

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SARS-COV-2 KANTİTATİF TANISINDA KULLANILAN FARKLI
REAL-TİME PCR CİHAZLARININ VE KİTLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
Arş. Gör. Dr. Hatice ALBAYRAK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SARS-COV-2 KANTİTATİF TANISINDA KULLANILAN FARKLI
REAL-TİME PCR CİHAZLARININ VE KİTLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Hatice ALBAYRAK

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 17.12.2021 tarih ve 21277 protokol numarası ile desteklenmiştir/~~desteklenmemiştir.~~

ŞANLIURFA

2022

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca bilgisinden yararlandığım, sürecimin her aşamasında emeği olan, daha iyi bir eğitim almamız için büyük çabalar harcayan ve meslek hayatımda bana ilham kaynağı olan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve aynı zamanda tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e,

Tez konum ile ilgili beni cesaretlendiren, tez sürecim boyunca bana rehberlik eden ve katkılarını esirgemeyen yardımcı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Akın YİĞİN'e,

Her konuda bilgi ve deneyimlerini paylaşan, yetişmemde büyük emeği olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Salim YAKUT'a,

Birlikte çalışmaktan keyif duyduğum laboratuvar ekibimize,

Asistanlığım süresince birlikte birçok ânı paylaştığımız, desteklerinden kuvvet aldığım Aile Hekimliği asistanı arkadaşlarıma ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan, maddi manevi destekleriyle bugüne ulaşmamda büyük emekleri olan canım ablam Dr. Öğr. Üyesi Ebru ALBAYRAK'a, annem Naciye ve babam Prof. Dr. Davut ALBAYRAK'a, abim Hüseyin Oğuz ALBAYRAK'a,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hatice ALBAYRAK

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koronavirüslerin Yapısı ve Genel Özellikleri	3
2.2. Koronavirüslerin Proteinleri	4
2.3. Önemli Koronavirüsler	6
2.3.1. IBV	6
2.3.2. Hafif Seyirli İnsan Koronavirüsleri	6
2.3.3. SARS-CoV	7
2.3.4. MERS-CoV	7
2.4. SARS-CoV-2	8
2.4.1. SARS-CoV-2 Epidemiyolojisi	8
2.4.2. SARS-CoV-2 Proteinleri	10
2.4.3. SARS-CoV-2 Varyantları	13
2.4.4. SARS-CoV-2 Bulaş Yolları	14
2.4.5. Patogenez ve İmmünite	15
2.5. COVID-19'da Klinik	16
2.5.1. Akciğer Tutulumu	17
2.5.2. Akciğer Dışı Organ Tutulumları	17
2.6. COVID-19 Tanısı	18
2.6.1. Moleküler Tanı	18
2.6.2. Serolojik Tanı	24
2.6.3. Klinik Bulgular	26
2.6.4. Laboratuvar Bulguları	27
2.6.5. Radyolojik Bulgular	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Etik Kurul İzni	30

3.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	30
3.2.1. Cihaz	30
3.2.2. SARS-CoV-2 RNA Tespit Kitleri	30
3.2.3. Ekipmanlar ve Sarf Malzemeleri	30
3.2.4. Kitlerin Çalışma Prosedürleri	31
3.3. Hasta Popülasyonu	32
3.4. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi	33
3.5. RT-qPCR Uygulanması	33
3.6. Standart Lineer Eğrilerin Eldesi	34
3.7. İstatiksel Analiz	34
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	83
Ek-1: Etik Kurul Kararı	83
Ek-2: Turnittin Raporu	84

Tablo-1: COVID-19'un ortaya çıkışından pandemi ilan edilmesine kadarki süreç	9
Tablo-2: COVID-19 sürecinde değişen bazı biyobelirteçler	28
Tablo 3: Cihaz ve kit ikililerinin aynı örnekleri düşük veya yüksek Ct değerlerinde saptama durumu	41
Tablo-4: Her bir kit ile cihazda elde edilen Ct ortalama değerleri ve bunlar arasındaki fark	42
Tablo-5: Viral yükü düşük olan örneklerde SARS-CoV-2 tespiti açısından, incelenen Real-time PCR cihazlarının ve kitlerin birbiriyle olan uyumu	44
Tablo-6: Cinsiyete göre viral yük ortalamalarının dağılımı	47
Tablo-7: Hastaların sağ kalım durumuna göre viral yük değerlerinin dağılımı	48
Tablo-8: Lökosit değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	49
Tablo-9: Nötrofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	50
Tablo-10: %Nötrofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	51
Tablo-11: % Lenfosit değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	51
Tablo-12: % Eozinofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	52
Tablo-13: COVID-19 hastalarında elde edilen verilerin birbirleriyle olan ilişkisi	54
Tablo-14: Viral yük değerlerinin hasta verileri ile olan ilişkisi	57

Şekil-1: Koronavirüsün elektron mikroskopundaki görüntüsü.	3
Şekil-2: SARS-COV-2'nin şematik yapısı.	10
Şekil-3: SARS-CoV-2 patogeneğine etki eden virüse ve konağa ait faktörler	12
Şekil-4: PCR sıcaklık döngüsü.	19
Şekil-5: RT-PCR eğrileri.	21
Şekil-6: Real-time PCR standart eğrisi.	22
Şekil-7: SARS-CoV-2 tespitinde RT-PCR'da kullanılacak amplikon hedef bölgeleri	23
Şekil-8: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri	36
Şekil-9: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri	37
Şekil-10: Rotor-Gene cihazında Diagnovital kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri	37
Şekil-11: Rotor-Gene cihazında Diagnovital kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri	37
Şekil-12: Rotor-Gene cihazında Coronex kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri	38
Şekil-13: Rotor-Gene cihazında Coronex kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri	38
Şekil-14: Bio-Rad cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	39
Şekil-15: Bio-Rad cihazında Diagnovital kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	39
Şekil-16: Bio-Rad cihazında Coronex kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	39
Şekil-17: Abbott cihazında Coronex kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	40
Şekil-18: Abbott cihazında Diagnovital kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	40
Şekil-19: Abbott cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri	40
Şekil-20: Cihaz ve kit ikililerinde elde edilen Ct değerleri	41
Şekil-21: Farklı kit-cihaz ikililerinde saptanan Ct ortalama değerleri	43
Şekil-22: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile elde edilen standart eğri	44
Şekil-23: Cihazlarda elde edilen Ct ortalama değerlerinin karşılaştırılması	45
Şekil-24: Kitlerde elde edilen Ct ortalama değerlerinin karşılaştırılması	45
Şekil-25: En düşük viral yüke sahip 7 hastada kit ve cihazların birbirleriyle uyumunun İncelenmi	46
Şekil-26: Viral yükün yaş gruplarına göre dağılımı	47

Şekil-27: Viral yükün hastaların klinik durumlarına göre dağılımı	48
Şekil-28: Lenfosit değerleri normal sınırlarda olan ve düşük olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	49
Şekil-29: Eozinofil değerleri normal sınırlarda olan ve düşük olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı	50
Şekil-30: Hastaların LDH düzeylerine göre kantitasyon değerlerinin dağılımı	52
Şekil-31: Hastaların D-dimer düzeylerine göre kantitasyon değerlerinin dağılımı	53



KISALTMALAR

COVID-19	: Coronavirus Disease-2019= Koronavirüs hastalığı-2019
ACE2	: Anjiotensin Converting Enzim 2
ALT	: Alanin aminotransferaz
ARDS	: Acute Respiratory Distress Syndrome= Akut solunum sıkıntısı sendromu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention= Hastalık Koruma ve Önleme Merkezi
cDNA	: Komplementer DNA
CLIA	: Kemilüminesan immünoassay
CMV	: Sitomegalovirus
CRP	: C Reaktif Protein
Ct	: Cycle Treshold
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksinükleikasit
dNTP	: deoksinükleozit trifosfat
ELISA	: Enzim-bağlı immünosorbent assay
HCoV	: Human Coronavirus= İnsan koronavirüsü
HT	: Hipertansiyon
IBV	: Avian İnfeksiyöz Bronşit Virüsü
IFN	: Interferon
Ig	: Immunglobulin
IL-2	: Interlökin-2
LAI	: lateral akım immünoassay
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MERS-CoV	: Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus= Orta Doğu solunum sendromu
MIS-C sendromu	: Multisystem inflammatory syndrome in children= çoklu sistem inflamatuvar sendromu
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NSP	: Non-Structural Protein= Yapısal olmayan protein
ORF	: Open Reading Frame
PCR	: Polimerase Chain Reaction= Polimeraz Zincir Reaksiyonu

R₀	: Reproduction Number= Bulaştırma katsayısı
RBD	: Reseptor Binding Domain= Reseptör bağlayan bölge
RT-PCR	: Real-time Reverse Transkriptaz PCR
RNA	: Ribonükleik asit
SARS-CoV-2	: Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2
TNF	: Tumour necrosis factor= Tümör Nekroz Faktörü
UV	: Ultraviyole
VOC	: Variants of Concern= Endişe verici varyantlar
WBC	: White Blood Cell= Lökosit
WHO	: World Health Organization= Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

SARS-CoV-2 Kantitatif Tanısında Kullanılan Farklı Real-time PCR Cihazlarının ve Kitlerin Karşılaştırılması

Dr. Hatice ALBAYRAK

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Amaç: COVID-19, etkin bir tedavisi olmaması ve yüksek bulaştırıcılığı sebebiyle dünya genelinde sağlık sistemlerini zorlamış bir enfeksiyondur. Virüsün bulaştırıcılığının yüksek olması morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır. Bulaşı önlemek ve erken tedaviyi sağlayabilmek için enfekte kişilerin erken ve doğru tespiti, dolayısıyla güvenilir bir tanı yönteminin belirlenmesi önem arz etmektedir. Real-time RT-PCR, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından COVID-19 tanısında önerilen tanı yöntemidir. Ancak PCR, uygulandığı koşullara göre verimliliği etkilenebilen bir testtir. Biz bu çalışmamızda, SARS-CoV-2 genomunu saptayan farklı ticari kitlerin, farklı Real-time PCR sistemlerindeki performanslarını incelemeyi ve laboratuvar uzmanlarına bu konuda bir fikir vermeyi amaçladık. Bu araştırmanın yanısıra, çalışmamızda hasta numunelerinde elde ettiğimiz viral yükleri ve hastaların bazı kan değerlerini inceleyerek, bu verilerin birbirleriyle olan ilişkilerini inceledik.

Yöntem: Çalışmamızda 46 nazofarengeal sürüntü örneği Bio-Speedy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR kiti (Bioeksen Ltd, Istanbul, Turkey), DS Coronex COVID-19 multiplex RT-qPCR tanı kiti (DS Bio and Nano Technology, Ankara, Türkiye) ve Diagnovital HS SARS-CoV-2 multiplex Real time PCR kiti (RTA, Türkiye) kitleri kullanılarak Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya), Bio-Rad CFX96 Real Time PCR cihazı ve Abbott m2000rt Real-time PCR sistemlerine yüklendi. Bu kit ve cihazların performansları incelendi. Bio-Speedy kiti kullanılarak Rotor-Gene cihazında elde edilen lineer standart eğrisi, hasta numunelerindeki SARS-CoV-2 viral yükünü saptamada kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamızda SARS-CoV-2 tespitinde, denediğimiz kit ve cihazlar arasında en yüksek Ct değeri veren kit-cihaz ikilisi Diagnovital kiti – Abbott cihazı, en düşük veren ikili ise Rotor-Gene – Bio-Speedy idi. Virüs genom tespitinde Bio-Speedy kitinin, Diagnovital ve Coronex kitlerine göre daha düşük Ct değerleri verdiğini saptadık. Yüksek viral yük ile lökositöz, kan D-dimer düzeyi yüksekliği ve ölümün ilişkili olduğunu gördük. Çalışmamızda yaş, cinsiyet, kan CRP, D-dimer,

lökosit, lenfosit ve nötrofil değerlerini inceledik. Hastalarda ileri yaş, hastanın klinik durumu ve kan nötrofil yüzdesinin yüksekliğinin, ölüm riskini öngörmeye kullanılabileceğini saptadık.

Sonuç: Real-time PCR cihazı farklı hedef genlerde, farklı numune tiplerinde, farklı cihaz ve kitlerde farklı sonuçlar verebilmektedir. Her yeni çalışma protokolünde denemeler yapılmalı, kitler ve cihazlar performans açısından test edilmelidir. Ayrıca izolasyon önlemlerinin asemptomatik hastalarda da sıkı bir şekilde alınması, bu hasta grubunda görülen yüksek viral yük nedeniyle, bulaştırıcılığın önlenmesinde oldukça kritiktir.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, Viral yük, PZR, COVID-19

ABSTRACT

Comparison of Different Real-time PCR Devices and Kits for SARS-CoV-2 Quantitative Diagnosis

Hatice ALBAYRAK, MD

Speciality Thesis, Department of Medical Microbiology

Objective: COVID-19 is an infection that has challenged health systems all around the world due to its high contagiousness and the lack of an effective treatment. The high contagiousness of the virus increases morbidity and mortality. To prevent transmission and provide early treatment, early and accurate detection of infected people is needed. Therefore, it is important to determine a reliable diagnostic method. Real-time RT-PCR is the diagnostic method recommended by the World Health Organization (WHO) in the diagnosis of COVID-19. However, PCR is a test whose efficiency can be affected by the conditions under which it is applied. In our study, we aimed to examine the performance of different commercial kits that detect the SARS-CoV-2 genome in different Real-time PCR systems and to give an idea to the laboratory experts on this subject. In addition to this research, we examined the viral loads obtained in the patient samples and some blood values of the patients in our study and the correlations of these data with each other.

Method: In our study, 46 nasopharyngeal swab samples were used with Bio-Speedy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR kit (Bioeksen Ltd, Istanbul, Turkey), DS Coronex COVID-19 multiplex RT-qPCR diagnostic kit (DS Bio and Nano Technology, Ankara, Turkey) and Diagnovital HS SARS-CoV-2 multiplex Real-time PCR kit (RTA, Turkey) to detect SARS-CoV-2 genome. Samples were loaded into Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), Bio-Rad CFX96 and Abbott m2000rt Real-time PCR systems. The performances of these kits and devices were examined. Standard curve obtained on the Rotor-Gene device using the Bio-Speedy kit were used to detect SARS-CoV-2 viral load in patient samples.

Findings: With the findings we obtained in our study, we saw using Diagnovital kit into Abbott device gave the highest Ct values as a kit-device pair in the detection of SARS-CoV-2. Rotor-Gene – Bio-Speedy had the lowest Ct values as a kit-device pair. We found that Bio-Speedy kit gave lower Ct values than Diagnovital and Coronex kits in virus genome detection. We found that high viral load was associated with leukocytosis, high blood D-dimer levels and death. In our study, we examined age, gender, blood CRP, D-dimer, leukocyte, lymphocyte and neutrophil values. We found

that advanced age, clinical status of the patient and high blood neutrophil percentage could be used to predict the risk of death.

Results: Real-time PCR device can give different results in different target genes, sample types, devices and kits. Trials should be made in each new study protocol and commercial kits or devices should be tested for performance before being used in diagnosis. In addition, strict implementation of isolation precautions in asymptomatic patients is very critical in preventing contagiousness due to the high viral load seen in this patient group.

Keywords: SARS-CoV-2, Viral Load, PCR, COVID-19



1. GİRİŞ

SARS-CoV-2, Coronaviridae ailesine ait tek zincirli, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür [1]. İlk kez 2019 yılında Çin'in Wuhan şehrinde tespit edilmiş, sebep olduğu COVID-19 ise Mart 2020'de WHO tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir [2].

COVID-19, hâlâ etkin bir tedavisi olmaması ve yüksek bulaştırıcılığı sebebiyle dünya genelinde sağlık sistemlerini zorlayan bir enfeksiyondur. Virüs primer olarak solunum yollarını tutmakla birlikte gastrointestinal sistemi, karaciğeri, merkezi sinir sistemini de etkileyebilmektedir. Hastalık, bazı komorbidite durumlarında (astım, DM, HT, böbrek hastalığı) ve 60 yaş üstünde daha ciddi seyretme eğilimindedir. Virüsün bulaştırıcılığının yüksek olması da morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır [3].

COVID-19'da temel hedef bulaştırıcılığı önlemek ve hastalığa karşı etkili klinik yaklaşımları tanımlamaktır [4]. Bulaşı önlemek ve erken tedaviyi sağlayabilmek için enfekte kişilerin erken ve doğru tespiti, dolayısıyla güvenilir bir tanı yönteminin belirlenmesi önem arz etmektedir. Bir numunede bulunan bir hedef geni çoğaltmak için kullanılan bir teknik olan PCR, patojenin genomunu hedeflediği için spesifik ve güvenilirdir. Real-time RT-PCR (Reverse transkriptaz PCR), WHO tarafından COVID-19 tanısında önerilen yöntemdir [5]. Ancak PCR, uygulandığı koşullara göre verimliliği etkilenebilen bir testtir. Farklı termal cykler cihazları kullanılarak yapılan PCR'larda farklı sonuçlar olup olmayacağının değerlendirilmesi, tanı laboratuvarlarına bu konuda ışık tutacaktır.

Alınan numunelerde PCR testiyle belirlenen düşük Ct (cycle threshold) değerleri yüksek viral yük ve hastalığın ağır seyretmesi ile ilişkilidir [6]. Bu sebeple Ct değerini veya aralığını bildirmek klinik kararları daha iyi yönlendirebilir [7]. Ct değerlerinin yanında, hastalığın ağırlığının göstergesi olabilecek bazı kan değerleri de bildirilmiştir. COVID-19 inflamatuvar immun yanıt oluşturarak sitokin fırtınasına sebep olur [4]. Proinflamatuvar sitokin salınımı ve aşırı inflamatuvar cevap, ARDS ve yaygın doku hasarına ve böylece ölüme götürebilir. Buna işaret olabilecek bazı kan değerleri; lenfopeni, artmış nötrofil/lenfosit oranı, trombositopeni, CRP artışı, D dimer artışı, LDH artışı, ALT ve AST artışı, ferritin artışı, kreatinin artışıdır [8].

Çalışmamızda farklı termal cykler cihazları ve farklı PCR kitleri kullanılarak uygulanan Real-time PCR çalışmalarında farklı sonuçlar alınıp alınmayacağını görmeyi amaçladık. Böylece çalışmamızın, laboratuvarlarda kullanılan farklı Real-time PCR koşullarının, aynı örnekler için olası sonuçları hakkında laboratuvar uzmanlarına fikir vereceğini düşünüyoruz.

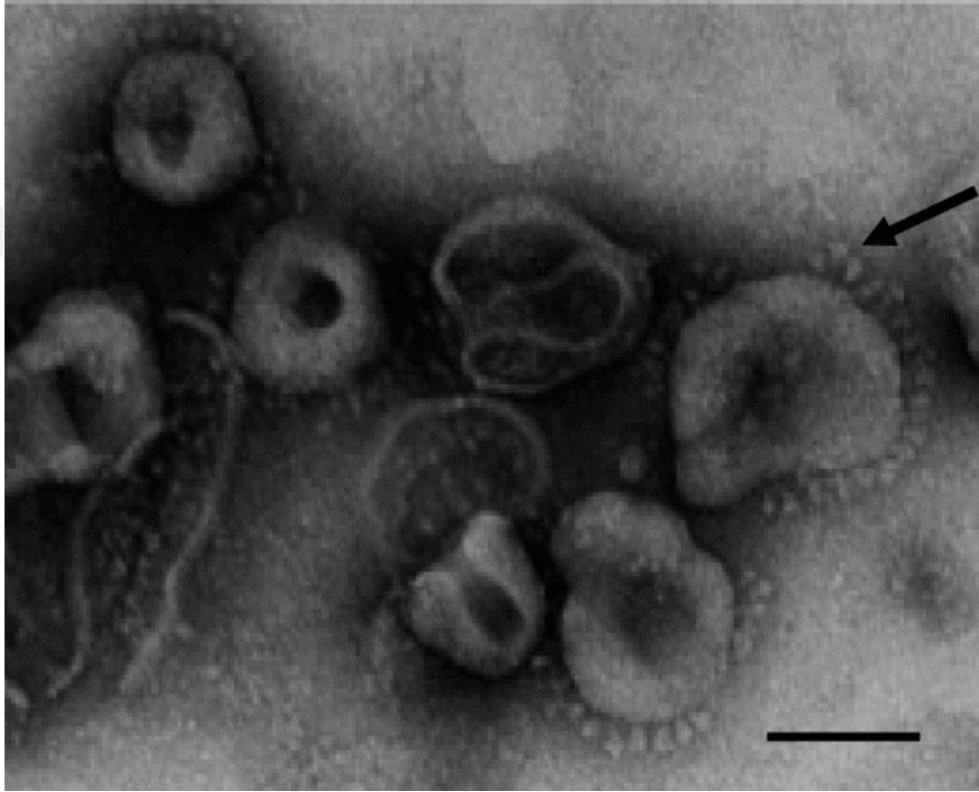
Bunun yanısıra, PCR sonuç raporunda kalitatif sonuç vermenin yanında Ct değeri de bildirmek klinisyenin hastanın prognozu hakkında fikir sahibi olmasına katkıda bulunacaktır. Hastanın bazı kan değerlerinin bilinmesinin de klinisyeni hasta yönetiminde yönlendirebileceğini düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Coronaviridae ailesi zarflı, yaklaşık 125 nm çapında, yüzeyinde virüse taç görünümünü veren Spike proteinleri bulunan virüslerden oluşur. Virüs corona (taç) ismini, bu çıkıntılardan alır. Pozitif polariteli, tek zincirli RNA'ya sahiptir [9].



Şekil-1: Koronavirüsün elektron mikroskopundaki görüntüsü. Oklar, virion yüzeyindeki çıkıntıları göstermektedir [10].

Koronavirüsler (CoV) Nidovirales takımı, Coronaviridae ailesi, Orthocoronavirinae alt ailesinde bulunmaktadır. Koronavirüsler genetik ve antijenik farklılıklara göre 4 cinse ayrılmaktadır: alfakoronavirüs (α -CoV), betakoronavirüs (β -CoV), gamakoronavirüs (γ -CoV) ve deltakoronavirüs (d-CoV) [11].

Alfa ve betakoronavirüsler genellikle insanlarda solunum yolu enfeksiyonu, hayvanlarda gastroenterit yapar. Alfakoronavirüsler içinde insan koronavirüsü (HCoV)-229E ve HCoV-NL63 bulunurken, Betakoronavirüsler içerisinde HCoV-OC43, HCoV-HKU1, Severe Acute Respiratory Syndrome human coronavirus (SARS-HCoV), Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus

(MERS-CoV) ve SARS-CoV-2 bulunur. Gamakoronavirüslerde balina ve kuş gibi hayvanlarda hastalık yapan bazı koronavirüsler bulunur. Deltakoronavirüsler domuzlardan ve kuşlardan izole edilmiştir [12].

Tüm koronavirüsler hayvanlardan köken almaktadır. SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-229E ve HCoV-NL63'ün yarasalardan, HCoV-OC43 ve HKU1'in kemirgenlerden köken aldığı düşünülmektedir. Evcil hayvanlar, ara konak olarak doğal konaklardan insana geçişte önemli rol oynayabilirler [13].

Koronavirüsler kuşlarda, kedilerde, köpeklerde, atlarda ve başka hayvanlarda da görülebilmekte hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık yapabilmektedir. Solunum yollarını, bağırsakları ve karaciğeri etkileyebilen, nörolojik bulgulara yol açabilen enfeksiyonlara sebep olabilirler [14]. 2002 yılına kadar koronavirüsler genellikle hafif enfeksiyonlara sebep olan viral etkenler olarak bilinirken, 2002 yılında ortaya çıkan SARS ve 2012'de ortaya çıkan MERS salgınlarına, yüksek patojeniteye sahip koronavirüs suşları sebep olmuştur [13]. İnsanlarda mevsimsel grip etkeni olarak HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HCoV-HKU-1 türleri söylenebilir [9].

2.2. Koronavirüslerin Proteinleri

Koronavirüslerde genomun üçte ikisi replikaz genlerini kodlamaktadır. Bu genler tarafından üretilen iki büyük poliprotein olan pp1a ve pp1ab proteolize uğrayarak 15 veya 16 yapısal olmayan proteine (nsp - nonstructural protein) dönüştürülür. Genomun kalan üçte birlik kısmı ise yapısal proteinleri kodlayan ORF'lerden (open reading frame - açık okuma bölgesi) oluşur. ORF'lerde aksesuar protein bölgeleri de bulunabilmektedir [15].

Koronavirüsün yapısal proteinleri 3 yüzey proteini olan Spike (S), Membrane (M) ve Envelope (E) proteinlerinden ve Nükleokapsit (N) proteininden oluşur. Bazı betakoronavirüslerde yüzey proteinlerine ek olarak hemagglütinasyon ve esteraz aktivitesi gösteren Hemagglutinin-esteraz (HE) proteini de bulunur. CoV genomunda bu proteinlerin genlerinin bulunma sırası (HE) S, M, E, N şeklindedir [16].

S proteini 180-200 kDa ağırlığında olan bir transmembran proteindir. Virüsün konak hücre reseptörüne tutunması ve konak hücresi ve virüs membranlarının birleştirilmesi S proteini ile sağlanır. Virüsü çevreleyen taç benzeri görünümü S proteini sağlar. Bunun yanı sıra S proteini nötralizan

antikorların hedefidir. S proteininin N-terminal ucu ekstrasellüler boşluğa bakarken, C-terminal ucu intrasellüler yüze bakar. Ekstrasellüler kısım S1 ve S2 olmak üzere iki alt üniteye ayrılır. S1 reseptör tutunmasından sorumlu iken, S2 membran füzyonunu sağlar. S1 alt ünitesinde N-terminal bölgesi (NTD) ve C-terminal bölgesi (CTD) bulunmaktadır. Bunlardan biri ya da ikisi de reseptör bağlayıcı kısım (RBD) olarak görev alabilir. Bazı istisnalar hariç, NTD şeker bazlı reseptörlere bağlanmayı sağlarken, CTD protein bazlı reseptörlere bağlanmayı sağlar [17].

S proteini sınıf I viral füzyon proteini olarak sınıflandırılmaktadır. Füzyondan sorumlu olan S2 alt ünitesi alfa helikal sekonder yapıya sahiptir. Füzyon peptitleri nokta mutasyonlara duyarlıdır, tek bir mutasyon dahi füzyonu inhibe edebilir [17].

M proteini virüste en fazla bulunan yapısal proteindir. Virüs zarfının şeklini sağlar. Diğer tüm yapısal proteinlerle etkileşime girmektedir. M proteinleri tek başına virion oluşumu için yeterli değildir. M proteinin N proteinine bağlanması, nükleokapsidi (N proteini-RNA kompleksi) stabilize ederek virüs oluşumunun tamamlanmasını destekler. M proteini ve E proteini birlikte viral zarfı oluşturur ve etkileşimleri VLP'lerin (virüs like particle) üretimini ve salınmasını sağlar [18].

Koronavirüslerdeki E proteini, virüsün morfogenezinde ve patogenezinde etkilidir. Zarf, fosforile N proteini ile kapsidlenmiş olan RNA genomunu çevreler. 74-109 aminoasitlik küçük proteinler olan E proteinleri, virüs ailesi içinde aminoasit sekans farklılıkları gösterebilmektedir. Virüs morfogenezi sırasında E proteini için mutlak gereksinim, virüs cinsine bağlı olarak değişir. E proteinleri ayrıca oligomerize olur ve iyon kanalları oluşturur [19].

E proteini, fareleri enfekte eden murine koronavirüsü (MHV) için virüs üretiminde gerekli değildir, ancak proteinin yokluğunda virüs üretimi önemli ölçüde azalır. Bu nedenle proteinin morfogenezi sırasında önemli bir rol oynadığını düşünülmektedir [20]. MERS' te E proteinin silinmesi replikasyon yapabilen, ancak yayılmada kusurlu virüslere neden olur. SARS CoV'da, E proteinin yokluğunda virüs salınımında 20 ila 200 kat azalma görülür [21].

Tüm koronavirüslerde N proteini aynı yapıya sahiptir. N proteinleri genomik RNA'ya bağlanarak helix yapıyı oluşturan fosforile proteinlerdir. N proteininin N-terminal bölgesi (NTD) RNA'ya bağlanmayı sağlarken, C-terminal bölgesi (CTD) hem RNA bağlanmasında hem de oligomerizasyonda etkilidir. N proteini koronavirüslerde viral RNA sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Gen transkripsiyonunda, interferon inhibisyonunda, konak hücre siklusu ve apoptozunda da etkili olabilmektedir [22].

Hemagglutinin-esteraz (HE) proteini bazı betakoronavirüslerde tespit edilen transmembran bir proteindir. Siyalik asit bağlayan hemagglutinin aktivitesi sayesinde S proteini için kofaktör görevi görür ve virion bağlanmasını kuvvetlendirir. O-asetillenmiş siyalik asitlerden asetil grubunu uzaklaştıran esteraz aktivitesi sayesinde virüslerin hücreden salınmasını da artırır [23].

Koronavirüslerde yapısal proteinler arasına dağılmış küçük ORF'ler bulunur. Bunlara aksesuar proteinler denir. Aksesuar proteinler koronavirüsler arasında farklılıklar gösterebilir. Bazı aksesuar proteinler virüs replikasyonunda kullanılsa da, bu proteinlerde mutasyon olması CoV'ların konak hücrede çoğalmasını ve viral patogenezi etkilemektedir [16].

2.3. Önemli Koronavirüsler

2.3.1. IBV

Avian İnfeksiyöz Bronşit Virüsü (IBV) 1937 yılında keşfedilmiştir. Bulunan ilk koronavirüs olup, gamakoronavirüs cinsi içindedir [24].

Üst solunum yolu silli epitel hücrelerini enfekte ederek üst solunum yolu enfeksiyonuna sebep olur. Solunum yolu dışında birçok epitelde de çoğalabilmekte, böbrek ve gonadlarda da hastalık yapabilmektedir [25].

IBV kanatlılarda hastalık yapar, oldukça bulaşıcıdır. Dünya genelinde birçok serotipi tanımlanmıştır. Viral genomda gerçekleşen mutasyonlar ve rekombinasyonlar sebebiyle sürekli yeni serotipler ortaya çıkmaktadır. Bu durum tanıyı ve kontrolü oldukça zorlaştırmaktadır. Serotiplendirmede S1 glikoprotein geni kullanılır [26].

2.3.2. Hafif Seyirli İnsan Koronavirüsleri

İnsanları enfekte ettiği bilinen 7 farklı CoV suşu vardır: HCoV-229E (229E) HCoV-OC43(OC43), SARS-CoV, HCoV-NL63 (NL63), HCoV-HKU1, MERS-CoV ve 2019'da yüksek bulaştırıcılığı ve düşük patojenitesiyle Çin'de ortaya çıkan SARS-CoV-2 [27, 28].

229E, OC43, NL63 ve HKU1 insanlarda primer olarak üst solunum yolunda ve gastrointestinal sistemde görülür. Hafif seyredilebilirlikle birlikte, bronşit ve pnömoniye ilerlediği durumlar olabilmektedir [29]. İnsandan insana yayılırlar [30].

Alfakoronavirüs olan 229E ve betakoronavirüs olan OC43, üst solunum yolu enfeksiyonlarında sık görülen etkenlerdir. Enfeksiyonlarında halsizlik, baş ağrısı, burun akıntısı ve boğaz ağrısı görülür. Ateş ve öksürük de olabilmektedir. Dünyada yaygın olarak bulunan bu virüsler, diğer solunum yolu enfeksiyonu etkenlerinden klinik olarak ayırt edilemez. İmmün yetmezliği olan bireylerde, çocuklarda ve yaşlılarda pnömoniye ilerleyebilir. Ortalama inkübasyon süresi yaklaşık 2-5 gündür. Hastalık 2-18 gün sürebilmektedir [31-33].

2.3.3. SARS-CoV

SARS-CoV, 2002-2003 yıllarında görülen Çin başlangıçlı ağır solunum yolu enfeksiyonu salgınının etkenidir [34]. Kısa sürede Doğu Asya'da yayılmış, dünyada 28 bölgede görülmüştür. 8098 kişiyi enfekte eden virüs 774 kişinin ölümüne sebep olmuştur [35]. Araştırmalar Çin'deki nalburunlu yarasaların (horseshoe bats) bu virüs için doğal konak olduğunu göstermiştir. Misk kedileri ise ara konak olarak görülmektedir [36].

Damlacık inhalasyonu ile alınan SARS-CoV trake, bronş, bronşiol ve alveol epitel hücrelerini invaze eder [37]. Anjiyotensin-converting enzim 2 (ACE2) reseptörünü kullanır ve primer olarak silyalı bronşiyal epitel hücrelerini ve tip 2 pnömositleri tutar [13].

SARS-CoV ile enfekte hastalar başlangıçta ateş, kas ağrısı, baş ağrısı, halsizlik bulguları gösterir. 5-7 gün sonra balgamsız öksürük, dispne, solunum sıkıntısı görülebilir ki bu da ARDS ve ölümle sonuçlanabilir [38]. Hastalığın ilerleyişi hakkında fikir verebilecek en önemli faktörün ileri yaş (>60 yaş) olduğu görülmüştür [39].

2.3.4. MERS-CoV

MERS-CoV 2012 yılında Suudi Arabistan'da ortaya çıkıp halen devam etmekte olan bir ağır solunum yolu enfeksiyonu salgınının etkenidir [40]. Yarasalardan orijin aldığı düşünülen bu virüs develerden insanlara geçmekte, insanda dipeptidil peptidaz 4 (DPP4) enzimini kullanarak silyasız bronşiyal epitel hücrelerini ve tip 2 pnömositleri enfekte etmektedir [13].

