın temel özelliklerinden biri, antijene özgü lenfositlerinin hızlı klonal genişlemesidir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunu kontrol etmek için yeterli sayıda adaptif immün hücre üretmek için gereken süre, virüsle karşılaştıktan sonra yaklaşık 6-10 gündür. Bu süre, farklı şiddette COVID-19 enfeksiyonuna sahip kişiler arasında değişebilir. Enfeksiyonun farklı aşamalarındaki viral yük ve immün yanıt seviyesi, COVID-19 semptomlarındaki şiddetin ana göstergeleridir. Şiddetli COVID-19 ve aşırı immün yanıt, yüksek ve kalıcı viral yüklerle ilişkilidir. Enfeksiyonun erken dönemlerinde viral replikasyonun kontrol edilememesi, daha ciddi hastalık ve organ hasarına yol açabilen inflamasyona neden olabilir (Torbatı ve ark., 2021).

2.6.2.1. Hücresel Bağışıklık

Neredeyse tüm COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2'ye özgü T hücre yanıtları tespit edilmiştir ve CD8⁺ T hücre yanıtlarına kıyasla daha belirgin CD4⁺ T hücre yanıtları gözlenmiştir. Virüse özgü CD4⁺ T hücreleri, interferon-gama (IFN γ) ve T foliküler yardımcı hücreler (T_{fh}) gibi antiviral sitokinler üreten Th1 hücrelerine farklılaşabilir. T_{fh} hücreleri, yüksek afiniteli antikor tepkileri ve uzun ömürlü plazma hücreleri ve bellek B hücreleri ile sonuçlanan germinal merkez reaksiyonu yoluyla uzun vadeli humoral bağışıklığın gelişiminde çok önemli bir rol oynar. SARS-CoV-2'ye özgü CD4⁺ T hücre yanıtları ağırlıklı olarak S ve M proteinlerine yöneliktir. M ve S reaktif CD4⁺ CD154⁺ T hücreleri, N reaktif CD4⁺ CD154⁺ T hücrelerine kıyasla birden fazla sitokin (IFN- γ , IL-2 ve TNF-a dahil) üreten çok işlevli lenfositlerdir (Torbatı ve ark., 2021).

Grifoni ve ark., pandemi öncesinde depolanmış periferik kan mononükleer hücresi numunelerinde hem spike hem de non-spike peptitlere çapraz reaktif CD4+ T hücre yanıtları tespit edilmiştir. İnsan mevsimsel CoV'lerine (NL63, 229E, HKU1 ve OC43) önceden maruz kalma, SARS-CoV-2 çapraz reaktif T hücre yanıtları oluşturabilir (Grifoni ve ark., 2020).

CD8+ T hücreleri ayrıca sitokin salgılayarak ve enfekte olmuş hücreleri inhibe ederek SARS-CoV-2 enfeksiyonunun temizlenmesinde önemli bir rol oynar. S, N, M ve ORF3a gibi bir dizi SARS-CoV-2 antijenine özgü SARS-CoV-2 CD8+ T hücreleri tanımlanmıştır. COVID-19'un akut fazlarında IFN γ , granzim B, perforin ve CD8+ T hücreleri tarafından degranülasyon belirteci CD107a'nın yüksek ekspresyon seviyeleri bildirilmiştir.

Mazzoni ve ark. tarafından yapılan çalışmada, SARS-CoV-2'ye özgü IgA, IgM ve IgG antikorlarının seviyeleri ile virüse reaktif CD4+CD154+ T hücrelerinin sıklığı arasında anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir. Antikorlar ve antiviral CD4+ arasındaki korelasyon başka çalışmalarda da bildirilmiştir (Torbatı ve ark., 2021).

2.6.2.2. Hümmoral Bağışıklık

B hücresi yüzeylerinde meydana gelen antijen-antikor etkileşimleri; virüse özgü hücre proliferasyonunu, antikor izotip değişimini, hücre olgunlaşmasını ve sistemik ve mukozal bölgelerde hücre yerleşimini yönlendirir. B hücrelerinin aktive olmalarıyla ortaya çıkan epitoplara, MHC II hücreleri aracılığıyla APC'ler tarafından CD4 T yardımcı hücreleri (Th1)'ne sunulur. Ayrıca APC'ler interleukin-12 (IL-12) salgılayarak Th1 hücrelerinin daha fazla uyarılmasını sağlar. Tfh hücreleri, aktif B hücrelerine ligandlar veya çözünür sitokinler şeklinde uyarıcı sinyaller sağlar. Bu sitokin salınımı aynı zamanda, sitotoksik CD8+ T hücrelerinin hazırlanmasını ve B hücrelerinin uyarılmasını ve çoğalmasını sağlar.

Çoğalan B hücreleri somatik hipermutasyona ve sınıf değişimine uğrar böylece BCR'lerinin antijene daha güçlü bağlanmasını sağlar. Antijenlere daha düşük afiniteye sahip olan B hücreleri hayatta kalamaz. Germinal merkez B hücrelerinin Tfh hücreleri

ile etkileşimi, B hücrelerinin kısa ömürlü plazma hücrelerine ve uzun ömürlü bellek B hücrelerine farklılaşmasını da teşvik edebilir. Kısa ömürlü plazma hücreleri, lenfoid organlarda bulunur ve antikorların sistemik dolaşıma salgılanmasından sorumludur. Bununla birlikte, ömrü nispeten kısadır ve bu popülasyonun ölümü, birincil antikor yanıtı olarak bilinen bir süreç olan antikor titrelerinin azalmasına neden olur. Bununla birlikte, bellek B hücreleri uzun bir ömre sahiptir ve antijenle yeniden karşılaşma durumunda, ikincil antikor yanıtı veya bellek B hücre yanıtı olarak bilinen bir süreçte hızlı çoğalmaya ve antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmaya başlarlar (Mahalingam ve ark., 2021).

2.6.3. Antikor Sınıfları ve Sınıf Değişimi

Çoklu antikor sınıfları, viral enfeksiyonlara karşı antikor aracılı immün yanıtlarda rol oynar. Bu sınıflar biyofiziksel özellikleri, fonksiyonları, doku dağılımları ve yarı ömürleri ile karakterizedir. Naif B hücresi gelişimi esnasında eksprese edilen ilk antikorlar IgD ve IgM'dir ve sınıf değiştirme sırasında üretilen antikorların çoğunu oluşturmaktadırlar.

IgM, serumdaki tüm antikorların yaklaşık %10'unu oluşturur. IgM antikorları, somatik mutasyonlar sebebiyle IgG'ye kıyasla nispeten düşük bir afinite göstermesine rağmen hedef antijen için yüksek avidite gösterirler. Serumda bulunan IgM antikorları antijen opsonizasyonunu kolaylaştırmaktadırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda gastrointestinal ve solunum yolları mukozasında sekretuar IgM'nin çeşitli rolleri de ortaya konmuştur.

IgA immüno globulinleri, mukozal yüzeylerde ve sekresyonlarda önemli ölçüde bulunarak mukozal bağışıklığın merkezinde yer alırlar. IgA, sekresyonlarda dimerik yapıda bulunur. Plazma hücreleri tarafından solunum sistemine salgılanan IgA antikorları, patojen nötralizasyonu yoluyla mukozal immünitede kilit bir rol oynar; bu, agregasyonu kolaylaştıran ve konak hücrelerin ilk enfeksiyonunu önleyen böylece bir patojene karşı sterilize edici immün yanıt kazandıran bir süreçtir.

IgG immüoglobulinleri serumdaki tüm antikorların yaklaşık % 75'ini oluşturur. IgG antikorları, somatik mutasyonlar yoluyla afinite olgunlaşma sürecinden geçmesi sebebiyle immün yanıtta daha sonra ortaya çıkar. Bu olgunlaşma süreci ile birlikte IgG antikorları, hem hedef antijen için yüksek afinite kazanır hem de patojenleri nötralize etme kapasitelerinde artış olur. Ayrıca IgG antikorları, özellikle hücre aktivasyonları ve antikora bağımlı hücrel sitotoksiste gibi Fc aracılı efektör fonksiyonları gibi diğer önemli rollere de sahiptir. Dolaşımdaki uzun yarı ömürleri ve farklılaşmış bellek B hücreleri ile ilişkileri sebebiyle kalıcı bağışıklık ile ilişkilidirler. Ayrıca IgG, doğal bağışıklık sisteminin klasik kompleman yolunu aktive eder. IgG antikorları, çoklu alt tiplere sahiptir. Bu alt tiplerin her biri humoral immünitede farklı rollere sahiptir. IgG1, IgG3 ve bazen IgG4 reenfeksiyonda protein antijenlerine yanıt olarak salgılanırken, IgG2 neredeyse sadece polisakkarit antijenlerine yanıt verir. Farklı patojenler, farklı IgG alt tiplerini ortaya çıkarır. Bu durum, koruma korelasyonları açısından aşı tasarımlarının etkinliğini izlemek için karakteristik profiller olarak kullanılabilir.

IgE immüoglobülinleri, serumda toplam antikorların % 0.01'inden azını oluşturur. Ağırlıklı olarak paraziter enfeksiyonlara, alerjik reaksiyonlara ve immün yanıtlara aracılık eder. IgE antikorları monomeriktir ve mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller gibi çok sayıda doğal bağışıklık hücresinde eksprese edilen FcεRI reseptörleri için güçlü bir afinite gösterir ve doğuştan gelen bağışıklık sistemi aktivasyonu yoluyla genelleştirilmiş bir enflamatuvar yanıtın üretilmesine izin verir.

Mevcut yayınlanmış veriler, IgM'nin SARS-CoV-2 enfeksiyonunda ortaya çıkan ilk izotip olduğu, IgA'nın ve son olarak IgG antikorların izlediğini desteklemektedir (Galipeau ve ark., 2020).

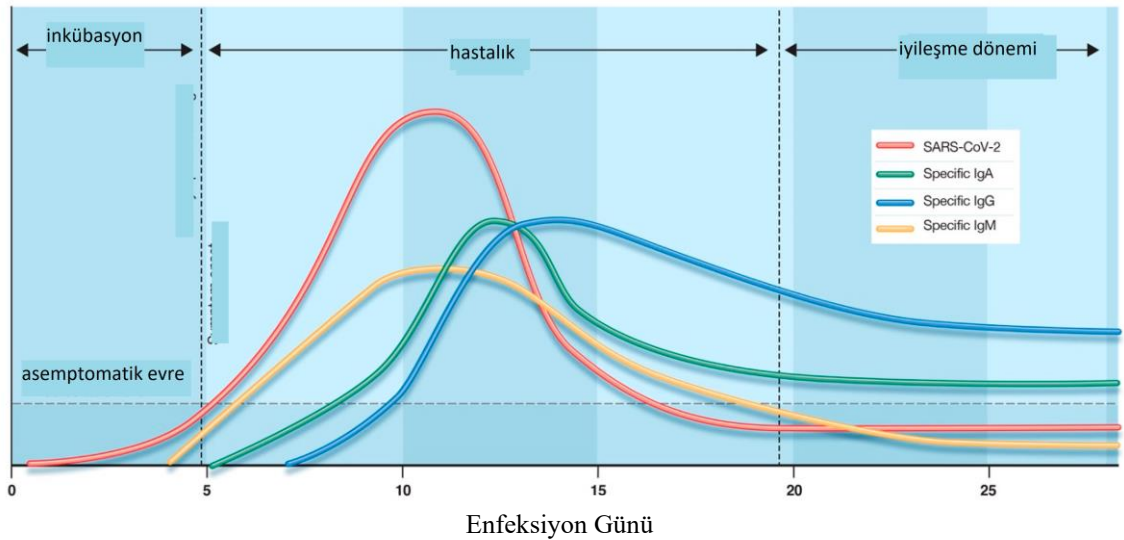
Bazı aktive IgM ve IgD eksprese eden efektör B hücreleri ağır zincir izotiplerini değiştirerek IgG, IgA veya IgE üreten hücrelere dönüşürler. Ağır zincir izotip değişimi, B hücrelerinin farklı antikor tipleri üretmelerine olanak sağlar böylece farklı mikroorganizmalara karşı değişik efektör fonksiyonları olan ve en iyi humoral immün yanıtı sağlayacak immüoglobülin tipi üretilir. Sınıf değiştirme sırasında, immüoglobulin ağır zincirinin sabit bölgesi değişir, ancak değişken bölgeler sayesinde

antijenik özgüllük sağlanır. Bu, aynı aktive edilmiş B hücresinden farklı hücrelerin farklı izotipler veya alt tipler üretmesine izin verir (Durmaz, 2013).

2.6.4. Antikor Yanıtının Kinetiği

COVID-19 antikor yanıtının kinetiği, bireyler arasında oldukça farklı gelişir. SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastalarda IgM, IgA ve IgG antikor yanıtları izlenirken IgE üretiminin indüklendiğine dair herhangi bir serolojik kanıt yoktur. Semptomların başlamasından 5 gün sonra IgM ve IgA antikorları kanda saptanırken IgG 14 gün sonra saptandığı bildirilmiştir (Şekil 8). IgG immünoglobulinleri, yüksek afinitesi, nötralizasyon kapasitesi, uzun vadeli bağışıklıktaki baskın rolü göz önüne alındığında en önemli etkilere sahiptir. COVID-19 semptomlarının başlamasından sonraki ilk 12 gün içinde, SARS-CoV-2'ye karşı serokonversiyon saptanabilir hale gelir.

Antikorların koruyuculuğu üzerine yapılan araştırmalar, semptomların başlamasından sonra en az 49 gün boyunca yüksek IgG düzeylerinin saptanabilir olduğunu, IgM düzeylerinin ise enfeksiyondan sonraki 35. günde hızla düştüğünü göstermektedir. (Ghaffari ve ark., 2020).



Şekil 8: SARS-CoV-2 enfeksiyonlarında IgM, IgG ve IgA antikorları için zaman çizelgeleri ve zirve seviyeleri (Ghaffari ve ark., 2020)

COVID-19 antikor yanıtının kinetiği konusunda aşağıdaki dört alanda ilerlemeler kaydedilmiştir:

1. Şiddetli ve hafif COVID-19 hastalarının antikor yanıtlarındaki farklılıklar
2. Enfeksiyondan sonraki ilk haftalarda serokonversiyon ve antikor yanıtının büyüklüğü
3. İlgili antijen hedeflerine bağlı olarak antikor kinetiğindeki değişkenlik
4. Antikorların zaman içinde koruyuculuğu ve nötralizasyon kapasitesindeki tartışmalar

Viral saçılım ve antikor tespitiyle ilgili bir kinetik çalışma, şiddetli hastalarda daha yüksek IgG ve IgM antikor titrelerinin varlığını bildirmektedir. Bu çalışma, güçlü antikor yanıtının hastalık şiddetine yol açtığını, zayıf yanıtın ise virüsün ortadan kaldırılmasıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (Chvatal-Medina ve ark., 2021).

Benzer bir çalışmada, 23 ağır ve hafif hastadan toplam 461 klinik örnek alındı. SARS-CoV-2 enfeksiyonunu şiddetli geçiren hastalarda viral saçılım enfeksiyon başlangıcından 30-40 gün sonrasına kadar devam etti, enfeksiyonu hafif geçiren hastaların çoğunda ise, viral RNA'nın tespitinden 15 gün sonra klinik örneklerde saptanabilir viral yük olmamıştır (Y. Wang ve ark., 2020).