Enfeksiyon asemptomatik geçirilebilir ya da ARDS ve böbrek yetmezliğine ilerleyen ağır pnömoni görülebilir. Ölen hastaların %75'inde en az bir komorbidite görülmüştür [41]. 2021 Mart'a kadar toplam 2574 vaka bildirilmiş, bunların 886'sı mortal seyretmiştir [42]. SARS-CoV-1'in fatalitesi yaklaşık %11 iken, MERS-CoV'un fatalitesi yaklaşık %36'dır [43].

2.4. SARS-CoV-2

Koronavirüslerin betakoronavirüs cinsine ait olan bu virüs, tüm koronavirüsler gibi zarflıdır (60-140 nm). Yüzeyinde ayırt edici çıkıntılar vardır ve pozitif polariteli tek zincirli RNA taşır [44]. Yeni nesil dizileme çalışmaları sonucunda bu virüs ile SARS-CoV arasında %79.0, MERS-CoV arasında %51.8 nükleotid özdeşliği bulunmuştur [45].

Genomik yakınlığa bakıldığında, SARS-CoV-2 için doğal konağın yarasalar olduğu düşünülmektedir. Ancak virüsün ilk ortaya çıktığı Huanan deniz ürünleri pazarında yarasa satılmaması, muhtemelen virüsün başka ara konaklarının olduğuna işaret etmektedir [46].

SARS-CoV-2'nin insandan insana geçişi SARS-CoV ve MERS-CoV'a kıyasla daha yüksek olmakla birlikte, ölüm oranı daha düşüktür [47]. Bulaştırıcılığın bir göstergesi olarak kullanılabilen R_0 değeri, enfekte olan bir bireyin enfektif ajanı kaç kişiye bulaştırdığını ifade eder. Bu değer ülkelere, milletlerin kültürlerine, salgının zamanına göre değişmektedir. Salgının ilk zamanlarında ölçülen değer 2.2 olarak bulunmuştur [48]. $R_0 > 1$ salgının devam ettiğini gösterirken, $R_0 < 1$ sona gelindiğini ifade eder [49].

2.4.1. SARS-CoV-2 Epidemiyolojisi

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde etyolojisi bilinmeyen toplum kökenli bir atipik pnömoni salgını bildirilmiştir. İlk vakalar, şehirdeki Huanan deniz ürünleri pazarı ile ilişkilendirilmiştir [50]. Bu pazardan alınan 585 numunenin 33'ünde SARS-CoV-2 saptanmıştır [51]. Ancak 1 Ocak 2020'den önce görülen vakaların %45'inin bu marketle bir teması olmamıştır [52].

Ocak 2020'nin sonlarına gelindiğinde Çin'in 31 şehrinde, Doğu Asya'da, Avrupa'da ve ABD'de vakalar bildirilmiştir. Nisan itibarıyla vakalar bir milyonu geçmiş, çoğu ülke bölgesel ya da ülke çapında karantina kararı almıştır [53].

Tablo-1: COVID-19'un ortaya çıkışından pandemi ilan edilmesine kadarki süreç [53].

Tarih	Durum	Toplam Vaka	Toplam Ölüm
1 Aralık 2019	Çin'in Wuhan şehrinde ilk vakanın semptomları başladı.		
31 Aralık 2019	Wuhan sağlık otoriteleri tarafından bilinmeyen etyolojiye sahip 27 atipik pnömoni vakası bildirildi.	27	0
1 Ocak 2020	Huanan deniz ürünleri pazarı kapatıldı.		
7 Ocak 2020	Wuhan'daki bir hastanın bronkoalveolar lavaj örneğinden yeni bir koronavirüs tanımlandı.		
10 Ocak 2020	Yeni koronavirüsün taslak genom analizi yayınlandı.		
11 Ocak 2020	İlk ölüm Wuhan'da bildirildi.	41	1
12 Ocak 2020	Yeni viral pnömoni, WHO tarafından geçici olarak 2019 Yeni Koronavirüs (2019-nCoV) Enfekte Pnömoni (NCIP) olarak isimlendirildi.		
13 Ocak 2020	Tayland'da, Çin dışında ilk kez bir vaka bildirildi.		
23 Ocak 2020	Wuhan'da tüm toplu taşımalar durduruldu.	845	25
30 Ocak 2020	WHO bu salgını uluslararası öneme sahip bir halk sağlığı acil durumu olarak duyurdu.	9,823	213
2 Şubat 2020	Çin dışında görülen ilk ölüm Filipinler'de bildirildi.	17,391	362
8 Şubat 2020	COVID-19 sebepli toplam ölüm sayısı, SARS'ın neden olduğu ölüm sayısını geçti.	37,552	813
11 Şubat 2020	Virüs, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. WHO, virüsün sebep olduğu hastalığı COVID-19 olarak isimlendirdi.	45,134	1,115
2020 Şubat Ortaları	Güney Kore'de, Japonya'da, İtalya'da ve ABD'de salgın görüldü.		
11 Mart 2020	WHO COVID-19'u pandemi olarak ilan etti.	126,335	4,627

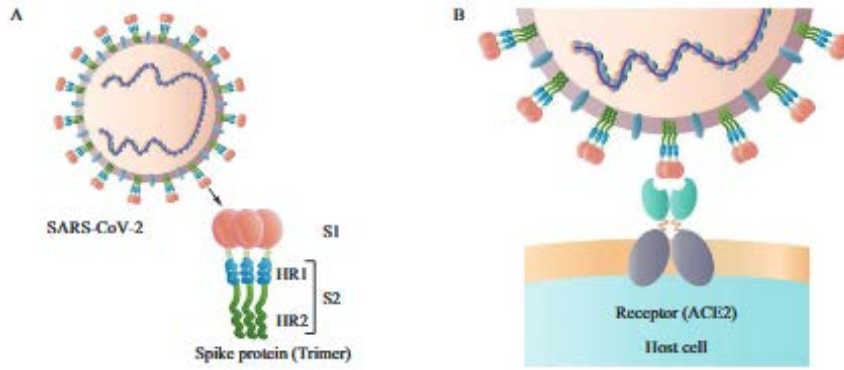
Virüsün yol açtığı hastalık olan COVID-19 (coronavirus disease-19), Mart 2020'de WHO tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir [2].

2.4.2. SARS-CoV-2 Proteinleri

Tüm genomun üçte ikisini oluşturan ORF1ab, pp1ab proteinini kodlar. Bu protein proteolitik yolla 16 nsp'ye ayrılır. Bu proteinler virüs replikasyonunda önemli rol oynarlar [44]. Genomun 3' ucuna doğru ise S, M, E ve N yapısal proteinleri bulunur [54].

Virüs yüzeyindeki trimerik S glikoproteininin reseptör bağlayan bölgesi (RBD), insan ACE2 reseptörlerine bağlanır ve hücreye girişi sağlar [55]. Ardından S1 ve S2 subünitelerine ayrılır. ACE2'nin peptidaz domainine bağlanan RBD, S1 subünitesinde bulunur. S2 subünitesi ise membran füzyonunu sağlar [56]. RBD hem konak seçimini hem virüs tropizmini hem de enfektiviteyi belirleyen kritik bir bölgedir. Bu bölgede meydana gelebilecek bir mutasyon, reseptöre bağlanmada önemli değişikliklere sebep olabilir. Diğer koronavirüslerden genomik ayırım, RBD bölgesine bakılarak yapılabilir [55]. S1 alt ünitesinde bulunan N-terminal domain (NTD) ve RBD nötralizan antikoların hedefi olabilmektedir [57].

Proteinin S1 ve S2 alt ünitelerini birbirine bağlayan PRRA adı verilen bölgedeki mutasyonlar, hayvan modellerinde patojenisiteyi azaltabilmektedir ve bu sebeple canlı atenüe aşılarda geliştirilmesinde önemli olabilir [58].



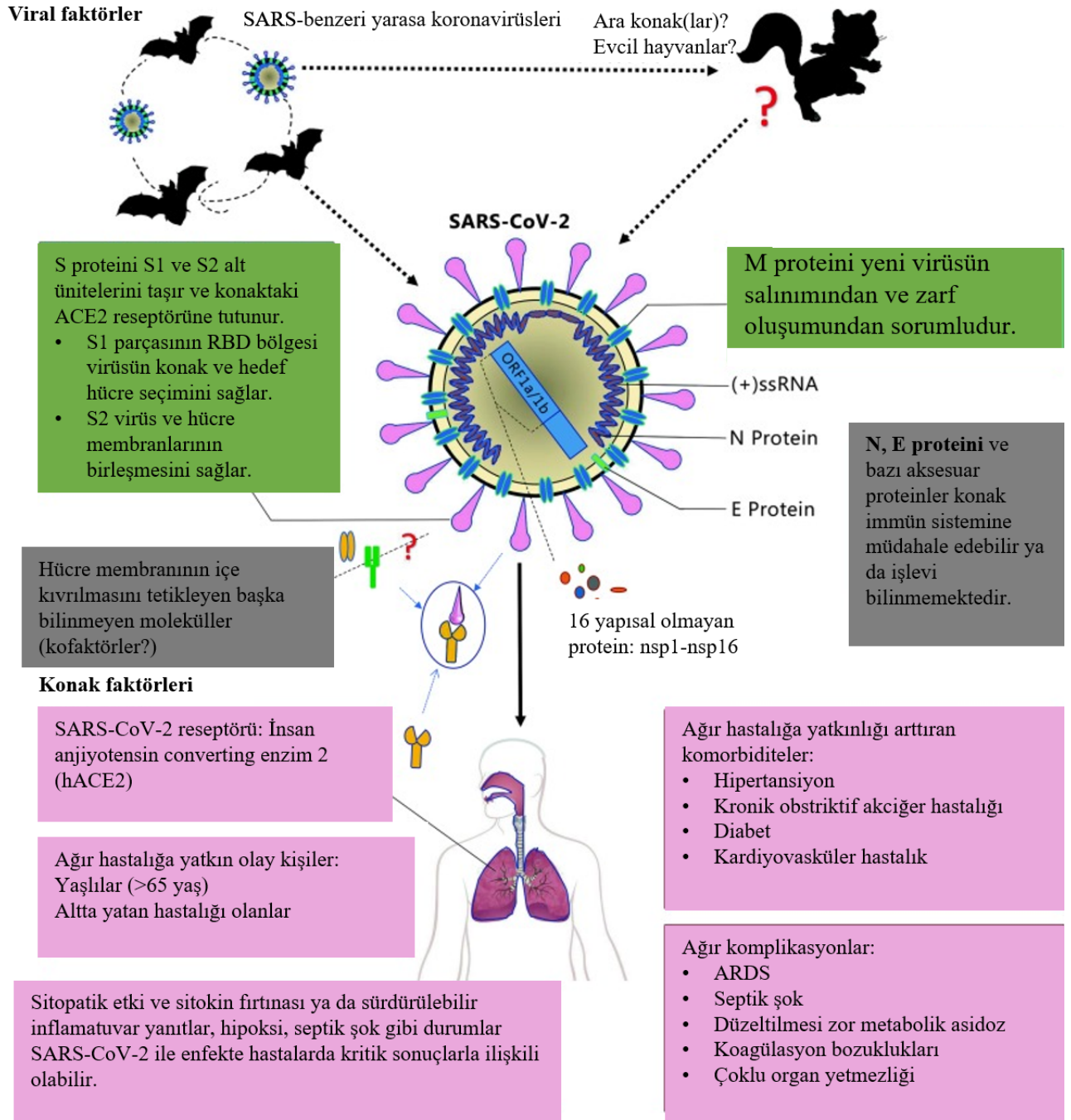
Şekil-2: SARS-COV-2'nin şematik yapısı. A: S proteininin yapısı; B: S proteini ile konak hücrenin ACE2 reseptörü arasındaki ilişki [59].

E proteini katyonlara yönelik viroporin oluşturarak, virüs oluşumunda ve tomurcuklanmada etkili olur. Konak inflamasyonunu uyardığı ve virülansta da etkili olduğu düşünülmektedir. Bazı koronavirüslerde yapılan deneylerde, E proteininin yokluğunun zayıflatılmış virüslerin sayısını arttırdığı, kanal aktivitesini ortadan kaldıran E mutasyonlarının ise virüs patojenisitesini düşürdüğü görülmüştür. Bu sebeple E proteini potansiyel bir antiviral ilaç hedefi ve aşı adaydır [57].

M proteini zarfta bolca bulunmaktadı. M proteininin viral morfogenezi sağlamının yanında, interferon supresyonuna sebep olarak viral replikasyonu arttırdığı görülmüştür [60].

SARS-CoV-2 N proteini, diğer CoV N proteinleriyle aynı yapıdadır. N proteininde iki yapısal bölge olan N-terminal domain (NTD) ve C-terminal domain (CTD) bulunur. Bu iki domain birbirine LKR (central linker region) ile bağlıdır. NTD RNA bağlanmasından sorumluyken, CTD RNA bağlanmasından ve dimerizasyonundan, LKR ise NTD ve CTD'nin RNA bağlamasını düzenlemekten sorumludur [61].

N proteini, viral genomik RNA'yı bağlayarak ribonükleoprotein (RNP) oluşturacak şekilde RNA'yı paketler. Virüs oluşumunun yanı sıra, viral mRNA transkripsiyon ve replikasyonunda, hücre iskeletinin oluşturulmasında ve immün regülasyonunda da görev alır. N proteini ayrıca hem humoral hem de hücreyel immün yanıtı indükleyebilir. Tüm bu işlevler bu proteini tanı ve aşı geliştirilmesinde önemli kılmaktadır [62].



Şekil-3: SARS-CoV-2 patojenezine etki eden virüse ve konağa ait faktörler [46].

Yarasalar çoğu koronavirüsün rezervuarıdır. Buna SARS-CoV'lar da dahildir. SARS-CoV-2 yarasalardan ya da bilinmeyen ara konaklardan kaynaklanarak insanlara geçiyor olabilir. Virüs-konak etkileşimi virüsün hücreye girişini ve çoğalmasını etkiler. Resmin üst kısmı: viral faktörler. SARS-CoV-2 zarflı, pozitif anlamlı tek zincirli RNA (ssRNA) virüsüdür. Viral RNA'nın üçte ikisi ilk ORF bölgesindedir (ORF 1a/b) ve 16 nsp'yi kodlar. Virüs genomunun kalan kısmı ise dört yapısal protein olan spike (S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsit (N) proteinlerini ve bazı aksesuar proteinleri kodlar. S glikoproteini virüsün konak hücre reseptörü olan ACE2'ye tutunmasını sağlar. Bu adım virüsün hücreye girişinde kritiktir. SARS-CoV-2'nin endositoz ile hücreye alınmasını

sağlayan membran invajinasyonunu hangi moleküllerin tetiklediği ise halen bilinmemektedir. Diğer virüs proteinleri patogeneze katkıda bulunabilir. Resmin alt kısmı: konak faktörleri. Bu faktörler de enfeksiyona yatkınlığı ve hastalık sürecini etkileyebilir. Daha yaşlı ve altta yatan hastalığı olan insanlar hastalığı şiddetli geçirme riskine sahiptir. RBD: reseptör bağlayan bölge [46].

2.4.3. SARS-CoV-2 Varyantları

Pandemi başlangıcından bu yana, SARS-CoV-2 genomunda çok sayıda mutasyon meydana gelmiştir ve çok sayıda yeni varyant ortaya çıkmıştır. CDC tarafından VOC (Variants of Concern – endişe verici varyantlar) olarak adlandırılan varyantlardaki mutasyonlar ağırlıklı olarak S proteinindedir. Bu mutasyonların artmış enfektiviteye ve doğal immüniteden ve aşı ile indüklenen nötralizan antikor yanıtından kaçış yeteneğinin artmasına neden olduğu düşünülmektedir [63].

Meydana gelen ilk önemli mutasyonlardan biri, S proteinindeki D614G nokta mutasyonudur. Bu varyant ilk kez 2020 Ocak ayının sonlarında Almanya ve Çin’de görülmüş, ardından tüm dünyaya yayılmıştır. Yeni varyantın enfektivitesi ve insan dokusundaki viral replikasyonu artmıştır, ancak artmış enfektivite ölüm oranlarını arttırmamıştır [59].

B.1.1.7 (Alfa) varyantı ilk kez Aralık 2020’de İngiltere’de görülmüştür. 8 adet S proteini ve D614G mutasyonunu da kapsayan 17 mutasyona sahip olan bu varyantın S proteininin RBD bölgesinin ACE2’ye olan afinitesinin arttığı gösterilmiştir [64].

Kasım 2020’de Amerika’nın New York şehrinde B.1.526 varyantı tanımlanmıştır. Varyant tanımlandıktan kısa süre sonra şehirde ve çevre şehirlerde hızla artmıştır. Bu varyant S proteininde E484K ve S447N mutasyonları taşımaktadır. E484K mutasyonunun virüs nötralizasyonunu azalttığı deneylerle ortaya konulmuştur [65].

B.1.351 suşu (Beta varyantı) 2020 yılının sonlarında Güney Afrika’da tanımlanmıştır. Bu varyantın, S proteininin RBD bölgesindeki E484K ve K417N’yi de kapsayan birçok mutasyonu bulunmaktadır. Varyantın nötralizasyonunda azalma gösterilmiştir [66].

Şubat 2020’de Brezilya’dan B.1.1.28 varyantı bildirilmiştir. Bu varyant grubunda tanımlanan Gama varyantı, Brezilya’dan Japonya’ya seyahat eden turistlerde görülmüştür. Bu varyant, artmış enfektivite ve azalmış antikor nötralizasyonu ile daha ağır seyretme eğilimindedir [59].

2020'nin sonlarında Hindistan'da B.1.617.2 varyantı (Delta) görülmüştür. Delta varyantı S proteininde birçok mutasyon barındırmaktadır. Bu varyant artmış bulaştırıcılığa sahiptir. Hastalığın daha ağır seyretmesine ve tedavi etkinliğinin düşmesine neden olmaktadır. Virüs mutasyonlarından biri olan L452R mutasyonunun, konak immün yanıtı kaçırmayı sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Varyant, aşılarla orijinal virüse göre daha düşük yanıt oluşturmaktadır [59, 67].

Kasım 2021'de Güney Afrika'da bir gezginde ortaya çıkan B1.1.529 (omicron) varyantının, aslında açıklanan ilk vakadan bir hafta önce Hollanda'da görüldüğü sonradan ortaya çıkmıştır. Omicron varyantı aralık ortasına doğru tüm dünyada 80 ülkede tespit edilebilir duruma gelmiştir. Tüm SARS-CoV-2'ler içinde en çok mutasyona sahip olan varyant omicrondur. Omicron varyantının bulaştırıcılığı ve reinfeksiyon riski daha yüksektir. COVID-19 aşılarıyla elde edilen immüniteye karşı kısmî dirence sahiptir [67].

2.4.4. SARS-CoV-2 Bulaş Yolları

Diğer mevsimsel koronavirüslerde olduğu gibi, SARS-CoV-2'nin vücuda asıl bulaş yolu nazal ve oral bölgedir. Ancak diğer virüslerin neden olduğu enfeksiyonlarda görülen burun akıntısı ve hapşurma, bu virüste pek görülmez. Ayrıca SARS ve MERS enfeksiyonlarının aksine, sıklıkla olfaktör epitelin tutulumuna bağlı koku alamama görülür [68].

ACE2 reseptörü tükürük bezlerindeki epitel hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilmektedir. Bu reseptörü eksprese eden hücreler virüs için hedef hücreler olması sebebiyle, oral kavite virüs için giriş yolu olabilmektedir. Semptomlar başlamadan önce dahi virüsün tükürükte saptanabilmesi, asemptomatik hastaların tükürük damlaları ya da aerosol yoluyla yüksek bulaştırıcılık riskine sahip olmasına sebep olmaktadır [69].

Korneada, limbal ve konjonktival epitelde ACE2 reseptörleri bulunmaktadır. Yapılan bazı hayvan deneylerinde, konjonktival yolla virüs ile enfekte edilen deneklerde enfeksiyon geliştiği görülmüştür. Bu da COVID-19 enfeksiyonu için gözün de bir bulaş yolu olabileceğini düşündürmektedir. COVID-19 hastalarının gözyaşı ve konjonktival örneğinde virüs tespiti ihtimali oldukça düşüktür ve tespit edilse dahi, bu tespit çoğunlukla enfeksiyonun ilk aşamasındadır [70]. Göz ile bulaş ihtimali oldukça düşük olsa da, COVID-19 için yüz siperliği ve gözlük kullanımı dünya genelinde yaygınlaşmıştır [71].

SARS ve MERS salgınlarında dışkı örneklerinde virüs saptanması sebebiyle, COVID-19 salgının başlarında gastrointestinal yolun da virüsün vücuda girebileceği bir yol olabileceği düşünülmüştür [72, 73]. Özefagus epitelinde ve ileum ve kolon enterositlerinde ACE2 tespit edilmiştir [74]. Mide bulantısı, kusma ve ishal semptomlarının COVID-19'da görülebiliyor olması bu düşünceyi destekler. ACE2, bağırsakta önemli ölçüde eksprese edilmektedir [75].

Nazofarengeal sürüntü örnekleri negatifleştikten sonra dahi rektal sürüntülerde virüs saptanabilmesi, virüsün yayılmasında gastrointestinal yolun önemli olduğunu, hatta fekal oral bulaşın önemli bir bulaş yolu olabileceğini gösterir [76].

2.4.5. Patogenez ve İmmünite

ACE2 reseptörleri, vazokonstriksiyon ile kan basıncını ayarlayan anjiyotensin hormonunun maturasyonunda rol oynamaktadır. Bu reseptörler akciğerlerde, kalpte, böbrekte ve bağırsakta bulunur [56]. SARS-CoV-2 hedef hücreye viral S proteini ile ACE2 reseptörlerine tutunarak girer. Reseptöre tutunan S proteini, konak transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) ile iki alt üniteye ayrılır [77]. S1 alt ünitesi RBD ile tutunmayı sağlarken, S2 alt ünitesi virüs ve hücre membranının füzyonunu sağlar. Füzyonun ardından, viral genomik RNA sitoplazmaya salınır. RNA, pp1a ve pp1ab poliproteinlerini sentezler ve çift membranlı bir vezikülün içinde replikasyon-transkripsiyon kompleksini (RTC) oluşturur. RTC art arda replike olarak subgenomik RNA'ları sentezler. pp1a ve pp1ab gen bölgeleri yapısal olmayan proteinleri kodlarken, subgenomik RNA'lar aksesuar ve yapısal proteinleri kodlar. Yeni oluşmuş genomik RNA, N proteinleri ve E proteinleri, endoplazmik retikulum ve golgi aracılığıyla bir araya gelerek veziküller oluşturur. Bu veziküller plazma membranıyla füzyona uğrayarak virüsün dışarı salınımını sağlar [46].

SARS-CoV-2'nin S proteininde meydana gelecek mutasyonlar virüsün tropizmini, enfektivitesini ve öldürücülüğünü etkileyebilir [59].

SARS-CoV-2 konak hücrede piroptozise (inflamasyon ile ilişkili programlı hücre ölümü) neden olabilir. Ayrıca virüs, makrofaj ve T hücrelerinin bölgeye göç etmesine ve burada proinflamatuvar sitokinler salınmasına neden olabilir. Bazı konaklarda bu durum IL2, IL7, TNF-alfa gibi sitokinlerin fazlaca artmasıyla sitokin fırtınasına ilerleyebilir ve multi-organ hasarı ve septik şok görülebilir [78].

COVID-19 enfeksiyonu süreci, solunum yollarında 3 klinik faza ayrılabilir. Asemptomatik fazda enfeksiyon burunda sınırlı kalır ve doğal immün sistem ile elimine edilir. Hafif semptomatik vakalarda enfeksiyon genellikle büyük havayollarının yalancı çok katlı epitelindedir ve daha güçlü bir doğal immün yanıt ile elimine edilmeye çalışılır. Bronşiolerde kulüp hücrelerinin de dahil olduğu enfeksiyonlar daha ağır seyredebilir. Üçüncü durumda ise enfeksiyon alveollere inmiştir. ACE-2 eksprese eden tip 2 pnömositler ve muhtemelen tip 1 pnömositler enfekte olmuştur. Bu durumda tip 2 hücrelerin kaybı, sürfaktan eksikliği, alveol ödemi sebebiyle solunum sıkıntısı meydana gelir. Tip 2 hücreler, tip 1 hücrelerin progenitörü olduğu için akciğerin tamiri duraksar. Hücre hasarı sebebiyle akciğere biriken sıvı geri emilemez, plazma proteinleri alveolar boşluğa geçer. Hiyalin membranları ve inflamatuvar eksuda alveolleri doldurarak ARDS'ye sebep olur [79].

COVID-19 bu hasarın yanında, damarlarda endotel hasarına ve trombüs oluşumuna sebep olabilir [80].

2.5. COVID-19'da Klinik

COVID-19 hastalarında sık görülen semptomlar halsizlik, ateş, öksürük, koku veya tat kaybı ve baş ağrısıdır. Bazı hastalarda diyare, bulantı ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomlar da görülebilmektedir [59].

COVID-19 hastalarının bir kısmı enfeksiyonu asemptomatik geçirmektedir. Bu asemptomatik hasta oranı üzerine yapılan metaanalizler incelendiğinde büyük farklılıklar görülebilmektedir. Semptomatik olan hastalara bakıldığında hastaların %40'ı hastalığı hafif, %40'ı orta şiddette geçirmektedir. Hastaların yaklaşık %15'inde ise oksijen desteği gerektiren ağır hastalık görülür. Hastaların %5'i solunum yetmezliği, ARDS, sepsis, tromboemboli, çoklu organ yetmezliği gibi komplikasyonların görüldüğü ciddi hastalardır. Bu oranlar genel oranlar olup, bölgeden bölgeye değişmektedir [81].

Çocuklar enfeksiyonu erişkinlere göre daha asemptomatik ya da daha hafif geçirme eğilimindedir. Nadir olmakla birlikte ciddi bir tablo olan, çocuklarda görülebilen çoklu sistem inflamatuvar sendromu (MIS-C), çoklu organ yetmezliği ve şok ile sonuçlanabilmektedir. Çocuklarda da erişkinlerde de altta yatan hastalık olması, ağır hastalık riskini artırır. Bu hastalıklar arasında kardiyovasküler hastalık, diyabet, kronik akciğer hastalıkları, immün süpresyon durumları sayılabilir [81].

Çoğu hastada hastalık sürecinde nörolojik semptomlar bulunabileceği unutulmamalıdır. Nörolojik belirtiler solunum semptomları olmadan dahi görülebilir. Bu belirtiler arasında anksiyete, depresyon, uyku problemleri, baş ağrısı, baş dönmesi, koku veya tat alma bozukluğu, myalji, deliryum, ensefalopati, inme bulunur. Hastaneye yatan hastalarda en sık görülen nörolojik bulgu anksiyete ve depresyondur [81].

2.5.1. Akciğer Tutulumu

COVID-19'da en sık etkilenen organ akciğerlerdir. Tutulumu durumunda sıklıkla görülen belirtiler öksürük, nefes darlığı ve ateştir [82, 83].

SARS-CoV-2, alveolar makrofajları aktive ederek sitokin salgılatır ve T hücre aktivasyonuna sebep olur. Sağlıklı bir immün sistem, virüsün vücuda girişine hızla cevap vererek virüsün eliminasyonunu sağlar. Aşırı immün yanıt ise kemokin ve sitokinlerin çok fazla salınımına (sitokin fırtınası) bağlı, hastada sistemik hasara neden olmaktadır. Artmış sitokinler ARDS'ye, çoklu organ hasarına neden olur [84]. Bu şiddetli tutulumda oksijen tedavisine dirençli ciddi hipoksi, akut hipoksik solunum yetmezliği ve ölüm görülebilir [82].

2.5.2. Akciğer Dışı Organ Tutulumları

Gastrointestinal tutulum: Gastrointestinal tutulumun muhtemel mekanizmasının fekal oral bulaş olduğu düşünülmektedir [85]. En sık gastrointestinal tutulum belirtileri bulantı, kusma, ishal ve karın ağrısıdır. Hastalarda ilk bulgular genellikle akciğer tutulumuna ait olsa da, nadiren solunum semptomlarından önce gastrointestinal tutulum bulguları başlayabilmektedir [48]. Bir çalışmada gastrointestinal semptomları olan hastalarda karaciğer hasarı ve ağır hastalık gelişme riski daha yüksek bulunmuştur [86]. Sindirim semptomları olan hastalar, solunum semptomları olanlara kıyasla daha uzun süre viral saçılım gösterebilmektedir [87].

Karaciğer tutulumu: Karaciğer ve safra kanalı hücrelerinde de ACE2 reseptör ekspresyonu görülmektedir. COVID-19'da karaciğer hasarının kolanjiyosit hücrelerinin disfonksiyonu, ilaç hasarı ve artmış sistemik immün yanıt sebebiyle gerçekleşiyor olabileceği düşünülmektedir [88].

COVID-19'un karaciğer tutulumuna dair yaygın belirtiler arasında serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) ve bilirubin seviyelerindeki yükselmeler bulunur. Albümin seviyelerinde ise düşüş görülür [89]. Bu değişimler hastalığın ağır seyri için prognostik faktörler olarak düşünülmektedir [90].

Kardiyovasküler tutulum: Kardiyak tutulum sonucu kardiyak aritmiler, perikardit, miyokardit görülebilir. Daha ağır durumlarda akut koroner sendrom ve kalp yetmezliği ile karşılaşılabilir [91]. Önceden kardiyovasküler hastalığı olan kişilerde ağır hastalık gelişme riski daha yüksektir [92]. Vasküler hasar sonucu tromboza eğilim ve pulmoner emboli görülebilir. Akut renal hasar, beyinde enfarktüs ve kanamalar da olası komplikasyonlar arasındadır [71, 93].

Santral sinir sistemi tutulumu: COVID-19 hastalarında görülen nörolojik belirtiler arasında baş ağrısı, baş dönmesi, koku alamama bulunur. Daha ağır olarak akut inme, konfüzyon ve bilinç bulanıklığı ile karşılaşılabilir. Akut inflamatuvar demiyelinizan polinöropati (Guillain-Barre sendromu), meningoensefalit, akut nekrotizan ensefalopati görülebildiği de rapor edilmiştir [94].

Viremi: Yatan hastaların kanında viral RNA %28 ila %32 oranlarında bulunabilmekle birlikte, yoğun bakım üniteleri özelinde bakıldığında bu oran %78'e çıkmaktadır. Plazma viral yükü ilk 10 gün pik yapar, sonrasında düşer. Ancak bu düşüş hasta prognozundan bağımsızdır. Virüs kanda tespit edilebilmesine rağmen, birçok çalışmada tespit edilen virüs hücre kültüründe üretilmemiştir. Bu da virüsün kan yoluyla organlara yayılımının olmadığını düşündürmektedir. Tespit edilen viral RNA, hasarlı epitel hücrelerinden kana salınan viral RNA'ya bağlı olabilir [71].

Post COVID sendromu: Alternatif bir açıklama olmaksızın 12 haftadan uzun süren fiziksel veya nöropsikiyatrik semptomların olması durumudur. Bu durum hastalığın ağırlığından bağımsız gelişmektedir. Hastaların çoğunda, hastalığın iyileşmesinden sonra en az bir rezidü semptom kalabilmektedir. Bu geçmeyen semptomlar sıklıkla nefes darlığı, miyalji, anksiyete, halsizlik ve uyku bozukluğu olma eğilimindedir [95].

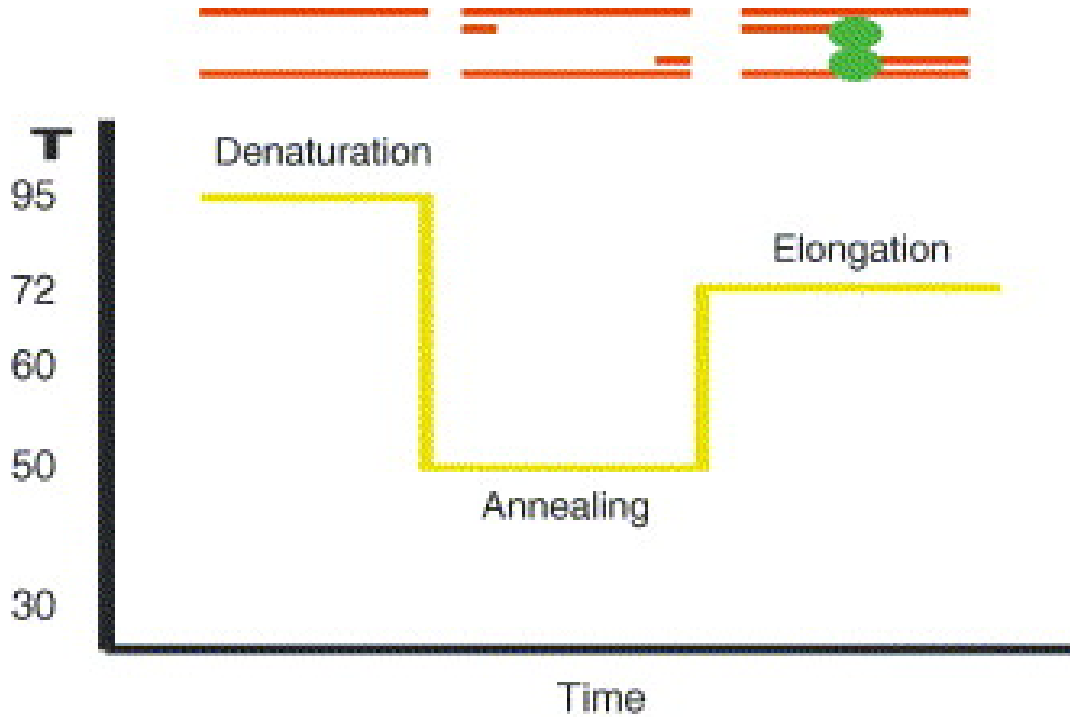
2.6. COVID-19 Tanısı

2.6.1. Moleküler Tanı

PCR testi DNA dizilerini çoğaltmak amacıyla sıcaklık döngülerinin kullanıldığı bir tekniktir. PCR yöntemi 1980'lerin başlarında geliştirilmiştir. Buluşun ardından hızla birçok alanda kullanılmaya adapte edilen bu yöntem DNA sekanslama, mutasyon tespiti, cDNA ve genomik DNA klonlamada kullanılmaktadır [96].