Bazı çalışmalar, asemptomatik bireylerin daha zayıf antikor tepkileri geliştirdiğini göstermiştir. Asemptomatik hastalarda gelişen antikorların seviyesinin hızlı bir şekilde düştüğü görülmüştür (Kamps ve Hoffmann, 2020). Long ve ark. yaptığı bir çalışmada asemptomatik hastalarda semptomatik hastalara göre daha düşük viral IgG düzeyleri bulunmuştur. Hastaların IgG ve nötralize edici antikor seviyeleri enfeksiyondan 2-3 ay sonra düşmeye başladı. Hastaların % 40'ı erken iyileşme fazında IgG için seronegatif hale geldi (Long ve ark., 2020).

Wang ve ark. plazmada SARS-CoV-2'nin N proteinine karşı IgM ve IgG antikor yanıtlarını ölçtü. Şiddetli hastalığı olan hastalarda IgM yanıtları, 1-2 hafta içinde artmış ve 4 hafta sonra kademeli olarak azalmıştır. Hafif derecede hasta olan hastaların çoğu ise tüm hastalık seyri boyunca anlamlı IgM antikoru üretmedi. Her iki hasta grubu da en

az 6 hafta süreyle korunan yüksek seviyelerde IgG antikorları gösterdi (Y. Wang ve ark., 2020).

Zhao ve ark. 173 hastanın katılımıyla gerçekleştirdiği bir çalışmada, IgM ve IgG için serokonversiyon oranları (medyan süre) sırasıyla %83 (12 gün) ve %65 (14 gün) idi. Daha yüksek bir antikor titresi, bağımsız olarak şiddetli hastalıkla ilişkilendirildi (Zhao ve ark., 2020).

Bazı hastalarda IgG'nin IgM'den daha hızlı oluştuğu gözlenir. Bu sonuç sCoV'lere karşı önceden var olan çapraz reaktivite ile ilgili olabilir. IgM ve IgG antikorlarının serokonversiyon modelleri üzerine yapılan bir çalışmada, IgG antikorunun serokonversiyon süresinin IgM'den daha önce olduğu bildirilmiştir. IgG antikoru en yüksek konsantrasyona 30. günde ulaştı, IgM antikoru ise 18. günde zirve yaptı, ancak daha sonra düşmeye başladı (Qu ve ark., 2020).

Çapraz reaktiviteyi araştırmak için yapılan bir çalışmada 6 insan CoV'nün S ve N proteinleri, IgG antikor tespiti için kullanıldı. SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmemiş 96 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hem ağır hem de hafif hasta gruplarından alınan plazma, kontrol grubuyla benzer şekilde SARS-CoV ve sCoV'ler HCoV-229E, NL63, HKU1, OC43'e bağışıklık yanıtı gösterirken MERS-CoV ve SARS-CoV-2'ye özgü antikorlar arasında belirgin bir çapraz reaktivite gözlenmemiştir (Y. Wang ve ark., 2020).

Gözlemsel bir vaka çalışmasında 16 SARS-CoV-2 hastasının tamamında anti-S-RBD IgG tespit edilirken, 15 hastada anti-N IgG ve anti-S-RBD IgM ve 14 hastada anti-N IgM tespit edildi (Shah ve ark., 2020). COVID-19'a özgü hümmoral immün yanıtı saptamaya yönelik ELISA tabanlı bir zaman kinetiği çalışması, hastaların SARS-CoV dışında diğer insan koronavirüsleriyle çapraz reaksiyona girmeyen IgM ve IgG antikorları ürettiğini gösterdi (Şekil) (Guo ve ark., 2020).

Farklı SARS-CoV-2 yapısal proteinlerinin antijenitesini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada S1, S2, RBD ve N proteinleri kullanıldı. Tüm proteinler hasta plazması

tarafından tanındı ve başlangıçtan 3-4 hafta sonra zirve yaptı. S ve S2 proteinlerine karşı serokonversiyon oranları, hastalık başlangıcından 7-14 gün sonra %100'e ulaşmıştır. Aynı dönemde S1 (%50), RBD (%65) ve N (%90) proteinlerine karşı serokonversiyon daha düşüktü ve hastalık başlangıcından 3 hafta sonra %100'e ulaştı (Y. Wang ve ark., 2020).

Long ve ark. Yaptığı bir çalışmada 285 hastanın tamamı semptom başlangıcından sonraki 19 gün içinde, antiviral IgG için pozitif test edildi. IgG ve IgM için serokonversiyon aynı anda veya sırayla meydana geldi. (Long ve ark., 2020). SARS-CoV-2 antikor yanıtının koruyuculuğunu ve uzun ömürlülüğünü belirlemek için New York City'deki Mount Sinai Sağlık Sisteminde taranan hafif ila orta derecede COVID-19 semptomları olan 30.082 enfekte bireyden oluşan bir kohortta, SARS-CoV-2 spike proteinine karşı nötralize edici antikor titreleri enfeksiyondan en az 5 ay sonra devam etti (Wajnberg ve ark., 2020).

2.6.5. Sitokin Fırtınası

Sitokinler; hücreler arası etkileşimi sağlayan, immün sistem tarafından salınan küçük moleküler ağırlıklı, çözünür proteinlerdir. Sitokinler, bağışıklık sistemi tepkilerinin düzenlenmesinde, enflamatuvar yanıtta rol alırlar. Yüksek miktarlarda salındıkları zaman ise “sitokin fırtınası” gibi sistemik etki de gösterebilirler (ATAK YÜCEL ve ark., 2020).

Sitokin fırtınası, COVID-19 hastalığında anahtar bir role sahiptir. SARS-CoV-2, solunum epitel hücrelerine girdikten sonra, zayıf bir IFN yanıtı ve enflamatuvar sitokin üretimi ile immün yanıtı indükler. Patojenik Th1 hücrelerinin ve olgunlaşmamış CD14+ CD16+ monositlerin proinflamatuvar immün yanıtlarına, membrana bağlı immün reseptörler ve sinyal yolları aracılık eder. Bunu makrofajların ve nötrofillerin akciğer dokusuna sızması izler ve bu da bir sitokin fırtınasına neden olur.

COVID-19'daki sitokin fırtınası, genel olarak, yüksek IL-6 ve TNF- α ekspresyonu ile karakterize edilir. SARS-CoV-2, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-

CSF) ve interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılamak için patojenik Th1 hücrelerini hızla aktive edebilir. GM-CSF ayrıca CD14+ CD16+ inflamatuvar monositleri aktive ederek büyük miktarlarda IL-6, TNF- α ve diğer sitokinleri üretir. Fc ve TLRs gibi membrana bağlı immün reseptörler, bozulmuş inflamatuvar cevaba katkıda bulunabilir ve zayıf IFN- γ indüksiyonu, sitokin üretiminin yükselmesine sebep olabilir. Nötrofiller tarafından salınan hücre dışı ağlar, sitokin salınımına katkıda bulunabilir. Sonuç olarak, doğal bağışıklığın SARS-CoV-2'ye karşı kontrolsüz enflamatuvar yanıtı ve bozulmuş edinsel bağışıklık sitokin fırtınasına neden olabilir (Biying Hu ve ark., 2021).

2.7. Klinik Bulgular

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun klinik sonuçları, iyi huylu bir seyirden semptomların başlamasından sonraki 2-3 hafta içinde ölüme yol açan bir hastalığa kadar değişkenlik gösterir (Boechat ve ark., 2021). SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçiren bireylerde en yaygın görülen klinik bulgular sırasıyla ateş, öksürük, yorgunluk, miyalji, balgam üretimi, nefes darlığı, baş ağrısı, tat ve koku kaybı yer almaktadır. Hastada enfeksiyona eşlik eden kronik bir hastalık olması durumunda enfeksiyon şiddetinin arttığı gözlenmiştir (Huang ve ark., 2020).

Enfekte olan kişilerin çoğu asemptomatiktir veya yalnızca üst solunum yolu semptomları yaşar, ancak bazı bireyler interstisyel pnömoni geliştirir, bu da hızlı bir şekilde solunum yetmezliğine ve akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) ilerleyebilir ve çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanabilir. Ek olarak, asemptomatik hastalar önemli ölçüde daha uzun viral saçılma dönemlerine sahiptir, bu da hastalığın yayılmasında önemli bir etkidir.

Şiddetli COVID-19'lu hastalarda enfeksiyon hızla ilerler. Şiddetli COVID-19 enfeksiyonu nedeniyle yoğun bakım ünitesine (YBU) yatırılan hastalarda solunum yetmezliğine ilişkin veriler incelendiğinde yardımcı ventilasyon gerektiren ARDS için semptomların başlamasından itibaren ortalama 1-2 hafta, dispne için 8 gün, ARDS için 9 gün ve yoğun bakım ünitesi için 10-12 gün gibi hızlı ilerlemeler bildirilmiştir.

Vakaların üçte birinde ana ölüm nedeni, şokla ilişkili solunum yetmezliğidir (Boechat ve ark., 2021).

2.8. Tanı

COVID-19'un klinik belirtilerinin hastalar arasında farklılıklar göstermesi ve bazı hastalarda teşhis edilememesi sebebiyle hastaların basit semptomlar için dahi izlenmesi ve hastalara çoklu testler uygulanması çok önemlidir. Bu sebeple COVID-19 pandemisinin başlangıcından itibaren, enfekte bireylerde virüsün hızlı, ucuz ve doğru tespitine yönelik artan bir ihtiyaç olmuştur. Laboratuvar testleri genel olarak iki farklı prensibe dayanır: viral RNA'nın saptanması ve ölçülmesi ve konağın SARS-CoV-2 antijenlerine karşı bağışıklık tepkisini yansıtan çeşitli izotiplerdeki antikorların ölçülmesi (Özçürümez ve ark., 2020). Genel olarak, taramanın ilk adımı, ters transkripsiyon ölçülebilir gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (revers transkription quantative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) yoluyla viral genomik materyalin saptanmasını, ardından tamamlayıcı radyolojik ve serolojik testlerin yapılmasını içerir (Sharma ve ark., 2021). Dünya genelinde COVID-19'un laboratuvar tanısında en sık kullanılan yöntemler; nükleik asit amplifikasyon yöntemleri, serolojik testler ve bilgisayarlı tomografi (BT) bulgularıdır (Temel ve ark., 2021).

2.8.1. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler, SARS-CoV-2'nin tanısında altın standart olarak kullanılmaktadır. SARS-CoV-2 için yaygın olarak kullanılan iki moleküler yöntem; RT-qPCR ve yüksek verimli sekanslamadır. Sekanslama teknolojisinin, ekipman gereksinimi ve yüksek maliyeti sebebiyle klinik tanıda uygulanması sınırlıdır. Bu nedenle RT-qPCR, patojenik virüsleri tespit etmek için en yaygın kullanılan etkili ve basit bir yöntemdir (SEMEN ve ark.).

RT-qPCR ile test edilen en yaygın örnek türleri, nazofarenks ve orofarenksten alınan sürüntülerdir (ALTINDIŞ ve Toptan, 2020). Testin mekanizması, pozitif tek

sarmallı RNA genomuna sahip SARS-CoV-2'nin saptanması için öncelikle viral RNA'nın revers transkriptaz enzimi ile komplemeneter DNA (cDNA)'ya dönüştürülmesi ve ardından rt-qPCR yöntemi ile amplifikasyonu işlemine dayanır. Genellikle SARS-CoV-2 gen bölgelerinden (N, RdRP, ORF1ab, Spike) en az birinin hedeflendiği protokoller ile uygulanan RT-qPCR yönteminde internal kontrol olarak konağın solunum yolu epitel hücrelerindeki insan RNase P geni hedeflenir. Bu yöntemde pozitif bir test sonucu, bireylerde viral RNA'nın varlığını gösterir (Mahalingam ve ark., 2021).

2.8.2. Serolojik Yöntemler

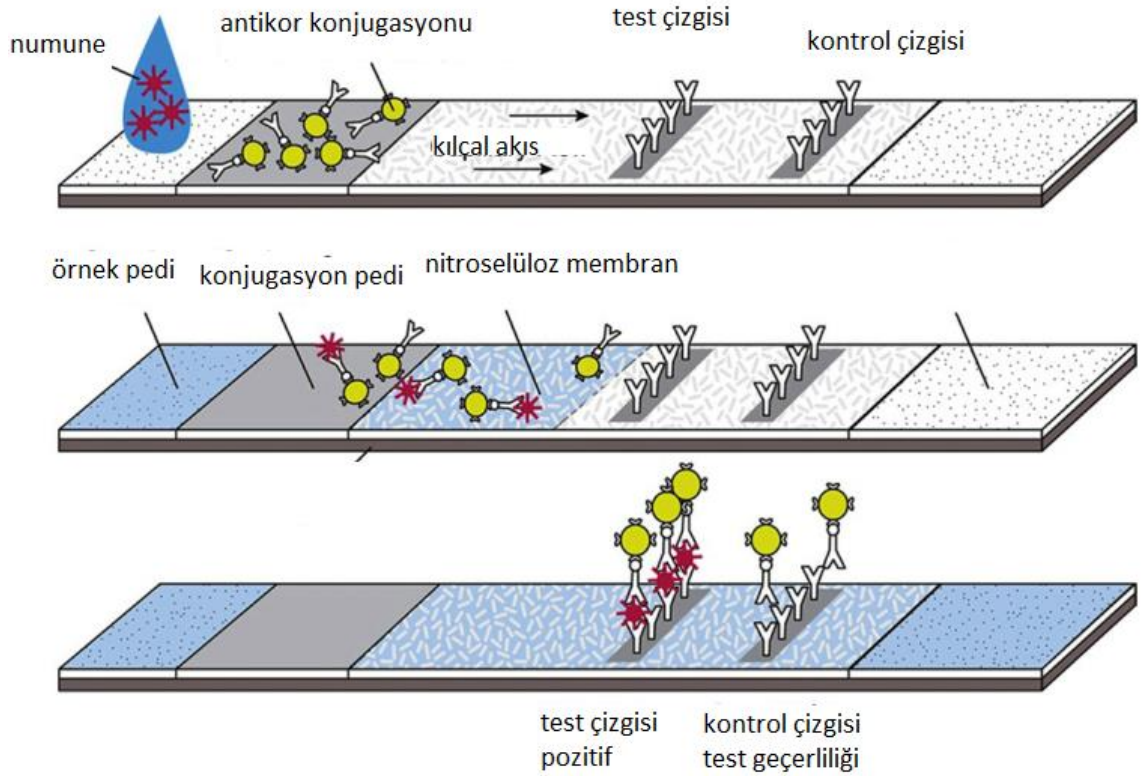
Serolojik testler, belirli bir patojene karşı antikorların varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır. COVID-19'da serolojik testlerin çeşitli faydaları bulunmaktadır. Belirli bir popülasyonda virüsle karşılaşan bireylerin oranını belirleyerek hastalık insidansını yakından izlemek için bir serolojik tahlilden yararlanılabilir. Popülasyon seroprevalansının ölçülmesi, asemptomatik bulaşmanın yaygınlığını ve hastalığa yakalanma risk faktörlerini değerlendirmek için de kullanılabilir. Ayrıca, antikor titrelerinin ölçülmesi ve antikor titrelerinin nötralize edilip edilmediğini belirlemek için güvenilir serolojik testler gereklidir. Geliştirilen aşılardan ve aşı adaylarının etkinliğinin ölçülmesinde de serolojik testler kullanılır. Klinikte, mevcut PCR tabanlı testlere ek olarak serolojik testler kullanılabilir. Son olarak, serolojik testler, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun sağladığı bağışıklığın süresini ve etkinliğini belirleyerek, yeniden enfeksiyon riskini karakterize ederek derin klinik ve epidemiyolojik sonuçlar elde edilmesini sağlar.