COVID-19 salgınının sürveyansı ve kontrolünde güvenilir tanı testleri oldukça önemli bir yer tutmaktadır [97]. Antijen ya da antikor gibi biyomarkerlardansa, doğrudan virüsün kendi genomunu ölçmesi sebebiyle, SARS-CoV-2 tanısında Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) testi altın standarttır [98]. RT-PCR, genomik RNA tespiti için geliştirilmiş bir PCR yöntemidir. Oldukça güvenilir ve hızlıdır [99].

Klasik PCR testlerinde çoğaltılacak bir hedef bölge için iki oligonükleotid primeri, dNTP'ler, ısıya dayanıklı polimeraz enzimi ve magnezyumlu tampon çözelti kullanılır. Teknik, sıcaklık döngüleri ile uygulanır. Önce sıcaklık yükseltılarak çift zincirli DNA'nın zincirlerinin ayrılması sağlanır (melting). Çift zincirler tamamen ayrılmalıdır, çünkü kısmen ayrılan yapılar sıcaklık düşürüldüğünde hızla tekrar birleşir ve primerler hedef bölgeye bağlanamaz. Ayarlanacak erime sıcaklığı ve süresi, kalıp DNA'nın uzunluğuna bağlıdır. Bu aşamanın ardından sıcaklık düşürülerek, primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır (annealing). Annealing sıcaklığı primerlere bağlıdır ve genellikle iki primerin erime sıcaklığından birkaç derece düşüktür. Bu sayede primerlerin sadece hedef dizilere bağlanması sağlanmaya çalışılır. Ardından, çoğu PCR protokolünde polimeraz enzimi olarak kullanılan Taq polimerazın optimum sıcaklığı olan 72 °C'de primerlerin uzatılması sağlanır ve döngü tamamlanır [100]. Amplifiye DNA'nın geleneksel tespiti, etidyum bromür kullanılarak çoğaltılmış dizilerin elektroforezi ve bantların ultraviyole ışıkla incelenmesi ile yapılır [101].



Şekil-4: PCR sıcaklık döngüsü. (Denaturation) sıcaklık 95 °C'ye çıkartılarak DNA'nın erimesi sağlanır, (Annealing) sıcaklık düşürülerek primerlerin bağlanması sağlanır, (Elongation) sıcaklık 72 °C'ye getirilerek polimerazın primerleri uzatması sağlanır [100].

PCR testlerinde yanlış pozitifliğe neden olabilen kontaminasyon, yaygın karşılaşılabilen bir sorundur. Kontaminasyon, çoğaltılacak hedef dizinin reaksiyona karışması ile meydana gelir. Testte

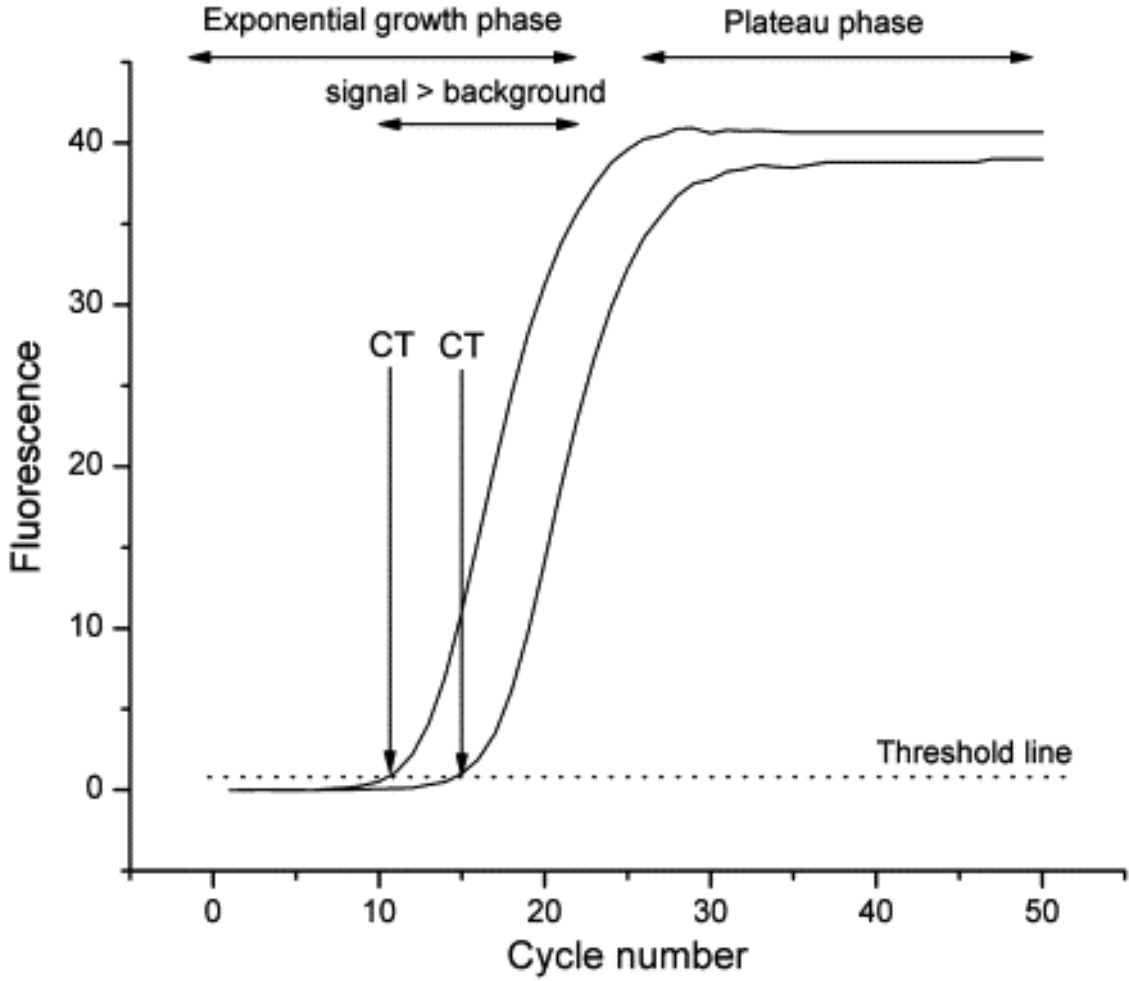
kullanılan ekipmandan, çözeltilerden veya çalışandan kaynaklanabilir. Kontaminasyonu kontrol etmek için, PCR’da yapılan her çalışmada içinde genom bulunmayan bir negatif kontrol kullanılmalıdır. Negatif kontrolde bir amplifikasyon ürününün ortaya çıkması kontaminasyonu gösterir. Bu durumda test DNA’larını içeren tüm reaksiyonlarda elde edilen amplifiye ürünler şüpheli hale gelir. Kontaminasyon durumunda kaynağı tespit etmekle vakit kaybetmek yerine, tüm solüsyonlar ve reaktifler ve tüm tek kullanımlık malzemeler atılmalı, aletler dekontamine edilmelidir. Olası kontaminasyonları önlemek için ise PCR işlemi, yalnızca PCR uygulanırken kullanılacak olan ekipmanlar ile birlikte ayrı bir odada yapılmalı, mümkünse ultraviyole (UV) ışık kullanılmalıdır [96].

PCR yönteminin çeşitli amaçlarla modifiye edilmiş uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin nested (iç içe) PCR metodu, PCR testlerinin spesifikliğinin artırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemde iki çoğaltma aşaması uygulanır ve iki farklı primer çifti seti kullanılır. Birinci set primer çifti, ilk çoğaltma aşamasında kullanılır. Elde edilen DNA dizileri üzerinde ikinci primer çifti kullanılarak ikinci bir çoğaltma işlemi uygulanır. İkinci çoğaltmada elde edilen DNA dizisi, birinciden daha kısadır. Bir başka uygulama, touchdown PCR tekniğidir. Çoğaltılmak istenen hedef gen diziliminin daha spesifik olarak saptanması sağlanır. Bu amaçla primerlerin bağlanma sıcaklığı çok yüksek tutulur. Bu sıcaklık her döngüde 1°C azaltılır ve 10 döngü sonra aynı sıcaklıkta 20-25 döngü daha uygulanır. Ters (inverse) PCR tekniğinde, bilinen DNA dizileri aracılığıyla bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılması amaçlanır. Kanca (anchored) PCR tekniğinde, DNA parçasının bir ucunun baz dizilimi bilinmekte, diğer ucun baz dizilimi aranmaktadır. Genelde virüslerin gen dizilimlerinin saptanmasında kullanılır. COVID-19 tanısında kullanılan RT-PCR tekniğinde RNA çoğaltılır. Bu teknik kullanılarak viral RNA, tRNA veya mRNA çoğaltılabilir [102]. Multiplex real-time PCR’da aynı reaksiyonda birden fazla primer seti kullanılarak birden fazla kalıp çoğaltılır. Böylece tek çalışmada birçok etken taranabilir [103].

RT-PCR testlerinde ilk aşamada RNA, reverse transkripsiyon enzimi kullanılarak tamamlayıcı DNA’ya (cDNA) dönüştürülür. Elde edilen cDNA, spesifik primerler ve floresan ile işaretli hidroliz problemleri kullanılarak, PCR yöntemiyle çoğaltılır. Spesifik primerler, amplifikasyonun sadece genomun seçilmiş bölgesine uygulanmasını sağlar. Problemler ise seçilmiş gen bölgesinin her başarılı çoğalmasında floresan sinyaller üreterek kantitatif sonuç elde edilmesini sağlar [104].

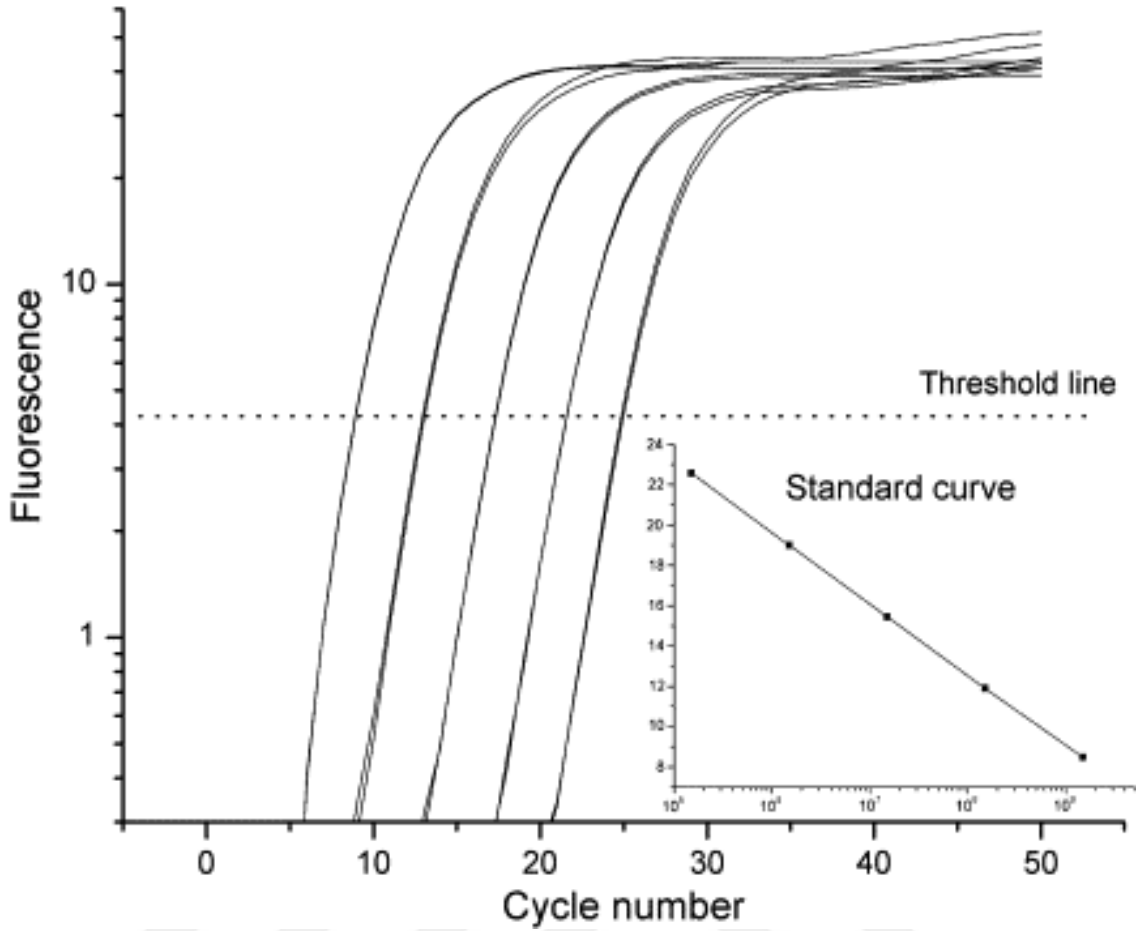
İlk döngülerde oluşan sinyaller zayıftır. Ürün (amplikon) arttıkça, oluşan sinyal katlanarak artar. Primerlerin, problemlerin ya da dNTP’lerin tükenmesiyle, oluşan bu sinyaller doygunluk noktasına ulaşır. Bu doygunluk noktası tüm RT-PCR deneylerinde aynı seviyededir. Bu sebeple bu noktadaki ölçümler, başlangıçta bulunan hedef molekül miktarı hakkında bir fikir veremez. Ancak bu sinyallerin

zamanla oluşturduğu eğri ile bir fikir edinilebilir. Farklı numunelerin belirli bir eşik floresan sinyal seviyesine (threshold) ulaşması için gereken amplifikasyon döngüsü sayısı farklıdır. Bu eşığe ulaşmak için gereken döngü sayısına Ct (cycle threshold) değeri denir. Ct değeri, numunelerde başlangıçta bulunan kalıp miktarı hakkında fikir edinmek için kullanılabilir. Ct değerinin daha yüksek olması eşik değere daha geç ulaşıldığını, dolayısıyla başlangıçta daha az kalıp genom olduğunu gösterir [100].



Şekil-5: RT-PCR eğrileri. Bir threshold seviyesi belirlenir ve bu seviyeye ulaşılması için gerekli olan döngü sayısı (Ct) saptanır [100].

Bir PCR testinin verimliliği, saflaştırılmış hedef diziyi içeren bir standardın seri seyreltilmesiyle oluşturulacak standart eğrisine bakılarak tahmin edilebilir [100].



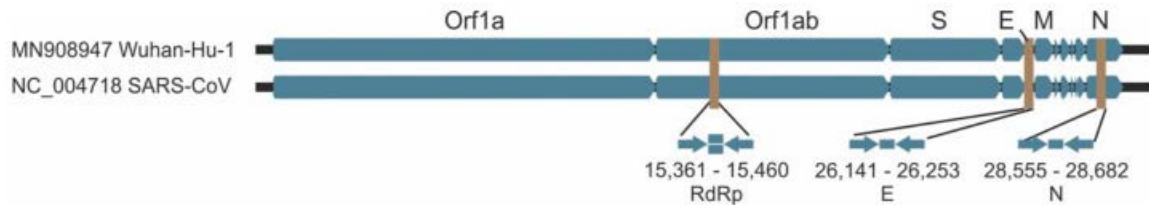
Şekil-6: Real-time PCR standart eğrisi. 5 standart örneği için logaritmik olarak çizilmiş yanıt eğrileri gösterilmektedir. Standart eğrisindeki eşik çizgisi ile kesişen noktalar Ct değerleridir [100].

Real-time PCR tekniğinde amplikon, amplifikasyon işlemi esnasında takip edilebilir. Bu takip, floresan moleküllerle işaretli primerler, probalar ya da amplikonlar ile sağlanır [105]. Real-time PCR tekniği ile kalıp genom kantitasyonu yapılabilmektedir. Bu kantitasyon relative (göreceli) veya absolute (kesin) şekilde yapılabilir. Relative kantitasyon, ilgili bir kalıpla karşılaştırıldığında, bir hedef dizinin miktarındaki değişiklikleri tanımlar. Absolute kantitasyonda ise hedef dizinin tam miktarı verilebilir [106].

Genellikle relative kantitasyon yeterli bilgi sağlamaktadır ve uygulaması daha basittir. Ancak bir enfeksiyonun sürecinin takibinde, klinikte, laboratuvarında, kısacası her alanda ortak olarak kullanılan belirli bir birimle kantitasyon vermesi sebebiyle absolute kantitasyon daha yararlıdır. Yine standart olarak kullanılacak bir reagent olmadığında, aktif ve kronik enfeksiyonun ayrımını yapmak için viral yükün kullanılması gerektiğinde ve virüs seviyelerindeki değişimi göstermek için sıralı numune bulunmadığında da absolute kantitasyon kullanışlı olacaktır.

Aktif enfeksiyon süreci, virüs-konak etkileşimi ve antiviral tedaviye yanıt hakkında viral yük kullanışlı bir göstergedir ve tedavi süreci üzerinde etkili olabilir. Bazı hastalıklarda viral yükün, hastalığın ağır seyriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple virüsün varlığı ya da yokluğunun yanı sıra kantitasyonunun da verilmesi, viral reaktivasyonu ya da hastalığın uzun seyredecek olmasını öngörmeye faydalıdır. Örneğin organ nakli sebebiyle immün süprese durumda olan hastalarda gelişen CMV enfeksiyonlarında, tedavinin başarılı olduğunu göstermede kalitatif PCR tespiti kullanılsa da, tedaviye cevabın izlenmesinde kantitatif PCR kullanılması tercih edilir [103].

PCR testlerinde tanı için hedef genlerin doğru seçilmesi kritiktir. COVID-19 tanısı için kullanımda olan çoğu kit, duyarlılığı ve özgüllüğü en üst düzeye çıkarmak için iki veya daha fazla gen hedefi içerir. Kullanılan bu hedefler arasında E geni daha yüksek duyarlılığa sahipken, N, S ve RdRP genleri daha yüksek özgüllüğe sahiptir [97].



Şekil-7: SARS-CoV-2 tespitinde RT-PCR’da kullanılabilecek amplicon hedef bölgeleri. S: Spike glikoproteini, E: Envelope proteini, M: Membran proteini, N: nükleokapsit; ORF: open reading frame; RdRp: RNA-bağımlı RNA polimeraz [98].

Viral RNA genellikle semptom başlangıcından 2-3 gün önce saptanabilir seviyeye gelir. Semptomların başlamasıyla, genellikle ilk hafta pik yapar ve izleyen haftalarda düşüş gösterir. Asemptomatik hastalarda yüksek viral RNA saptanabilmesi, bu bireylerin de virüsü bulaştırabildiğini göstermektedir. Viral RNA’nın saptanma süresi hastadan hastaya değişebilmektedir. Semptom başlangıcından sonra 83. hatta 104. gün üst solunum yolu örneklerinde viral RNA saptanan hastalar mevcuttur [107]. Bu hastalarda bulaştırıcılık olup olmadığı hakkında bize fikir verebilecek bir yöntem, virüs kültürüdür. Virüsün kültürde izole edilebilmesi, bulaştırıcılığın devam ettiğini düşündürmektedir. 15. günden sonra ağır hastalardan virüsün kültür izolasyonunun yapılabilirliği %5’ten daha düşük olmakla birlikte, ileri yaş, komorbidite, uzamış yatış süresi gibi durumlarda bulaştırıcılık uzayabilmektedir [108].

COVID-19 enfeksiyonunda semptomların ilk haftasında üst solunum yolu örneklerinde saptanan viral yük, alt solunum yolu örneklerinde saptanandan genellikle daha yüksektir. Üst

solunum yolu örneği olarak orofarengal ve nazofarengal sürüntü örneği kullanılması önerilmektedir. İlk haftadan sonra alt solunum yolu örnekleri pozitifleşmeye başlar. Bu sebeple üst solunum örneğinin negatif geldiği ve klinik şüphenin devam ettiği durumlarda alt solunum yolu örneği (balgam, endotrakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj) alınabilir [81]. Alt solunum yolu örneklerinin duyarlılığı diğer numunelerden yüksektir. Nazofarengal sürüntülerin duyarlılığı ise orofarengal sürüntülerden daha yüksektir [47]. Ancak nazal polip ya da nazal septum deviasyonu gibi durumlarda nazofarengal sürüntülerde yalancı negatiflik görülebilmektedir [109].

PCR yöntemi tanıda altın standart olmakla birlikte, negatif sonuç COVID-19 hastalığını dışlamamaktadır. Numune düşük kalitede ise, enfeksiyonun geç veya çok erken döneminde toplanmış ise, uygun olmayan şekilde taşınmışsa ya da testte teknik bir hata olmuşsa yanlış negatif sonuç saptanabilir. PCR testiyle üst solunum yolu örneğinde negatif sonuç bulunan ve kuvvetli klinik şüphesi bulunan hastalarda, ek alt solunum yolu örneği alınması düşünülmelidir [47].

RT-PCR, SARS-CoV-2 tespitinde en güvenilir yöntemdir. Ancak bir günde sınırlı sayıda test yapılabilmesi sebebiyle tüm nüfus taranamamakta, virüsün dünyadaki yaygınlığı hakkında net bir fikir elde edilememektedir. PCR yapılabilmesi için eğitimli personele ve donanımlı laboratuvara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunların yanı sıra, PCR testi vücutta etkisiz hale getirilmiş virüslerin genomunu da tespit edebildiği için, iyileşmiş hastalarda da pozitif sonuçlar verebilmektedir. PCR testini desteklemek için, viral proteinleri saptayan hızlı antijen testleri bazı durumlarda faydalı olabilir [98].

2.6.2. Serolojik Tanı

SARS-CoV-2 tespiti akut enfeksiyonda temel olarak viral nükleik asitin veya virüs antijenlerinin tespiti ile yapılırken, kronik enfeksiyonlarda viral antijenlere karşı oluşmuş antikorların saptanmasından yararlanılabilir [110].

Antijen testleri ucuz olması, kolay kullanımı ve hızlı sonuç vermesi sebebiyle COVID-19'da hızlı tanıyı, hızlı karantinayı ve bulaştırıcılığın önlenmesini, temaslıların hızla taranmasını sağlayabilir. Ancak nükleik asit amplifikasyon testlerine göre duyarlılıkları ve özgüllükleri düşüktür [81].

(Ct) ≥ 25 olduğunda veya semptom başlangıcından itibaren yedi günden fazla zaman geçtiğinde, antijen testlerinin duyarlılığının çok daha düşük olduğu gösterilmiştir. Hastalığın şiddetli

seyretmediği vakalarda, semptomların başlamasından sonraki 7., 8. veya 9. günlerde alınan sürüntülerden yapılan viral kültür çalışmalarında canlı virüsün saptanmamış olması, antijen testlerinin pozitifliğinin bulaştırıcılığı olan hastaların tespitinde oldukça etkili olabileceğini düşündürmektedir. RT-PCR testi ise canlı ve ölü virüsleri ayırt edememesi sebebiyle, bulaştırıcılık hakkında net bilgi verememektedir [111].

Antijen testleri enfeksiyonun ilk günlerinde oldukça etkili bir test olmasına rağmen, bulaşıcı olma ihtimali olan bazı hastaları gözden kaçırabilmekte ya da enfekte olmayan bireylerde yanlış pozitiflikler verebilmektedir [112].

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) önerisi, şüpheli vakalarda kullanılmak istenen antijen testlerinin referans bir nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) ile karşılaştırıldığında en az ≥ 80 duyarlılığa ve ≥ 97 özgüllüğe sahip olmasıdır. Antijen testinin negatif olduğu ancak yüksek klinik şüphenin bulunduğu vakalarda, mevcut olduğu durumda NAAT testi ile, mevcut olmadığına hızlı antijen testi ile 48 saat içinde tekrar test yapılmalıdır. Semptomların başlangıcının 5.-7. günlerinden sonra hastalarda daha az viral yük, antijen testlerinde daha fazla yalancı negatiflik görülebilmektedir. Toplumdaki PCR pozitifliği ≥ 5 değilse, tanıda antijen testi yerine NAAT kullanılması ya da pozitif antijen testinin NAAT ile doğrulanması daha doğru olacaktır [113].

Virüsün hızla mutasyona uğraması antijen testlerinin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır [98].

COVID-19 tanısında serolojik testler ile SARS-CoV-2'ye karşı oluşmuş antikorlar saptanabilir. Serolojik testlerden lateral akım immünoassay (LAI), enzim-bağlı immünosorbent assay (ELISA) ve kemilüminesan immünoassay (CLIA) bu amaçla kullanılmaktadır. Bu testler ile kullanılan kite bağlı olarak IgM, IgA, IgG veya total antikor saptanabilir [114].

Semptomların başlamasından yaklaşık 7-14 gün sonra çoğu hastada serum IgG saptanabilir düzeye gelmektedir. PCR ile doğrulanmış vakalarda, tanıdan sonra en az 4-6 ay IgG titreleri aynı kalmakta, IgA ve IgM titreleri ise hızla düşmektedir [115]. Bazı hastalarda IgG hiç oluşmayabilmektedir. Çok merkezli bir çalışmada, PCR ile tanısı konulmuş semptomatik hastaların %5'inde IgG oluşmadığı gösterilmiştir [116].

Hasta başı tanıyı sağlayan hızlı LAI testleri, hızlı tanı gerektiren durumlarda ve bulaşıcı hastalıkların yayılmasını engellemede oldukça önemli bir yer tutmaktadır. SARS-CoV-2'ye karşı oluşmuş antikorları tespit etmede kullanılabilen bu yöntemde, nitroselülöz bir membran üzerine

sabitlenmiş spesifik antikorlar kullanılır. Numune kuyucuğuna bırakılan numune ve dolayısıyla numunedeki hedef antikorlar, membran üzerinde hareket ederek nanopartiküller ile işaretlenmiş spesifik antikora bağlanır. Membranda bu şekilde ilerlemeye devam eden bu kompleks, test çizgisi bölgesinde capture antikorlarla bağlanarak durur. Meydana gelen bu duraklama, nanopartiküllerin aynı yerde yoğunlaşmasıyla test çizgisinde gözle görülür bir çizgi oluşmasına neden olur. Bağlanmayan işaretli antikorlar ise, membran üzerinde akmaya devam ederek kontrol çizgisindeki anti-insan antikorları tarafından yakalanır. Testin değerlendirilebilir olduğunun göstergesi olarak, kontrol çizgisi daima pozitif olmalıdır [117].

ELISA testlerinde, yüzeyi rekombinant viral antijenlerle kaplanmış plastik kuyucuklar kullanılır. Numune bu kuyucuklara eklenir. Numunede spesifik antikor bulunması durumunda antikor-antijen kompleksi meydana gelir. Bu kompleks üzerine eklenen enzim işaretli anti-insan antikorları ve enzime özgü substrat sayesinde renk değişimi meydana gelir ve spektrofotometre ile bu değişim okunur. CLIA testlerinin ELISA testlerinden farkı, işaretleme amacıyla enzim yerine kemilüminesan madde kullanılmasıdır. COVID-19 salgınının başlamasından bugüne kadar, dünya genelinde pek çok farklı antikor tespit kiti kullanıma girmiştir [98].

Lateral akımda kalitatif sonuç verilirken, ELISA ve CLIA’da kantitatif sonuç verilmektedir. Lateral akım testleri laboratuvar gerektirmez ve hasta başında hızlı bir şekilde uygulanabilir. ELISA ve CLIA testleri aynı anda daha fazla numunenin çalışılmasına izin vermektedir. Ancak bu testlerin çalışılması için laboratuvar ve deneyimli personel gerekmektedir [110, 118].

Serolojik testlerde çapraz reaktivite sonucu yalancı pozitiflik, antikorların geç oluşması sebebiyle enfeksiyonun erken döneminde yalancı negatiflik görülebilmektedir [98]. Akut enfeksiyon tanısında serolojik testlerin yararı kısıtlı olsa da, moleküler testlerin yapılamadığı veya sonucunun klinik durumu açıklamadığı durumlarda, post enfeksiyöz komplikasyonların etyolojisinde, aşı etkinliğinin değerlendirilmesinde ve toplum taramalarında başvurulabilir [118].

2.6.3. Klinik Bulgular

COVID-19 belirti ve bulguları oldukça değişkendir. Hastaneye başvurularda ateş, öksürük, halsizlik, nefes darlığı ve myalji sıklıkla görülür. Bazı vakalarda boğaz ağrısı, baş ağrısı, diyare, bulantı, kusma, koku ya da tat kaybı, baş dönmesi, nöbet gibi çok farklı bulgular görülebilir. Yaşlı ve immün yetmezlikli hastalarda ateş görülmeyebileceği, halsizlik, azalmış tepki, diyare, iştah kaybı,

konfüzyon gibi atipik semptomların olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çocuklarda ateş ve öksürük, erişkinlerdeki kadar sık görülmeyebilmektedir.

WHO rehberine göre ARDS, sepsis, septik şok görülen ya da mekanik ventilasyon (invaziv ya da non-invaziv) veya vazopressör tedavi gerektiren hastalar kritik COVID-19 hastalarıdır. Ağır hastalık tanımına ise oksijen saturasyonunun %90'ın altında olduğu, ağır pnömoninin görüldüğü, ağır nefes darlığı bulgularının olduğu durumlar girmektedir. Orta şiddette hastalıkta pnömoni bulguları vardır ve oksijen saturasyonu %90'ın üstündedir. Hafif hastalık ise pnömoni ya da hipoksi olmaksızın semptomatik hastalık olması durumudur. Oksijen saturasyonu değerlendirilirken hekimin dikkatli olması, şüphede kaldığı durumlarda hastalığı ağır hastalık lehine kabul etmesi önerilir [119].

2.6.4. Laboratuvar Bulguları

COVID-19 ateş, öksürük gibi hafif bir klinikten ARDS ve ölüme kadar uzanan geniş bir yelpazede seyredabilmektedir. Bu sebeple hastaları doğru yönetebilmek ve ölümcül komplikasyonları önleyebilmek ihtiyacıyla biyomarkereye yönelinmiştir. COVID-19'u şiddetli geçirenlerde ortak görülen yanıt, yüksek inflamatuvar yanıt sekonder sitokin fırtınasıdır. Ayrıca vaskülitte bağlı organ hasarı ve çoklu organ yetmezliği de görülebilmektedir. Bu kötüye gidişi öngörmede birçok çalışmada inflamatuvar veya koagülasyon yollarında görülen CRP, IL-6, prokalsitonin, lökositler (WBC), nötrofil miktarı ve nötrofil/lenfosit oranı, lenfosit miktarı, D-dimer, protrombin zamanı, aktif parsiyel tromboplastin zamanı ve hücre hasarında artışı gösteren laktat dehidrogenaz (LDH) ve transaminazlar değerlendirilmiş, bunların yalnızca birkaçının kötü prognozu tahmin etmede ve tedavi yanıtını öngörmede kullanılabileceği görülmüştür [120].

Pek çok çalışmada CRP'nin başlangıç değerleri ile hastalığın şiddeti arasında pozitif bir ilişki görülmüş, ayrıca CRP değerlerinin tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılabileceği düşünülmüştür [120]. Bir çalışmada CRP düzeyindeki her birim artış için hastalığın şiddetinde %5'lik bir artış riski bildirilmiştir [121]. Başka bir çalışmada COVID-19 sebebiyle ölenlerde CRP seviyeleri, hayatta kalanlardan 10 kat daha yüksek bulunmuştur [122].

Nötrofili ve lenfopeninin hastalık şiddeti ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak bu hücreler glukokortikoid tedavisi ve lenfoid dokuları etkileyen enfeksiyonlar gibi birçok faktörden etkilenebildiği için, oluşabilecek değişiklikler COVID-19'un şiddetine kesin olarak atfedilemez. Trombositopeni, hastalığın şiddetini öngörmede güvenilir bir biyobelirteç olarak kabul edilir. D-dimer düzeyleri ARDS gelişen ve ölen hastalarda daha yüksek

bulunmuştur. Hastalığın ağır seyrini ve mortaliteyi öngörmeye d-dimer kullanılabilmektedir. Ancak d-dimer düzeyinin ve trombositopeninin, CRP'den daha düşük prognostik doğruluğa sahip olduğu düşünülmektedir. Doku hasarıyla ilişkili yükselen LDH düzeyleri de ağır prognoz göstergesi olabilir.

Mekanik ventilasyon ihtiyacı olan, BT taramalarında akciğer hasarı görülen şiddetli hastalarda IL-6 bazal seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Ancak tedaviye yanıtın öngörülmesinde IL-6 düzeylerinin izlenmesi uygun görülmemektedir. Protrombin zamanı ağır hastalarda artmakla birlikte, ilk başvuruda çoğu hastada normal aralıkta olduğu için kullanımı tartışmalıdır [120].

Tablo-2: COVID-19 sürecinde değişen bazı biyobelirteçler [120].

İlişkili Olduğu Yer	Biyobelirteç
İnflamasyon	Artmış WBC düzeyi
	Artmış nötrofil düzeyi
	Azalmış lenfosit düzeyi
	Artmış nötrofil/lenfosit oranı
	Artmış monosit/lenfosit oranı
	Artmış eritrosit sedimentasyon hızı
	Artmış ferritin
	Artmış IL-2
	Artmış IL-8
	Artmış IL-10
Nekrozis	Artmış laktat dehidrogenaz
Kardiyak Hasar	Artmış NT-pro-BNP
	Artmış D-dimer
Karaciğer Hasarı	Artmış ALT
	Artmış AST
	Artmış GGT
	Artmış total bilirubin
Böbrek Hasarı	Artmış Kreatinin
	Artmış BUN
	Proteinüri
Kas Hasarı	Artmış CK
	Artmış myoglobin

Ağır COVID-19 hastalarında eozinopeni, lenfopeni, trombositopeni, artmış D-dimer seviyeleri görülebilmektedir. Monosit, eozinofil ve bazofil yüzdeleri de düşebilmektedir. Hafif hastalarda ise eozinopeni görülmemiştir [123].

2.6.5. Radyolojik Bulgular

Akciğerlerde buzlu cam ve bilateral ve periferik dağılımlı konsolidasyon, en yaygın BT bulgusu olarak saptanmıştır. Ekstrapulmoner radyolojik bulgu olarak ise damar duvarlarında kalınlaşma, karaciğer yağlanması, pankreas ve kalpte inflamasyon bulguları görülebilmekle birlikte, bunlar COVID-19'a özgül değildir. Beyin BT'de büyük pıhtılarla birlikte akut enfarktüsler ve kanamalar görülebilmektedir. Bunlar büyük ölçüde protrombotik duruma ve sitokin fırtınasıyla sonuçlanan bağışık yanıtı bağlıdır. Hastalığın uzun sürmesi ve yatışa bağlı komplikasyonlar ve hipertansiyon gibi ek hastalıklar da beyin hasarına neden olabilecek faktörlerdir [93, 124].

Hastalığı ağır geçiren vakaların çoğunda, semptomların başlangıcından üç ay sonra çekilen BT'de anormal bulgular görülmüştür. Bu bulgular çoğunlukla yaygın buzlu cam, retiküler patern ve bronşial dilatasyon olarak tespit edilmiştir [125].

BT, COVID-19 hastalarındaki göğüs BT bulgularının tipik olması sebebiyle vakaların erken dönemde teşhis edilmesinde oldukça faydalı olabilmektedir. Ayrıca RT-PCR'ın Bilgisayarlı Tomografi (BT) ile karşılaştırıldığında %60-71 olan düşük duyarlılığı ve her laboratuvarında çalışılmama durumu, COVID-19 tanısının gecikmesine neden olabilmektedir. Ancak BT bulgularının düşük özgüllüğü (%25) ve diğer viral pnömonilerden ayırt edilmesinin zorluğu sebebiyle, tek başına BT bulguları tanıda yeterli olmamaktadır. PCR ve BT verilerinin birlikte değerlendirilmesi, tanıdaki duyarlılığı ve karantinanın etkinliğini artırır [126].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul İzni

Bu araştırmaya, Harran Üniversitesi Tıp Fakóltesi Dekanlığının 07.06.2021 tarih ve 22621 sayılı onayı ve Harran Üniversitesi Tıp Fakóltesi Giriřimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun, çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına dair, 07.06.2021 tarih, 11 nolu oturum ve 30 sayılı onayı ile başlandı (Ek-1).

3.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

3.2.1. Cihaz

- Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- Bio-Rad CFX96 Real Time PCR cihazı (Bio-Rad, USA)
- Abbott m2000rt (Abbott Molecular Diagnostics, USA)

3.2.2. SARS-CoV-2 RNA Tespit Kitleri

- Bio-Speedy SARS-CoV-2 Double Gene RT-qPCR kit (Bioeksen Ltd, Istanbul, Türkiye)
- DS Coronex COVID-19 multiplex RT-qPCR tanı kiti (DS Bio and Nano Technology, Ankara, Türkiye)
- Diagnostical HS SARS-CoV-2 multiplex Real time PCR kit (RTA, Türkiye)

3.2.3. Ekipmanlar ve Sarf Malzemeleri

1. 1-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl mikropipet ve uyumlu pipet ucu (Brand, Almanya)
2. Vorteks (izolasyonda Isolab marka, miks aşamasında Scilogex marka)
3. vNAT taşıma besiyerli tp (Bioeksen, Ltd, Istanbul, Türkiye)
4. Swab (Orgamik, Türkiye)
5. Kilitli Şeffaf poşet
6. 3'l numune taşıma kabı
7. 2 ml eppendorf tüpleri (İsolab, Almanya)
8. BGD 2 kabin
9. Tek kullanımlık pudrasız eldiven

10. Tek kullanımlık önlük
11. Tek kullanımlık N95 maske (MFA, Türkiye)
12. -80 °C derin dondurucu

3.2.4. Kitlerin Çalışma Prosedürleri

Bio-Speedy tanı kiti için reaksiyon içeriğinde toplam hacim 20 µl olacak şekilde; reaksiyon başına 10 µl primer, 5 µl oligo ve 5 µl örnek alınarak 2 ml hacimli eppendorf tüpünde karıştırıldı. Çalışma kontrolü açısından her çalışmada 5'er µl pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Amplifikasyon koşulları;

- 52 °C 5 dakika (1 döngü)
- 95 °C 10 saniye (1 döngü)
- 95 °C 1 saniye + 55 °C 30 saniye (40 döngü) olacak şekilde kaydedilmiştir.

Bio-Speedy kiti Bio-Rad CFX96, Qiagen Rotor-Gene ve Roche LightCycler 96 Real-time PCR cihazları ile validedir. Ekstraksiyon yöntemi olarak vNAT (Bioeksen) solüsyonu ile validedir.

Coronex tanı kiti için reaksiyon içeriğinde toplam hacim 20 µl olacak şekilde; reaksiyon başına 12,5 µl mix E'den, 2,5 µl PP1'den, 5 µl örnekten alınarak reaksiyon oluşturuldu. Çalışma kontrolü açısından her çalışmada 5'er µl pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Amplifikasyon koşulları;

- 48 °C 10 dakika (1 döngü)
- 95 °C 2 dakika (1 döngü)
- 95 °C 5 saniye + 60 °C 10 saniye (35 döngü) olacak şekilde kaydedilmiştir.

Coronex kiti Magnetic Induction Cyler (MIC), Qiagen Rotor-Gene Q, Bio-Rad CFX96, Montania 4896 Real-time PCR ve LightCycler 480 (Roche) cihazları ile validedir. Ekstraksiyon yöntemi olarak kullandığımız vNAT solüsyonu ile ilgili validasyon bilgisine ulaşamamıştır.

Diagnovital tanı kiti için reaksiyon içeriğinde toplam hacim 20 µl olacak şekilde; reaksiyon başına 15 µl master mix, 5 µl örnek alınarak reaksiyon oluşturuldu. Çalışma kontrolü açısından her çalışmada 5'er µl pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Amplifikasyon koşulları;

- 45 °C 10 dakika (1 döngü)
- 95 °C 2 dakika (1 döngü)
- 95 °C 10 saniye + 55 °C 30 saniye (45 döngü) olacak şekilde kaydedilmiştir.

Diagnovital kiti Bio-Rad CFX96, Qiagen Rotor-Gene Q, Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Corbett Realtime PCR, BMS Mic, Applied Biosystem ABI 7500, Applied Biosystem ABI 7500 Fast, Applied Biosystem ABI StepOne, Applied Biosystem ABI StepOne Plus, Thermo Scientific Quant Studio 5, Slan Realtime PCR, Tianlog Gentier 96E, Tianlong Gentier 96R, Stratagene Mx3500p, Azure Biosystemleri Cielo 3 ve 6 real-time PCR sistemleri ile validedir. Ekstraksiyon yöntemi olarak kullandığımız vNAT solüsyonu ile ilgili validasyon bilgisine ulaşamamıştır.

Bio-Speedy ve Coronex kitleri SARS CoV-2'ye spesifik Orf1ab ve N genlerine yönelik primer ve prob miksleri içerirken, Diagnovital kiti N genini saptamaktadır. Her üç kit de internal kontrol olarak insan RNaseP genini hedef alan primer ve prob miksleri içermektedir.

3.3. Hasta Popülasyonu

Çalışmaya 2021 yılında Harran Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 46 COVID-19 hastasının orofarengeal/nazofarengeal kombine sürüntü örnekleri dahil edildi. Hasta seçimi etik kurul onayından sonra hastanemize COVID-19 şüphesi ile başvuran hastalardan alınan sürüntü örneklerinin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında, Bio-Speedy kiti ile Bio-Rad cihazında yapılan rutin COVID-19 PCR testi pozitif olan hastalar arasından rastgele yapıldı ve seçilen hastalardan yeni numune alındı. Çalışmaya dahil edilen hastaların 24'ü ayaktan, 15'i COVID servisinde yatan, 7'si yoğun bakımda yatan olmak üzere hastalar 3 gruptan oluşmaktaydı.

Çalışmadaki hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri ve WBC, nötrofil, lenfosit, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit, % eozinofil, D-dimer, CRP ve LDH değerleri hastane bilgi yönetim sisteminden (HBYS) elde edildi.

3.4. Örneklerin Toplanması ve İşlenmesi

Çalışmamızda 2021 yılında Harran Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 24'ü ayakta, 15'i COVID servisinde, 7'si yoğun bakımda yatan olmak üzere toplam 46 COVID-19 hastasından orofarengeal/nazofarengeal kombine sürüntü örnekleri alındı. Örneklerin transferi ve saklanması amacıyla, laboratuvarımızda rutinde kullanılan vNAT (Bioeksen Ltd, İstanbul, Türkiye) transfer tüpü kullanıldı.

vNAT transfer tüpünün içeriğinde viral nükleik asit ekstrakte edici ve koruyucu bir sıvı bulunmaktadır. vNAT içinde gelen hasta örnekleri vortekslendikten sonra doğrudan Real-Time PCR reaksiyonlarında kullanılabilir. Bu sebeple çalışmamızda RNA ekstraktları, üretici firma önerileri doğrultusunda örneklerin vNAT ekstraksiyon tamponu ile vortekslenmesiyle elde edildi.

Her bir örnek, yapılan bu işlemin ardından homojen bir şekilde 6 ayrı eppendorf tüpüne alındı ve hasta bilgileriyle etiketlenerek -80°C'de muhafaza edildi.

3.5. RT-qPCR Uygulanması

-80°C'de muhafaza edilen örnekler, çalışma yapılacağı gün çıkartılarak oda ısısına gelmeleri için bekletildi. Oda ısısına gelen örnekler SARS-CoV-2 tespiti için Bio-Speedy, Coronex ve Diagnostics kitleri yukarıda bahsedilen talimatlara uyularak Bio-Rad, Rotor-Gene ve Abbott RT-qPCR cihazlarında çalışıldı (Uygulanan protokoller için bkz. Başlık 3.2.4).

Tüm cihazlar ve kitler için her bir çalışmada iki negatif, iki pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol olarak tanı kitlerinin negatif kontrolleri ve ddH₂O (steril, nükleaz bulundurmeyen distile su) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak tanı kitlerinin pozitif kontrolleri kullanıldı.

Abbott ve Bio-Rad cihazlarındaki her çalışmada negatif kontroller için 96'lık platelerdeki ilk iki kuyucuk kullanıldı. Ardından her bir hasta art arda ikişer kez yüklenmek üzere 46 hasta için toplam 92 kuyucuk hazırlandı. Platedeki son iki kuyucuğa pozitif kontroller eklenerek platerler cihazlara yüklendi.

Rotor-Gene cihazı için 72'lik tüplerdeki ilk iki tüpe negatif kontroller, sonraki tüplere tekrarlı olmak üzere hasta numuneleri ve ardından iki pozitif kontrol konularak yükleme yapıldı.

Rotor-Gene cihazı 72'lik tüp ile çalıştığı için, bu uygulama ile her bir kit için ikişer yükleme yapıldı. Her yüklemde iki negatif, iki pozitif kontrol kullanıldı. Elde edilen Ct değerleri not edildi.

Bir örnekteki Ct değerinin başka bir örnektekinden daha yüksek olması, o örnekte başlangıçta daha az kalıp genom olduğunu ve eşik değere daha geç ulaşıldığını gösterir [100]. Yani düşük Ct değerleri yüksek viral yüke, yüksek Ct değerleri ise düşük viral yüke işaret eder. Aynı örneğin farklı cihaz ve kitlerde farklı Ct değerleri vermesi ise virüsün farklı koşullarda saptanabilme sürelerinin farklı olmasından kaynaklanır ve uygulanan koşulların performansını ortaya koyar.

3.6. Standart Lineer Eğrilerin Eldesi

Standart lineer eğrilerin eldesi ve kantitasyonda kullanılması amacıyla MOTAKK dış kalite kontrol programı kapsamında gönderilen CoV-2-K2201.03 Kodlu örnek kullanıldı (1.080.000 kopya/ml). Örnek ½ oranında 6 kez sulandırıldı ve sulandırmalar 6 kuyucuk halinde Rotor-Gene RT-qPCR cihazına Bio-Speedy tanı kiti kullanılarak yüklendi. Yüklemede, örneğin viral RNA yük miktarı her bir kuyucukta ½ oranında azaltılarak cihaza tanımlandı ve bu 6 kuyucuk kullanılarak standart lineer eğri cihazda elde edildi. Ardından bu standart lineer eğri, yine Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile çalışılan hasta örneklerine exporte edilerek, her bir örnek için SARS-CoV-2 viral RNA yükü elde edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tüm veri analizleri Windows için SPSS 24.0 (SPSS Inc, NY, ABD) ve JMP 14 programı kullanılarak yapıldı. Veriler (cihaz ve kitler için) sırasıyla Levene testi ve Shapiro Wilk testi ile varyansların eşitliği ve normallik varsayımı için istatistiksel olarak analiz edildi ($p > 0.05$). Daha sonra veriler (cihaz ve kitler için) GLM (General Linear Model) ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gruplar arasında farklılığın olup olmadığını belirlemek için analiz edildi.

İki değişken arasındaki ilişkinin yönünü ve büyüklüğünü belirlemek için Pearson korelasyon analizi uygulandı. Veriler ortalama ve standart hata olarak sunuldu. Önem düzeyi, tüm testler için $p < 0.05$ 'te değerlendirildi. Eksik gözleme sahip değişkenlere herhangi bir değer atanmadan (ortalama vs.) analizler yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini açıklamak için regresyon analizi uygulandı. Ayrıca diğer normal dağılım ve homojenlik varsayımları yerine gelmeyen veriler için Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis H testi kullanıldı. İki değişken

arasındaki ilişkinin yönünü ve büyüklüğünü belirlemek için Kendal tau-b katsayısı korelasyonu, nokta çift serili korelasyon, Sperman rank korelasyon analizi uygulandı [127, 128]. Veriler örnek sayısı, en küçük, en büyük, ortanca, ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Önem düzeyi, tüm testler için $p < 0.05$ 'te değerlendirildi. Ayrıca, örneklem büyüklüğü G*Power 3.1.9.4 ile analiz edildi. Etki boyutu 0.40, alfa 0.05 ve güç 0.80 olarak ayarlandığında etkileşim başına 9 birey gelmek suretiyle minimum toplam 81 örneğe ihtiyaç duyulduğu tespit edildi. Yani her bir cihaz ve kit seviyesi için 9 adet birey gereklidir. Sonuç olarak, alınan örneklem sayılarının popülasyonu temsil edebilecek büyüklükte olarak gözlemlenmiştir.



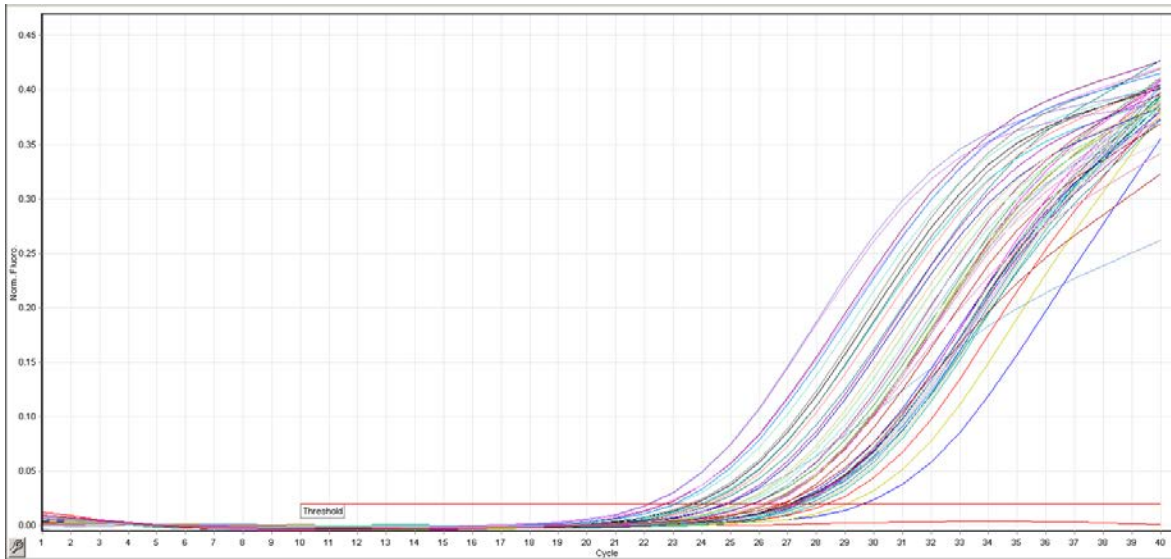
4. BULGULAR

Çalışma 2021 yılında Şanlıurfa Harran Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya %50 (n=23)'si erkek, %50 (n=23)'si kadın olmak üzere 46 COVID-19 hastası dahil edilmiştir. Hastalar yaşları açısından %24'ü 60 yaş üstü (n=11), %76'sı 60 yaş altı (n=35) olarak iki gruba ayrılmıştır.

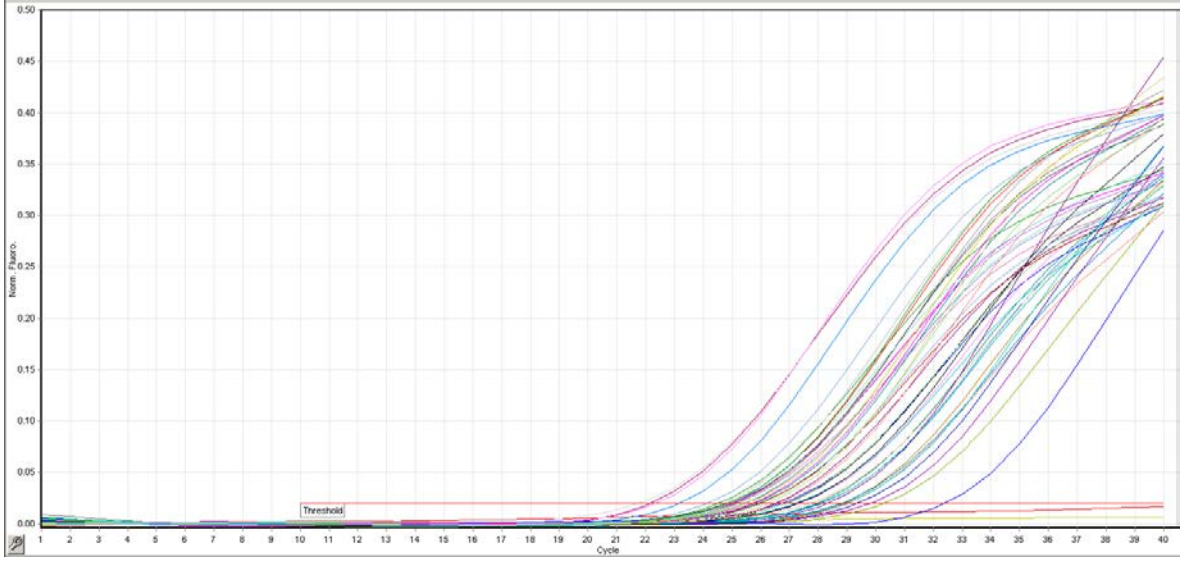
Hastalar WHO'nun önerileri doğrultusunda, klinik durumlarına göre sınıflandırıldığında %22'si (n=10) ağır (oksijen desteğine ihtiyaç duyan), %52'si (n=24) hafif (klasik semptomlara sahip hastalar), %26'sı (n=12) orta şiddette (pnömoni bulguları olan hastalar) olarak ayrılmıştır [81]. Hastaların %13'ü (n=6) ex olmuş, %87'si (n=40) hastalığı atlattır.

Pozitifliği bilinen hastalardan çalışma için tekrar alınan numuneler Abbott, Bio-Rad ve Rotor-Gene cihazlarında, Bio-Speedy, Diagnostics ve Coronex kitleriyle çalışılmıştır. Çalışmada 4 numune Abbott cihazına Bio-Speedy kitiyle yapılan yüklemde negatif bulunmuştur. Bu negatif bulunan numunelerin bir tanesi Abbott cihazına Diagnostics kiti ile yapılan yüklemde de negatif bulunurken, başka bir tanesi Bio-Rad cihazına Bio-Speedy kiti ile yapılan yüklemde de negatif bulunmuştur.

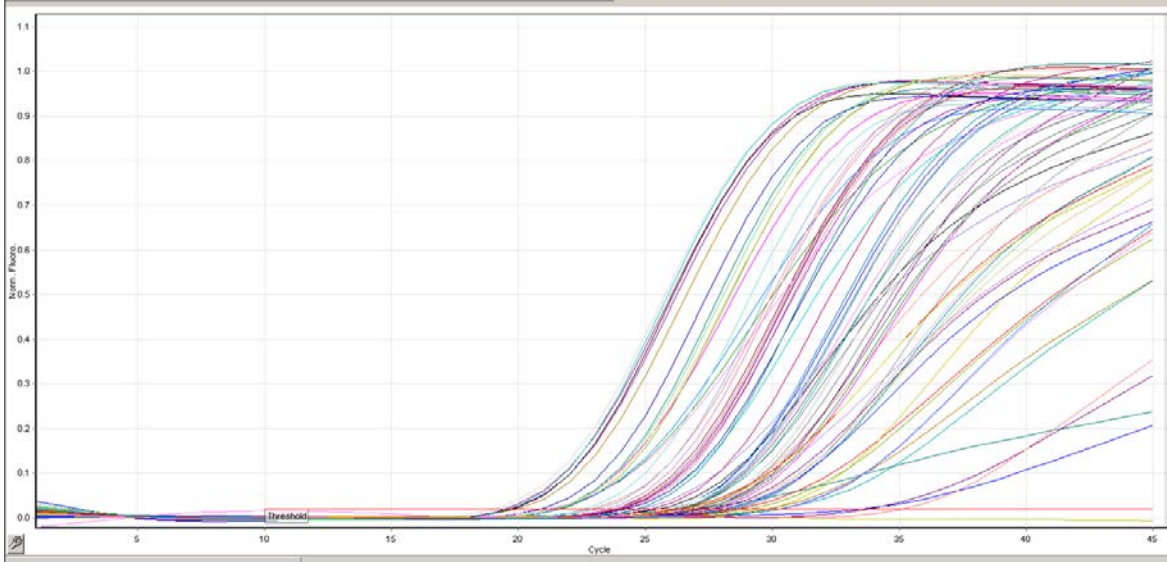
Rotor-Gene cihazı 72'lik tüp ile çalıştığı için, her bir kit ile iki yüklem yapılmıştır. Elde edilen Ct değerleri Şekil 8-13'te görülmektedir. 46 hastanın tamamı Rotor-Gene cihazında tüm kitlerle pozitif bulunmuştur.



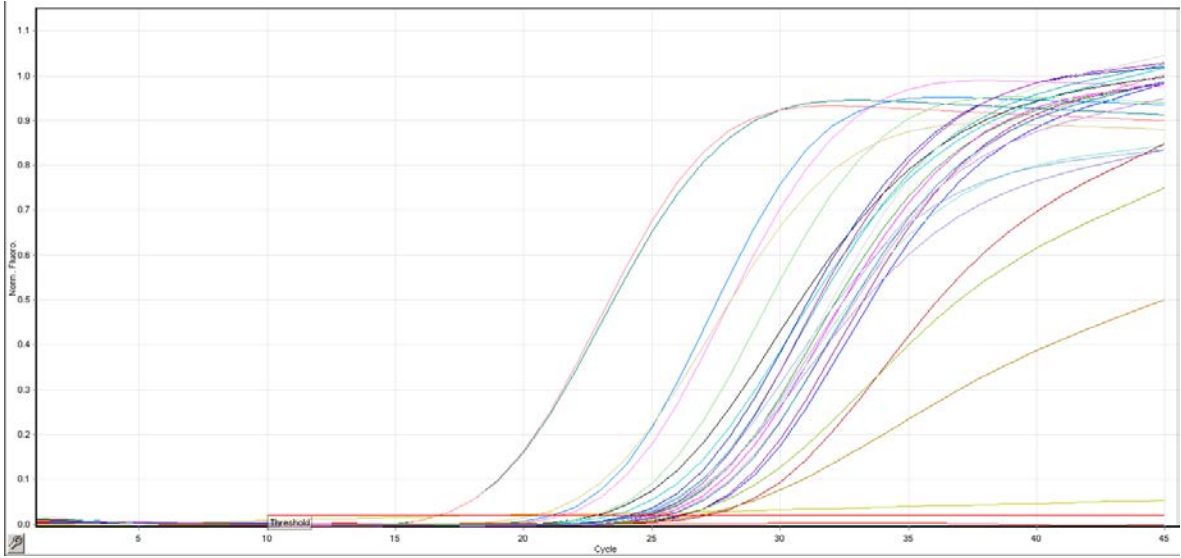
Şekil-8: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri



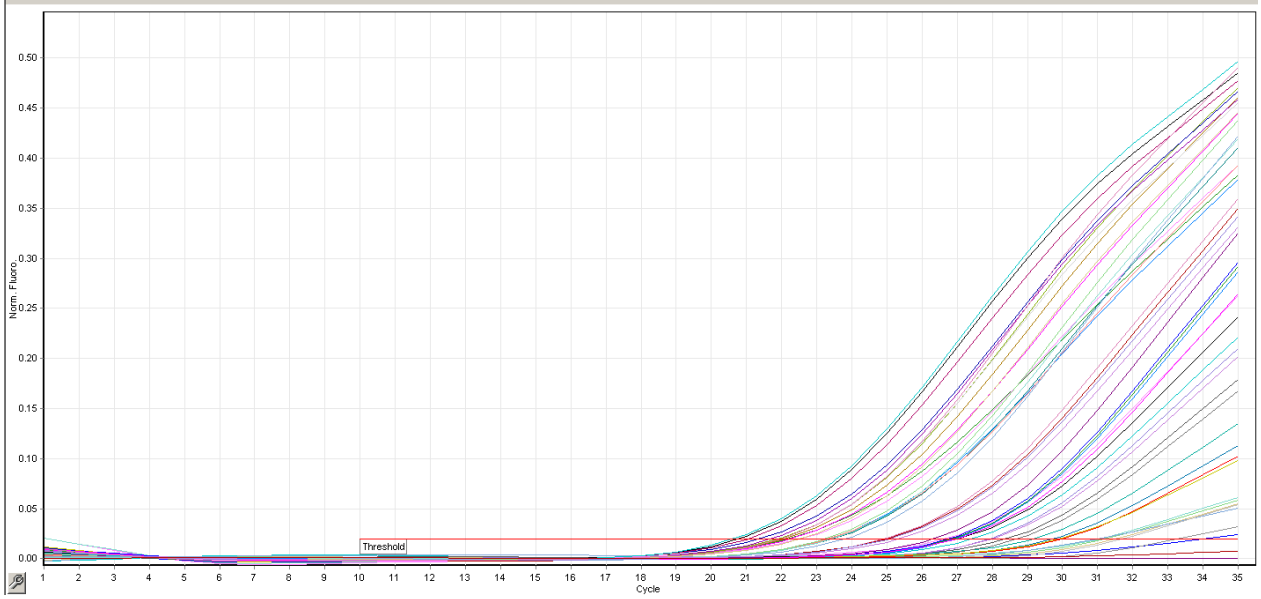
Şekil-9: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri



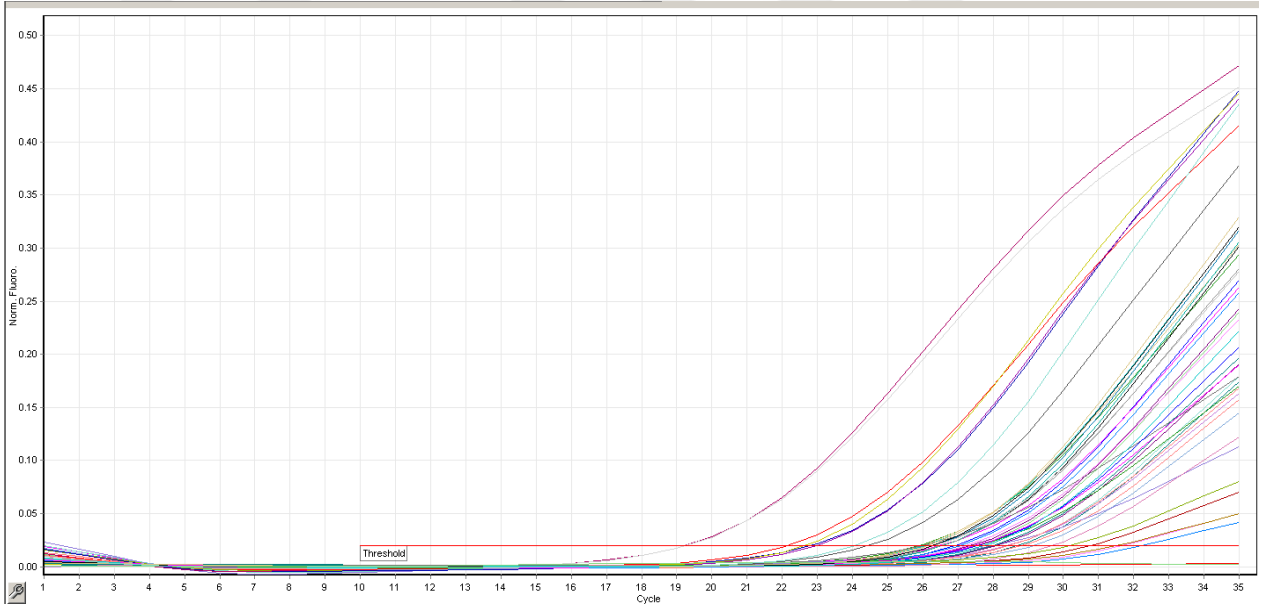
Şekil-10: Rotor-Gene cihazında Diagnovital kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri



Şekil-11: Rotor-Gene cihazında Diagnovital kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri

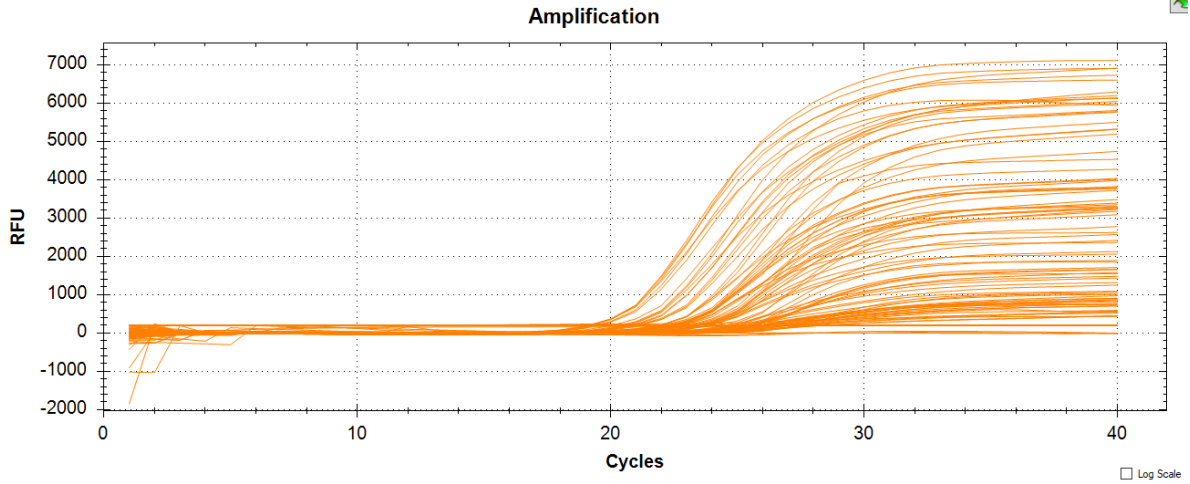


Şekil-12: Rotor-Gene cihazında Coronex kiti ile yapılan ilk çalışmada elde edilen Ct değerleri

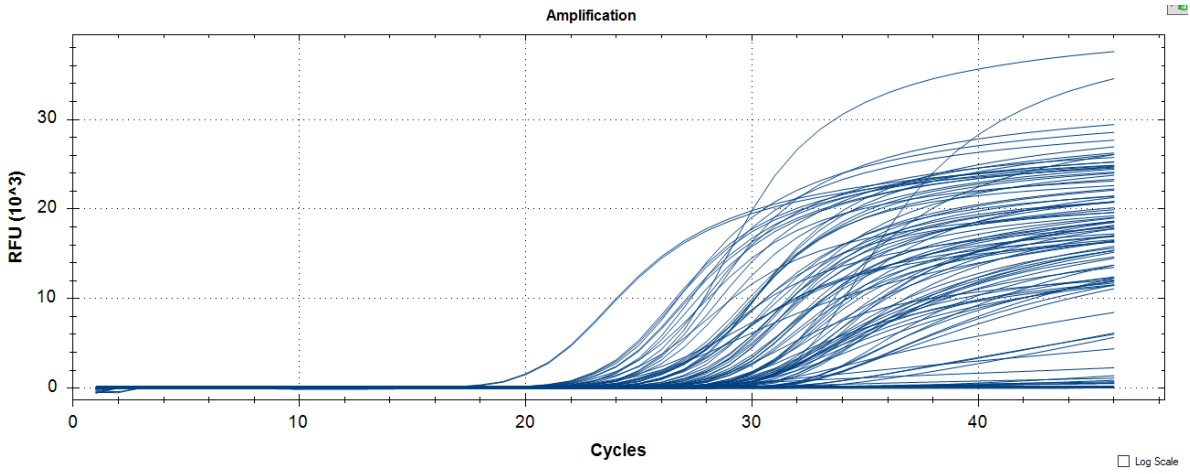


Şekil-13: Rotor-Gene cihazında Coronex kiti ile yapılan 2. çalışmada elde edilen Ct değerleri

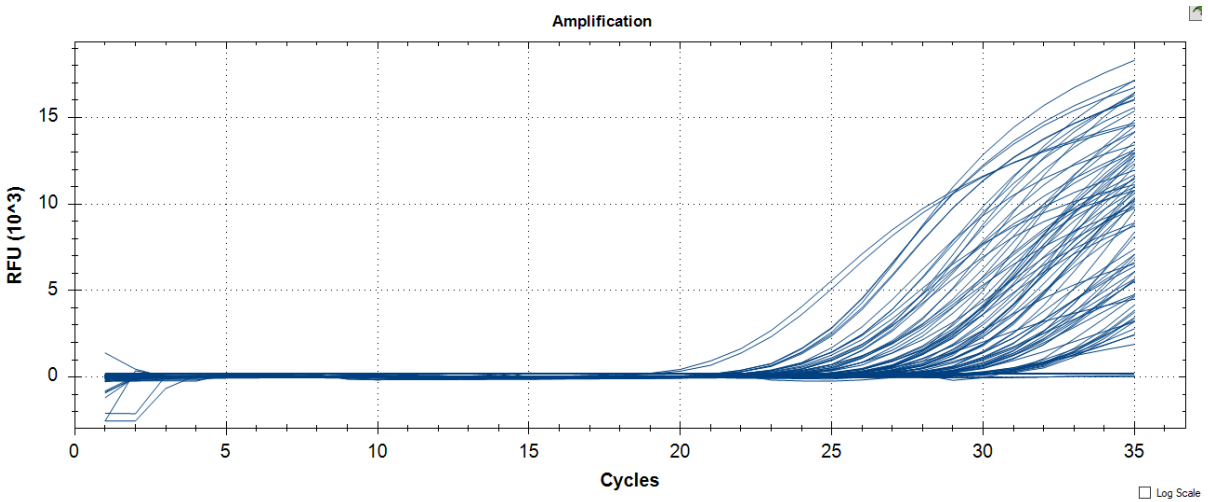
Bio-Rad cihazına 96'lık plate ile yapılan yüklemelerde elde edilen Ct değerleri şekil 14-16'da sunulmuştur. Bir hasta Bio-Rad cihazına Bio-Speedy kiti ile yapılan yüklemelerde negatif bulunmuştur.