Pozitif bir serolojik test sonucu, geçmişte patojene ait antijenle karşılaşmanın göstergesidir, bu sebeple aktif bir enfeksiyonun varlığını göstermeyebilir. SARS-CoV-2'nin neden olduğu bir enfeksiyonda, viral RNA seviyeleri ikinci haftada hızla düşer ve tespit edilemez hale gelebilir. Bu durumda antikorlar, geçmiş bir enfeksiyonu tespit etmek için birincil ve en doğru yöntem haline gelir. Serolojik testler ayrıca popülasyondaki asemptomatik ve daha önce tanı konulmamış enfeksiyonların tespiti için de kritik öneme sahiptir. Bu bilgi, halk sağlığı müdahalelerine rehberlik etmek için

gereklidir. Serolojik testler genel olarak iki kategoriye ayrılabilir: Hızlı Tanı Test (RDT)'leri ve platform tabanlı testler.

2.8.2.1. Hızlı Tanı Testleri (RDT'ler)

Hızlı Tanı Testleri ekipmana ihtiyaç duymadan kullanım için tasarlanmış hızlı, kaliteli ve anlaşılması kolay okumalar sağlar. Yanal akış analizi (lateral flow analysis; LFA) 30 dakikalık bir zaman penceresi içinde birden fazla SARS-CoV-2 antijenine karşı antikorların varlığını saptayan en yaygın olarak kullanılan RDT'dir. SARS-CoV-2 tespiti için, test cihazının bir tarafına hastadan alınan sıvı bir numune (örn. kan veya tükürük) eklenir. Numune daha sonra konjugasyon pedine yayılır, burada koloidal altın gibi bir kolorimetrik tespit molekülüne konjuge viral antijenler mevcuttur. Numunede SARS-CoV-2 antikorları mevcutsa, antijen-antikor etkileşimi başlayacak ve sürekli kılcal akışla, genellikle anti-IgG ve anti-IgM olmak üzere antikorların hareketsizleştirildiği bir nitroselüloz membrana göç edeceklerdir (Şekil 9).



Şekil 9: Hızlı tanı testlerinin prensibi (Abduljalil, 2020)

RDT'ler hızlı ve kolay kullanım için ideal olsa da son çalışmalar SARS-CoV-2 için yeni geliştirilen birçok RDT'nin hızlı olmayan testlere kıyasla gerekli duyarlılık ve özgüllük standartlarını karşılayamadığını göstermiştir. RTD'lerin dezavantajları;

- daha yüksek maliyet oranları,
- birden fazla numuneyi aynı anda analiz edememeleri,
- nicel veri eksikliği,
- platform tabanlı test yöntemlerine göre daha düşük test hassasiyeti.

Bu nedenle, araştırma amaçları için RTD'ler ideal seçim değildir (Galipeau ve ark., 2020).

2.8.2.2. Platform Tabanlı Testler

Serolojik testler, B lenfositleri tarafından üretilen antikorların çoklu izotiplerini saptamak amacıyla kullanılır. Yaygın olarak kan, serum, plazma veya tükürük numuneleri kullanılır. Günümüzde Halk Sağlığı Laboratuvarlarında SARS-CoV-2 serolojik testleri için çeşitli platform tabanlı serolojik testler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanlar; enzim bağlantılı immünosorbent testler (ELISA), immünofloresan testler (IFA) ve kemilüminesans enzim immünolojik testler (CLIA)'dir.

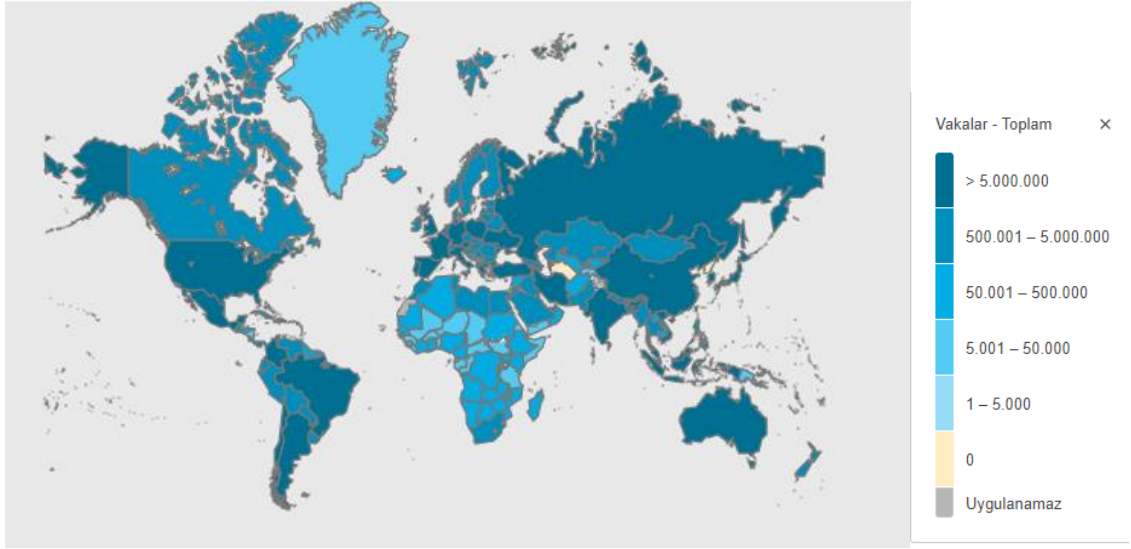
Platform tabanlı serolojik testler temel olarak tükürük veya kan numunesi içinde bulunan SARS-CoV-2 antikorlarının, SARS-CoV-2 antijeni ile kaplanmış bir plak gibi katı bir desteğe yakalanmasını içerir. Bu aşamayı bir yıkama adımı izler ve genellikle bir florofora veya yaban turpu peroksidaz (Horseradish Peroxidase; HRP) gibi bir enzime konjuge edilen bir saptama antikoru eklenir. Fazla antikor yıkanır ve tespit yapılır. Kullanılan serolojik yöntemle bağlı olarak son tespit yöntemi için ELISA'da kolorimetrik, CLIA'da lüminesan ve IFA'da floresan yöntemler kullanılabilir (Galipeau ve ark., 2020).

Serolojik test yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüğü üzerine yapılan 40 çalışmanın sistematik bir incelemesine göre IgG veya IgM'yi ölçen ELISA'ların duyarlılığı %84,3 LFIA'ların %66,0 (%49,3 ila %79,3) ve CLIA'ların %97,8 olarak ölçülmüştür (Kamps ve Hoffmann, 2020). Platform tabanlı testler RDT'lerden farklı olarak, numunelerdeki

antikor miktarı hakkında da değerli bilgiler sağlayabilir ve RDT'lerden çok daha hassastır (Galipeau ve ark., 2020).

2.9. Epidemiyoloji ve Korunma

COVID-19 pandemisinin, Çin'in Wuhan şehrinde 12 Aralık 2019'da ateş, öksürük, nefes darlığı ve atipik pnömoni gibi benzer klinik semptomlarla çok sayıda hastanın başvurusuyla başladığı varsayılmaktadır. Yeni patojenlerin zamanında tanımlanmasını sağlamak amacıyla 2002–2003 SARS salgınının ardından kurulan bir sürveyans mekanizması kullanılarak yerel hastaneler tarafından dört "etyolojisi bilinmeyen pnömoni" vakası 31 Aralık'ta resmi olarak DSÖ'ne bildirildi. Kısa zamanda artan pnömoni vakalarının şehirde bulunan deniz ürünleri pazarı ile epidemiyolojik olarak bağlantılı olduğu görüldü. Hastalardan alınan bronkoalveolar lavaj sıvısının izole edilmesiyle etken patojenin BetaCoV olduğu öğrenilmiş ve 2019-nCoV olarak isimlendirilmiştir. Çin dışında bildirilen ilk vaka 13 Ocak'ta Tayland'da görüldü (Chams ve ark., 2020). Daha sonra, Amerika, Japonya ve Güney Kore başta olmak üzere birçok ülke pnömoni vakalarını bildirmeye başladı. DSÖ tarafından 30 Ocak 2020'de CoV Uluslararası Sağlık Acil Durumu olarak ilan edildi. DSÖ 11 Şubat 2020'de yeni CoV'ün "SARS-CoV-2" ve bu yeni CoV'ün sebep olduğu hastalığın "CoV hastalığı-2019 (COVID-19)" olarak adlandırılacağını duyurdu. Ülkemizde ilk pozitif vaka 11 Mart 2020'de saptandı ve ardından DSÖ; COVID-19'u pandemi olarak ilan etti (Dikmen ve ark., 2020). 10 Şubat 2023 itibariyle küresel çapta, DSÖ'ye bildirilen 755.385.709 doğrulanmış COVID-19 vakası (Şekil 10) ve 6.833.388 ölüm vakası olmuştur. 30 Ocak 2023 tarihi itibariyle toplam 13.168.935.724 doz aşı yapılmıştır. Ülkemizde ise 3 Ocak 2020'den 10 Şubat 2023'e kadar, DSÖ'ye bildirilen 101.419 ölümle birlikte 17.004.677 doğrulanmış COVID-19 vakası olmuştur. 24 Aralık 2022 tarihi itibariyle toplam 139.664.329 doz aşı yapılmıştır (<https://covid19.who.int/>).



Şekil 10: Dünya çapında SARS-CoV-2 epidemiyolojisi (<https://covid19.who.int/>)

Pandemi sırasında virüsler, konak genetik çeşitliliği ve farklı hücresel ortamlarla karşılaşarak virüs mutasyonlarına uğrayabilir ve bu mutasyonlar virülanslarını, bulaşabilirliklerini ve patogenezelemlerini etkileyebilir. COVID-19 salgını sırasında küresel olarak çok sayıda SARS-CoV-2 varyantı belgelenmiştir. Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) gibi kurumlar ortaya çıkan varyantları hızla karakterize etmek için halk sağlığına yönelik tehdit düzeyine göre bir sınıflandırma sistemi geliştirdi. Bu sınıflandırma sistemine göre SARS-CoV-2 varyantları endişe uyaran varyantlar (VOC) (Tablo 3), dikkate alınması gereken varyantlar (VOI) ve izleme altındaki varyantlar (VUM) olarak gruplandırılır. SARS-CoV-2 varyantlarının isimlendirilmesi için genel olarak kullanılan üç ana terminoloji önerilmiştir; PANGO lineage, Nextstrain ve GISAID (Janik ve ark., 2021).

Spesifik bir tedavi yöntemi bulunmayan COVID-19'dan korunmak için ulusal ve küresel düzeyde halk sağlığı önlemleri alınmıştır. Yapılan çalışmalar; maske, sosyal mesafe, el hijyeni, izolasyon gibi çeşitli kişisel koruyucu ve sosyal önlemlerin COVID-19 insidansındaki azalmalarla ilişkili olduğunu göstermektedir (Talic ve ark., 2021).

Tablo 3: Endişe yaratan varyantlar (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>)

İSİMLENDİRME				
DSÖ	PANGO	NEXTSTRAIN	GISAID	ÇIKIŞ YERİ
Alfa	B.1.1.7	201 (V1)	GRY	İngiltere, Eylül 2020
Beta	B.1.351	20H (V2)	GH/501Y.V2	Güney Afrika, Mayıs 2020
Gama	P.1	20J (V3)	GR/501Y.V3	Brezilya, Kasım 2020
Delta	B.1.617.2	21A,21I,21J	G/478K.V1	Hindistan, Ekim 2020
Omikron	B.1.1.529	21K,21L,21M	GR/484A	Birden çok ülke, Kasım 2021

Aşılar, bulaşıcı hastalıkları kontrol altına almak için en önemli önleyici tedbirlerden biridir. COVID-19'a karşı bağışıklığın aşı yoluyla sağlanması, yalnızca virüsün yayılmasını önlemekle kalmayacak, aynı zamanda pandeminin ciddi sağlık sonuçlarını da sınırlayacaktır (Sharif ve ark., 2021).

2.10. COVID-19 Aşıları

COVID-19 pandemisine yanıt vermek amacıyla gerçekleştirilen en etkili ve stratejik müdahalelerden biri kitlesel COVID-19 aşılmasıdır. Tanımlanmış bir popülasyonda enfeksiyon şiddetini azaltmak, net ölüm oranını en aza indirmek ve popülasyonu COVID-19'a bağışık hale getirmek için gereken sürü bağışıklığı oranı %60-72 olarak açıklanmıştır (Anderson ve ark., 2020). Bu toplumsal bağışıklık oranına ancak aşılarla ulaşılabilineceği düşünülmektedir. Pandemi öncesinde bir aşı geliştirmenin ortalama maliyeti 200-500 milyon dolar ve 5-18 yıl sürerken COVID-19 gibi ciddi bir pandemi

koşulunda finansal kaynakların fazlalığı, daha önce yürütülmekte olan çalışmalar ve teknolojik gelişmeler gibi etkenler sayesinde ortalama 12-18 ayda SARS-CoV-2'ye karşı aşılarının geliştirilmesi mümkün kılınmıştır (Yavuz, 2020). COVID-19'a karşı güvenli ve etkili aşılar olan acil ihtiyaç, birkaç aşı adayının gelişimini hızlandırmış ve bunlardan bazıları acil kullanım onayı almıştır (Tablo 4) (Sharif ve ark., 2021).

Tablo 4: DSÖ tarafından onay almış COVID-19 aşıları ve özellikleri.
(<https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/>)

AŞI ADI	ÜRETİCİ FİRMA	AŞI TİPİ	ÜLKE
Covovax	Hindistan serum enstitüsü	Protein alt birim	Hindistan
Nuvaxovid	Novavax	Protein alt birim	Çek Cumhuriyeti
Spikevax	Moderna	m-RNA	İspanya
BNT162b2	Pfizer/Biontech	m-RNA	Almanya
Convidecia	CanSino	Viral Vektör	
Jcovden	Johnson&Johnson	Viral Vektör	Belçika
Vaxzevria	Oxford/Astra Zeneca	Viral Vektör	Kore
Covishield	Hindistan serum enstitüsü	Viral vektör	Hindistan
Covaxin	Bharat Biotech	İnaktif aşı	Hindistan
Covilo	Sinopharm	İnaktif aşı	Çin
CoronaVac	SinoVac	İnaktif aşı	Çin

2.10.1. BNT162b2 – Pfizer/Biontech

Pfizer'in geliştirdiği BNT162b2 isimli COVID-19 aşısı, geliştirilen en hızlı aşı oldu. Mayıs 2020'de faz I/II denemelerinin yapılmasından yaklaşık 7 ay sonra Aralık 2020'de Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) acil kullanıma izin vermiştir. Aşı, SARS-CoV-2 spike glikoproteinini kodlayan nükleosid modifiyeli bir mRNA içerir. Bu mRNA konak hücrelere daha verimli bir şekilde iletilmesi için lipid nanoparçacıkları içinde iletilir. MRNA, SARS-CoV-2 glikoproteinlerinden S2-P antijenini spesifik olarak kodlar. Aşının amacı, spike proteinine karşı hem B hem de T hücresi tepkilerini ortaya çıkarmaktır. mRNA aşısı, uzun süreli protein ekspresyonu, antijene özgü T-foliküler yardımcı hücrelerin indüksiyonu ve germinal merkez B hücrelerinin aktivasyonunu üretmeyi amaçlar (Patel ve ark., 2022).