Şekil-14: Bio-Rad cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri

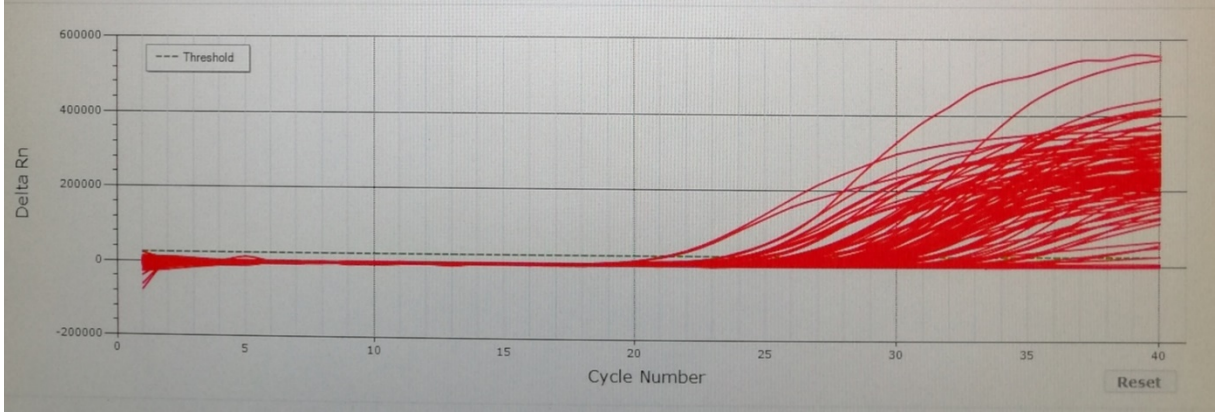


Şekil-15: Bio-Rad cihazında Diagnovital kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri

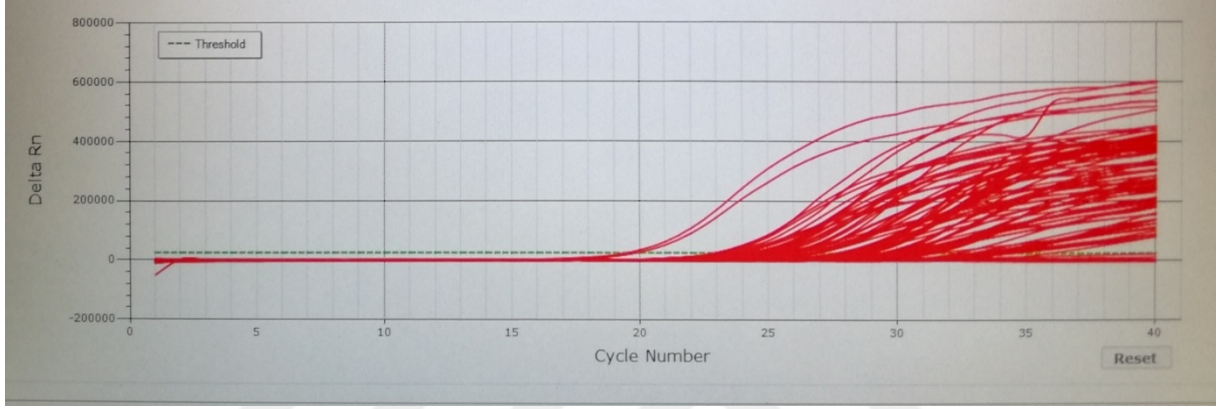


Şekil-16: Bio-Rad cihazında Coronex kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri

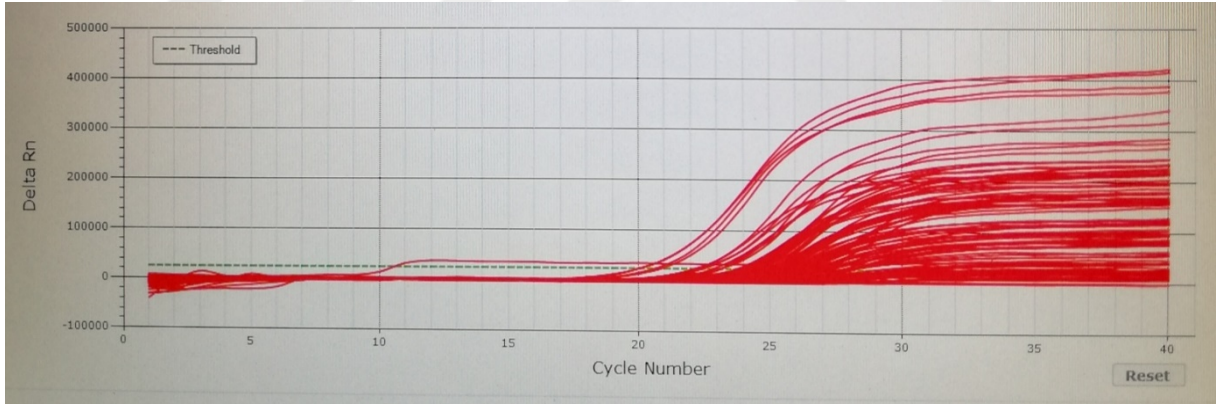
Abbott cihazına 96'lık plate ile yapılan yüklemelerde elde edilen Ct değerleri şekil 17-19'da sunulmuştur.



Şekil-17: Abbott cihazında Coronex kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri

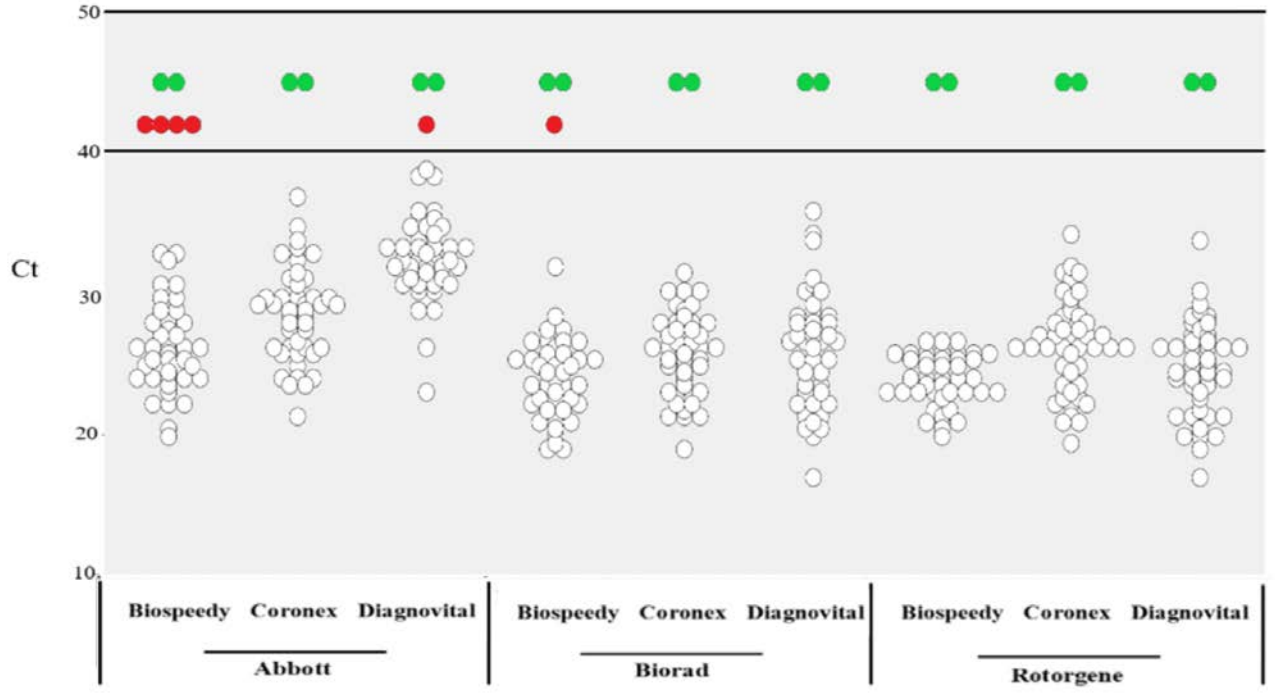


Şekil-18: Abbott cihazında Diagnovital kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri



Şekil-19: Abbott cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan çalışmada elde edilen Ct değerleri

Şekil 20'de, çalışılan tüm cihaz ve kitlerde elde edilen Ct değerleri sunulmuştur.



Şekil-20: Cihaz ve kit ikililerinde elde edilen Ct değerleri. Şeffaf noktalar pozitif bulunan hastaların Ct değerlerini; yeşil noktalar negatif kontrolleri; kırmızı noktalar ise yalancı negatifleri göstermektedir.

Cihaz ve kit ikilileri hastalardan elde edilen Ct değerleri yönünden karşılaştırıldığında Rotor-Gene - Bio-Speedy ikilisi ile 23 hastada <24 , Abbott - Diagnovital ile 12 hastada >34 Ct değerleri saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo-3: Cihaz ve kit ikililerinin aynı örnekleri düşük veya yüksek Ct değerlerinde saptama durumu

Ct	Bio-Rad			Abbott			Rotor-Gene		
	Bio-Speedy *(n)	Diagnovital *(n)	Coronex *(n)	Bio-Speedy *(n)	Diagnovital *(n)	Coronex *(n)	Bio-Speedy *(n)	Diagnovital *(n)	Coronex *(n)
<24	22	15	13	9	1	4	23	17	12
24-34	23	29	33	33	32	40	23	29	33
>34	0	2	0	0	12	2	0	0	1
Negatif	1	0	0	4	1	0	0	0	0

*n: Hasta sayısı

Cihaz (Abbott, Bio-Rad, Rotor-Gene), kit (Bio-Speedy, Coronex, Diagnovital) ve bu kit ve cihazlarda elde edilen Ct değerlerinin incelenmesi amacıyla ANOVA analizi yapılmıştır ve her birinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fark bulunmuştur ($p < 0.001$).

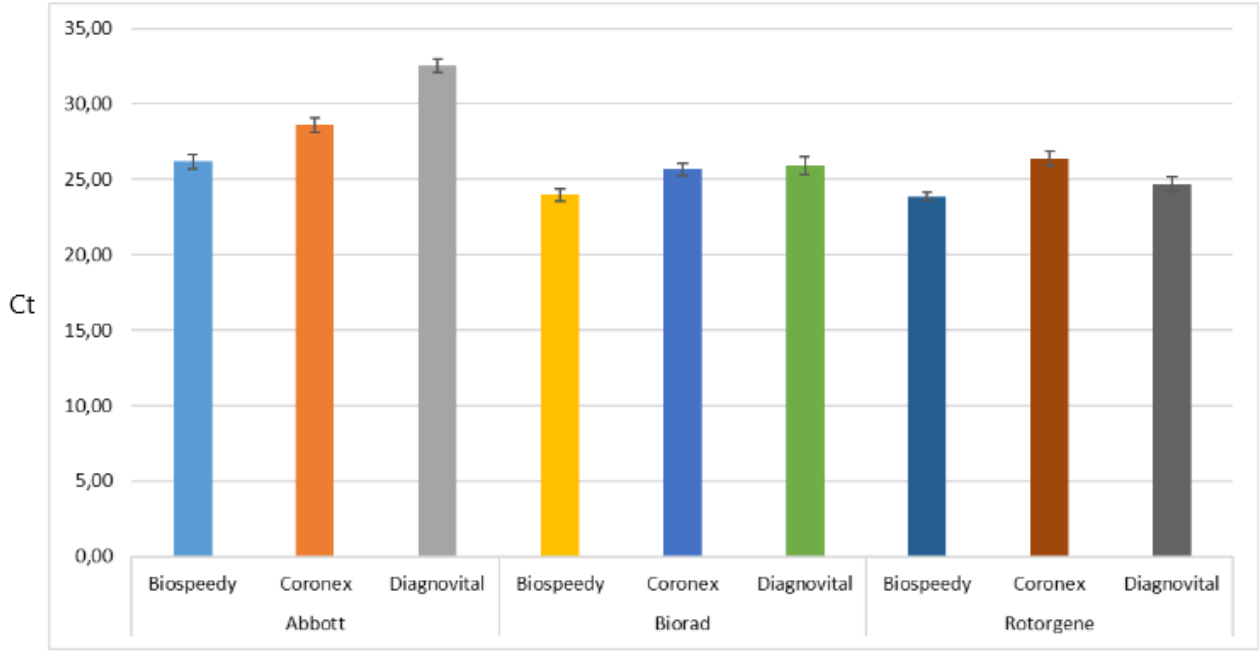
Saptanan farklılık üzerine, farklılığı anlayabilmek amacıyla Tukey analizi yapılmıştır. Cihazlar ve kitler sonuç üzerinde birlikte anlamlı bir etkiye sahip olduğundan, bireysel olarak herhangi bir cihaz veya kitin yorumlanması yanlış olacaktır. Kit-cihaz ikililerine bakıldığında ise, Abbott cihazında Diagnovital kiti ile yapılan ölçümün en yüksek ortalamaya (32.53 ± 0.43), Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile yapılan ölçümün ise en düşük ortalamaya (23.87 ± 0.26) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda SARS-CoV-2 saptanmasında en uyumlu cihaz-kit ikilisi Rotor-Gene - Bio-Speedy iken, Abbott – Diagnovital ikilisinin ise en uyumsuz olduğu söylenebilmektedir.

Tek başına yorumlanmaları doğru olmasa da fikir vermesi açısından; cihazlardan Abbott en yüksek Ct ortalamasına (29.10 ± 0.46), Bio-Rad ve Rotor-Gene aynı olup en düşük ortalamalara (sırasıyla, 25.19 ± 0.47 , 24.97 ± 0.41); Coronex ve Diagnovital kitlerinin en yüksek ortalamalara (sırasıyla, 26.88 ± 0.46 , 27.72 ± 0.50), Bio-Speedy kitinin ise en düşük ortalamaya (24.67 ± 0.38) sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4 ve Şekil 21).

Tablo-4: Her bir kit ile cihazda elde edilen Ct ortalama değerleri ve bunlar arasındaki fark

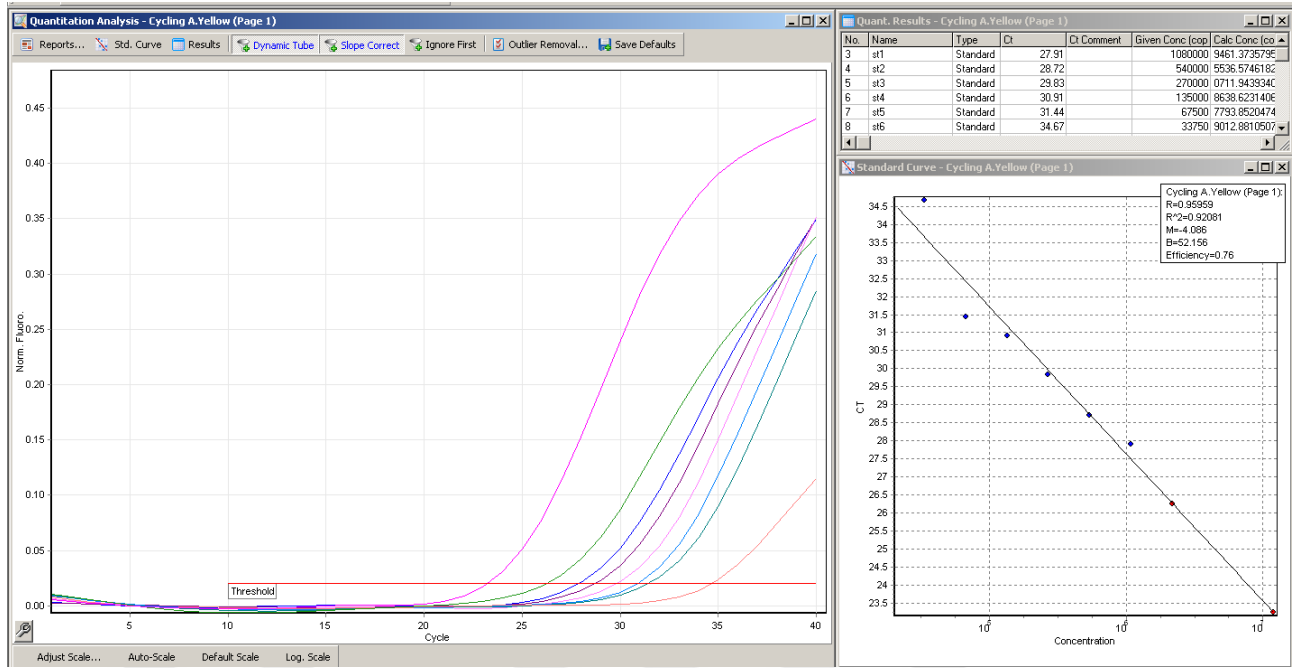
Cihaz	Kit			Cihaz için ortalama
	Bio-Speedy	Coronex	Diagnovital	
Abbott	26.18 ± 0.48	28.60 ± 0.49	32.53 ± 0.43	29.10 ± 0.46
Bio-Rad	23.96 ± 0.40	25.67 ± 0.42	25.94 ± 0.59	25.19 ± 0.47
Rotor-Gene	23.87 ± 0.26	26.37 ± 0.49	24.68 ± 0.49	24.97 ± 0.41
Kit için ortalama	24.67 ± 0.38	26.88 ± 0.46	27.72 ± 0.50	

p-değerleri	Etki		
	Cihaz (C)	Kit (K)	(Cihaz*Kit)
	<0.001	<0.001	<0.001



Şekil-21: Farklı kit-cihaz ikililerinde saptanan Ct ortalama değerleri

Cihaz ve kitlerde düşük viral yükü kaçırma ihtimalini araştırmak amacıyla, çalışmamızdaki en düşük viral yüke sahip 7 hasta seçilmiştir. Bu hastaların seçiminde Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile elde ettiğimiz, hasta örneklerindeki viral yükü gösteren standart lineer eğri kullanılmıştır (Şekil 22). Buna göre viral yükler içerisindeki 6 basamaklı ve en düşük viral yüke sahip tüm numuneler alınmıştır. Ardından bu 7 numunenin her bir kit ve cihazda elde edilen Ct değerleri incelenmiştir.



Şekil-22: Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile elde edilen standart eğri

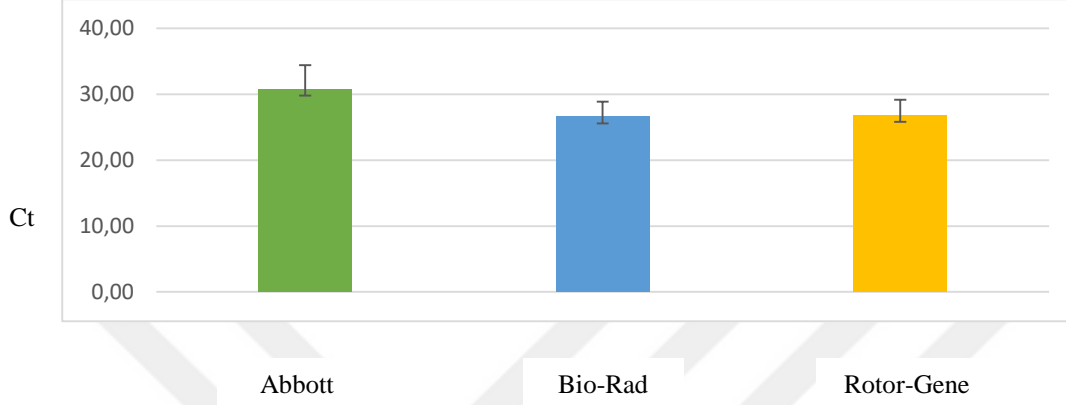
Bu 7 hasta kullanılarak cihazların, kitlerin ve cihaz-kit ikililerinin düşük viral yüklü hastaları yakalayabilme ve kaçırma durumlarını incelemek amacıyla faktöriyel varyans analizi yapılmıştır (Tablo 5). Buna göre, cihazların ve kitlerin kendi aralarında ve cihaz-kit ikilileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu farklılığın incelenmesi için Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Tablo-5: Viral yükü düşük olan örneklerde SARS-CoV-2 tespiti açısından, incelenen Real-time PCR cihazlarının ve kitlerin birbiriyle olan uyumu

*VK	*SD	*KT	F	p	Etki büyüklüğü	
					(η^2)	Gözlemlenen güç)
Cihaz	2	187.034	16.271	<0.001***	0.390	0.999
Kit	2	71.355	6.207	0.004**	0.196	0.875
Cihaz * Kit	4	88.771	3.861	0.008**	0.232	0.868
Hata	51	293.127				
Genel	59	664.756				

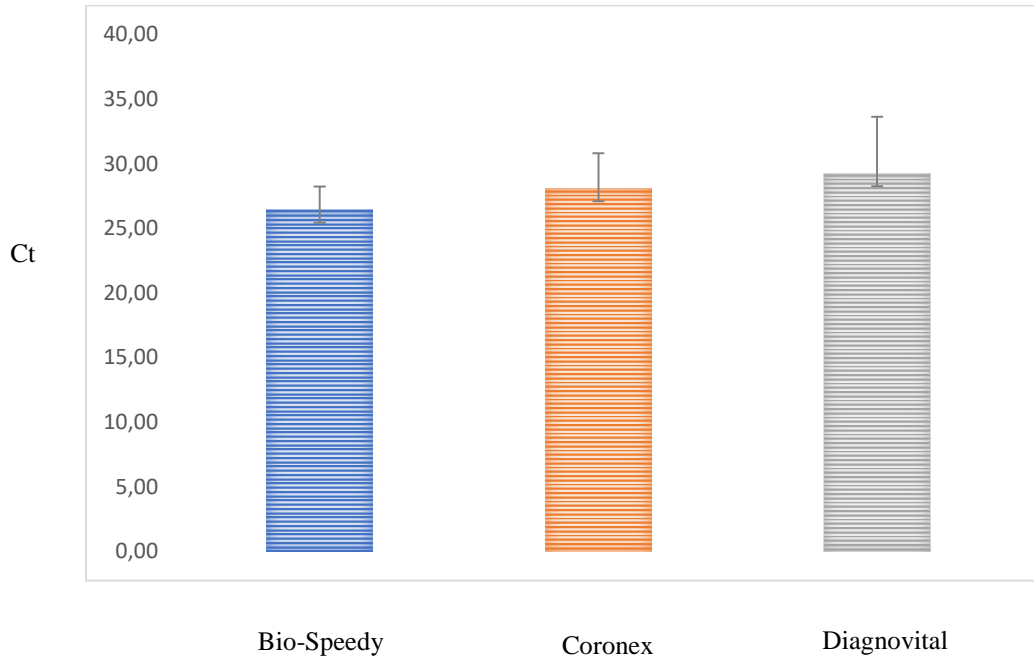
*VK: Varyasyon Kaynağı, SD: Serbestlik Derecesi, KT: Katsayılar Toplamı.

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre cihazlar arası farklar incelendiğinde, Abbott cihazında elde edilen Ct değerleri en yüksek bulunurken, Rotor-Gene ve Bio-Rad cihazlarında elde edilen Ct değerleri aynı ve en düşük ortalamaya sahip bulunmuştur. Yani numuneler 3 cihazda denendiğinde Abbott cihazının, Bio-Rad ve Rotor-Gene cihazlarından daha yüksek Ct değerleri verdiği görülmüştür (Şekil 23).



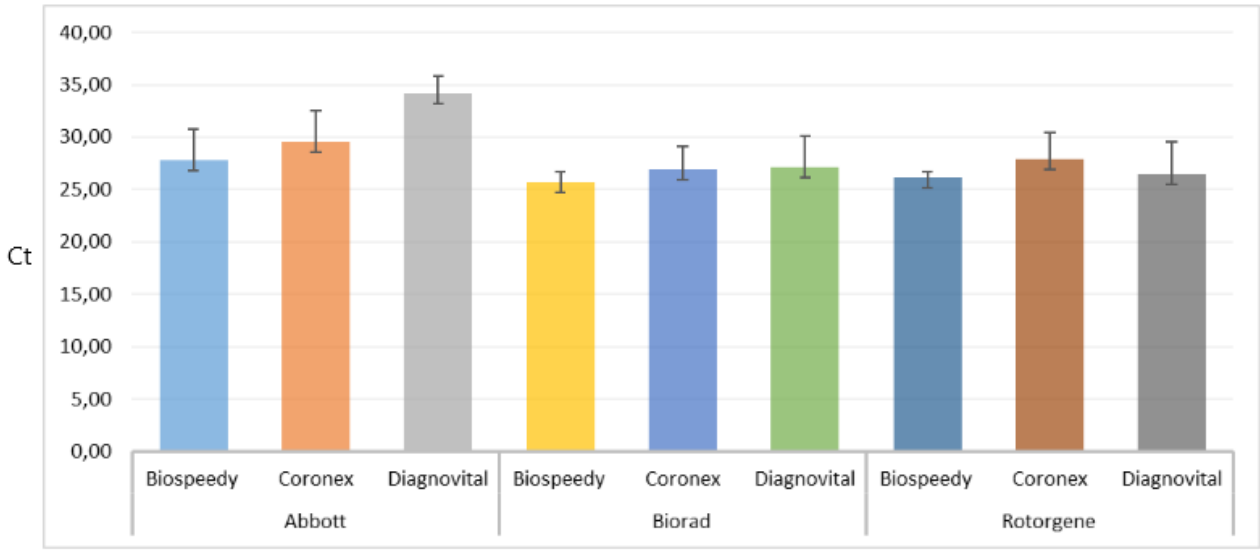
Şekil-23: Cihazlarda elde edilen Ct ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre kitler arası farklar incelendiğinde, Diagnovital kitinin en yüksek ve Bio-Speedy kitinin en düşük ortalamaya sahip olduğu, ayrıca Coronex kitinin ara geçiş olduğu gözlemlenmiştir. Yani Diagnovital kitinden Bio-Speedy kitine gelindiğinde, ortalamada istatistiksel olarak önemli bir düşüşün olduğu görülmektedir (Şekil 24).



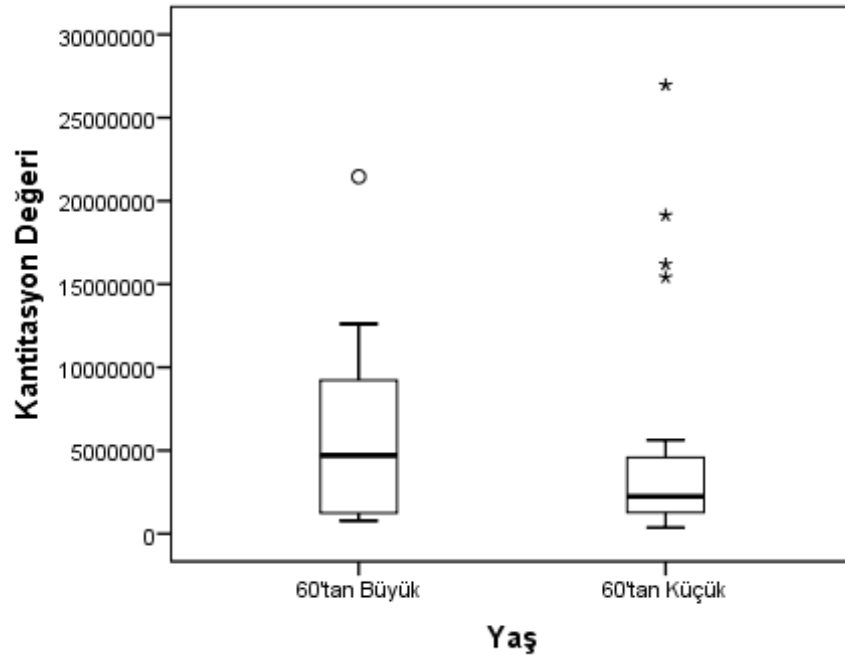
Şekil-24: Kitlerde elde edilen Ct ortalama değerlerinin karşılaştırılması

Kitlerin cihazlarla uyumunu incelemek amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Bu teste göre, Abbott cihazına Diagnovital kiti ile yapılan yüklemde Ct değerlerinin en yüksek olduğu, diğer tüm kit-cihaz ikililerinin Ct değerlerinin aynı olup en düşük ortalamaya sahip olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 25). Buna göre SARS-CoV-2 tanısında Abbott cihazında Diagnovital kiti ile yapılan testlerde, diğer incelediğimiz cihaz ve kit ikililerinden daha uyumsuz sonuçlar elde edilecek, düşük viral yüklü hastalar kaçırılabilir. En uyumlu ikili araştırıldığında ise, diğer tüm cihaz-kit ikililerinin uyumlarının benzer olduğu görülmüştür.



Şekil-25: En düşük viral yüke sahip 7 hastada kit ve cihazların birbirleriyle uyumunun incelenmesi

Çalışmamızda incelenen 46 hasta, yaşları 60 altı ve 60 üstü olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kantitasyon çalışmasında elde edilen viral yükler incelendiğinde, bu iki yaş grubu arasında kantitasyon değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte ($U=155.0$; $z=-0.966$; $p>0.05$; $r=0.14$), 60 yaş üstü hastaların kantitasyon değerleri ortancası, 60 yaş altı hastaların kantitasyon değerleri ortancasından daha yüksek bulunmuştur (Şekil 26). Hastaların bulunduğu yaşın, kantitasyon değerleri üzerine etkisi azdır.



Şekil-26: Viral yükün yaş gruplarına göre dağılımı

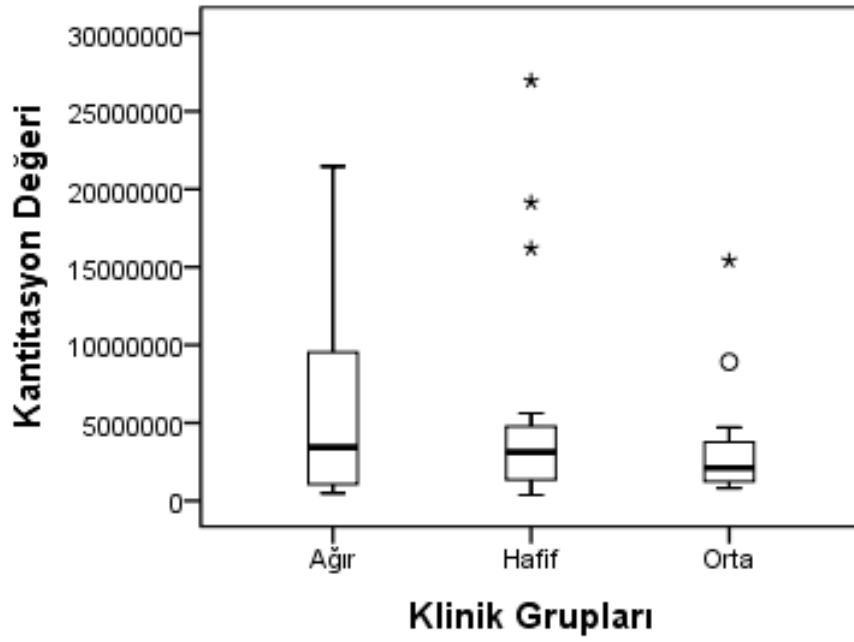
Hastaların kantitasyonları cinsiyete göre değerlendirildiğinde, kantitasyon değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($U= 211.0$; $z=-1.175$; $p>0.05$; $r=0.17$). Ancak kadın hastaların kantitasyon değerleri ortancası, erkek hastaların değerlerinden daha yüksek bulunmuştur (Tablo 6). Değerler incelendiğinde cinsiyetin kantitasyon üzerine etkisinin az olduğu görülmüştür.

Tablo-6: Cinsiyete göre viral yük ortalamalarının dağılımı

Cinsiyet	*n	En		Ortanca	Ortalama	Etki		
		Küçük	Büyük			Büyüklüğü	(r)	z
Erkek	23	369724.1	21453807.5	2247305.2	3724644	0.17	-1.175	0.240
Kadın	23	657560.8	26962849.7	2830216.9	6004123.2			

*n: Hasta sayısı

Kantitasyon değerleri hastalığı farklı şiddette geçiren kişiler arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($KW= 0.339$; $p>0.05$). Yine de, ağır kliniğe sahip hastaların kantitasyon değerleri ortancası diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur (Şekil 27).



Şekil-27: Viral yükün hastaların klinik durumlarına göre dağılımı

Kaybedilen hastalar ve sağ kalanlar incelendiğinde, ölen hastalarda kantitasyon değerleri, sağ kalan hastalardan anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($U= 54.0$; $z=-2.153$; $p<0.05$; $r=0.32$). Kaybedilen hastalarda kantitasyon değerleri ortancası da sağ kalanlardan daha yüksek gözlenmiştir (Tablo 7).

Tablo-7: Hastaların sağ kalım durumuna göre viral yük değerlerinin dağılımı

Sağ kalım	*n	En				Etki Büyüklüğü		
		Küçük	Büyük	Ortanca	Ortalama	(r)	z	p
Ölüm	6	1128000.7	21453807.5	8095570.1	9356066.3	0.32	-	0.031
Sağ	40	369724.1	26962849.7	2177126.4	4190631.2			

*n: Hasta sayısı

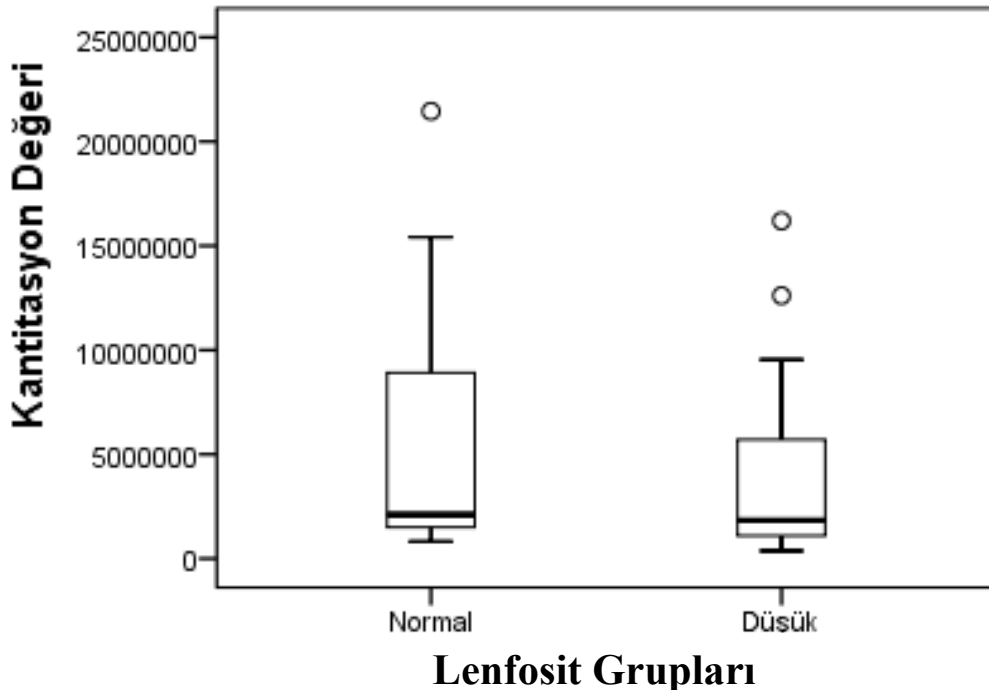
Çalışmada ayaktan hastaların kan değerlerine ulaşamadığından, sadece yatan hastalarda ($n=24$) kan değerleri ile viral yük arasındaki ilişki araştırılmıştır. Buna göre; referans değerinin üstünde lökosit sayısına sahip hastalardaki viral yük, lökosit düzeyi referans aralığında olan hastalara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($U= 24.0$; $z=-2.255$; $p<0.05$; $r=0.46$). Aynı zamanda lökositozu olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası da, normal olan gruptan daha yüksek gözlemlenmiştir (Tablo 8).

Tablo-8: Lökosit değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

Lökosit	*n	Etki				Büyüklüğü	(r)	z	p
		En Küçük	En Büyük	Ortanca	Ortalama				
Yüksek	7	1190178.9	21453807.5	8915452.3	9324313.5	0.46	-2.255	0.024	
Normal	17	369724.1	16195270.1	1309376.5	3312824.4				

*n: Hasta sayısı

Kan lenfosit sayısı incelendiğinde, referans değerlerin altında olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($U= 56.0$; $z=-0.906$; $p>0.05$; $r=0.18$). Ancak lenfosit düzeyi düşük olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası normal olan gruptan daha düşük gözlemlenmiştir (Şekil 28).



Şekil-28: Lenfosit değerleri normal sınırlarda olan ve düşük olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

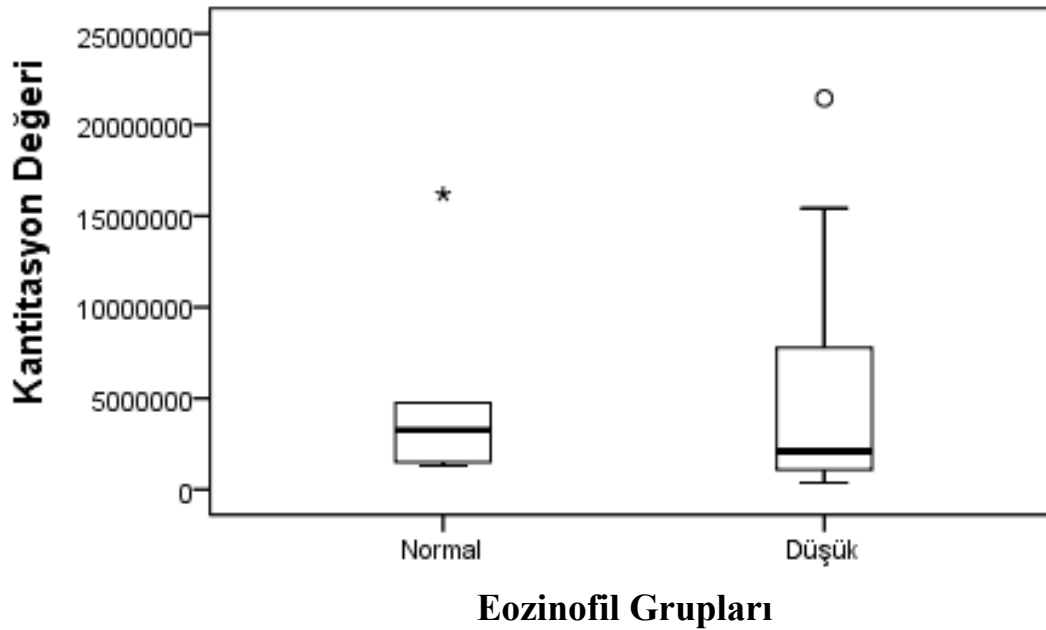
Kan nötrofil sayısı incelendiğinde, referans değerlerin üstünde olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($U= 40.0$; $z=-1.812$; $p>0.05$; $r=0.36$). Nötrofil düzeyi yüksek olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek gözlemlenmiştir (Tablo 9).

Tablo-9: Nötrofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

*NEU	*n	En				Etki		
		Küçük	Büyük	Ortanca	Ortalama	Büyüklüğü (r)	z	p
Normal	16	369724.1	16195270.1	1405681.8	3392158.3	0.36	-1.812	0.07
Yüksek	9	1061376.6	21453807.5	6647366.2	7682541.0			

*Neu: Nötrofil, n: Hasta sayısı

Kan eozinofil düzeyi incelendiğinde, referans değerlerin altında olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. (U= 44.0; z=-0.827; p>0.05; r=0.17). Eozinofil düzeyi normal olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, düşük olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Şekil 29).



Şekil-29: Eozinofil değerleri normal sınırlarda olan ve düşük olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

Kan nötrofil yüzdesi (% N) incelendiğinde, referans değerlerin üstünde olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir (U= 44.0; z=-1.585; p>0.05; r=0.32). % N düzeyi yüksek olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Tablo 10).

Tablo-10: % Nötrofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

*N	*n	En		Ortanca	Ortalama	Etki		
		Küçük	Büyük			Büyüklüğü	(r)	z
Yüksek	16	922408.8	21453807.5	2820757.4	6319556.4	0.32	-1.585	0.113
Normal	9	369724.1	8915452.3	1501987.1	2478277.7			

* N: Nötrofil yüzdesi, n: Hasta sayısı

Kan lenfosit yüzdesi (% L) incelendiğinde, referans değerlerin altında olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. (U= 40.0; z=-1.392; p>0.05; r=0.28). % L düzeyi düşük olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Tablo 11).

Tablo-11: % Lenfosit değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

*L	*n	En		Ortanca	Ortalama	Etki		
		Küçük	Büyük			Büyüklüğü	(r)	z
Normal	7	487000.3	4707054.1	1501987.1	1859903.3	0.28	-1.392	0.164
Düşük	18	369724.1	21453807.5	2820757.4	6133226.6			

* L: Lenfosit yüzdesi, n: Hasta sayısı

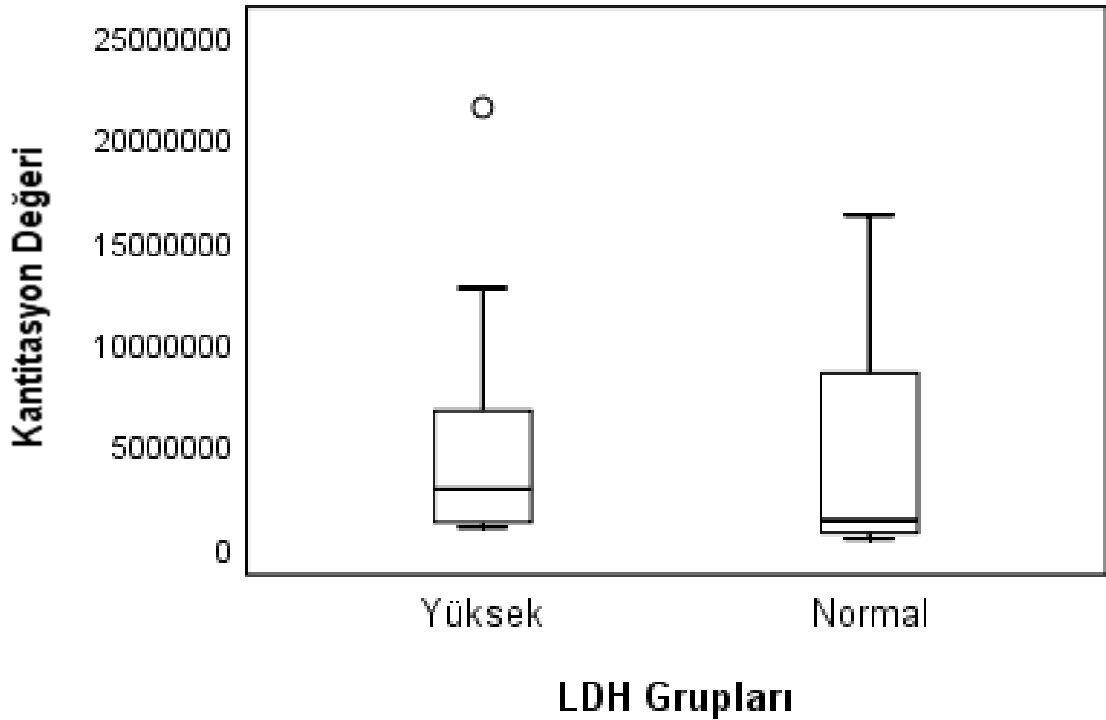
Kan eozinofil yüzdesi (% E) incelendiğinde, referans değerlerin altında olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir (U= 35.0; z=-1.019; p>0.05; r=0.20). % E düzeyi normal olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, düşük olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Tablo 12).

Tablo-12: % Eozinofil değerleri normal sınırlarda olan ve yüksek olan hastaların kantitasyon değerlerinin dağılımı

*E	*n	En				Etki		
		Küçük	Büyük	Ortanca	Ortalama	Büyüklüğü (r)	z	p
Normal	5	1295935.0	16195270.1	4707054.1	5756175.0	0.20	-1.019	0.308
Düşük	20	369724.1	21453807.5	1804467.4	4731826.4			

* E: Eozinofil yüzdesi, n: Hasta sayısı

LDH düzeyleri incelendiğinde, referans değerlerin üstünde olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülememiştir (U= 43.0; z=-1.019; p>0.05; r=0.21). LDH düzeyi yüksek olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (şekil 30). LDH değerlerinin, kantitasyon değerleri üzerine etkisi küçüktür.

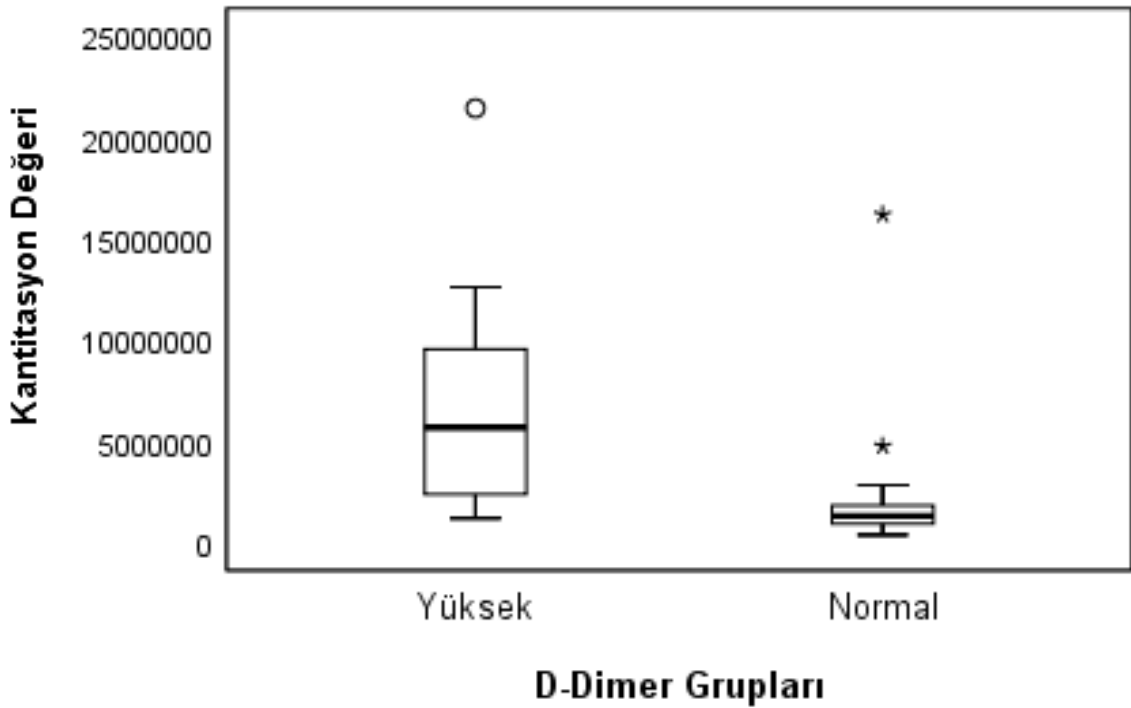


Şekil-30: Hastaların LDH düzeylerine göre kantitasyon değerlerinin dağılımı

CRP düzeyleri incelendiğinde, referans değerlerin üstünde olan ve normal değerlere sahip olan hastalar arasında kantitasyon değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir (U= 16.0;

$z=-1.422$; $p>0.05$; $r=0.21$). CRP düzeyi yüksek olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir.

D-dimer düzeyleri incelendiğinde, D-dimer düzeyi referans değerlerin üstünde olan hastalarda saptanan kantitasyon değerlerinin, normal düzeyde olan hastaların değerlerine göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. ($U= 22.0$; $z=-2.667$; $p<0.01$; $r=0.56$). D-dimer düzeyi yüksek olan gruba ait kantitasyon değerlerinin ortancası, normal olan gruptan daha yüksek olarak gözlemlenmiştir (Şekil 31).



Şekil-31: Hastaların D-dimer düzeylerine göre kantitasyon değerlerinin dağılımı

Hastaların yatış sürelerine göre kantitasyon değerlerinde bir farklılık olup olmadığı incelenmiştir. Yatış günündeki değişimin kantitasyon değerlerinde artışa veya azalışa neden olup olmadığı, artış veya azalış olması durumunda bu değişimin anlamlılığının tespiti için regresyon analizi uygulanmıştır. Buna göre, yatış gününde 1 günlük artış olduğunda kantitasyon değeri üzerinde ortalama 120669.8 birimlik bir artış olmaktadır (Şekil 32). Regresyona ait varyans analizinin anlamlı bulunmamasından dolayı bulunan sonuçların anlamlı olmadığı görülmektedir.

Kendal tau-b katsayısı korelasyonu analizi yapılarak, tüm verilerin birbiriyle olan ilişkisi incelenmiştir (Tablo 13).

Tablo-13: COVID-19 hastalarında elde edilen verilerin birbirleriyle olan ilişkisi

	Yaş	Klinik	Ölüm	Lökosit	Lenfosit	Nötrofil	Eozinofil	% Nötrofil	% Lenfosit	% Eozinofil	LDH	CRP	D-dimer
Yaş	r 1.000												
	p												
	n 46												
Klinik	r 0.025	1.000											
	p 0.868												
	n 46	46											
Ölüm	r .388**	.576**	1.000										
	p 0.008	0.000											
	n 46	46	46										
Lökosit	r 0.387	0.123	0.265	1.000									
	p 0.061	0.565	0.211										
	n 24	24	24	24									
Lenfosit	r 0.068	-	-	0.324	1.000								
	p 0.747	0.156	0.277	0.122									
	n 25	25	25	24	25								
Nötrofil	r .408*	0.146	0.164	.828**	0.132	1.000							
	p 0.043	0.485	0.434	0.000	0.530								
	n 25	25	25	24	25	25							
Eozinofil	r -	-	-	-	0.359	-.421*	1.000						
	p 0.716	0.495	0.646	0.116	0.078	0.036							
	n 25	25	25	24	25	25	25						
% Nötrofil	r -	0.375	.421*	0.259	-.479*	0.389	-0.359	1.000					
	p 0.747	0.064	0.036	0.221	0.015	0.055	0.078						
	n 25	25	25	24	25	25	25	25					
% Lenfosit	r 0.036	-	-	-	.460*	-.468*	.484*	-.831**	1.000				
	p 0.863	0.111	0.086	0.075	0.021	0.018	0.014	0.000					
	n 25	25	25	24	25	25	25	25	25				
% Eozinofil	r 0.000	-	-	-	0.250	-	.890**	-0.250	0.356	1.000			
	p 1.000	0.422	0.824	0.174	0.228	0.065	0.000	0.228	0.080				
	n 25	25	25	24	25	25	25	25	25	25			
LDH	r 0.308	0.160	0.370	0.232	-0.260	0.308	-0.265	.519**	-.476*	-0.122	1.000		
	p 0.144	0.456	0.075	0.286	0.219	0.144	0.211	0.009	0.019	0.569			
	n 24	24	24	23	24	24	24	24	24	24	24		
CRP	r 0.050	0.226	0.208	-	-0.236	0.021	-0.369	-0.021	-0.044	-.431*	.589**	1.000	
	p 0.811	0.278	0.320	0.872	0.256	0.922	0.070	0.922	0.835	0.032	0.002		
	n 25	25	25	24	25	25	25	25	25	25	24	25	
D-dimer	r .734**	0.073	0.278	.671**	0.096	.754**	-0.321	0.164	-0.199	-0.250	.510*	0.271	1.000
	p 0.000	0.742	0.199	0.001	0.663	0.000	0.135	0.454	0.363	0.251	0.015	0.212	
	n 23	23	23	22	23	23	23	23	23	23	22	23	23

Yaş ile sağ kalım durumu arasında pozitif yönde hafif, D-dimer ve nötrofil seviyeleriyle pozitif yönde kuvvetli bir ilişki mevcuttur. Yaş ile hastalığın şiddetli seyri, kan lökosit, lenfosit, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit, % eozinofil, LDH ve CRP düzeyleriyle bir ilişkisi bulunmamaktadır.

Enfeksiyonun şiddetli geçiyor olması hastanın ölüm riski ile pozitif yönde orta derecede ilişkilidir. Ancak hastanın yaşından, kan lökosit, lenfosit, nötrofil, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit, LDH, CRP ve D-dimer düzeylerinden bağımsızdır.

Hastanın sağ kalımı ile hastanın yaşı (hafif düzeyde), klinik durumu (orta derecede) ve % nötrofil düzeyi (orta derecede) pozitif yönde korelasyon göstermektedir. Sağ kalım durumu hastanın lökosit, lenfosit, nötrofil, eozinofil, % lenfosit, % eozinofil, LDH, CRP ve D-dimer seviyelerinden bağımsız bulunmuştur.

Kan lökosit düzeyi nötrofil düzeyi ile pozitif yönde kuvvetli derecede, D-dimer düzeyiyle pozitif yönde kuvvetli derecede korelasyon göstermektedir. Hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, lenfosit, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit, % eozinofil, LDH ve CRP düzeyleri ile bir ilişkisi bulunmamıştır.

Kan lenfosit düzeyi % nötrofil ile negatif yönde orta şiddette korelasyona sahipken, yaş, klinik durum, sağ kalım, lökosit, nötrofil, eozinofil, % eozinofil, LDH, CRP ve D-dimer seviyeleriyle bir ilişkisi yoktur.

Nötrofil düzeyleri hastanın yaşıyla pozitif yönde orta şiddette, lökosit düzeyiyle pozitif yönde kuvvetli derecede, eozinofil düzeyiyle negatif yönde orta şiddette, % lenfosit ile negatif yönde orta şiddette, D-dimer düzeyleriyle pozitif yönde kuvvetli derecede ilişkilidir. Hastanın klinik durumu, sağ kalımı, lenfosit, % eozinofil, LDH ve CRP düzeylerinden bağımsızdır.

Eozinofil düzeyi nötrofil düzeyi ile negatif yönde orta derecede, % lenfosit ile pozitif yönde orta derecede korelasyona sahiptir. Hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, lökosit, lenfosit, % nötrofil, LDH, CRP ve D-dimer düzeylerinden ise bağımsızdır.

% nötrofil düzeyi sağ kalım ile pozitif yönde orta şiddette, lenfosit sayısı ile negatif yönde orta şiddette, % lenfosit ile negatif yönde kuvvetli derecede, LDH ile pozitif yönde orta derecede ilişkili bulunmuştur. Hastanın yaşı, klinik durumu, lökosit, nötrofil, eozinofil, % eozinofil, CRP ve D-dimer düzeyleriyle ilişkisizdir.

% lenfosit düzeyi nötrofil düzeyi ile negatif yönde orta şiddette, eozinofil düzeyi ile pozitif yönde orta şiddette, % nötrofil ile negatif yönde kuvvetli derecede, LDH düzeyi ile negatif yönde orta

düzyde korelasyon göstermektedir. Hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, lökosit, % eozinofil, CRP ve D-dimer düzeylerinden bağımsızdır.

% eozinofil düzeyleri CRP düzeyi ile negatif yönde orta şiddette korelasyon göstermektedir. Hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, lökosit, lenfosit, nötrofil, % nötrofil, % lenfosit, LDH ve D-dimer düzeyleri ile ilişkisi bulunmamaktadır.

LDH düzeyleri % nötrofil ile pozitif yönde orta şiddette, % lenfosit ile negatif yönde orta şiddette, CRP ve D-dimer ile pozitif yönde orta şiddette korelasyon göstermektedir. LDH düzeyleri hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, kan lökosit, lenfosit, nötrofil, eozinofil, % eozinofil düzeyleriyle ilişkisizdir.

CRP düzeyleri ile % eozinofil ile negatif yönde orta şiddette, LDH ile pozitif yönde orta şiddette korelasyon mevcuttur. CRP düzeyleri hastanın yaşı, klinik durumu, sağ kalımı, lökosit, lenfosit, nötrofil, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit ve D-dimer düzeyleriyle ilişkisizdir.

D-dimer düzeyleri hastanın yaşı, nötrofil ve lökosit düzeyleri ile pozitif yönde kuvvetli derecede, LDH ile pozitif yönde orta şiddette korelasyon göstermektedir. D-dimer seviyeleri hastanın klinik durumu, sağ kalımı, lenfosit, eozinofil, % nötrofil, % lenfosit, % eozinofil ve CRP düzeylerinden bağımsızdır.

Hastaların kantitasyon değerleri ile diğey verileri nokta çift serili korelasyon kullanılarak karşılaştırılmıştır (Tablo 14). Kantitasyon değerleri ölüm ile hafif, lökosit düzeyi ile pozitif yönde orta, D-dimer seviyeleri ile pozitif yönde orta düzeyde anlamlı korelasyon göstermektedir. Kantitasyon değerleri hastaların yaşından, cinsiyetinden, klinik durumdan, % nötrofil, % lenfosit, lökosit, % eozinofil, LDH, lenfosit, nötrofil, eozinofil ve CRP düzeylerinden bağımsızdır.

Tablo-14: Viral yük değerlerinin hasta verileri ile olan ilişkisi

	Viral Yük			Viral Yük			Viral Yük	
Yaş	r	-0.146	Sağ kalım	r	-.292*	LYM*	r	-0.199
	p	0.332		p	<u>0.049</u>		p	0.340
	n	46		n	46		n	25
Cinsiyet	r	0.191	D-dimer	r	.416*	NEU*	r	-0.361
	p	0.202		p	<u>0.048</u>		p	0.076
	n	46		n	23		n	25
Klinik	r	-0.137	WBC*	r	.473*	EOS*	r	-0.011
	p	0.366		p	<u>0.020</u>		p	0.959
	n	46		n	24		n	25
N*	r	-0.324	E*	r	-0.072	CRP	r	0.391
	p	0.115		p	0.733		p	0.053
	n	25		n	25		n	25
L*	r	0.337	LDH	r	0.012			
	p	0.100		p	0.954			
	n	25		n	24			

*WBC: Lökosit, Lym: Lenfosit, Neu: Nötrofil, Eos: Eozinofil, N: Yüzde Nötrofil, L: Yüzde Lenfosit, E: Yüzde Eozinofil.

5. TARTIŞMA

SARS-CoV-2 tespiti için dünya genelinde kullanılan birçok tanı kiti ve Real-time PCR sistemi mevcuttur. Bu kit ve cihazların bir kısmına yönelik yapılan birçok karşılaştırma çalışması vardır. Ancak Bio-Speedy, Coronex ve Diagnovital kitlerini, Abbott, Bio-Rad ve Rotor-Gene Real-time PCR sistemlerinde karşılaştıran bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamız bu konuda ilk olma özelliği taşımaktadır.

Biz bu çalışmada kullandığımız kit ve cihazları değerlendirdiğimizde, SARS-CoV-2 tespitinde kitler arasında en düşük Ct değerlerini Bio-Speedy kitinin, en yüksek Ct değerlerini Diagnovital kitinin verdiğini tespit ettik. Real-time PCR cihazları arasında Bio-Rad ve Rotor-Gene cihazlarının Ct değerleri arasında bir fark bulunmamaktadır. Abbott cihazında saptanan Ct değerlerinin ise anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir. Cihaz kit ikililerine bakıldığında Rotor-Gene - Bio-Speedy ikilisi diğerlerinden daha düşük Ct değerleri verirken, Abbott - Diagnovital ikilisi daha yüksek Ct değerleri vermektedir. Abbott cihazının farklı hedef genlerde iyi performans gösterdiğine dair birçok çalışma mevcuttur. Ancak Abbott cihazı kullanıcı müdahalesine kapalı bir sistemdir ve çalışmada kullanılan her üç tanı kitinin prospektüsünde bu cihaz ile validasyon bilgisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte bu çalışma kitlerle cihazların validasyonlarını anlamak adına deneme amacıyla yapılmıştır. Bunun yanı sıra çalışmamızda örneklerin izolasyonunun, COVID-19 salgını boyunca laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan vNAT (Bioeksen) taşıma besiyeri ile yapıldığı gerçek anlamda bir eksraksiyon protokolü uygulanmadığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

Düşük viral yükün saptanmasında sonuçların değişip değişmeyeceğini değerlendirmek amacıyla, çalışmadaki en düşük viral yüke sahip 7 numune ile istatistik tekrarlanmıştır. İlk bulguyla uyumlu bir şekilde, Diagnovital kitinin Abbott cihazında kullanılması durumunda SARS-CoV-2 tespitinde Ct değerlerinin anlamlı bir şekilde yükseldiğini görülmektedir. Diğer kit-cihaz ikilileri arasında ise anlamlı bir farklılık görülmemektedir.

Dünya genelinde SARS-CoV-2 tespitinde farklı kit ve cihazların verimlerinin incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Diagnovital ve Bio-Speedy kitlerinin karşılaştırıldığı Tuncel ve arkadaşlarının bir çalışmasında, 1'i Bio-Speedy kitiyle, diğerleri Diagnovital kiti ile pozitif bulunan toplam 43 rutin hasta örneğini her iki kit ile aynı anda tekrar çalışmışlardır. Her örnek Diagnovital ile tekrar pozitif bulunurken, sadece 10'u Bio-Speedy kiti ile pozitif sonuç vermiştir. Bu 10 hastada Ct

değerlerinin Bio-Speedy kitinde genel olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgu, bizim çalışmamızdan oldukça farklıdır [129].

Bosna Hersek'te yapılan bir çalışmada 30 nazofarengeal numune 10 farklı kit ile Bio-Rad CFX96 Real-time PCR cihazında test edilmiştir. Kitlerin özgüllük ve duyarlılıkları referans olarak kullanılan LabGun TM COVID-19 (LabGenomics) kit sonuçlarına göre belirlenmiştir. Çalışmada Bio-Speedy (Bioeksen), Diagnovital (RTA), UltraGene Combo2Screen SARS-CoV-2 (ABL), LabGun ExoFast (LabGenomics), PhoenixDx SARS-CoV-2 Multipleks, Bosphore Novel Coronavirüs (Anatolia Geneworks), Sacace Biotechnologies COVID-19, STAT-NAT (Sentinel Diagnostics), SAVVYGEN (Savyon diagnostics) kitleri kullanılmıştır. Test edilen kitlerin tümünde %100 özgüllük bulunmuştur. En düşük duyarlılık Savvygen kitinde (%46), en yüksek duyarlılık STAT-NAT kitinde (%83) bulunmuştur. Diagnovital ve Bio-Speedy kitlerinde duyarlılık sırasıyla %79 ve %70 olarak bulunmuştur. Ct>34 olan numuneler incelendiğinde ise, Bosphore ve Bio-Speedy kitlerinin en düşük duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür [130]. Bu çalışmada ve Tuncel ve arkadaşlarının çalışmasında, incelenen örnekler uygulanan ekstraksiyon yöntemi bizim çalışmamızdan farklıdır. Bu durum farklı sonuçların elde edilmesine neden olmuş olabilir.

COVID-19 tanısında Coronex (DS Bio ve Nano Teknoloji) ve RealStar (Altona Diagnostic) kitlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, her iki kitin de aynı 50 hastayı pozitif verdiği bildirilmiştir. RealStar kitinde, bu hastalara ek olarak iki farklı hastada da pozitiflik saptanmıştır. Çalışma incelendiğinde Coronex kitinin RealStar kitine göre örneklerde daha yüksek Ct değerleri verdiği görülmektedir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak uyum incelendiğinde, çalışmada her iki ticari kitin birbiriyle oldukça uyumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır [131]. Yüksek uyuma sahip her iki kit de COVID-19 tanısında güvenle kullanılabilir.