Polack ve ark. Faz III çalışması için 18 Kasım 2020'de yürüttüğü çalışma dünya çapında 46.000'den fazla katılımcıyı içeriyor ve çalışma, daha önce enfeksiyon geçirmemiş veya geçirmemiş katılımcılarda ikinci dozdan 7 ve 14 gün sonra ortaya çıkan enfeksiyonları değerlendirmektedir. Etkinlik verilerinin incelenmesinin ardından, ikinci doz uygulamasından 7 gün sonra enfeksiyonu önlemede %95.0'lik bir etkinlik buldu ve bu sonuçların ardından, FDA aşı için acil kullanım onayı vermiştir (Polack ve ark., 2020).

Birçok çalışmada S2-P'ye karşı bağlayıcı antikor yanıtı, aşı etkinliğini değerlendirme yöntemi olarak kullanılmıştır (Jackson ve ark., 2020; Patel ve ark., 2022). Jackson ve ark. yaptığı çalışma sonucunda aşı, hem tam uzunluktaki S2-P'ye hem de reseptör bağlama alanına antikor tepkilerini indüklemeye başarılı oldu. İnterferonla ilişkili genlerin erken aktivasyonunu önleyen modifiye nükleotitlerin kullanımıyla birlikte aşı tarafından kullanılan güçlü lipid-nanopartikül verme sistemi, aşının etkinliğine katkıda bulunan özelliklerdir (Jackson ve ark., 2020).

2.10.2. CoronaVac – SinoVac

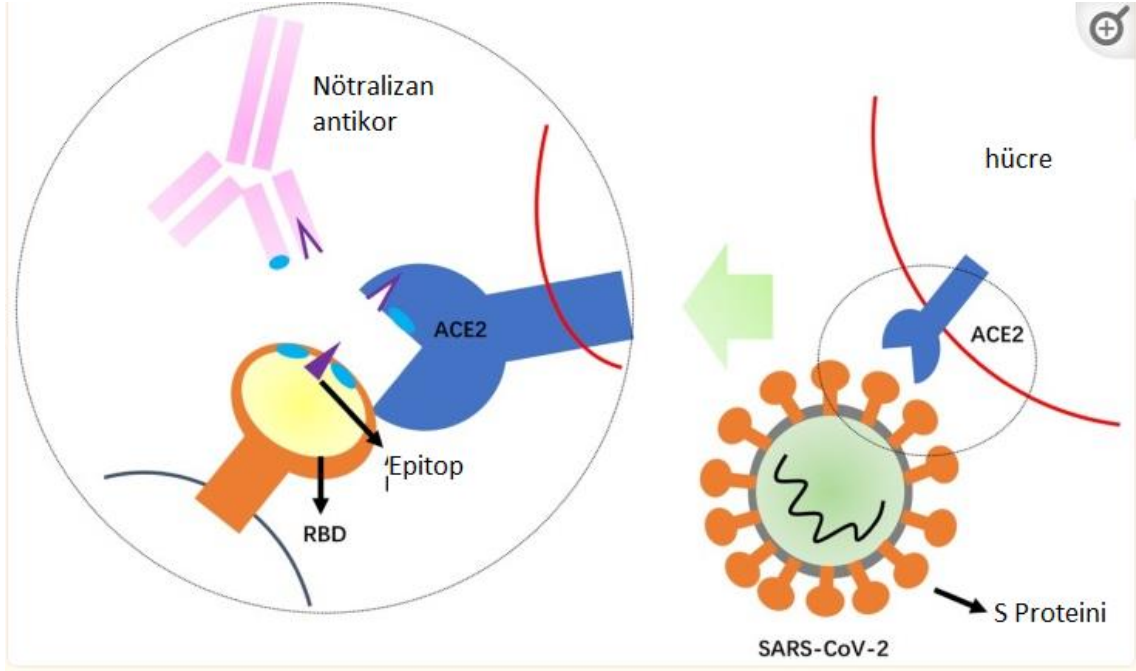
İnaktif aşılar, virüsün hücre kültüründe üretilmesi ve ardından kimyasal olarak inaktive edilmesi yoluyla üretilir. İnaktive edilmiş virüs, bağışıklık yanıtını

güçlendirmek için bir adjuvan ile birleştirilir. İnaktif aşılarda üretimi için biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarlar gereklidir. SARS-CoV-2 için üretilen inaktif aşılarda oluşan bağışıklık yanıtı, yalnızca belirli bir proteine değil, virüsün tüm bileşenlerini hedef alacaktır. İnaktif aşılarda üretimi zordur ve vücutta replike olmadıkları için rapel doz gerekir.

Sinovac'ın ürettiği Coronavac aşısı inaktive edilmiş bir tam virüs aşısıdır. Daha güçlü bağışıklık tepkisi için alüminyum hidroksit adjuvanına sahiptir. Aşı, 28 gün arayla iki doz şeklinde uygulanmaktadır (Dayan, 2021). Tanrıöver ve ark., CoronaVac aşısının Türkiye'deki ilk faz 3 klinik çalışmasını yapmışlardır. Türkiye'de 18-59 yaşları arasında 10.000'den fazla katılımcının katıldığı faz 3 randomize kontrollü çalışmanın analizine göre, iki doz CoronaVac'ın, semptomatik COVID-19'a karşı etkinliğinin %83,5 olduğu ve %90 oranında güçlü nötralizan antikor yanıtı oluşturduğu bildirilmiştir. Herhangi bir ciddi yan etki bildirilmemiştir (Tanrıöver ve ark., 2021).

2.11. Nötralizan Antikor

Antikorların önemli bir özelliği, hedef hücrelere viral girişi bloke eden nötralizasyon işlevleridir. Böylece, nötralizan antikorlar enfeksiyonu önleyebilir veya enfeksiyon sonrası viral yayılımı inhibe ederek viral yükü sınırlayabilir. Nötralizan antikorlar, NK hücreler tarafından meydana gelen antikora bağımlı hücresel sitotoksiste gibi Fc aracılı efektör fonksiyonlar aracılığıyla virüslerin ve virüs bulaşmış hücrelerin temizlenmesini kolaylaştırır (Şekil 12). Bu güçlü antiviral işlevlerden yararlanarak, belirli bir enfeksiyona karşı nötralize edici antikorların gelişimi, enfeksiyon gelişmesi ve yayılmasını önlemek ve uzun süreli bağışıklık sağlamak için oldukça önemlidir (Gruell ve ark., 2022).



Şekil 12: Nötralizan antikor etki mekanizması (Zhou ve Zhao, 2020)

SARS-CoV-2 ile enfeksiyon veya mevcut COVID-19 aşılıları ile aşılama SARS-CoV-2 virüsünün antijenlerine karşı IgG antikorlarının gelişmesini sağlayacaktır. Ancak bireylerde SARS-CoV-2 virüsüne karşı oluşan yüksek düzeyde IgG antikorları seviyesine rağmen ikincil enfeksiyon görülebilir. Bu nedenle, SARS-CoV-2 virüsüne karşı gelişen humoral bağışıklığın incelenmesinin yanı sıra nötralize edici SARS-CoV-2 viral antikorlarının araştırılması önem taşımaktadır. (Hoher ve ark., 2022). SARS-CoV-2 enfeksiyonu için mevcut veriler, antiviral T ve B hücrelerinin viral enfeksiyona karşı korumaya katkı sağladığını gösterse de serumda nötralizan antikorların varlığının güçlü bir koruyucu rolü olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Örneğin, nötralize edici antikorların pasif transferi, birden fazla hayvan modelinde şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemekte başarılı olmuştur (Khoury ve ark., 2021).

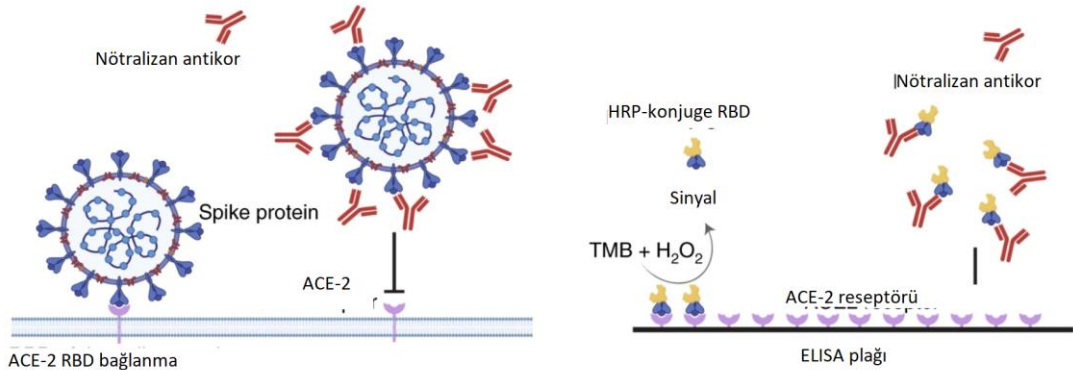
2.11.1. Nötralizasyon Testleri

SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı immün yanıtın ortaya çıkarılmasında, serolojik testler COVID-19 için tamamlayıcı bir tanı aracı olarak yardımcı olur (Kamps ve Hoffmann, 2020). Bu immünolojik testler gelişen IgG, IgM ve IgA immüoglobülinlerin varlığını ölçmekte ancak bir SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ortaya çıkardığı antikor yanıtının etkinliğini ortaya koyamamaktadır (Meyer ve ark., 2020;

Riepler ve ark., 2020). Viral nötralizasyon testleri, aşılama veya doğal enfeksiyondan sonra koruyucu bağışıklığın etkinliğini değerlendirmek için kullanılan önemli testlerdir (Meyer ve ark., 2020). Bu yönleri ile nötralizasyon testleri, bir hastanın immün yanıtını değerlendirmek için altın bir standarttır (Riepler ve ark., 2020).

Hasta serumlarında nötralize edici aktivitenin belirlenmesi için, canlı viral partiküllere dayalı konvansiyonel nötralizasyon testleri, kültürlenmiş hücrelerin enfeksiyonunu inhibe eden antikorların varlığını değerlendiren referans altın standart olarak kullanılır. Ancak bu testler yoğun emek ve zaman harcanmasını gerektirir, biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarlarda uygulanabilir, standardize edilmesi ve büyük ölçekte uygulanması zordur. Konvansiyonel viral nötralizasyon testleri (cVNT)'nin bu zorluğundan dolayı psödovirüs bazlı ve substitüsyonel viral nötralizasyon testleri yaygın olarak kullanılır (Kamps ve Hoffmann, 2020).

Psödovirüs tabanlı viral nötralizasyon testleri (pVNT), kullanılan virüs suşuna bağlı olarak biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarlarda gerçekleştirilebilir. Psödovirüs olarak, SARS-CoV-2'nin S proteinini içeren Veziküler Stomatit Virüsü, Adenovirüs veya lentivirüsler gibi rekombinant psödovirüsler kullanılır. Ayrıca transenfeksiyon aşamalarında plazmid ve hücre kültürünün kullanıldığı psödovirüs tabanlı testler de maliyetlidir ve yoğun emek ve zaman gerektirir (Meyer ve ark., 2020).



Şekil 13: sVNT test prensibi (Tan ve ark., 2020)

Bu sınırlamalar, SARS-CoV-2 antijenlerine dayanan, özellikle yüksek oranda immünojenik spike (S) proteinine odaklanan, ticari olarak temin edilebilen subtitüsyonel viral nötralizasyon testleri (sVNT) kullanılarak aşılabılır (Dolscheid-Pommerich ve ark., 2022). sVNT'ler biyogüvenlik düzeyi 2 laboratuvarlarda, birkaç satte tamamlanabilen, herhangi bir canlı virüs veya hücreye ihtiyaç duymadan Nab'leri tespit eden viral nötralizasyon testleridir. S proteininin RBD alanı ile konak hücre reseptörü ACE-2'nin etkileşimini bir ELISA mikropalakasında taklit edilmektedir (Şekil 13). Bu ACE2-RBD etkileşimi cVNT ve pVNT'de olduğu gibi hasta serumlarında gelişen spesifik Nab'ler tarafından nötralize edilebilir. RBD'ye özgü antikorların etkileşime müdahale etme yeteneği ölçülür (Tan ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, sVNT'lerin psödovirüs bazlı ve konvansiyonel testlerle yüksek duyarlılık ve özgüllülüğe sahip olduğunu göstermiştir. sVNT'nin performansını doğrulamak için pVNT ile karşılaştırma analizi yapan bir çalışmada pVNT ve sVNT'de test edilen 71 örnek üzerinde, iki yöntem arasındaki uyum %97,2 olarak bulunmuştur (Favresse ve ark., 2021). Üç viral nötralizasyon testini karşılaştıran bir çalışmada sVNT'nin %99,93 özgüllüğe ve %95-100 duyarlılığa sahip olduğu ve sVNT'nin performansının hem cVNT hem de pVNT'nin performansıyla iyi bir korelasyon içinde olduğunu gösterilmiştir (Tan ve ark., 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Popülasyonu

Bu tez çalışması için 2022 yılının Ocak ve Haziran ayları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmunoloji Laboratuvarına, SARS-CoV-2 virüsüne karşı oluşan antikorların saptanması için başvuranlardan, Sinovac veya Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış olan bireyler dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylerin yazılı onamları alındıktan sonra demografik özelliklerini yansıtan bilgi formu doldurulmuştur. Katılımcıların yaşı, antikor seviyeleri ve SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirme durumları göz önüne alınarak gruplandırılmıştır (Tablo 5). Nötralizasyon aktivitesini etkileyebilecek kronik hastalığa sahip bireyler bu gruplandırmaya dahil edilmemiştir. Böylece nötralizasyon aktivitesini etkileyebilecek özelliklerin sabitlendiği 10'ar kişilik 12 grup oluşturulmuştur. Her grubun cinsiyet dağılımının eşit olması sağlanmıştır.

Tablo 5: Çalışma gruplarının yaş, cinsiyet ve antikor düzeylerine göre dağılımı

YAŞ	18-40			41-65		
ANTİKOR DÜZEYİ (AU/mL)	50-5000	5000-10000	>10000	50-5000	5000-10000	>10000
Aşı	10	10	10	10	10	10
Aşı + Geçirilmiş Enfeksiyon	10	10	10	10	10	10

Tez çalışmamız, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 24/12/2021 tarih ve 23 sayılı karar sonucu ve Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bilimsel Araştırma Platformundan alınmış izin sonrasında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Yazılı onamları alınmış gönüllülerden 10 cc'lik sarı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örnekleri, her biri üç ependorf tüpüne bölünmüştür. Bölünen kanlar çalışmada kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Her çalışma sırasında aynı örneğin farklı ependorf tüpü kullanılarak serum örneklerinin donma- çözme olayından etkilenmemesi sağlanmıştır.