Bio-Rad CFX96 cihazı kullanılarak 9 farklı SARS-CoV-2 tanı kitinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada önceden pozitif bulunan örnekleri yakalama durumlarına göre kitlerin hassasiyetini Fast Track Diagnostics (%100), Mikrogen Diagnostik (%97), SolGent Co. Ltd. (Hedef gen SG-N için %97, SG-Orf1a için %92), Altona Diagnostics (Hedef gen AT-E için %90, AT-S için %97), BGI (%95) ve Shanghai Fosun Long March Medical Science Co. Ltd. (%94) şeklinde bulmuşlardır. GmbH & Co KG, Wells BIO INC. ve Primerdesign Ltd. testleri ise sırasıyla %49, %62 ve %86 değerleriyle en düşük duyarlılığı göstermiştir. Kitler arasındaki bu farklılığın, primer tasarımındaki farklılıklardan veya hedeflenen genom bölgelerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışmada kitlerin özgüllükleri incelendiğinde, hiçbir örneğin diğer koronavirüsler sebebiyle yanlış pozitiflik vermediği görülmüştür [132].

Farklı ticari kitlerin ve laboratuvarında geliştirilen RT-PCR testlerinin (LDT) değerlendirildiği bir çalışmada Cobas SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) kiti cobas 6800 (Roche) cihazında, Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid) kiti GeneXpert Dx (Cepheid) cihazında çalışılmıştır. LDT-1 Bio-Rad CFX96 Real-time PCR sistemi ile, LDT-2 Rotor-Gene Q Real-time PCR-cycler (Qiagen) sistemi ile çalışılmıştır. Bu çalışmada karşılaştırma yapılması amacıyla SARS-CoV-2 genomu olmayan negatif numuneler, SARS-CoV-2 genomu bulunduran pozitif numuneler ve mevsimsel koronavirüsler dahil bazı yaygın solunum yolu virüslerini içeren numuneler kullanılmıştır. Karşılaştırılan testler arasında hiçbiri yalancı pozitiflik ya da yalancı negatiflik vermemiş, diğer solunum yolu virüsleri ile çapraz reaksiyon görülmemiştir. Testler arasında %100 uyum görülmüştür. Ancak bu çalışmada kullanılan örneklerin çoğu düşük Ct değeri vermekte, çalışmada zayıf pozitif örnek bulunmamaktadır [133].

Moran ve arkadaşlarının çalışmasında Roche Cobas testi ve Cepheid Xpert kitleri karşılaştırılmıştır. Roche Cobas SARS-CoV-2 testi ORF1 ve E genlerini, Cepheid Xpert Xpress testi E ve N genlerini saptar. Roche Cobas testi Cobas 6800 sistemi (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), Cepheid Xpert kiti ise GeneXpert sistemi (Cepheid, Sunnyvale, CA) ile çalışılmıştır. Çalışmada testler arasında mükemmel uyum bulunmuştur [134]. Tüm bu çalışmalar ve bizim bulgularımız SARS-CoV-2 tespiti için nazofarengeal sürüntü örnekleri kullanılarak elde edilmiştir.

SARS-CoV-2 tespitinde kullanılan PCR testleri kalitatif sonuç vermektedir. Bununla birlikte, Real-time PCR testleri ile kantitasyon elde edilerek viral yük de hesaplanabilmektedir [135]. Çalışmamızda Rotor-Gene cihazında Bio-Speedy kiti ile elde ettiğimiz standart lineer eğriyi kullanarak 46 hastanın nazofarengeal sürüntü örneğinde viral yük elde edilmiştir. Bu hastaların viral yükleri ile hastaların bilgileri incelendiğinde, viral yükün hastaların kan D-dimer düzeylerinin yüksekliğiyle ve lökositöz ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu saptanmıştır. Ölen hastalarda viral yük, sağ kalanlardan anlamlı bir şekilde daha yüksektir. Bununla birlikte viral yük hastanın yaşı, cinsiyeti ve enfeksiyonun klinik seyri ile ilişkili değildir.

Kan değerleri incelendiğinde viral yük ile kan lenfosit, nötrofil, eozinofil, % nötrofil, % eozinofil, % bazofil, CRP ve LDH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte gençlere göre >60 yaş hastalarda, erkeklere göre kadınlarda, enfeksiyonu hafif geçirenlere göre ağır geçirenlerde, lenfosit düzeyi normal olanlara göre lenfosit düşüklüğü olanlarda ve nötrofil düzeyi normal olan hastalara göre nötrofil yüksekliği olanlarda, kan

CRP ve LDH düzeyleri normal olanlara göre yüksek olanlarda viral yük ortancası daha yüksek bulunmuştur.

Yaptığımız analize göre hastalarda ileri yaş ölüm, nötrofil ve D dimer yüksekliği ile ilişkiliydi. Kliniğin şiddetli geçmesi ölüm ile, ölüm ise ileri yaş ve % nötrofil yüksekliği ile ilişkiliydi. Lökositoz ile nötrofil ve D dimer yüksekliği ilişkiliyken, nötrofil ileri yaş, lökositoz, eozinopeni ve D dimer yüksekliği ile ilişkiliydi. LDH yüksekliği CRP ve D dimer yüksekliği ile, CRP yüksekliği LDH yüksekliği ile ilişkiliydi. D dimer yüksekliği ise >60 yaş, lökositoz, nötrofil, LDH yüksekliği ile ilişkiliydi.

COVID-19 hastalarında viral yük üzerine yapılmış birçok çalışma mevcuttur. COVID-19 enfeksiyonu geçiren hastalarda tespit edilen viral yükler ile hastaların yaşı arasındaki ilişki incelendiğinde, yaşlı hastalarda genç hastalara göre viral yükün daha fazla bulunduğu çalışmalar görülmektedir [136-138]. İyileşen ve hastaneden taburcu edilen hastalarda yüksek IFN yanıtlarının görülmesi, iyileşme için etkin bir immün sistem varlığının önemine işaret eder. Gençlerde immün sistem daha aktifken, yaşlı bireylerde immün sistemin enfeksiyonu temizleme kapasitesi yetersiz kalabilmektedir. Yaşlı hastalarda viral yükün daha yüksek olmasında bu durum etkili olmuş olabilir.

Bunun aksine, viral yükün yaş ile bir ilişkisinin olmadığını da raporlandığı çalışmalar da görülmektedir [139-141]. Bizim çalışmamızda da bunu destekler nitelikte farklı yaş gruplarında viral yüklerde anlamlı bir farklılık görülmemiş, ancak 60 yaş üstü bireylerde viral yük ortancası genç hastalardan daha yüksek bulunmuştur. Kadın ve erkekler arasında bir değerlendirme yapıldığında da viral yüklerde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Literatür incelendiğinde, birçok çalışmada cinsiyetler arasında viral yüklerde anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür [138-140].

Çalışmamızda yaş ile ölüm riski arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, artan yaşın ölüm riski artışını beraberinde getirdiği görülmüştür. Başka bir çalışmada da, 65 yaş üstü olmanın, ölüm riskini değerlendirmede prognostik değeri olduğundan bahsedilmektedir [142]. Wang ve arkadaşlarının bir çalışmasında, yoğun bakım yatışı yapılan hastalarda yaş, diğer hastalara göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur [48].

COVID-19 hastalarında viral yükün bilinmesi, hastalar hakkında bazı öngörülerde bulunmayı kolaylaştırabilmektedir. Walsh ve arkadaşlarının uyguladığı bir metaanaliz çalışmasında, hastaların klinik durumlarının kötüleşmesinden önce viral yükün yükseldiği saptanmıştır. Hastaların viral yükleri takip edildiğinde, semptomların iyileşmesinden önce viral yükün düşmeye başlaması

dikkat çekmektedir [143]. Pnömonili hastalarda saptanan viral yükün, hafif hastalara göre daha yüksek bulunduğu çalışmalar mevcuttur. Viral yük, pnömoninin şiddeti ile pozitif ilişkili saptanmıştır [144, 145]. Tsukagoshi ve arkadaşlarının 370 hastada yaptıkları bir analizde, hastalığı semptomatik geçirenlerde bulunan viral yükün asemptomatik hastalardan daha yüksek olduğu saptanmıştır [139]. Felipe ve arkadaşlarının yaptığı 255 hastayı içeren bir çalışmada, şiddetli hastalarda saptanan SARS-CoV-2 viral yükünün diğer hastalardan önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür [146]. Yine başka birçok çalışma göstermektedir ki, viral yük, hastalığı şiddetli geçirenlerde hafif geçirenlere göre daha yüksektir [147-150].

Bizim çalışmamızdaki viral yükler incelendiğinde, viral yük ile hastalık şiddeti arasında anlamlı bir farklılık saptanmamakla birlikte, ağır kliniğe sahip hastalarda kantitasyon değerlerinin ortancası daha yüksek bulunmuştur. Asemptomatik hastalarda da viral yükün yüksek saptanması, izolasyon önlemlerinin önemini ortaya koymaktadır. Bulaşmanın önemli bir bölümünün presemptomatik dönemde gerçekleşmesi, semptomların ortaya çıkışından sonra alınan izolasyon, hijyen ve maske gibi önlemlerin etkinliğini önemli ölçüde azaltacaktır [140]. Bu sebeple asemptomatik hastalara bulaştırıcılığın önlenmesi için izolasyon önlemleri uygulanmalıdır. Chen ve arkadaşları, viral yükün hastalık progresyonunu öngörmede etkili olduğunu öne sürmektedir [151]. Daha fazla virüs varlığında daha fazla hücre enfekte olacak, konak immün sistem daha çok hücrenin ölümüne neden olacaktır [152]. Hem bu durum hem de aşırı aktive olmuş immün sistem hücrelerinin çok fazla miktarda sitokin salgılaması, viral yükü yüksek olan hastalarda hastalığın şiddetine katkıda bulunuyor olabilir.

Bu çalışmalara karşıt olarak, Argyropoulos ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, hafif hastalığı olan kişilerde ağır hastalığı olan kişilere göre daha yüksek viral yük saptanmıştır [153]. Pawar ve arkadaşları da çalışmalarında yoğun bakım ünitelerinde yatan ve entübe olan hastalardaki viral yükü, diğer tüm yatan hastalardan anlamlı ölçüde yüksek bulmuştur [154]. He ve arkadaşları ise viral yükün hastalık şiddeti ile bir ilişkisinin olmadığını savunmaktadır [140]. Bu bulgular semptomatik hastalardan numunelerin, hastalığın ilerleyen dönemlerinde alınmasına ve viral yükün zamanla azalmış olmasına bağlı olabilir.

Viral yük özellikle hafif semptomatik, hastaneye yatışı yapılmayan hastalarda bulaştırıcılığın önemli bir göstergesi olup, izolasyon önlemlerine yön verecektir. Ancak tanı laboratuvarlarında uygulanmasının zor olması, ciddi bir sınırlayıcı etkidir [153]. Çalışmamızda ve literatürde de görüldüğü gibi, asemptomatik hastalarda da görülebilen yüksek viral yük sebebiyle bulaştırıcılığın en aza indirilebilmesi için, asemptomatik hastalara da izolasyon önlemlerinin

uygulanması büyük önem arz etmektedir. Virüs saptanan her hasta bulaştırıcı anlamına gelmemektedir. Bu hastalarda yapılacak virüs kültürleri ile bulaştırıcılık görülebilmekte, gerektiğinde taburculuk düşünülebilmektedir. Enfektivite riski çok aza indiği için, semptomlarının 10. gününü aşan ve balgamda saptanan viral yükü 100.000 RNA kopya sayısından az olan hastalarda taburculuk verilebileceği söylenmektedir [155]. Scola ve arkadaşlarının uyguladıkları virüs kültürü çalışması da bu öneriyi desteklemektedir. Bu çalışmada semptom başlangıcından 8 gün sonra alınan veya Ct değeri 34'ün üzerinde olan hiçbir örnekte virüs izole edilememiş, bu hastalar taburculuğa uygun bulunmuştur [156]. Yatak kapasitesinin sınırlı olduğu durumlarda düşük viral yüke sahip hastalarda erken taburculuk düşünülebilir.

Pujadas ve arkadaşlarının 1145 hastada yaptıkları bir çalışmada, mL başına düşen viral yükün \log_{10} tabanında her bir birimlik artışında %7'lik ölüm riski artışı saptamışlardır [135]. Filho ve arkadaşları yatan hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, viral yükü yüksek olan yatan hastalarda mortalite riskini daha yüksek bulmuştur [157]. Viral yük ile klinik seyir arasındaki ilişkiyi inceleyen bir başka çalışmada da ölen hastalardaki viral yük daha yüksek saptanmıştır [139]. De la Calle ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, başlangıç viral yükleri yüksek olan hastalarda 30 gün içindeki mortalitenin yüksek bulunması dikkat çekicidir [158]. Bizim çalışmamızda ölen hastalarda anlamlı ölçüde yüksek bulunan viral yük değerleri, bu verilerle uyumludur. Bu bulgulara tezat olarak, Le Borgne ve arkadaşlarının 287 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ölen ve hayatta kalan hastaların viral yükleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Yine bu çalışmada viral yükün hastalığın şiddeti ile de ilişkili olmadığı rapor edilmiştir. Çalışmada hastalığın şiddetini öngörmede hastaların komorbiditeleri ve immün yanıtlarının kullanılabilmesi belirtilmiştir [142].

COVID-19 hastalarında kan parametreleri oldukça değişken olabilmektedir. Enfeksiyonun şiddetli seyretme ihtimalinin öngörülebilmesi, klinik müdahale için hekimi yönlendirecektir [159]. Bunu öngörmede kullanılacak parametreler araştırılmaktadır. Araştırılan laboratuvar parametrelerinden birisi C-reaktif protein (CRP)'dir. CRP, inflamasyon durumlarında erken belirteç olarak kabul edilen akut faz proteinlerinin bir üyesidir. Kesin tanı koymada ya da tanı dışlamada tek başına kullanılamaz, ancak bazı durumlarda CRP düzeylerinin bilinmesi, hasta hakkında önemli fikirler verebilmektedir [160]. Örneğin, COVID-19 hastalarında yapılan bir çalışmada CRP değerleri yüksek olan hastaların, semptomların başladığı gün daha yüksek viral yüke sahip olduğu görülmüştür [144]. Yüksek viral yükte yüksek CRP düzeylerinin saptandığı çalışmalar mevcuttur [148, 151].

Hasanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, viral yük ile lenfosit düzeyi arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir [161]. Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir analizde, yüksek viral yükün

yüksek nötrofil sayısı ile ilişkili olduğunu saptamıştır [151]. Qin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada şiddetli vakalarda eozinofil yüzdelerinin düşük olma eğiliminde olduğu görülmüştür [162]. Bizim çalışmamızda viral yük ile kan lenfosit, nötrofil, eozinofil, CRP ve LDH düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. D-dimer düzeylerindeki artış ve lökositoz ise viral yük artışı ile anlamlı ölçüde ilişkili bulunmuştur.

Lökosit değerleri üzerine yapılan bir metaanalizde, lökositoz ve yüksek CRP düzeyleri kötü klinik seyir ile ilişkilendirilmiştir [163]. Başka bir çalışmada yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar ile diğer hastalar karşılaştırılmış, yoğun bakım hastalarında lökosit seviyeleri daha yüksek bulunmuştur [48]. Qin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da buna uyumlu şekilde, şiddetli vakalarda yüksek lökosit düzeyleri görülmüştür [162]. Hu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, COVID-19 enfeksiyonunu ağır geçiren vakalarda lökositoz görüldüğünü belirtmiştir [164].

Akciğerde bulunan immün sistem hücreleri, inhale edilen patojenlere karşı çok hızlı yanıt geliştirmekte ve inhale edilen havadaki partikülleri sürekli temizlemektedir. Akciğerlerdeki hava-kan bariyerinin gaz alışverişine devam edebilmesi için bu immün yanıt kritiktir. Ancak diğer solunum yolu enfeksiyonlarında olduğu gibi, COVID-19'da da lökositlerin solunum yolunda artış göstermesiyle lökosit ilişkili moleküllerin salınımı çok fazla artar ve kontrolsüz artış çeşitli komplikasyonları beraberinde getirir. Bu komplikasyonlar hem akciğer hasarı yoluyla hava alışverişini bozarak hem de diğer organları etkileyerek kötü klinik sonuçlara neden olacaktır [165]. Lökosit artışının klinikte bozulmaya neden olmasının sebebi bu olabilir. Bir çalışmada, lenfopeni şiddetli COVID-19 enfeksiyonuyla ilişkili bulunmuştur [142]. Başka bir çalışmada hastalar takip edildiğinde, ölen hastalarda ölüm gerçekleşene kadar lenfosit seviyelerinin düşmeye, D-dimer seviyelerinin artmaya devam ettiği görülmüştür [48]. Lenfopenin şiddetli hastalık ile ilişkili olduğunu ortaya koyan pek çok çalışma vardır [166-168]. Wen ve arkadaşları, COVID-19 hastalarının periferik kandaki mononükleer hücrelerin artış veya azalışını görebilmek için yaptıkları bir çalışmada erken iyileşme evresindeki hastalarda T hücrelerinin önemli ölçüde azaldığını, B lenfositlerde anlamlı bir değişiklik olmadığını, monositlerin arttığını saptamıştır. Lenfositlerin azalmasının olası nedeni olarak, enfekte dokuya lenfosit göçü öne sürülmüştür. İmmün sistemin lenfositleri yıkması, kemik iliği veya timüs baskılanması da olası nedenler arasındadır [169].

COVID-19 hastalığında koagülasyon yolaklarında bozukluk olabilmekte, buna bağlı komplikasyonlar görülebilmektedir. Koagülasyon bozukluğu varlığının incelenmesi amacıyla yapılan otopsilerde damar içi fibrin trombüsleri tespit edilmiştir [170]. D dimer antijeni, fibrin yıkımı belirteci olarak kabul edilmektedir [171]. COVID-19'da koagülasyon bozukluğu olup olmadığını

görmek için D dimer seviyeleri kullanılabilir. Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yoğun bakım ünitesine yatışı yapılan hastalarda D Dimer seviyeleri daha yüksek bulunmuştur [172]. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yüksek D dimer seviyelerinin şiddetli hastalığı öngörmeye kullanılabileceği bildirilmektedir [173]. Başka bir çalışmada, koagülopati nedeniyle kanama görülen hastalarda yüksek D dimer seviyeleri saptanmış, yüksek D dimer seviyelerinin hastalarda yatış süresince koagülasyon ile ilişkili komplikasyon görülme riskini öngörebildiği tespit edilmiştir [174].

Brasen ve arkadaşları, hangi inflamasyon belirteçlerinin hastalığın seyrini takip etmede yararlı olabileceğini saptamak amacıyla 84 hastalık bir çalışma uygulamıştır. Bu çalışmada elde edilen bulgular, CRP düzeylerinin klinik durum ile birlikte değerlendirilmesinin, hastaların hastaneye yatırılıp yatırılmaması kararına yardımcı olabileceği düşüncesini desteklemektedir [175]. Shi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, CRP düzeylerinin hastaların kötüleşmesiyle istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği bulunmuştur. Bu çalışmaya göre, CRP değerleri hafif ya da şiddetli seyri öngörmeye yararlı olsa da, şiddetli hastalarda viral yükü öngörmeye yararlı değildir [144]. Bizim çalışmamızda ise CRP düzeyleriyle hastalık şiddeti arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Enfeksiyon öngörücüsü olarak kullanılabilecek parametreler, farklı çalışmalarda farklı gruplamalar ile sunulmaktadır. Örneğin Liu ve arkadaşları yaş, CRP, LDH artışı ve lenfopeninin COVID-19 hastalığının şiddetli olacağını bir göstergesi olabileceğini söylemiştir [145]. Guo ve arkadaşları ise CRP, D dimer, lökosit ve nötrofil değerlerinin yüksek olduğu, lenfosit değerinin düşük olduğu hastalarda enfeksiyonun daha şiddetli seyrettiğini görmüştür [138]. Kwon ve arkadaşları başlangıç lökosit değerlerinin düşük, CRP seviyelerinin yüksek olmasının hastalığın şiddetli seyredecek olmasıyla ilişkili olduğunu bulmuştur [176]. Zhang ve arkadaşlarının bir çalışmasında, yatan hastalarda lökosit ve nötrofil görülmesi, lenfopeni ve eozinopeninin devam etmesi ölümle ilişkili bulunmuştur [177]. Başka bir çalışmada ise lökosit, lenfopeni, artmış D-dimer ve CRP seviyeleri şiddetli hastalık ile ilişkili bulunmuştur [178]. Wang ve arkadaşlarının bir çalışmasında lökosit, nötrofil, artmış D-dimer seviyeleri ve lenfopeni şiddetli hastalık ile ilişkili bulunmuştur [48]. Çalışmamıza göre ileri yaş, kan nötrofil yüzdesinin yüksekliği ve şiddetli klinik seyir, ölüm riskini öngörmeye kullanılabilecek parametrelerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Real-time PCR cihazı farklı hedef genlerde, farklı numune tiplerinde, farklı cihaz ve kitlerde farklı sonuçlar verebilmektedir. Her yeni çalışma protokolünde denemeler yapılmalı, en uygun koşullar belirlenmelidir. Herhangi bir etkene yönelik ticari kit ya da cihazlar, tanıda kullanılmadan önce performans açısından test edilmelidir.
2. Çalışmamızda SARS-CoV-2 tespitinde diğer cihaz kit ikililerine göre Rotor-Gene – Bio-Speedy ikilisinin daha düşük Ct değerleri verdiği görülmüştür. Ancak hem Ct ortalama değerleri hem de düşük Ct’de pozitif bulunan örnek sayısı incelendiğinde, Rotor-Gene – Bio-Speedy ile Bio-Rad – Bio-Speedy ikilisinde elde edilen değerlerin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür.
3. Niteliksel sonuç veren testleri viral yükün nicel ölçümüne dönüştürmek, hastaların riske göre sınıflandırılmasında ve yönetilmesinde yardımcı olacaktır. Viral yükün bilinmesi, uygulanacak izolasyon önlemlerini de etkileyebilir.
4. Viral yükler üzerine yapılan çalışmalarda çelişkili görülebilen farklılıklar olabilmesinin sebebi, nazofarengeal örneklerin hastalığın farklı zamanlarında alınması ya da hasta seçimindeki farklılıklar olabilir. Ayrıca asemptomatik hastalarda bulunan düşük viral yük, hastalığın ilerleyen dönemlerinde artış gösterebilir. Çalışmalar incelenirken, bu detaylar göz önünde bulundurulmalıdır.
5. Yüksek viral yük ile lökositoz, kan D-dimer düzeyi yüksekliği ve ölümün ilişkili olduğunu gördük. Bu bulguların hasta yönetiminde klinik hekimlerine yardımcı olacağını düşünüyoruz.
6. Hastalığın sürecini öngörmede tanımlanan, hastaya ait çeşitli parametreler mevcuttur. Biz çalışmamızda yaş, cinsiyet, kan CRP, D-dimer, lökosit, lenfosit ve nötrofil değerlerini inceledik. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre >60 yaş, klinik durum ve kan nötrofil yüzdesinin yüksekliği ölüm riskini öngörmede kullanılabilir.
7. Çalışmamızdaki hasta sayısı 46’dır. Çalışmaya dahil edilen hasta sayısı cihaz ve kit uyumluluklarını değerlendirmek için istatistiksel olarak yeterli olmakla birlikte, çalışmaya daha fazla hasta dahil edilmesi, diğer parametreler ile ilgili sonuçların genellenebilmesi için yararlı olacaktır.
8. Çalışmamızda hastalardan tek numune alınmış, hastalığın ilerleyişi sürecindeki viral yük dalgalanmaları izlenememiştir. Her hastanın semptom başlangıcından itibaren belirli günlerde alınacak numuneler ile viral yükün izlenebilir. Böylece kan parametrelerindeki değişim ile viral yük değişimi arasındaki ilişki incelenebilir. Ancak çalışmamızda diğer araştırmalara geniş bir şekilde yer verildiği için, çalışma bu noktada eksik kalmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Samudrala PK, Kumar P, Choudhary K, Thakur N, Wadekar GS, Dayaramani R, Agrawal M, Alexander A. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. *Eur J Pharmacol.* 2020 Sep 15;883:173375-6.
2. Cucinotta D, Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed.* 2020 Mar 19;91(1):157-160. doi: 10.23750/abm.v91i1.9397. PMID: 32191675; PMCID: PMC7569573.
3. Abate SM, Checkol YA, Mantefardo B. Global prevalence and determinants of mortality among patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Ann Med Surg (Lond).* 2021 Apr;64:102204-5.
4. Pollard CA, Morran MP, Nestor-Kalinowski AL. The COVID-19 pandemic: a global health crisis. *Physiol Genomics.* 2020 Nov 1;52(11):549-57.
5. Islam KU, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Nov 10;10:560616-7.
6. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* 2020 Sep;9(3):573-86.
7. Tom MR, Mina MJ. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clin Infect Dis.* 2020 Nov 19;71(16):2252-4.
8. Mishra SK, Tripathi T. One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? *Acta Trop.* 2021 Feb;214:105778-9.
9. Ün, H. Coronaviridae virus ailesi: Genel bir değerlendirme. *Journal of advances in vetbio science and techniques* 5.1. 2020; 1-12.
10. Cook JK, Jackwood M, Jones RC. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol.* 2012;41(3):239-50.
11. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020 Apr;42(1):3-11.
12. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, Megawati D, Hayati Z, Wagner AL, Mudatsir M. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *J Infect Public Health.* 2020 May;13(5):667-73.
13. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019 Mar;17(3):181-92.
14. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 2012 Nov 8;367(19):1814-20.

15. Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res.* 2014 Sep;109:97-109.
16. Payne, S. Family coronaviridae. *Viruses.* 2017: 149-50.
17. T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* 2020 Jun;178:104792-3
18. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology.* 2019 May 27;16(1):69..
19. Venkatagopalan P, Daskalova SM, Lopez LA, Dolezal KA, Hogue BG. Coronavirus envelope (E) protein remains at the site of assembly. *Virology.* 2015 Apr;478:75-85.
20. Kuo, Lili, Masters PS. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *Journal of virology.* 2003;77(8):4597-608.
21. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 2007 Feb;81(4):1701-13.
22. Tok, Taskin T, Tatar G. Structures and functions of coronavirus proteins: molecular modeling of viral nucleoprotein. *Int J Virol Infect Dis.* 2017;2(1):1-7.
23. Liu, Ding X, Liang JQ, and Fung TS. Human coronavirus-229E,-OC43,-NL63, and-HKU1 (Coronaviridae). *Encyclopedia of virology.* 2021:428-9.
24. Henry R. Etymologia: coronavirus. *Emerging Infectious Diseases.* 2020;26(5):1027
25. Boltz DA, Nakai M, Bahra JM. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Dis.* 2004 Dec;48(4):909-15.
26. Jackwood MW. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 2012 Dec;56(4):634-41.
27. Kin N, Mischczak F, Lin W, Gouilh MA, Vabret A; EPICOREM Consortium. Genomic Analysis of 15 Human Coronaviruses OC43 (HCoV-OC43s) Circulating in France from 2001 to 2013 Reveals a High Intra-Specific Diversity with New Recombinant Genotypes. *Viruses.* 2015 May 7;7(5):2358-77.
28. Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. *Int J Biol Sci.* 2020 Mar 15;16(10):1686-97.
29. Wevers BA, van der Hoek L. Recently discovered human coronaviruses. *Clin Lab Med.* 2009 Dec;29(4):715-24.
30. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 2016 Jun;24(6):490-502.
31. Monto AS. Medical reviews. Coronaviruses. *Yale J Biol Med.* 1974 Dec;47(4):234-51

32. Tyrrell DA, Cohen S, Schlarb JE. Signs and symptoms in common colds. *Epidemiol Infect.* 1993 Aug;111(1):143-56.
33. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967 Apr;57(4):933-40.
34. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY; SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003 Apr 19;361(9366):1319-25.
35. World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. 2003 [cited April 10, 2022].
36. Lytras S, Xia W, Hughes J, Jiang X, Robertson DL. The animal origin of SARS-CoV-2. *Science.* 2021 Aug 27;373(6558):968-70.
37. Guo Y, Korteweg C, McNutt MA, Gu J. Pathogenetic mechanisms of severe acute respiratory syndrome. *Virus Res.* 2008 Apr;133(1):4-12.
38. World Health Organization. Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). 2003;
39. Cameron MJ, Bermejo-Martin JF, Danesh A, Muller MP, Kelvin DJ. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Res.* 2008 Apr;133(1):13-9.
40. Raj VS, Osterhaus AD, Fouchier RA, Haagmans BL. MERS: emergence of a novel human coronavirus. *Curr Opin Virol.* 2014 Apr;5:58-62.
41. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet.* 2015 Sep 5;386(9997):995-1007.
42. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) - Saudi Arabia. Available from: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2021-DON317>. 2021;
43. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, Jordan TX, Oishi K, Panis M, Sachs D, Wang TT, Schwartz RE, Lim JK, Albrecht RA, tenOever BR. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell.* 2020 May 28;181(5):1036-45.
44. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, Yuen KY. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 28;9(1):221-36.

45. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, Jiang YZ, Xiong Y, Li YJ, Li XW, Li H, Fan GH, Gu XY, Xiao Y, Gao H, Xu JY, Yang F, Wang XM, Wu C, Chen L, Liu YW, Liu B, Yang J, Wang XR, Dong J, Li L, Huang CL, Zhao JP, Hu Y, Cheng ZS, Liu LL, Qian ZH, Qin C, Jin Q, Cao B, Wang JW. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)*. 2020 May 5;133(9):1015-24.
46. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, Tan KS, Wang DY, Yan Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*. 2020 Mar 13;7(1):11-2.
47. Zayed RA, Omran D, Zayed AA. COVID-19 clinical and laboratory diagnosis overview. *J Egypt Public Health Assoc*. 2021 Aug 18;96(1):25-6.
48. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, Wang B, Xiang H, Cheng Z, Xiong Y, Zhao Y, Li Y, Wang X, Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020 Mar 17;323(11):1061-9.
49. Hethcote, Herbert W. The mathematics of infectious diseases. *SIAM review*. 2000;42(4):599-653.
50. Xiao X, Newman C, Buesching CD, Macdonald DW, Zhou ZM. Animal sales from Wuhan wet markets immediately prior to the COVID-19 pandemic. *Sci Rep*. 2021 Jun 7;11(1):11898-9.
51. Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog*. 2020 May 22;16(5):1008536.
52. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, Ren R, Leung KSM, Lau EHY, Wong JY, Xing X, Xiang N, Wu Y, Li C, Chen Q, Li D, Liu T, Zhao J, Liu M, Tu W, Chen C, Jin L, Yang R, Wang Q, Zhou S, Wang R, Liu H, Luo Y, Liu Y, Shao G, Li H, Tao Z, Yang Y, Deng Z, Liu B, Ma Z, Zhang Y, Shi G, Lam TTY, Wu JT, Gao GF, Cowling BJ, Yang B, Leung GM, Feng Z. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 2020 Mar 26;382(13):1199-1207.
53. To KK, Sridhar S, Chiu KH, Hung DL, Li X, Hung IF, Tam AR, Chung TW, Chan JF, Zhang AJ, Cheng VC, Yuen KY. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect*. 2021 Dec;10(1):507-35.
54. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020 Mar;579(7798):265-9.
55. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol*. 2021 Mar;61(3):180-202.

56. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020 Mar 27;367(6485):1444-8.
57. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA, Dregni AJ, Kolocouris A, Hong M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol*. 2020 Dec;27(12):1202-8.
58. Lau SY, Wang P, Mok BW, Zhang AJ, Chu H, Lee AC, Deng S, Chen P, Chan KH, Song W, Chen Z, To KK, Chan JF, Yuen KY, Chen H. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):837-42
59. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr Med Sci*. 2021 Dec;41(6):1037-51.
60. Zheng Y, Zhuang MW, Han L, Zhang J, Nan ML, Zhan P, Kang D, Liu X, Gao C, Wang PH. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Dec 28;5(1):299-300.
61. Chang CK, Hou MH, Chang CF, Hsiao CD, Huang TH. The SARS coronavirus nucleocapsid protein--forms and functions. *Antiviral Res*. 2014 Mar;103:39-50.
62. Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, Gao GF, Song H. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO J*. 2020 Oct 15;39(20):105938-9.
63. Burke MJ, Del Rio C. Long COVID has exposed medicine's blind-spot. *Lancet Infect Dis*. 2021 Aug;21(8):1062-4.
64. Shen X, Tang H, McDanal C, Wagh K, Fischer W, Theiler J, Yoon H, Li D, Haynes BF, Sanders KO, Gnanakaran S, Hengartner N, Pajon R, Smith G, Glenn GM, Korber B, Montefiori DC. SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 is susceptible to neutralizing antibodies elicited by ancestral spike vaccines. *Cell Host Microbe*. 2021 Apr 14;29(4):529-39.
65. Zhou H, Dcosta BM, Samanovic MI, Mulligan MJ, Landau NR, Tada T. B.1.526 SARS-CoV-2 Variants Identified in New York City are Neutralized by Vaccine-Elicited and Therapeutic Monoclonal Antibodies. *mBio*. 2021 Aug 31;12(4):138621-2.
66. Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, Voysey M, Koen AL, Fairlie L, Padayachee SD, Dheda K, Barnabas SL, Borat QE, Briner C, Kwatra G, Ahmed K, Aley P, Bhikha S, Bhiman JN, Borat AE, du Plessis J, Esmail A, Groenewald M, Horne E, Hwa SH, Jose A, Lambe T, Laubscher M, Malahleha M, Masenya M, Masilela M, McKenzie S, Molapo K, Moultrie A, Oelofse S, Patel F, Pillay S, Rhead S, Rodel H, Rossouw L, Taoushanis C, Tegally H, Thombrayil A, van Eck S, Wibmer CK, Durham NM, Kelly EJ, Villafana TL, Gilbert S, Pollard AJ, de Oliveira T, Moore PL, Sigal A, Izu A; NGS-SA Group; Wits-VIDA COVID Group. Efficacy of the

- ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N Engl J Med.* 2021 May 20;384(20):1885-98.
67. Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *J Med Virol.* 2022 May;94(5):1825-32.
 68. Desai M, Oppenheimer J. The Importance of Considering Olfactory Dysfunction During the COVID-19 Pandemic and in Clinical Practice. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 Jan;9(1):7-12.
 69. Mateos-Moreno MV, Mira A, Ausina-Márquez V, Ferrer MD. Oral antiseptics against coronavirus: in-vitro and clinical evidence. *J Hosp Infect.* 2021 Jul;113:30-43.
 70. Armstrong L, Collin J, Mostafa I, Queen R, Figueiredo FC, Lako M. In the eye of the storm: SARS-CoV-2 infection and replication at the ocular surface? *Stem Cells Transl Med.* 2021 Jul;10(7):976-86.
 71. Sridhar S, Nicholls J. Pathophysiology of infection with SARS-CoV-2-What is known and what remains a mystery. *Respirology.* 2021 Jul;26(7):652-65.
 72. Leung WK, To KF, Chan PK, Chan HL, Wu AK, Lee N, Yuen KY, Sung JJ. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology.* 2003 Oct;125(4):1011-7.
 73. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, Flemban H, Al-Nassir WN, Balkhy HH, Al-Hakeem RF, Makhdoom HQ, Zumla AI, Memish ZA. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013 Sep;13(9):752-61.
 74. Barbosa da Luz B, de Oliveira NMT, França Dos Santos IW, Paza LZ, Braga LLVM, Platner FDS, Werner MFP, Fernandes ES, Maria-Ferreira D. An overview of the gut side of the SARS-CoV-2 infection. *Intest Res.* 2021 Oct;19(4):379-85.
 75. Chen Z, Lv Y, Xu H, Deng L. Herbal Medicine, Gut Microbiota, and COVID-19. *Front Pharmacol.* 2021 Jul 7;12:646560.
 76. B, Singh R, Ha SE, Zogg H, Park PJ, Ro S. Pathophysiological mechanisms underlying gastrointestinal symptoms in patients with COVID-19. *World J Gastroenterol.* 2021 May 21;27(19):2341-52.
 77. Ozono S, Zhang Y, Ode H, Sano K, Tan TS, Imai K, Miyoshi K, Kishigami S, Ueno T, Iwatani Y, Suzuki T, Tokunaga K. SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat Commun.* 2021 Feb 8;12(1):848-9.

78. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363-74.
79. Mason RJ. Thoughts on the alveolar phase of COVID-19. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020 Jul 1;319(1):115-20.
80. Calabrese F, Pezzuto F, Fortarezza F, Hofman P, Kern I, Panizo A, von der Thüsen J, Timofeev S, Gorkiewicz G, Lunardi F. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*. 2020 Sep;477(3):359-72.
81. World Health Organization. COVID-19 clinical management: living guidance,. World Health Organization, 25 January 2021;
82. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, Alvarado-Arnez LE, Bonilla-Aldana DK, Franco-Paredes C, Henao-Martinez AF, Paniz-Mondolfi A, Lagos-Grisales GJ, Ramírez-Vallejo E, Suárez JA, Zambrano LI, Villamil-Gómez WE, Balbin-Ramon GJ, Rabaan AA, Harapan H, Dhama K, Nishiura H, Kataoka H, Ahmad T, Sah R; Latin American Network of Coronavirus Disease 2019-COVID-19 Research (LANCOVID-19). Electronic address: <https://www.lancovid.org>. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020 Mar-Apr;34:101623.
83. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, Liu L, Shan H, Lei CL, Hui DSC, Du B, Li LJ, Zeng G, Yuen KY, Chen RC, Tang CL, Wang T, Chen PY, Xiang J, Li SY, Wang JL, Liang ZJ, Peng YX, Wei L, Liu Y, Hu YH, Peng P, Wang JM, Liu JY, Chen Z, Li G, Zheng ZJ, Qiu SQ, Luo J, Ye CJ, Zhu SY, Zhong NS; China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 2020 Apr 30;382(18):1708-20.
84. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Garout MA, Al-Qaaneh AM, Sule AA, Tirupathi R, Mutair AA, Alhumaid S, Hasan A, Dhawan M, Tiwari R, Sharun K, Mohapatra RK, Mitra S, Emran TB, Bilal M, Singh R, Alyami SA, Moni MA, Dhama K. Diverse Immunological Factors Influencing Pathogenesis in Patients with COVID-19: A Review on Viral Dissemination, Immunotherapeutic Options to Counter Cytokine Storm and Inflammatory Responses. *Pathogens*. 2021 May 7;10(5):565-6.
85. Wong SH, Lui RN, Sung JJ. Covid-19 and the digestive system. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 May;35(5):744-8.
86. Jin X, Lian JS, Hu JH, Gao J, Zheng L, Zhang YM, Hao SR, Jia HY, Cai H, Zhang XL, Yu GD, Xu KJ, Wang XY, Gu JQ, Zhang SY, Ye CY, Jin CL, Lu YF, Yu X, Yu XP, Huang JR, Xu KL, Ni Q, Yu CB, Zhu B, Li YT, Liu J, Zhao H, Zhang X, Yu L, Guo YZ, Su JW, Tao JJ, Lang GJ, Wu XX, Wu WR, Qv TT, Xiang DR, Yi P, Shi D, Chen Y, Ren Y, Qiu YQ, Li LJ, Sheng J,

- Yang Y. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut*. 2020 Jun;69(6):1002-9.
87. Han C, Duan C, Zhang S, Spiegel B, Shi H, Wang W, Zhang L, Lin R, Liu J, Ding Z, Hou X. Digestive Symptoms in COVID-19 Patients With Mild Disease Severity: Clinical Presentation, Stool Viral RNA Testing, and Outcomes. *Am J Gastroenterol*. 2020 Jun;115(6):916-23.
88. Chai, Xiaoqiang, et al. Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection. *Biorxiv*. 2020;
89. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, Qiu Y, Wang J, Liu Y, Wei Y, Xia J, Yu T, Zhang X, Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):507-13.
90. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1131-4.
91. Johnson KD, Harris C, Cain JK, Hummer C, Goyal H, Perisetti A. Pulmonary and Extra-Pulmonary Clinical Manifestations of COVID-19. *Front Med (Lausanne)*. 2020 Aug 13;7:526-7.
92. Li B, Yang J, Zhao F, Zhi L, Wang X, Liu L, Bi Z, Zhao Y. Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China. *Clin Res Cardiol*. 2020 May;109(5):531-8.
93. Moonis G, Filippi CG, Kirsch CFE, Mohan S, Stein EG, Hirsch JA, Mahajan A. The Spectrum of Neuroimaging Findings on CT and MRI in Adults With COVID-19. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Oct;217(4):959-74.
94. Tsai PH, Lai WY, Lin YY, Luo YH, Lin YT, Chen HK, Chen YM, Lai YC, Kuo LC, Chen SD, Chang KJ, Liu CH, Chang SC, Wang FD, Yang YP. Clinical manifestation and disease progression in COVID-19 infection. *J Chin Med Assoc*. 2021 Jan 1;84(1):3-8.
95. Sykes DL, Holdsworth L, Jawad N, Gunasekera P, Morice AH, Crooks MG. Post-COVID-19 Symptom Burden: What is Long-COVID and How Should We Manage It? *Lung*. 2021 Apr;199(2):113-9.
96. Green MR, Michael R., Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019;(6):95109-10.
97. Mushtaq MZ, Shakoor S, Kanji A, Shaheen N, Nasir A, Ansar Z, Ahmed I, Mahmood SF, Hasan R, Hasan Z. Discrepancy between PCR based SARS-CoV-2 tests suggests the need to re-evaluate diagnostic assays. *BMC Res Notes*. 2021 Aug 17;14(1):316-7.

98. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron.* 2021 Jan 15;172:1127-52.
99. Green K, Winter A, Dickinson R, Graziadio S, Wolff R, Mallett S, et al. What tests could potentially be used for the screening, diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages. *CEBM2020.* 2020;13-4.
100. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
101. Kidd IM, Clark DA, Emery VC. A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. *J Virol Methods.* 2000 Jun;87(1-2):177-81.
102. Yılmaz S, Devran Zjd. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve bitki biyoteknolojisinde yaygın uygulamaları. 2016;20(1):31-42. Yılmaz S, Devran Z. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pzr) Ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları. *Derim.* 2016;20(1):31-42.
103. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
104. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1559-82.
105. Matthews JA, Kricka LJ. Analytical strategies for the use of DNA probes. *Anal Biochem.* 1988 Feb 15;169(1):1-25.
106. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999 Jan;26(1):112-22, 124-5.
107. Tirupathi R, Ramparas TR, Wadhwa G, Areti S, Kaur J, Salim S, Rabaan AA, Al-Tawfiq JA. Viral dynamics in the Upper Respiratory Tract (URT) of SARS-CoV-2. *Infez Med.* 2020 Dec 1;28(4):486-99.
108. Cárdenas G, Torres-García D, Cervantes-Torres J, Rosales-Mendoza S, Fleury A, Fragoso G, Laclette JP, Sciutto E. Role of Systemic and Nasal Glucocorticoid Treatment in the Regulation of the Inflammatory Response in Patients with SARS-Cov-2 Infection. *Arch Med Res.* 2021 Feb;52(2):143-50.
109. Davis ME, Yan CH. Coronavirus Disease-19 and Rhinology/Facial Plastics. *Otolaryngol Clin North Am.* 2020 Dec;53(6):1139-51.
110. Thomas E, Delabat S, Carattini YL, Andrews DM. SARS-CoV-2 and Variant Diagnostic Testing Approaches in the United States. *Viruses.* 2021 Dec 13;13(12):2492-3.

- 111.** Homza M, Zelena H, Janosek J, Tomaskova H, Jezo E, Kloudova A, Mrazek J, Svagera Z, Prymula R. Covid-19 antigen testing: better than we know? A test accuracy study. *Infect Dis (Lond)*. 2021 Sep;53(9):661-8.
- 112.** Dinnes J. COVID-19 rapid antigen testing strategies require careful evaluation. *EBioMedicine*. 2021 Aug;70:103491.
- 113.** World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection (Interim Guidance). 2021;
- 114.** Mekonnen D, Mengist HM, Derby A, Nibret E, Munshea A, He H, Li B, Jin T. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2021 May;31(3):2181-2.
- 115.** Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, Li Z, Chao G, Rojas OL, Bang YM, Pu A, Christie-Holmes N, Gervais C, Ceccarelli D, Samavarchi-Tehrani P, Guvenc F, Budyłowski P, Li A, Paterson A, Yue FY, Marin LM, Caldwell L, Wrana JL, Colwill K, Sicheri F, Mubareka S, Gray-Owen SD, Drews SJ, Siqueira WL, Barrios-Rodiles M, Ostrowski M, Rini JM, Durocher Y, McGeer AJ, Gommerman JL, Gingras AC. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 2020 Oct 8;5(52):5511-2.
- 116.** Oved K, Olmer L, Shemer-Avni Y, Wolf T, Supino-Rosin L, Prajgrod G, Shenhar Y, Payorsky I, Cohen Y, Kohn Y, Indenbaum V, Lazar R, Geylis V, Oikawa MT, Shinar E, Stoyanov E, Keinan-Boker L, Bassal R, Reicher S, Yishai R, Bar-Chaim A, Doolman R, Reiter Y, Mendelson E, Livneh Z, Freedman LS, Lustig Y. Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 non-responding seronegative subpopulation. *EClinicalMedicine*. 2020 Dec;29:100651-2.
- 117.** Soh JH, Chan H-M, Ying J. Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. *Nano Today*. 2020;30:100831-2.
- 118.** Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Respiratory Viruses (ESGREV). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jul;27(7):981-6.
- 119.** World Health Organization. Clinical management of COVID-19. 2020;
- 120.** Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. *Ann Lab Med*. 2021 Nov 1;41(6):540-8.
- 121.** Ali N. Elevated level of C-reactive protein may be an early marker to predict risk for severity of COVID-19. *J Med Virol*. 2020 Nov;92(11):2409-11.

122. Luo X, Zhou W, Yan X, Guo T, Wang B, Xia H, Ye L, Xiong J, Jiang Z, Liu Y, Zhang B, Yang W. Prognostic Value of C-Reactive Protein in Patients With Coronavirus 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19;71(16):2174-29.
123. Anka AU, Tahir MI, Abubakar SD, Alsabbagh M, Zian Z, Hamedifar H, Sabzevari A, Azizi G. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. *Scand J Immunol*. 2021 Apr;93(4):12998-9.
124. Karacan A, Aksoy YE, Öztürk MH. The radiological findings of COVID-19. *Turk J Med Sci*. 2021 Dec 17;51(SI-1):3328-39.
125. Balbi M, Conti C, Imeri G, Caroli A, Surace A, Corsi A, Mercanzin E, Arrigoni A, Villa G, Di Marco F, Bonaffini PA, Sironi S. Post-discharge chest CT findings and pulmonary function tests in severe COVID-19 patients. *Eur J Radiol*. 2021 May;138:109676.
126. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography (Lond)*. 2021 May;27(2):682-7.
127. Alpar C. Spor Sağlık Ve Eğitim Bilimlerinden Örneklerle Uygulamalı İstatistik Ve Geçerlik Güvenirlik. Detay Yayıncılık. 2016;
128. Doğan İ, Doğan N. Adım adım çözümlü parametrik olmayan istatistiksel yöntemler. Detay Yayıncılık, Ankara. 2014;93:95-6.
129. Tuncel G, Ergoren MC, Baddal B, Tulay P, Arikan A, Guler E, et al. Comparison of RT-qPCR results of different gene targets for SARS-CoV-2 in asymptomatic individuals during COVID-19 pandemic. *The EuroBiotech Journal*. 2021;5(s1):26-31.
130. Mulahuseinovic N, Salihefendic L, Durgut S, Kandic E, Konjhodzic R. Comparative Analysis of SARS-CoV-2 Detection Kits. *Acta Inform Med*. 2022 Jun;30(2):110-4.
131. Senol Akar S, Akcali S. Comparison of Two Different Commercial SARS-CoV-2 PCR Diagnostic Kits. *Flora Enfeksiyon Hastaliklari Ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*. 2022:177-82.
132. Eberle U, Wimmer C, Huber I, Neubauer-Juric A, Valenza G, Ackermann N, Sing A; Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team. Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Jun;40(6):1303-8.
133. Dust K, Hedley A, Nichol K, Stein D, Adam H, Karlowsky JA, Bullard J, Van Caesele P, Alexander DC. Comparison of commercial assays and laboratory developed tests for detection of SARS-CoV-2. *J Virol Methods*. 2020 Nov;285:113970.
134. Moran A, Beavis KG, Matushek SM, Ciaglia C, Francois N, Tesic V, Love N. Detection of SARS-CoV-2 by Use of the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 Assays. *J Clin Microbiol*. 2020 Jul 23;58(8):772-3.

- 135.**Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A, Nadkarni G, Glicksberg BS, Houldsworth J, Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med.* 2020 Sep;8(9):70-1.
- 136.**To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, Yip CC, Cai JP, Chan JM, Chik TS, Lau DP, Choi CY, Chen LL, Chan WM, Chan KH, Ip JD, Ng AC, Poon RW, Luo CT, Cheng VC, Chan JF, Hung IF, Chen Z, Chen H, Yuen KY. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020 May;20(5):565-74.
- 137.**Shlomai A, Ben-Zvi H, Glusman Bendersky A, Shafran N, Goldberg E, Sklan EH. Nasopharyngeal viral load predicts hypoxemia and disease outcome in admitted COVID-19 patients. *Crit Care.* 2020 Sep 1;24(1):539-40.
- 138.**Guo X, Jie Y, Ye Y, Chen P, Li X, Gao Z, Li G, Deng H, Zheng Y, Lin B, Chong Y, Chen F. Upper Respiratory Tract Viral Ribonucleic Acid Load at Hospital Admission Is Associated With Coronavirus Disease 2019 Disease Severity. *Open Forum Infect Dis.* 2020 Jul 5;7(7):282-3.
- 139.**Tsukagoshi H, Shinoda D, Saito M, Okayama K, Sada M, Kimura H, Saruki N. Relationships between Viral Load and the Clinical Course of COVID-19. *Viruses.* 2021 Feb 15;13(2):304-5.
- 140.**He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med.* 2020 May;26(5):672-5.
- 141.**Jacot D, Greub G, Jaton K, Opota O. Viral load of SARS-CoV-2 across patients and compared to other respiratory viruses. *Microbes Infect.* 2020 Nov-Dec;22(10):617-21.
- 142.**Le Borgne P, Solis M, Severac F, Merdji H, Ruch Y, Alamé Intern K, Bayle E, Hansmann Y, Bilbault P, Fafi-Kremer S, Meziani F; CRICS TRIGGERSEP Group (Clinical Research in Intensive Care and Sepsis Trial Group for Global Evaluation and Research in Sepsis). SARS-CoV-2 viral load in nasopharyngeal swabs in the emergency department does not predict COVID-19 severity and mortality. *Acad Emerg Med.* 2021 Mar;28(3):306-13.
- 143.**Walsh KA, Jordan K, Clyne B, Rohde D, Drummond L, Byrne P, Ahern S, Carty PG, O'Brien KK, O'Murchu E, O'Neill M, Smith SM, Ryan M, Harrington P. SARS-CoV-2 detection, viral load and infectivity over the course of an infection. *J Infect.* 2020 Sep;81(3):357-71.
- 144.**Shi F, Wu T, Zhu X, Ge Y, Zeng X, Chi Y, Du X, Zhu L, Zhu F, Zhu B, Cui L, Wu B. Association of viral load with serum biomarkers among COVID-19 cases. *Virology.* 2020 Jul;546:122-6.

145. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, Wang Z, Li J, Li J, Feng C, Zhang Z, Wang L, Peng L, Chen L, Qin Y, Zhao D, Tan S, Yin L, Xu J, Zhou C, Jiang C, Liu L. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci.* 2020 Mar;63(3):364-74.
146. Pérez-García F, Martín-Vicente M, Rojas-García RL, Castilla-García L, Muñoz-Gomez MJ, Hervás Fernández I, González Ventosa V, Vidal-Alcántara EJ, Cuadros-González J, Bermejo-Martin JF, Resino S, Martínez I. High SARS-CoV-2 Viral Load and Low CCL5 Expression Levels in the Upper Respiratory Tract Are Associated With COVID-19 Severity. *J Infect Dis.* 2022 Mar 15;225(6):977-82.
147. Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, Goyal P, Safford MM, Satlin MJ. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2021 Dec 6;73(11):4197-205.
148. Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, Corry H, Wong C, Rosenthal A, Worrall D, Giguel F, Piechocka-Trocha A, Atyeo C, Fischinger S, Chan A, Flaherty KT, Hall K, Dougan M, Ryan ET, Gillespie E, Chishti R, Li Y, Jilg N, Hanidziar D, Baron RM, Baden L, Tsibris AM, Armstrong KA, Kuritzkes DR, Alter G, Walker BD, Yu X, Li JZ; Massachusetts Consortium for Pathogen Readiness. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun.* 2020 Oct 30;11(1):5493-4.
149. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jun;20(6):656-7.
150. He Y, Xu X, Lu Q, Hu Z, Jiang Y, Song C, et al. High viral load suggests increased COVID-19 severity in a longitudinal cohort. 2020;
151. Chen W, Xiao Q, Fang Z, Lv X, Yao M, Deng M. Correlation Analysis between the Viral Load and the Progression of COVID-19. *Comput Math Methods Med.* 2021 Jun 8;2021:9926249.
152. Wang Y, Guo Q, Yan Z, Zhou D, Zhang W, Zhou S, Li YP, Yuan J, Uyeki TM, Shen X, Wu W, Zhao H, Wu YF, Shang J, He Z, Yang Y, Zhao H, Hong Y, Zhang Z, Wu M, Wei T, Deng X, Deng Y, Cai LH, Lu W, Shu H, Zhang L, Luo H, Ing Zhou Y, Weng H, Song K, Yao L, Jiang M, Zhao B, Chi R, Guo B, Fu L, Yu L, Min H, Chen P, Chen S, Hong L, Mao W, Huang X, Gu L, Li H, Wang C, Cao B; CAP-China Network. Factors Associated With Prolonged Viral Shedding in Patients With Avian Influenza A(H7N9) Virus Infection. *J Infect Dis.* 2018 May 5;217(11):1708-17.
153. Argyropoulos KV, Serrano A, Hu J, Black M, Feng X, Shen G, Call M, Kim MJ, Lytle A, Belovarac B, Vougiouklakis T, Lin LH, Moran U, Heguy A, Troxel A, Snuderl M, Osman I, Cotzia P, Jour G. Association of Initial Viral Load in Severe Acute Respiratory Syndrome

- Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Patients with Outcome and Symptoms. *Am J Pathol.* 2020 Sep;190(9):1881-7.
- 154.** Pawar RD, Balaji L, Mehta S, Cole A, Liu X, Peradze N, Grossestreuer AV, Issa MS, Patel P, Kirby JE, Rowley CF, Berg KM, Moskowitz A, Donnino MW. Viral load and disease severity in COVID-19. *Intern Emerg Med.* 2022 Mar;17(2):359-67.
- 155.** Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, Niemeyer D, Jones TC, Vollmar P, Rothe C, Hoelscher M, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Ehmman R, Zwirgmaier K, Drosten C, Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020 May;581(7809):465-9.
- 156.** La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, Gautret P, Raoult D. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Jun;39(6):1059-61.
- 157.** Faíco-Filho KS, Passarelli VC, Bellei N. Is Higher Viral Load in SARS-CoV-2 Associated with Death? *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Nov;103(5):2019-21.
- 158.** de la Calle C, Lalueza A, Mancheño-Losa M, Maestro-de la Calle G, Lora-Tamayo J, Arrieta E, García-Reyne A, Losada I, de Miguel B, Díaz-Simón R, López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Carretero O, San Juan R, Aguado JM, Lumbreras C. Impact of viral load at admission on the development of respiratory failure in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Jun;40(6):1209-16.
- 159.** Zhang H, Wang X, Fu Z, Luo M, Zhang Z, Zhang K, et al. Potential factors for prediction of disease severity of COVID-19 patients. *MedRxiv* 2020;
- 160.** Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med.* 1999 Nov-Dec;17(6):1019-25.
- 161.** Hasanoglu I, Korukluoglu G, Asilturk D, Cosgun Y, Kalem AK, Altas AB, Kayaaslan B, Eser F, Kuzucu EA, Guner R. Higher viral loads in asymptomatic COVID-19 patients might be the invisible part of the iceberg. *Infection.* 2021 Feb;49(1):117-26.
- 162.** Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, Xie C, Ma K, Shang K, Wang W, Tian DS. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020 Jul 28;71(15):762-8.
- 163.** Yamada T, Wakabayashi M, Yamaji T, Chopra N, Mikami T, Miyashita H, Miyashita S. Value of leukocytosis and elevated C-reactive protein in predicting severe coronavirus 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2020 Oct;509:235-43.
- 164.** Hu L, Chen S, Fu Y, Gao Z, Long H, Ren HW, Zuo Y, Wang J, Li H, Xu QB, Yu WX, Liu J, Shao C, Hao JJ, Wang CZ, Ma Y, Wang Z, Yanagihara R, Deng Y. Risk Factors Associated

- With Clinical Outcomes in 323 Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Hospitalized Patients in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19;71(16):2089-98.
- 165.** Alon R, Sportiello M, Kozlovski S, Kumar A, Reilly EC, Zarbock A, Garbi N, Topham DJ. Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021 Jan;21(1):49-64.
- 166.** Feng Z, Li J, Yao S, Yu Q, Zhou W, Mao X, et al. The use of adjuvant therapy in preventing progression to severe pneumonia in patients with coronavirus disease 2019: a multicenter data analysis. *MedRxiv*. 2020;
- 167.** Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, Wu Y, Zhang L, Yu Z, Fang M, Yu T, Wang Y, Pan S, Zou X, Yuan S, Shang Y. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020 May;8(5):475-81.
- 168.** Qu R, Ling Y, Zhang YH, Wei LY, Chen X, Li XM, Liu XY, Liu HM, Guo Z, Ren H, Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J Med Virol*. 2020 Sep;92(9):1533-41.
- 169.** Wen W, Su W, Tang H, Le W, Zhang X, Zheng Y, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell discovery*. 2020;6(1):1-18.
- 170.** Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir Med*. 2020 Jul;8(7):681-86.
- 171.** Adam SS, Key NS, Greenberg CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2878-87.
- 172.** Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506.
- 173.** Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol*. 2020 Jul;108(1):17-41.
- 174.** Al-Samkari H, Karp Leaf RS, Dzik WH, Carlson JCT, Fogerty AE, Waheed A, Goodarzi K, Bendapudi PK, Bornikova L, Gupta S, Leaf DE, Kuter DJ, Rosovsky RP. COVID-19 and coagulation: bleeding and thrombotic manifestations of SARS-CoV-2 infection. *Blood*. 2020 Jul 23;136(4):489-500.
- 175.** Brasen CL, Christensen H, Olsen DA, Kahns S, Andersen RF, Madsen JB, Lassen A, Kierkegaard H, Jensen A, Sydenham TV, Madsen JS, Møller JK, Brandslund I. Daily

monitoring of viral load measured as SARS-CoV-2 antigen and RNA in blood, IL-6, CRP and complement C3d predicts outcome in patients hospitalized with COVID-19. *Clin Chem Lab Med*. 2021 Aug 30;59(12):1988-97.

- 176.** Kwon JS, Kim JY, Kim MC, Park SY, Kim BN, Bae S, Cha HH, Jung J, Kim MJ, Lee MJ, Choi SH, Chung JW, Shin EC, Kim SH. Factors of Severity in Patients with COVID-19: Cytokine/Chemokine Concentrations, Viral Load, and Antibody Responses. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Dec;103(6):2412-8.
- 177.** Zhang JJ, Cao YY, Tan G, Dong X, Wang BC, Lin J, Yan YQ, Liu GH, Akdis M, Akdis CA, Gao YD. Clinical, radiological, and laboratory characteristics and risk factors for severity and mortality of 289 hospitalized COVID-19 patients. *Allergy*. 2021 Feb;76(2):533-50.
- 178.** Zhang JJ, Dong X, Cao YY, Yuan YD, Yang YB, Yan YQ, Akdis CA, Gao YD. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1730-41.

SARS-COV-2 KANTİTATİF TANISINDA KULLANILAN FARKLI REAL-TİME PCR CİHAZLARININ VE KİTLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

6%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

- 1 acikbilim.yok.gov.tr
Etiketler 144 words — 1%
- 2 Kacmaz, Nesiba. "Karaciger Nakli yapılan Hasta Ve Hasta yakinlarinin Psikososyal durumlarinin yasad Kalitesi uzerine Etkisi", Marmara Universitesi (Turkey), 2021
ProQuest 84 words — < 1%
- 3 Ilkay Bahceci, Ilknur E Yildiz, Omer F Duran, Umut S Soztanaci, Zeynep Kirdi Harbawi, Feray F Senol, Gokhan Demiral. "Secondary Bacterial Infection Rates Among Patients With COVID-19", Cureus, 2022
Crossref 72 words — < 1%
- 4 www.a1lifesciences.com.tr
Internet 41 words — < 1%
- 5 acikerisim.nku.edu.tr
Internet 38 words — < 1%
- 6 dergipark.org.tr
Internet 31 words — < 1%
- 7 Erdem, Filiz. "Mikozis Fungoides hastalarinin Deri Biyopsilerinde Toll-Benzeri reseptor Ekspresyon 30 words — < 1%

Düzeyi Ve Profili", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2021

ProQuest

- 8 Bülent ÇAKAL. "Origin of SARS-CoV-2", Türkiye Klinikleri Journal of Medical Ethics-Law and History, 2020
Crossref 29 words — < 1%
- 9 www.researchgate.net
Internet 28 words — < 1%
- 10 openaccess.amasya.edu.tr
Internet 27 words — < 1%
- 11 openaccess.hacettepe.edu.tr:8080
Internet 27 words — < 1%
- 12 docs.neu.edu.tr
Internet 26 words — < 1%
- 13 atuder.org.tr
Internet 24 words — < 1%
- 14 Angelica Moran, Kathleen G. Beavis, Scott M. Matushek, Carol Ciaglia, Nina Francois, Vera Tesic, Nedra Love. "The Detection of SARS-CoV-2 using the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 Assays", Journal of Clinical Microbiology, 2020
Crossref 23 words — < 1%
- 15 ziraat.harran.edu.tr
Internet 22 words — < 1%
- 16 www.medwinpublishers.com
Internet 21 words — < 1%
- 17 www.captodayonline.com
Internet 19 words — < 1%

18	openaccess.maltepe.edu.tr internet	17 words – < 1%
19	www.yorulmazmedikolegal.com internet	17 words – < 1%
20	www.bioeksen.com.tr internet	15 words – < 1%
21	Houman Khosravani. "The Dysfunction is in the Details: Neurovascular Changes in COVID-19", Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques, 2020 Crossref	14 words – < 1%
22	www.science.gov internet	13 words – < 1%
23	www.thelancet.com internet	13 words – < 1%
24	9lib.net internet	12 words – < 1%
25	acikerisim.baskent.edu.tr internet	12 words – < 1%
26	nek.istanbul.edu.tr:4444 internet	12 words – < 1%
27	www.myfikirler.org internet	12 words – < 1%
28	acikerisim.ybu.edu.tr:8080 internet	11 words – < 1%

29	www.biorxiv.org Internet	11 words — < 1%
30	214371a4-52b9-4cbc-86d2- f78c0a4d44d5.filesusr.com Internet	10 words — < 1%
31	utsakcongress.com Internet	10 words — < 1%
32	www.psikguncel.org Citizet	10 words — < 1%
33	www.yumpu.com Internet	10 words — < 1%
34	Selda Erensoy. "COVID-19 Pandemisinde SARS- CoV-2 ve Mikrobiyolojik Tanı Dinamikleri", Mikrobiyoloji Bulteni, 2020 Crossref	9 words — < 1%
35	acikerisim.gelisim.edu.tr Internet	9 words — < 1%
36	arthritis-research.biomedcentral.com Internet	9 words — < 1%
37	covid19.gumushane.edu.tr Internet	9 words — < 1%
38	ihslc.mehmetakif.edu.tr Internet	9 words — < 1%
39	library.cu.edu.tr Internet	9 words — < 1%
40	sbuiemc.org	

- Internet 9 words — < 1%
- 41 www.cheric.org 9 words — < 1%
Internet
- 42 www.qixiandoc.com 9 words — < 1%
Internet
- 43 www.sozcu.com.tr 9 words — < 1%
Internet
- 44 Adem Özdemir, Mervenur Demir Çuha, Gülçin Telli
Dizman, Alpaslan Alp, Gökhan Metan, Burçin
Şener. "Sağlık Çalışanlarında SARS-CoV-2 Seroprevalansı:
Türkiye'deki Bir Üniversite Hastanesi Verilerinin Retrospektif
Analizi", Mikrobiyoloji Bulteni, 2021 8 words — < 1%
Crossref
- 45 Deniz Mavi, Ahmet Çağkan İnkaya, "COVID-19:
İmmün Patogenez", Flora the Journal of Infectious
Diseases and Clinical Microbiology, 2020 8 words — < 1%
Crossref
- 46 Gülay Börekçi, Ayşegül Çetinkaya, Özlem
Kandemir, İrem Bekalp Yılmaz, Gülhan Örekici
Temel, Nurcan Aras. "TNF- α , IL-12A, IL-12B ve IFN- γ Gen
Polimorfizmleri ile Kronik Hepatit C Arasındaki İlişkinin
Araştırılması", Mikrobiyoloji Bulteni, 2020 8 words — < 1%
Crossref
- 47 Linda J. Carter, Linda V. Garner, Jeffrey W. Smoot,
Yingzhu Li et al. "Assay Techniques and Test
Development for COVID-19 Diagnosis", ACS Central Science,
2020 8 words — < 1%
Crossref

48	academic.oup.com <small>Internet</small>	8 words — < 1%
49	adudspace.adu.edu.tr:8080 <small>Internet</small>	8 words — < 1%
50	www.finddx.org <small>Internet</small>	8 words — < 1%
51	www.mintankesmie.no <small>Internet</small>	8 words — < 1%
52	www.sporbilim.com <small>Internet</small>	8 words — < 1%
53	www.urfahaberler.com <small>Internet</small>	8 words — < 1%
54	A Curukoglu, MC Ergoren, FE Ozgencil, S Sayiner, ME Ince, T Sanlidag. " First direct human - to - cat transmission of the 2019-nCoV B.1.1.7 variant ", Australian Veterinary Journal, 2021 <small>Crossref</small>	6 words — < 1%
55	Togay Muderris, Abdülhalim Aysel, Reyhan Yiş, Tuba Muderris, İbrahim Mehmet Ali Öktem, Onur Çorakçı. "Is adenotonsillectomy safe in covid-19 era? Investigation of sars-cov2 in adenoid and tonsil tissues", American Journal of Otolaryngology, 2022 <small>Crossref</small>	6 words — < 1%
56	www.ttb.org.tr <small>Internet</small>	6 words — < 1%