3.3. Yapılan Testler

Çalışmaya dahil edilen bireylerin serum örneklerinde SARS-CoV-2'ye karşı oluşan IgG antikorları ve bu antikorların nötralizasyon aktivitesini ölçen testler yapılmıştır. Tüm testlerin uygulanması İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmunoloji Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu testlerin uygulanması sırasında kullanılan sarf malzeme, cihaz ve kitler aşağıda açıklanmıştır.

3.3.1. Sarf Malzemeler

1. 100-1000 µL'lik pipet uçları
2. Ependorf tüpü
3. Kapaklı cam tüp
4. Sarı kapaklı vakumlu jelli kan alma tüpü (10 cc)
5. Vacutainer

3.3.2. Rotina 38 Santrifüj Cihazı

Gönüllülerden 10 cc'lik sarı kapaklı tüplere alınan kan örnekleri “Rotina 38” marka santrifüj cihazında (Şekil 14) 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serum örneklerine ayırıştırılmıştır.



Şekil 14: Rotina 38 Santrifüj Cihazı

3.3.3. 100-1000 µl uyumlu mikropipetler

Serum örneklerinin ependorf tüplerine bölünmesi işlemi sırasında İsolab ve LP Italiana Spa marka pipetörler kullanılmıştır.

3.3.4. Abbott Architect plus i2000 SR (Abbott, Amerika)

Serum örneklerinde, SARS-CoV-2 S proteininin S1/RBD alanına karşı geliştirilen IgG antikorlarının düzeyleri, kemilüminesan mikropartikül immün assay (CMIA) yöntemine dayalı Abbott Architect plus i2000 SR (Abbott, Amerika) (Şekil 15) cihazında aynı firmanın kantitatif saptama kiti kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışma Prosedürü

- 1- Numune, SARS-CoV-2 antijen kaplı paramanyetik mikropartiküller ve tetkik dilüenti ile birleştirilir ve inkübe edilir.

- 2- Numunede bulunan SARS-CoV-2 IgG antikorları SARS-CoV-2 antijen kaplı mikropartiküllere bağlanır.
- 3- Karışım yıkanır.
- 4- Bir reaksiyon karışımı oluşturmak için anti-insan IgG akridinyum işaretli konjugat eklenir ve inkübe edilir.
- 5- Yıkama işlemi uygulanır.
- 6- Pre-Trigger ve Trigger Çözeltileri eklenir.
- 7- Ortaya çıkan kemilüminesan reaksiyon bağlı ışık birimi (Relative Light Unit; RLU) olarak ölçülür.
- 8- Numunedeki SARS-CoV-2'ye karşı IgG antikorlarının miktarı ile optik sistemi tarafından saptanan RLU'lar arasında doğrudan bir ilişki vardır. SARS-CoV-2 IgG II Quant tetkiki kalibrasyonu ve sonuçları üretmek için 4 Parametrelili Lojistik Eğrisine uygun veri azaltma yöntemini (4PLC, Y-ağırlıklı) kullanır.
- 9- Cut-off 50 AU/mL'dir.



Şekil 15: Abbott Architect plus i2000 SR

3.3.5. SARS-CoV-2 IgG II Quant Kiti (Abbott, Amerika)

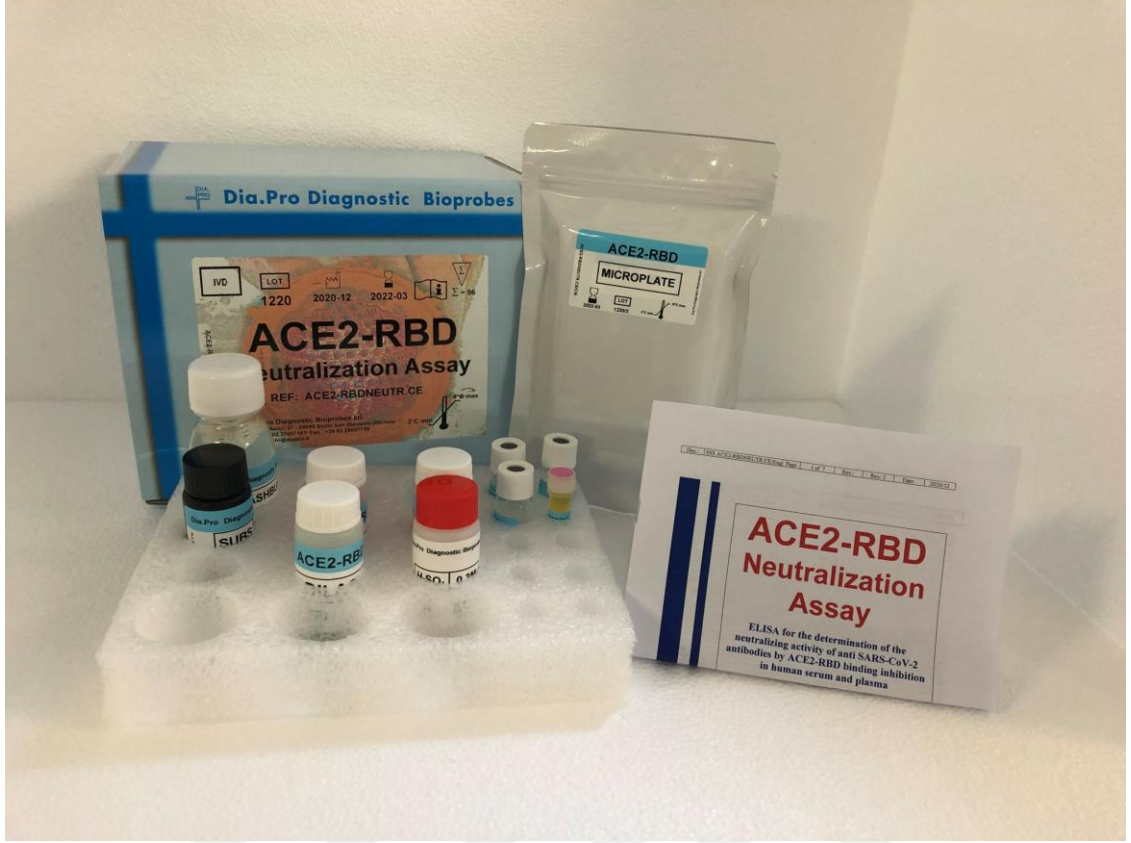
Serum örneklerinde SARS CoV-2 S proteininin S1/RBD alanına karşı oluşmuş özgül IgG antikor varlığını saptamak için SARS-CoV-2 IgG II Quant kiti (Abbott, Amerika) (Şekil 16) kullanıldı. Çalışmalar, Abbott Architect plus i2000 SR cihazı ile yapılmıştır. Test prosedürü aşamaları üretici firma talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. Kullanılan kit ile SARS CoV-2 IgG serum düzey, AU/mL biriminde kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Sonuçlar, <50 negatif, >50 pozitif olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 16: SARS-CoV-2 IgG II Quant kiti (Abbott, Amerika)

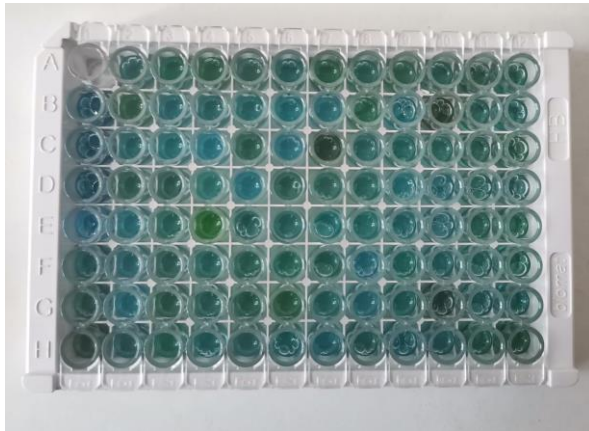
3.3.6. ACE2-RBD Neutralizing Assay Kiti (Diapro, İtalya)

SARS CoV-2 IgG II testi pozitif olan serum örnekleri SARS-CoV-2'ye karşı gelişen antikorlar tarafından indüklenen RBD-ACE2 bağlanmasının inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi için ACE2-RBD Neutralizing Assay (Diapro, İtalya) kiti (Şekil 17) kullanılmıştır.

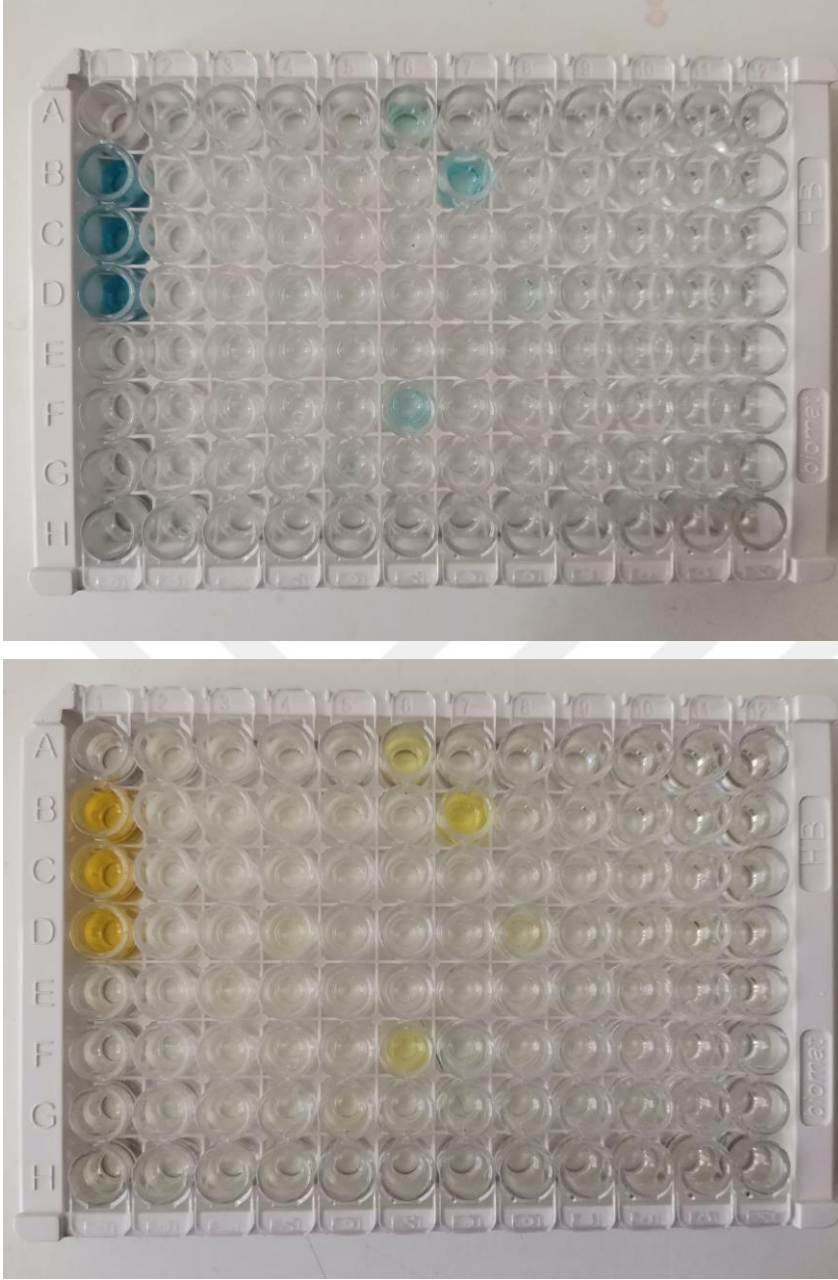


Şekil 17: ACE2-RBD Neutralizing Assay kiti (Diapro, İtalya)

Antikorların nötralize edici etkisi; ACE2 reseptörü ile RBD arasındaki bağlanmanın inhibisyonuna dayalı plazma/serum örneğinde çalışılan bir ELISA vasıtasıyla belirlenir. Mikroplakalar, SARS-CoV-2'ye özgü rekombinant glikosile edilmiş RBD ile kaplanmıştır. Örnek, anti RBD/Spike antikorlarının bu tür antijene bağlanmasına izin verecek şekilde inkübe edilir. Yıkama sonrasında RBD'ye herhangi bir antikor bağlanmamışsa kuyucuklarda renk değişimi gözlenir.



Şekil 18: SARS-CoV-2'ye özgü rekombinant glikosile edilmiş RBD ile kaplı mikrolakalara serum örneklerinin eklenmesi



Şekil 19: Enzimatik reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 100 µl Sülfürik Asit pipetlenmiştir. Bu aşamada, negatif kontrol ve negatif numuneler maviden sarıya dönmüştür.

Numunenin dilue edilerek çalışılması durumunda nötralizasyon değeri sağlayan bir titre hesaplanabilir. Çalışmamızda her bir hasta örneği için hem tarama hem de titrasyon testi çalışılmıştır. Dilusyon oranı 1/2, 1/4 ve 1/32 olarak belirlenmiştir.

Tarama Testi

- Mikroplakaların 3 kuyusu Negatif Kontrol, 1 kuyusu Pozitif Kontrol, 1 kuyusu da blenk olarak ayrılmış geri kalan 91 kuyucuk hasta serum örneklerinin çalışılması için kullanılmıştır.
- Tüm kuyucuklara 50 ul Test Seyreltici (DILAS) eklenmiştir.
- Ardından her bir kuyucuğa 100 ul numune dağıtılmış (Şekil 18) ve mikroplakayı +37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Mikroplaka, 350ul/kuyucuk seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve yıkama işlemi 5 kez tekrar edilmiştir.
- Kit prosedürüne uygun olarak hazırlanan ACE2/SAVHRP kompleks konjugatı karıştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl dağıtılmış ve mikroplaka +37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.
- Mikroplaka, 350ul/kuyucuk seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve yıkama işlemi 5 kez tekrar edilmiştir.
- Tüm kuyucuklara 100 µl Kromojen/Substrat karışımı eklenmiş, ardından mikroplaka oda sıcaklığında (18-24°C) 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Enzimatik reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 100 µl Sülfürik Asit pipetlenmiştir. Bu aşamada, negatif kontrol ve negatif numuneler maviden sarıya dönmüştür (Şekil 19).
- Mikroplaka 450nm ve 620-630nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okunmuştur.

Testin yorumlanması;

DEĞER	NÖTRALİZAN ANTİKOR
Co/S<1	NEGATİF
1<Co/S<5	DÜŞÜK POZİTİF
5<Co/S<10	ORTA POZİTİF
10<Co/S	YÜKSEK POZİTİF

Titrasyon Testi

Daha önce açıklanan tarama testinde pozitif olan bir numunenin nötralize edici biyoaktivitesinin titrasyonu, bu tür antikorun RBD ile reseptörü ACE2 arasındaki bağlanmayı nötralize etme gücünü belirlemek için çalışılmıştır.

- Her hasta örneği için; 1/2, 1/4 ve 1/32 dilusyon oranı çalışılmış ve örnekleri seyreltmek için Negatif Kontrol (NC) kullanılmıştır.
- Seyreltilmiş tüm örneklerin üzerine 50 ul DILAS dağıtılmış ve mikropılaka +37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Mikropılaka, 350ul/kuyucuk seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve yıkama işlemi 5 kez tekrar edilmiştir.
- Kit prosedürüne uygun olarak hazırlanan ACE2/SAVHRP kompleks konjugatı karıştırılarak her bir kuyucuğa 100 µl dağıtılmış ve mikropılaka +37°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir.
- Mikropılaka, 350ul/kuyucuk seyreltilmiş yıkama solüsyonu ile yıkanmış ve yıkama işlemi 5 kez tekrar edilmiştir.
- Tüm kuyucuklara 100 µl Kromojen/Substrat karışımı eklenmiş, ardından mikropılaka oda sıcaklığında (18-24°C) 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Enzimatik reaksiyonu durdurmak için tüm kuyucuklara 100 µl Sülfürik Asit pipetlenmiştir. Bu aşamada, negatif kontrol ve negatif numuneler maviden sarıya dönmüştür.
- Mikropılaka 450nm ve 620-630nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okunmuştur.
- Testin yorumlanması;

Co/S	TİTRASYONUN YORUMLANMASI
<1	Nötralizan antikor için negatif
1	Nötralizan antikor için pozitif
>1	Nötralizan antikor için pozitif

TİTRE	TİTRASYONUN YORUMLANMASI
1:2	DÜŞÜK TİTRE
1:4	ORTA TİTRE
1:8	
1:16	
1:32	YÜKSEK TİTRE

3.4. İstatistiksel Yöntem

Tanımlayıcı istatistiklerde sürekli veriler ortalama standart sapma, median, minimum ve maksimum değerleriyle birlikte verilmiştir.

Verilerin istatistiksel karşılaştırmasında sürekli veriler için normal dağılıma uygunluk kolmogorov simirnov analizi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız gruplarda sürekli verilerin karşılaştırılmasında iki grup varlığında Mann Whitney U testi kullanılarak yapılmıştır. Sürekli verilerin birlikte değişimi Spearman Korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Korelasyon katsayısının yorumunda 0,0-0,24 zayıf 0,25-0,49 orta 0,50- 0,74 güçlü 0,75- 1,00 çok güçlü olarak kabul edilmiştir. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında kıkare testi kullanılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık için %95 güven aralığında 0,05 in altındaki p değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS v 21.0 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Bu tez çalışmasına Ocak 2022 ve Eylül 2022 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nde, SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmemiş ve Sinovac yada Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış (Aşı Grubu) veya SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmiş ve Sinovac yada Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış (Aşı + Enfeksiyon Grubu) bireyler dahil edilmiştir. Çalışma grupları SARS-CoV-2 IgG kantitatif sonuçlarını baz alınarak antikor düzeylerine göre alt gruplara ayrılmış ve bütün gruplar nötralizan antikor kapasitesini etkileyebilecek yaş ve cinsiyet faktörleri yönünden sabitlenip tabakalı örneklem uygulanmıştır. Sonuç olarak 10'ar kişilik 12 grup oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen toplam 120 bireyin median yaş ortalaması 41 (19-63), aritmetik ortalaması (Mean) ise 39 (SD=13) olarak bulunmuştur. Aşı ve Aşı + Enfeksiyon grubu ayrı ayrı değerlendirildiğinde Aşı grubunda median yaş ortalaması 41 (20-63), Aşı + Enfeksiyon grubunda median yaş ortalaması da 41 (19-60) olarak belirlenmiştir. Her iki grubun mean değerleri ise sırası ile 41(SD=13) ve 38 (SD=11) bulunmuştur. Çalışmamızda gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı

		AŞI GRUBU		AŞI+ENFEKSİYON GRUBU		
		Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	P
CİNSİYET	Erkek	30	50,0%	30	50,0%	1
	Kadın	30	50,0%	30	50,0%	
YAŞ	18-40	30	50,0%	30	50,0%	1
	41-65	30	50,0%	30	50,0%	
ANTİKOR DÜZEYİ	50-5000	20	33,3%	20	33,3%	1
	5000-10000	20	33,3%	20	33,3%	
	10000-40000	20	33,3%	20	33,3%	

4.2. Çalışma Sonuçları

Çalışma kapsamında incelenen ve SARS-CoV-2 IgG II test sonucu 50 AU/mL'nin üzerinde çıkan toplam 120 örneğin yapılan ACE-2 RBD Tarama test sonuçlarının tamamı pozitif bulunmuştur. Ancak Aşı grubunun 2 örneğinde düşük pozitiflik saptanırken Aşı + Enfeksiyon grubunun tamamı yüksek pozitif bulunmuştur. Yapılan titrasyon değerlendirmesinde ise Aşı grubunda 1 düşük, 3 orta titrasyon Aşı + Enfeksiyon grubunda 1 orta titrasyon elde edilmiştir. Bu örneklerin SARS-CoV-2 IgG II test düzeyine göre 50-5000 AU/mL grubundan olduğu belirlenmiştir. Aşı grubundaki 1 düşük ve bir orta titrasyon aynı zamanda RBD testinde de düşük pozitif bulunurken orta titreli diğer iki örneğin RBD testi yüksek pozitif bulunmuştur. Aşı + Enfeksiyon grubundaki orta titreli örneğin RBD tarama test sonucu yüksek pozitif bulunmuştur (Tablo 7).

Çalışmamızda uygulanan SARS-CoV-2 IgG II, ACE-2 RBD Tarama ve Titrasyon testlerinin sonuçları için mean ve median değerleri hesaplanmıştır. Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarına göre yapılan bu değerlendirmede SARS-CoV-2 IgG II, ACE-2 RBD Tarama ve Titrasyon testlerinin sonuçlarının mean ve median değerleri için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 8).

Tablo 7: RBD Titrasyon Karşılaştırması

AŞI GRUBU					AŞI + ENFEKSİYON GRUBU				
TİTRASYON	RBD			Toplam	TİTRASYON	RBD			Toplam
	DÜŞÜK	ORTA	YÜKSEK			DÜŞÜK	ORTA	YÜKSEK	
DÜŞÜK	1	0	0	1	DÜŞÜK	0	0	0	0
ORTA	1	0	2	3	ORTA	0	0	1	1
YÜKSEK	0	0	56	56	YÜKSEK	0	0	59	59
TOPLAM	2	0	58	60	TOPLAM	0	0	60	60

Tablo 8: Test sonuçlarının Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarına göre dağılımı

	AŞI GRUBU					AŞI + ENFEKSİYON GRUBU					P
	Mean	Standard Deviasyon	Median	Minimum	Maksimum	Mean	Standard Deviasyon	Median	Minimum	Maksimum	
IgG II (AU/ml)	10661,8	10172,3	6669,5	83,3	40000	11367,7	10377,7	7125,6	1267	40000	0,582
ACE2-RBD Tarama	38,87	9,52	40,82	1,08	51,77	40,21	5,11	40,92	24,44	49,5	0,838
1/2 Titrasyon	27,75	7,9	29,4	1,06	54,16	29,16	6,36	29,6	15,59	41,15	0,381
1/4 Titrasyon	26,01	8,98	29,41	0,9	37,68	28,33	6,43	29,3	13,54	41,06	0,339
1/32 Titrasyon	18,1	10,83	19,73	0,64	34,38	20,3	10,82	22,01	0,92	38	0,276

4.3. SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2- RBD Korelasyon Analizi

Çalışmamızda yaş gruplarına göre SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD tarama test düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 9).

Tablo 9: SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2RBD tarama test düzeylerinin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Test	Yaş Grubu									
	18-40					41-65				
	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max
SARS-CoV-2 IgG	10142,5	8829,7	7542,7	83,3	40000,0	11887,0	11485,5	6650,2	378,7	40000,0
ACE-2 RBD	39,61	7,26	40,39	4,65	51,77	39,46	8,05	41,80	1,08	49,49

P değeri SARS-CoV-2 IgGII testi için 0,546, ACE-2 RBD testi için 0,809.

SD: Standart Deviasyon, Min: Minimum, Max: Maksimum

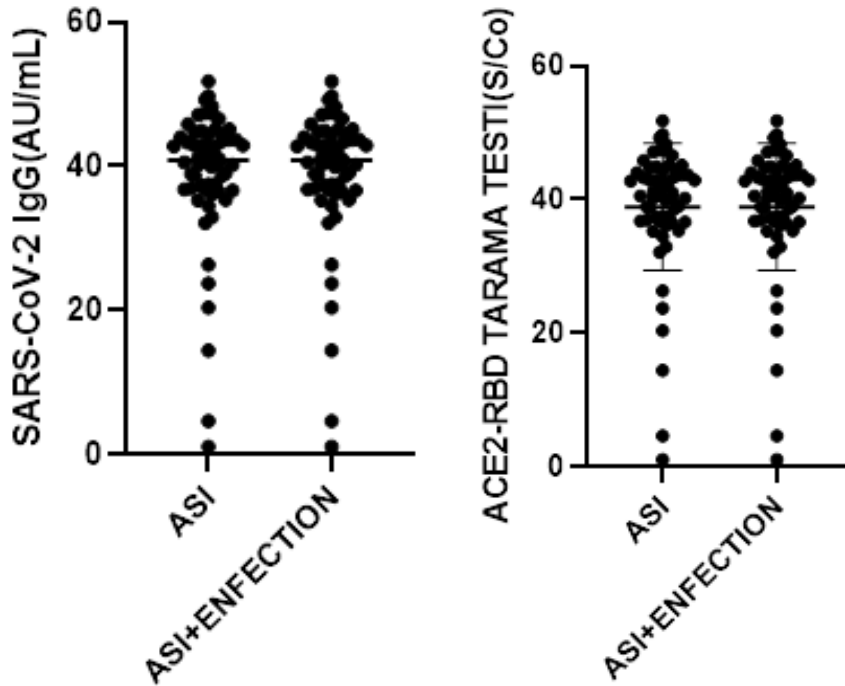
Çalışmamızda cinsiyete göre SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD tarama test düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 10).

Tablo 10: SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2RBD tarama test düzeylerinin cinsiyete göre karşılaştırılması

Test	Cinsiyet									
	Erkek					Kadın				
	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max
SARS-CoV-2 IgG	10999,2	10804,3	7322,2	83,3	40000,0	11029,8	9749,9	6431,3	378,7	40000,0
ACE-2 RBD	40,26	7,56	41,18	4,65	49,50	38,84	7,70	40,35	1,08	51,77

P değeri SARS-CoV-2 IgGII testi için 0,165, ACE-2 RBD testi için 0,964.

Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarında SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD testlerinin bir karşılaştırılmasını Graphpad ile yaptık. Mann Withney testinin p değerlerine göre anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 20)



Şekil 20: Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarında Mann Withney ile SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD karşılaştırması

Çalışmamızda hem aşı grubunda ($r=0,622$ $p<0,001$) hem de Aşı + Enfeksiyon grubunda ($r=0,529$ $p<0,001$) SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile 1/32 titrasyon düzeyleri arasında güçlü pozitif anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (Tablo 11).

Tablo 11: Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarında SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

Korelasyon						
			ACE2-RBD Tarama	1/2 Titrasyon	1/4 Titrasyon	1/32 Titrasyon
Aşı	IgG II (AU/mL)	r	0,083	-0,068	-0,036	0,622*
		p	0,529	0,604	0,786	0,000
Aşı+ enfeksiyon	IgG II (AU/mL)	r	-0,131	-0,223	-0,105	0,529*
		p	0,319	0,087	0,423	0,000

* Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır

Çalışmamızda tüm grup değerlendirildiğinde SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile 1/32 titrasyon düzeyleri arasında güçlü pozitif anlamlı bir korelasyon vardır. ($r=0,568$ $p<0,001$) (Tablo 12).

Tablo 12: Tüm gruplarda SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile ACE2-RBD düzeyleri arasındaki korelasyon

Korelasyon					
		ACE2-RBD Tarama	1/2 Titrasyon	1/4 Titrasyon	1/32 Titrasyon
IgG II (AU/mL)	r	-0,033	-0,143	-0,061	0,568*
	p	0,721	,119	0,507	0,000
	n	120	120	120	120

* Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır

Çalışmamızda hem erkeklerde ($r=0,529$ $p<0,001$) hem de kadınlarda ($r=0,61$ $p<0,001$) SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile 1/32 titrasyon düzeyleri arasında güçlü pozitif anlamlı bir korelasyon bulunmuştur (Tablo 13).

Tablo 13: Cinsiyete göre SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

Korelasyon						
			ACE2-RBD Tarama	1/2 Titrasyon	1/4 Titrasyon	1/32 Titrasyon
Erkek	IgG II (AU/mL)	r	-0,092	-0,101	-0,028	0,529**
		p	0,489	0,447	0,833	0,000
Kadın	IgG II (AU/mL)	r	0,007	-0,215	-0,117	0,610**
		p	0,957	0,097	0,370	0,000

* Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır

Çalışmamızda yaşa göre SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon incelendiğinde hem 18-40 yaş aralığında ($r=0,542$ $p<0,001$) hem de 41-65 yaş aralığında ($r=0,566$ $p<0,001$) IgGII düzeyleri ile 1/32 titrasyon düzeyleri arasında güçlü pozitif anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. 18-40 yaş aralığında IgGII düzeyleri ile 1/2 titrasyon düzeyleri arasında zayıf negatif anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($r=-0,297$ $p=0,021$) (Tablo 14).

Tablo 14: Yaşa göre SARS-CoV-2 IgG II düzeyleri ile titrasyon düzeyleri arasındaki korelasyon

Korelasyon						
			ACE2-RBD Tarama	1/2 Titrasyon	1/4 Titrasyon	1/32 Titrasyon
18-40	IgG II (AU/mL)	r	0,030	-0,297*	-0,056	0,542**
		p	0,819	0,021	0,669	0,000
41-65	IgG II (AU/mL)	r	-0,120	-0,028	-0,073	0,566**
		p	0,363	0,835	0,578	0,000

* Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır

** Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır

5. TARTIŞMA

İlk olarak Çin'in Wuhan kentinde bildirilen SARS-CoV-2 enfeksiyonu, dünya çapında hızla yayılmış ve COVID-19 pandemisine neden olmuştur (Mouna ve ark., 2023). SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçiren veya aşılanan bireylerin çoğu, viral antijenlerle karşılaştıktan sonraki birkaç hafta içinde virüse karşı hümmoral bir bağışıklık tepkisi oluşturur, ancak gelişen immün yanıtın süresi, koruyuculuğu ve klinik tablo üzerine göstereceği etki henüz belirlenmemiştir ve bireyler arasında farklı seyreder (Abe ve ark., 2020). Antikor aracılı hümmoral yanıt, viral enfeksiyonların önlenmesinde çok önemlidir (Zhou ve Zhao, 2020). Enfeksiyonun bağışıklık yanıtlarının ortaya konulması özellikle seroprevalansın, seropozitif bireylerde sağlanan bağışıklığın anlaşılması; SARS-CoV-2'nin klinik ve halk sağlığı yönetiminde tedavi yaklaşımları, aşılama stratejileri, SARS-CoV-2'ye karşı antikorların miktarının belirlenmesi, epidemiyolojik gözetim ve kontrol için veri toplanması, aşılama sonrası izleme ve terapötik tedavi denemeleri için kullanılabilecek iyileşen plazma örneklerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir (Abe ve ark., 2020; Dolscheid-Pommerich ve ark., 2022; Luchsinger ve ark., 2020). Viral partiküllerin yüzey epitoplarına bağlanarak ACE-2 ve RBD etkileşimini inhibe eden ve böylece virüsün hücreye girişini engelleyerek viral enfeksiyonu azaltan antikorlar, nötralize edici antikorlar (NAb'ler) olarak tanımlanır (Zhou ve Zhao, 2020). SARS-CoV-2'nin S proteini, nötralize edici hümmoral yanıtın ana hedefidir ve bu nedenle aşılarda ve monoklonal antikor tedavilerinin geliştirilmesi için kullanılır. Virüse özgü NAb'ler, viral replikasyonu azaltmada ve SARS-CoV-2'nin viral klirensini hızlandırmada önemli bir rol oynar (Mouna ve ark., 2023). Serolojik testler, bir enfeksiyon veya aşılama karşı gelişen hümmoral immün yanıtı IgG, IgM ve IgA'nın varlığını kalitatif, kantitatif veya yarı kantitatif olarak ölçerek ortaya koymakta ancak gelişen antikorların nötralize edici aktivitelerini veya virüsle yeniden enfeksiyona karşı korumayı değerlendirememektedir (Mouna ve ark., 2023; Riepler ve ark., 2020; Zhou ve Zhao, 2020). NAb'ler, viral nötralizasyon testleri kullanılarak saptanabilir ve bunların varlığı genellikle koruyucu bağışıklık ile ilişkilidir (Mouna ve ark., 2023). Viral nötralizasyon testleri; konvansiyonel viral nötralizasyon testleri (cVNT), psödo virüs bazlı viral nötralizasyon testleri (pVNT) ve subtitusyonel viral nötralizasyon testleri (sVNT)'dir.

cVNT'ler, DSÖ tarafından önerilen standart yöntem olmasına rağmen, yoğun emek ve zaman isteyen, pahalı, tehlikeli testlerdir. Biyogüvenlik düzey 3 laboratuvarlarda uygulanabilirler, canlı hücre kültürüyle çalışmayı gerektirirler bu sebeplerden dolayı büyük çaplı çalışmalarda kullanılması maliyetli ve zordur (Zhiwei Ru, 2021).

Bu tez çalışmasında, SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve aşılama sonrasında gelişen koruyucu antiviral bağışıklığı değerlendirmek için SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirenlerde ve aşılananlarda S proteinine karşı oluşan IgG antikorlarının nötralizan aktivitesinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Dünyada benzer çalışmalar yapılmış olup ülkemizde benzer bir çalışma bulunmaması bakımından çalışmamız önem taşımaktadır.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmunoloji Laboratuvarına, Ocak – Haziran 2022 ayları arasında başvuran hastalardan Sinovac veya Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış olan bireyler yazılı onam imzalayarak dahil edilmiştir. Kronik hastalığa sahip olan bireyler ve SARS-CoV-2 IgG II sonucu <50 AU/mL olan bireyler dışlama kriterleri gereği çalışmadan çıkarılmıştır. Sonuç olarak tabakalı örneklem uygulanarak katılımcıların yaş, cinsiyet, antikor seviyeleri bakımından eşit dağılım göstermesi sağlanmış ve nötralizasyon aktivitesini etkileyebilecek özellikler sabitlenmiştir. Sinovac veya Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış ve enfeksiyon geçirmemiş bireyler Aşı grubunda, Sinovac veya Biontech aşılarıyla en az 2 doz aşılanmış ve geçirilmiş enfeksiyona sahip bireyler Aşı + Enfeksiyon grubunda yer almıştır. Çalışmada SARS-CoV-2 S proteini reseptörü RBD ile ACE-2 etkileşimini bloke eden serum antikorlarının tespiti için ACE2-RBD Neutralizing Assay kiti (Diapro, İtalya) kullanılmıştır. Test sVNT olup ELISA prensibi ile çalışmaktadır.

SARS-CoV-2 IgG II test sonucu 50 AU/mL'nin üzerinde olan toplam 120 numuneye uygulanan ACE-2 RBD Tarama test sonuçlarının tamamı pozitif bulunmuştur. Aşı grubunda bulunan 60 hastanın ikisi ACE-2 RBD bakımından düşük pozitif nötralizan aktivite gösterirken 58 kişi yüksek pozitif sonuç göstermiştir. Düşük pozitif nötralizan yanıt gösteren hastaların SARS-CoV-2 IgG II antikor düzeyleri incelendiğinde <500 AU/mL antikor düzeyinde yer aldıkları görülmüştür. Aşı + Enfeksiyon grubunda yer alan tüm bireylerde ACE-2 RBD Tarama testi yüksek pozitif olarak saptanmıştır. ACE2-RBD Tarama testi bakımından pozitif olan tüm hasta serumları $1/2$, $1/4$ ve $1/32$ oranlarında seyreltilerek titrasyon çalışması yapılmıştır.

Titrasyon çalışması sonucunda Aşı grubunda yer alan 60 kişi için 1 düşük, 3 orta ve 56 yüksek titrasyon elde edilmiştir. Düşük titrasyon gösteren hasta ACE2-RBD Tarama testinde de düşük pozitif yanıt göstermiştir. Orta titrasyon gösteren hastalardan biri ACE2-RBD Tarama bağlamında zayıf pozitiflik gösterirken diğerleri yüksek pozitiflik göstermektedir. Aşı grubunda düşük ve orta titrasyon gösteren bu dört örneğin SARS-CoV-2 IgG II testine göre 50-5000 AU/mL antikor düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Aşı + Enfeksiyon grubunda bulunan 60 hastadan bir kişi orta titrasyon göstermiş ve bireyin 50-5000 AU/mL SARS-CoV-2 IgG II antikor düzeyine sahip olduğu ve ACE2-RBD Tarama sonucunun yüksek pozitif olduğu saptanmıştır. Aşı + Enfeksiyon grubundaki diğer bireylerin tamamında yüksek titre saptanmıştır.

Çalışmamızda uygulanan SARS-CoV-2 IgG II, ACE-2 RBD Tarama ve Titrasyon testleri için Aşı ve Aşı + Enfeksiyon gruplarına göre mean ve median değerleri hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Tüm gruplarda, SARS-CoV-2 IgG II, ACE-2 RBD Tarama ve Titrasyon testleri ile koreleydi. Bu sonuçlar 2021'de González ve 2020'de Wang'ın yaptığı çalışmalar ile uyumluydu (González-Stegmaier ve ark., 2021; Y. Wang ve ark., 2020). Malipiero ve ark.'nın 57 sağlık çalışanını 6 ay takip ederek yaptığı çalışmada anti-RBD IgG immünoassay ve bir sVNT gerçekleştirilmiştir. Rapel doz sonrası serum anti-RBD IgG düzeyleri ile NAb'ler arasında korelasyon olmadığı ancak rapel doz sonrası 2.-6. aylar arasında sonuçların korele olduğu görülmüştür. 6. Aydan sonra serum IgG düzeyleri düşerken NAb düzeyleri hala serumda saptanabilir düzeyde olduğu bulunmuştur (Malipiero ve ark., 2022). Hoher ve ark. 2022'de yaptığı bir çalışmada 2994 hastada SARS-CoV-2'nin S1 proteinine karşı gelişen IgG antikorların nötralize edici etkisini incelenmiştir. Numuneler SARS-CoV-2 S1 IgG için otomatik ELISA ve SARS-CoV-2 sVNT kiti ile ölçülmüştür. Bu çalışmada S1 IgG ile SARS-CoV-2 NAb arasında doğrusal olmayan bir ilişki bulunmuştur (Hoher ve ark., 2022). Vollenberg ve ark. 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip 95 hasta ve 42 sağlıklı kontrol grubunu 2 doz aşılama sonrası 6 ay takip ederek SARS-CoV-2 IgG II ve sVNT değerlendirmesi yapmışlardır. SARS-CoV-2 IgG II ve sVNT arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ve bu sonuç çalışmamızla uyumludur. 6. ayda hem SARS-CoV-2 IgG II hem de sVNT sonuçlarında düşüş görülmüştür (Vollenberg ve ark., 2022). Infantino ve ark. tarafından İtalya'da 57 sağlık çalışanı üzerinde yapılan bir çalışmada 2 doz Biontech

aşılmasından 1 ay, 3 ay, 6 ay sonra alınan serum örnekleri S1 IgG ve NAb bakımından karşılaştırıldı. S1 IgG tespiti için floroenzim-immünoassay ve NAb için sVNT yöntemleri kullanıldı. Tüm zamanlarda S1 IgG ve sVNT paralellik göstermedi. Bu nedenle aşı etkinliğinin ölçülmesi için her iki yöntemin de kullanılması önerilmiştir (Infantino ve ark., 2022). Bir çalışmada rt-PCR pozitif hastalar semptom başlangıcından sonra 1 hafta izlenmiş ve serum örnekleri yarı kantitatif bir IgG ve IgA ELISA kiti ve sVNT yöntemi ile değerlendirilmiştir. sVNT'nin duyarlılığı (97,8) IgG (84,4) ve IgA'nın (91,1) duyarlılığından önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Putcharoen ve ark., 2021). Bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada COVID-19 nekahat döneminde olan 54 hasta ve SARS-CoV-2 enfeksiyonu geçirmemiş 89 bireyden alınan örnekler Anti-RBD antikorlarının varlığı için SARS-CoV-2 IgM ve IgG II ve NAb'ler için sVNT ile test edilmiştir. Bu çalışmada, nekahat dönemindeki hastalarda Anti-RBD SARS-CoV-2 IgM ve IgG II yanıtları sVNT ile güçlü bir pozitif korelasyon göstermiştir (Kitagawa ve ark., 2022).

Çalışmamızda SARS-CoV-2 IgG II ve ACE2-RBD tarama test düzeylerinde yaş ve cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. González ve ark. IgG seviyelerini yaş faktörüne göre incelemiş, 18-24 yaş grubunda ve 55 yaş üstünde daha yüksek anti-RBD IgG varlığı mevcut olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada ayrıca cinsiyete göre anlamlı bir fark görülmemiş ancak yetişkin erkeklerde genç erkeklere göre daha yüksek IgG seviyeleri tespit edilmiştir (González-Stegmaier ve ark., 2021). Başka bir çalışmada S1 IgG düzeyleri ve sVNT ile karşılaştırılmış ve SARS-CoV-2 sVNT pozitif olup ancak serumda S1 IgG saptanmayan hastalar mevcut olduğu görülmüştür. Kohort yaşa göre incelendiğinde bu hastaların tamamı hem SARS-CoV-2 sVNT hem de S1 IgG düzeyi pozitif olan hastalardan daha genç olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada hem S1 IgG hem de SARS-CoV-2 sVNT sonuçlarının totalde kadınlarda daha yüksek olduğu saptanmasına rağmen SARS-CoV-2 S1 IgG bakımından pozitif sVNT bakımından negatif olan grupta kadın hastaların sayısı fazlaydı (Hoher ve ark., 2022).

Çalışmamızda 1/32 titrasyon düzeyinde pozitif yanıt veren yüksek titre serum örnekleri seyreltilerek 1/64 titrasyon çalışması yapılmış ve Aşı grubunda 1/32 titrasyonda pozitif olan 16 numuneden 5 tanesi 1/64 titrasyonda negatife dönmüştür. 5 hastanın tamamı SARS-CoV-2 IgG II testinde 50-5000 AU/mL antikor düzeyinde

bulunmaktadır. Aşı + enfeksiyon grubunda ise 1/32 titrasyonda pozitiflik gösteren 12 bireyden 2 kişi 1/64 titrasyonda negatif olarak saptanmıştır. 2 kişinin SARS-CoV-2 IgG II testinde 50-5000 AU/mL antikor düzeyinde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar >5000 AU/mL düzeyinde yüksek NAb titreleri ile ilişkilendirilebilir. Bonelli ve ark.'nın 2020'de 304 numune üzerinde yaptığı bir çalışmada 80 AU/mL ve üzeri S1/S2 IgG düzeyinde SARS-CoV-2 sVNT pozitifliği %87 iken 80 AU/mL altında bu oran %47 idi (Bonelli ve ark., 2020). Bu sonuç çalışmamızı desteklemektedir.

Sonuç olarak; SARS-CoV-2 antikor tespitinde kullanılan mevcut rutin serolojik testlerin; enfeksiyondan korunma, halk sağlığı stratejilerinin belirlenmesi, seroprevalansın ölçülmesi, risk faktörlerinin değerlendirilmesi, geliştirilen aşıların etkinliğinin ölçülmesi gibi faktörler yönünden oynadığı rolün yeterliliği çoğu zaman tartışmaya açık bir konu olarak gündemdeki yerni korumaktadır. Bu tez çalışmasının sonucunda SARS-CoV-2 IgG II testiyle 5000 AU/mL üzerinde saptanan antikorların yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin yeterli nötralizan aktiviteye sahip olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucu hem aşılansın hem de aşılansın ile birlikte enfeksiyon geçirmiş kişilerde geçerliliğini korumaktadır. Ancak aşılansın ile birlikte enfeksiyon geçiren grupta, 50-10000 AU/mL düzeyindeki antikor seviyesi için sadece aşılansın gruba göre daha olumlu nötralizan aktivite yanıtı elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abduljalil, J. M. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New microbes and new infections*, 36, 100713.
- Abe, K. T. ve Li, Z. ve Samson, R. ve Samavarchi-Tehrani, P. ve Valcourt, E. J. ve Wood, H. ve ark. (2020). A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2. *JCI insight*, 5(19).
- Akdoğan, H..Karslıgil, T. (2021). SARS-CoV-2: Bildiklerimiz, Bilmediklerimiz. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 51(3), 203-213.
- ALTINDİŞ, M..Toptan, H. (2020). SARS CoV 2 Laboratuvar Tanısı. *Journal of biotechnology and strategic health research*, 4, 76-84.
- Anderson, R. M., Vegvari, C., Truscott, J..Collyer, B. S. (2020). Challenges in creating herd immunity to SARS-CoV-2 infection by mass vaccination. *The Lancet*, 396(10263), 1614-1616.
- Arya, R. ve Kumari, S. ve Pandey, B. ve Mistry, H. ve Bihani, S. C. ve Das, A. ve ark. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, 433(2), 166725.
- Astuti, I. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4), 407-412.
- ATAK YÜCEL, A., BAYRAKAL, V..BASKIN, A. (2020). Sitokin Fırtınası ve COVID-19.
- Bakhiet, M..Taurin, S. (2021). SARS-CoV-2: targeted managements and vaccine development. *Cytokine & growth factor reviews*, 58, 16-29.

- Boechat, J. L., Chora, I., Morais, A., Delgado, L. (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology—current perspectives. *Pulmonology*, 27(5), 423-437.
- Bonelli, F. ve Sarasini, A. ve Zierold, C. ve Calleri, M. ve Bonetti, A. ve Vismara, C. ve ark. (2020). Clinical and analytical performance of an automated serological test that identifies S1/S2-neutralizing IgG in COVID-19 patients semiquantitatively. *Journal of clinical microbiology*, 58(9), e01224-01220.
- Bonilla, F. A., Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33-S40.
- Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., Zheng, Z.-M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1-17.
- Chams, N. ve Chams, S. ve Badran, R. ve Shams, A. ve Araj, A. ve Raad, M. ve ark. (2020). COVID-19: a multidisciplinary review. *Frontiers in public health*, 8, 383.
- Chowdhury, M. A., Hossain, N., Kashem, M. A., Shahid, M. A., Alam, A. (2020). Immune response in COVID-19: A review. *Journal of infection and public health*, 13(11), 1619-1629.
- Chvatal-Medina, M., Mendez-Cortina, Y., Patino, P. J., Velilla, P. A., Rugeles, M. T. (2021). Antibody responses in COVID-19: a review. *Frontiers in immunology*, 12, 633184.
- Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192.
- Dayan, S. (2021). COVID-19 ve Aşı. *Dicle Tıp Dergisi*, 48, 98-113.

- Dikmen, A. U., Mediha, K., Özkan, S., İlhan, M. N. (2020). COVID-19 epidemiyolojisi: Pandemiden ne öğrendik. *Journal of biotechnology and strategic health research*, 4, 29-36.
- Dolscheid-Pommerich, R. ve Bartok, E. ve Renn, M. ve Kümmerer, B. M. ve Schulte, B. ve Schmithausen, R. M. ve ark. (2022). Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity. *Journal of medical virology*, 94(1), 388-392.
- Durmaz, E. Ö. (2013). B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi. *Archives of the Turkish Dermatology & Venerology/Turkderm*.
- Erensoy, S. (2020). SARS-CoV-2 and microbiological diagnostic dynamics in COVID-19 pandemic. *Mikrobiyoloji bulteni*, 54(3), 497-509.
- Favresse, J. ve Gillot, C. ve Di Chiaro, L. ve Eucher, C. ve Elsen, M. ve Van Eeckhoudt, S. ve ark. (2021). Neutralizing antibodies in COVID-19 patients and vaccine recipients after two doses of BNT162b2. *Viruses*, 13(7), 1364.
- Fehr, A. R., Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23.
- Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., Langlois, M.-A. (2020). Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. *Frontiers in immunology*, 11, 610688.
- Ghaffari, A., Meurant, R., Ardakani, A. (2020). COVID-19 serological tests: how well do they actually perform? *Diagnostics*, 10(7), 453.
- González-Stegmaier, R. ve Cereceda, K. ve Briones, J. ve Beltran-Pávez, C. ve Oyarzún-Arrau, A. ve Riquelme-Barrios, S. ve ark. (2021). Seroconversion and abundance of IgG antibodies against S1-RBD of SARS-CoV-2 and neutralizing activity in the Chilean population. *Journal of immunology research*, 2021.

Grifoni, A. ve Weiskopf, D. ve Ramirez, S. I. ve Mateus, J. ve Dan, J. M. ve Moderbacher, C. R. ve ark. (2020). Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501. e1415.

Gruell, H., Vanshylla, K., Weber, T., Barnes, C. O., Kreer, C., Klein, F. (2022). Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. *Immunity*.

Guo, L. ve Ren, L. ve Yang, S. ve Xiao, M. ve Chang, D. ve Yang, F. ve ark. (2020). Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clinical infectious diseases*, 71(15), 778-785.

Hasöksüz, M., Kiliç, S., Saraç, F. (2020). Coronaviruses and sars-cov-2. *Turkish journal of medical sciences*, 50(SI-1), 549-556.

Hocher, B., Schönbrunn, A., Chen, X., Krämer, B. K., von Baehr, V. (2022). Outliers Matter—Correlation between S1 IgG SARS-CoV-2 Antibodies and Neutralizing SARS-CoV-2 Antibodies. *Microorganisms*, 10(10), 2067.

Hosseini, E. S., Kashani, N. R., Nikzad, H., Azadbakht, J., Bafrani, H. H., Kashani, H. H. (2020). The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 551, 1-9.

<https://covid19.who.int/>.

<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.

Hu, B., Guo, H., Zhou, P., Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154.

Hu, B., Huang, S., Yin, L. (2021). The cytokine storm and COVID-19. *Journal of medical virology*, 93(1), 250-256.

- Huang, C. ve Wang, Y. ve Li, X. ve Ren, L. ve Zhao, J. ve Hu, Y. ve ark. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506.
- Infantino, M. ve Manfredi, M. ve Stacchini, L. ve Cosma, C. ve Grossi, V. ve Lari, B. ve ark. (2022). The role of neutralizing antibodies by sVNT after two doses of BNT162b2 mRNA vaccine in a cohort of Italian healthcare workers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 60(6), 934-940.
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B.,Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3-20.
- Jackson, L. A. ve Anderson, E. J. ve Rouphael, N. G. ve Roberts, P. C. ve Makhene, M. ve Coler, R. N. ve ark. (2020). An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *New England journal of medicine*.
- Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Majsterek, I.,Bijak, M. (2021). The emerging concern and interest SARS-CoV-2 variants. *Pathogens*, 10(6), 633.
- Jiang, S., Zhang, X., Yang, Y., Hotez, P. J.,Du, L. (2020). Neutralizing antibodies for the treatment of COVID-19. *Nature biomedical engineering*, 4(12), 1134-1139.
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A.,Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of basic Microbiology*, 61(3), 180-202.
- Kahn, J. S.,McIntosh, K. (2005). History and recent advances in coronavirus discovery. *The Pediatric infectious disease journal*, 24(11), S223-S227.
- Kamps, B. S.,Hoffmann, C. (2020). COVID reference. *Munich: Steinhauser Verlag*.

- Khan, M. ve Adil, S. F. ve Alkhathlan, H. Z. ve Tahir, M. N. ve Saif, S. ve Khan, M. ve ark. (2020). COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far. *Molecules*, 26(1), 39.
- Khoury, D. S. ve Cromer, D. ve Reynaldi, A. ve Schlub, T. E. ve Wheatley, A. K. ve Juno, J. A. ve ark. (2021). Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nature medicine*, 27(7), 1205-1211.
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502.
- Kitagawa, Y. ve Imai, K. ve Matsuoka, M. ve Fukada, A. ve Kubota, K. ve Sato, M. ve ark. (2022). Evaluation of the correlation between the access SARS-CoV-2 IgM and IgG II antibody tests with the SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. *Journal of medical virology*, 94(1), 335-341.
- Levinson, W. J., Ernest. (2004). *Medical Microbiology and Immunology*. Lange.
- Long, Q.-X. ve Liu, B.-Z. ve Deng, H.-J. ve Wu, G.-C. ve Deng, K. ve Chen, Y.-K. ve ark. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature medicine*, 26(6), 845-848.
- Luchsinger, L. L. ve Ransegnola, B. P. ve Jin, D. K. ve Muecksch, F. ve Weisblum, Y. ve Bao, W. ve ark. (2020). Serological assays estimate highly variable SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity in recovered COVID-19 patients. *Journal of clinical microbiology*, 58(12), e02005-02020.
- Machhi, J. ve Herskovitz, J. ve Senan, A. M. ve Dutta, D. ve Nath, B. ve Oleynikov, M. D. ve ark. (2020). The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(3), 359-386.

- Mahalingam, S. ve Peter, J. ve Xu, Z. ve Bordoloi, D. ve Ho, M. ve Kalyanaraman, V. S. ve ark. (2021). Landscape of humoral immune responses against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 disease and the value of antibody testing. *Heliyon*, 7(4), e06836.
- Malipiero, G., D'Agaro, P., Segat, L., Moratto, A., Villalta, D. (2022). Long-term decay of anti-RBD IgG titers after BNT162b2 vaccination is not mirrored by loss of neutralizing bioactivity against SARS-CoV-2. *Clinica Chimica Acta*, 524, 11-17.
- Meşe, S., Ağaçfıdan, A. (2020). Coronavirus: Genel Özellikler ve Güncel Yaklaşım. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 3(S1), 14-23.
- Meyer, B. ve Reimerink, J. ve Torriani, G. ve Brouwer, F. ve Godeke, G.-J. ve Yerly, S. ve ark. (2020). Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging microbes & infections*, 9(1), 2394-2403.
- Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The journal of gene medicine*, 23(2), e3303.
- Mouna, L., Razazian, M., Duquesne, S., Roque-Afonso, A.-M., Vauloup-Fellous, C. (2023). Validation of a SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test in Recovered and Vaccinated Healthcare Workers. *Viruses*, 15(2), 426.
- Mousavizadeh, L., Ghasemi, S. (2021). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 159-163.
- Naqvi, A. A. T. ve Fatima, K. ve Mohammad, T. ve Fatima, U. ve Singh, I. K. ve Singh, A. ve ark. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution,

pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878.

of the International, C. S. G. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536.

Ortiz-Prado, E. ve Simbaña-Rivera, K. ve Gómez-Barreno, L. ve Rubio-Neira, M. ve Guaman, L. P. ve Kyriakidis, N. C. ve ark. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 98(1), 115094.

Özçürümez, M. K. ve Ambrosch, A. ve Frey, O. ve Haselmann, V. ve Holdenrieder, S. ve Kiehntopf, M. ve ark. (2020). SARS-CoV-2 antibody testing—questions to be asked. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), 35-43.

Patel, R., Kaki, M., Potluri, V. S., Kahar, P., Khanna, D. (2022). A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 18(1), 2002083.

Peng, Y. ve Du, N. ve Lei, Y. ve Dorje, S. ve Qi, J. ve Luo, T. ve ark. (2020). Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *The EMBO journal*, 39(20), e105938.

Polack, F. P. ve Thomas, S. J. ve Kitchen, N. ve Absalon, J. ve Gurtman, A. ve Lockhart, S. ve ark. (2020). Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England journal of medicine*.

Putcharoen, O. ve Wacharapluesadee, S. ve Chia, W. N. ve Paitoonpong, L. ve Tan, C. W. ve Suwanpimolkul, G. ve ark. (2021). Early detection of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients in Thailand. *PloS one*, 16(2), e0246864.

- Qu, J. ve Wu, C. ve Li, X. ve Zhang, G. ve Jiang, Z. ve Li, X. ve ark. (2020). Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical infectious diseases*, 71(16), 2255-2258.
- Riepler, L. ve Rössler, A. ve Falch, A. ve Volland, A. ve Borena, W. ve von Laer, D. ve ark. (2020). Comparison of four SARS-CoV-2 neutralization assays. *Vaccines*, 9(1), 13.
- SEMEN, Z., EKİCİ, S.,MALAS, B. COVID-19 İÇİN MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİNE GENEL BAKIŞ. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 11(2), 72-79.
- Shah, V. K., Firmal, P., Alam, A., Ganguly, D., Chattopadhyay, S. (2020). Overview of immune response during SARS-CoV-2 infection: lessons from the past. *Frontiers in immunology*, 11, 1949.
- Sharif, N., Alzahrani, K. J., Ahmed, S. N., Dey, S. K. (2021). Efficacy, immunogenicity and safety of COVID-19 vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in immunology*, 4149.
- Sharma, A., Ahmad Farouk, I., Lal, S. K. (2021). COVID-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses*, 13(2), 202.
- Sofi, M. S., Hamid, A., Bhat, S. U. (2020). SARS-CoV-2: A critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment. *Biosafety and health*, 2(4), 217-225.
- Talic, S. ve Shah, S. ve Wild, H. ve Gasevic, D. ve Maharaj, A. ve Ademi, Z. ve ark. (2021). Effectiveness of public health measures in reducing the incidence of

covid-19, SARS-CoV-2 transmission, and covid-19 mortality: systematic review and meta-analysis. *bmj*, 375.

Tan, C. W. ve Chia, W. N. ve Qin, X. ve Liu, P. ve Chen, M. I.-C. ve Tiu, C. ve ark. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature biotechnology*, 38(9), 1073-1078.

Tanrioer, M. D. ve Doğanay, H. L. ve Akova, M. ve Güner, H. R. ve Azap, A. ve Akhan, S. ve ark. (2021). Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet*, 398(10296), 213-222.

Tekol, S. D. (2020). SARS-CoV-2: Virolojisi ve Tanıda Kullanılan Mikrobiyolojik Testler. *Southern Clinics of Istanbul Eurasia*.

Temel, A., Ateş, A., Eraç, B. (2021). COVID-19 Pandemisinde Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 51(2), 99-108.

Torbati, E., Krause, K. L., Ussher, J. E. (2021). The immune response to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Viruses*, 13(10), 1911.

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.

Vabret, N. ve Britton, G. J. ve Gruber, C. ve Hegde, S. ve Kim, J. ve Kuksin, M. ve ark. (2020). Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity*, 52(6), 910-941.

Valencia, D. N. (2020). Brief review on COVID-19: the 2020 pandemic caused by SARS-CoV-2. *Cureus*, 12(3).

- Vollenberg, R. ve Tepasse, P.-R. ve Kühn, J. E. ve Hennies, M. ve Strauss, M. ve Rennebaum, F. ve ark. (2022). Humoral immune response in IBD patients three and six months after vaccination with the SARS-CoV-2 mRNA vaccines mRNA-1273 and BNT162b2. *Biomedicines*, 10(1), 171.
- Wajnberg, A. ve Amanat, F. ve Firpo, A. ve Altman, D. R. ve Bailey, M. J. ve Mansour, M. ve ark. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 370(6521), 1227-1230.
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 724.
- Wang, Y. ve Zhang, L. ve Sang, L. ve Ye, F. ve Ruan, S. ve Zhong, B. ve ark. (2020). Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. *The Journal of clinical investigation*, 130(10), 5235-5244.
- Weiss, S. R., Leibowitz, J. L. (2011). Coronavirus pathogenesis. *Advances in virus research*, 81, 85-164.
- Yavuz, E. (2020). COVID-19 aşılı. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 24(4), 223-234.
- Yesudhas, D., Srivastava, A., Gromiha, M. M. (2021). COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*, 49(2), 199-213.
- Zhao, J. ve Yuan, Q. ve Wang, H. ve Liu, W. ve Liao, X. ve Su, Y. ve ark. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. *Clinical infectious diseases*, 71(16), 2027-2034.
- Zhiwei Ru, Y. Z., Jinyin Wu, Huihong Huang, Yiwen Liang, Xiang Yang, Jie Wu and Jjianrong Lou. (2021). Comparison of the SARS-CoV-2 Surrogate Virus

Neutralization Test (sVNT) Assay and Direct Binding ELISA (S-IgG) with the Cytopathic Effect Assay (CPE) in Analyzing the Neutralization Antibody of Vaccination People. *Journal of Clinical Immunology & Immunotherapy* <https://doi.org/10.24966/CIIT-8844/1000063>

Zhou, G..Zhao, Q. (2020). Perspectives on therapeutic neutralizing antibodies against the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1718-1723.



HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SARS-COV-2 ENFEKSİYONU VE AŞILANMA SONRASINDA GELİŞEN ANTİKORLARIN NÖTRALİZAN AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 14	% 12	% 4	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	amedeo.com İnternet Kaynağı	% 1
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	sbbcongress.usak.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
8	lutfikirdareah.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1

openaccess.bezmialem.edu.tr