



### INVITED REVIEW

#### COVID-19 için tanısal yaklaşımlar

İlke Karayel Hacıoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş:14.08.2020, Kabul: 11.10.2020

\*ilkekarayel@gmail.com

#### Diagnostic approaches for COVID-19

**Eurasian J Vet Sci, 2020, Covid-19 Special Issue, 30-40**

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2020.292

#### Öz

Coronavirus hastalığı-2019 (COVID-19), Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaletinde ortaya çıkmış ve tüm dünyaya yayılmıştır. Hastalığın etkeni olan SARS-CoV-2'nin hızlı ve doğru laboratuvar testleri tespit edilebilmesi erken tanı, hızlı raporlama, karantina tedbirlerinin alınması, erken tedavinin uygulanması ve bulaşma yolunun kesilmesinde önem arz etmektedir. COVID-19 hastalarında gözlenen semptomlar spesifik semptomlar olmadığı için kesin tanı bunlardan yararlanılamamaktadır. Günümüzde, COVID-19 tanısı, RT-PCR, serolojik testler ve bilgisayarlı tomografi ile yapılmaktadır; ayrıca LAMP, RT-LAMP, CRISPR vb. gibi alternatif teknolojiler de geliştirme aşamasındadır ve yakın zamanda COVID-19 tanısında kullanılacağı düşünülmektedir. Bu derlemede, SARS-CoV-2 tanısı amacıyla örnek toplama, kullanılan nükleik asit testleri, serolojik testler ve bilgisayarlı tomografi yanı sıra alternatif teknikler hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır. COVID-19'un dünya çapındaki yayılımı göz önüne alındığında, hızlı, güvenilir ve ucuz alternatif tanı testlerinin geliştirilmesine acil ihtiyaç duyulmaktadır ve bu yöntemlerin geliştirilmesi gelecekteki salgınları önlemek açısından da faydalı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** COVID-19, RT-PCR, teşhis, SARS-CoV-2

#### Abstract

Coronavirus disease-2019 (COVID-19) emerged in Hubei Province of China in December 2019 and spread all over the world. Fast and accurate laboratory tests of SARS-CoV-2, the cause of the disease, are important in early diagnosis, early reporting, taking early quarantine measures, applying early treatment and stopping the transmission path. Since the symptoms observed in COVID-19 patients are not specific symptoms, they cannot be utilized in the definitive diagnosis. Currently, the diagnosis of COVID-19 is made by RT-PCR, serological tests and computed tomography, also alternative technologies such as rapid diagnostic kits, LAMP, RT-LAMP, CRISPR etc., are under development and are thought to be used in the diagnosis of COVID-19 in the future. In this review, it is aimed to give information about sample collection, nucleic acid tests, serological tests and computed tomography as well as alternative techniques for the diagnosis of SARS-CoV-2. Given the worldwide spread of COVID-19, there is an urgent need to develop fast, reliable and inexpensive alternative diagnostic tests, and the development of these methods will also be useful in preventing future epidemics.

**Keywords:** COVID-19, diagnosis, RT-PCR, SARS-CoV-2





## Giriş

Coronavirus hastalığı-2019 (COVID-19), Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaletinde ortaya çıkmıştır. Hastaların, ateş, öksürük, nefes darlığı ve diğer bazı semptomlarla hastanelere başvurduğu kaydedilmiştir. Yapılan taramalar sonucunda elde edilen bulgular, sağlıklı akciğer görüntüleri ile karşılaştırıldığında, hastaların akciğerlerinde, daha yoğun ve yaygın opasite gösteren alanların olduğu gözlenmiştir. Bilinen patojenlere karşı yapılan multipleks kantitatif PCR (qPCR) analizlerinin tümünün negatif sonuçlanması, bu pnömoninin nedeninin bilinen etkenlerden farklı olduğunu göstermiştir (Udugama ve ark 2020, Zhou ve ark 2020). Ocak ayında, hastaların bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvılarından alınan numuneler, yeni nesil sekans ile analiz edilmiş ve elde edilen veriler hastalığın betacoronavirus B 'ye benzer genetik sekansa sahip bir virus nedenli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Lu ve ark 2020). Bu yeni virusun, sırasıyla, şiddetli akut solunum sendromu virusu (SARS-CoV), yarasa kaynaklı SARS-benzeri coronavirus ve Orta Doğu solunum sendromu virusu (MERS-CoV) ile yaklaşık %96, %80 ve %50 benzerliğe sahip olduğu keşfedilmiştir (Zhou ve ark 2020). ICTV, 11 Şubat 2020'de bu yeni virusun adını "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)" olarak açıkladı ve bu virusun yapmış olduğu hastalığa da "COVID-19" adı verildi.

Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre 14 Ağustos 2020 itibarıyla hastalık en az 215 ülkeye yayıldı, 20 milyondan fazla insana bulaştı ve küresel olarak en az 750.000'den fazla ölümle sonuçlandı (WHO 2020c). Ancak, tespit edilmeyen birçok hafif veya asemptomatik vaka olduğu için, bildirilen toplam COVID-19 enfeksiyonu sayısının muhtemelen bildirilenden çok daha fazla olduğu değerlendirilebilir.

SARS-CoV-2 insandan insana bulaşmaktadır (Lu ve ark 2020). Günümüzdeki mevcut hipotez, ilk bulaşmanın yarasalar ile henüz belirlenmemiş bir ara konak hayvan arasında gerçekleşmiş olduğu üzerinedir (Zhou ve ark 2020). Bu aşamada, en olası bulaşma yolunun doğrudan temas ve damlacık enfeksiyonu yoluyla olduğu düşünülmektedir (Kitajima ve ark 2020). SARS-CoV-2 için R0 değeri yaklaşık 2,3 olarak tahmin edilmektedir ve bu değer SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş bir kişinin bu virusu en azından 2 ya da 3 yeni insana bulaştırabileceğini ifade etmektedir. Sonuç olarak 2009 influenza pandemisi için R0 değerinin 1,5 olduğu da dikkate alındığında, SARS-CoV-2 nedenli pandeminin insan sağlığı, psikolojik ve sosyolojik boyutları, ekonomi vb. alanlarındaki önemi açıktır (Petersen ve ark 2020).

Viral patojenin hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi, erken tespit ve raporlama, hızla tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi, karantina, virus yayılımını yavaşlatma ve en aza indirme mücadelesinde gereklidir (Jalandra ve ark 2020, Yan ve ark 2020). Vakayı tanımlama, izolasyon ve temas izleme (enfekte bir hastayla temas etmiş olabilecek kişileri tanım-

lamak) yoluyla yayılmayı sınırlayan kontrol önlemlerinin hızlı bir şekilde uygulanmasını mümkün kılmaktadır. Etkili teşhis yaklaşımlarının tartışılması ve virusun kendisini veya konakçı vücudun virusa yanıtını tespit etmeye çalışılması gerekir (Jalandra ve ark 2020). Günümüzde, SARS-CoV-2 tespiti için çok sayıda tanısal teknoloji mevcuttur ve birçoğu geliştirilme aşamasındadır.

## SARS-CoV-2'nin biyolojik özellikleri

SARS-CoV-2 ilk olarak Wuhan'daki hasta örneklerinde tanımlanmıştır. Hastalardan alınan BAL sıvısı örneklerinin insan solunum yolu epitel hücrelerine inokulasyonundan sonra, hasar görmüş veya öldürülmüş hücrelerden toplanan süpernatant, negatif boyanmış transmisyon elektron mikroskopisi ile analiz edilmiştir (Zhu ve ark 2020). Elde edilen veriler, virusun 60-140 nm çapında protein çıkıntılarıyla çevrili bir zarfa sahip olduğunu ortaya koymuştur (Zhu ve ark 2020). Genel olarak virus, *Coronaviridae* familyasındaki diğer viruslara benzemektedir.

CoV'lar, insanların, diğer memelilerin ve kuşların solunum, gastrointestinal, hepatik ve merkezi sinir sistemlerinde enfeksiyona neden olabilen tek iplikçikli pozitif polariteli RNA viruslarıdır (Fehr ve Perlman 2015). CoV'lar *Coronaviridae* ailesinin *Orthocoronavirinae* alt ailesinde yer almaktadır ve bu alt aile *Alfa-*, *Beta-*, *Gama-* ve *Deltacoronavirus* olmak üzere dört genustan oluşmaktadır (ICTV). SARS-CoV-2, Beta CoV'lar içerisinde yer almaktadır. Yaklaşık 30.000 nükleotidten oluşan genom, 5' UTR, korunmuş bir replikaz domain (ORF1ab), spike, zarf, membran ve nükleokapsid olmak üzere 4 adet yapısal protein kodlayan genleri, 3' UTR ve birçok tanımlanmamış yapısal olmayan açık okuma alanı (Open Reading Frame, ORF) içermektedir (Fehr ve Perlman 2015). RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp), genom bütünlüğünü korumak için yapısal olmayan proteinlerle birlikte hareket eder. SARS-CoV-2'deki RdRp geninin yarasa coronavirus RaTG13 RdRp gen bölgesine oldukça benzer olduğu ve tüm genom karşılaştırıldığında SARS-CoV-2 nin %96 oranında RaTG13 genom dizisine benzer olduğu ortaya konulmuştur (Zhou ve ark 2020).

SARS-CoV-2'nin dört yapısal proteini spike yüzey glikoproteini (S), küçük zarf proteini (E), matriks proteini (M) ve nükleokapsid proteini (N)'dir (Lu ve ark 2020). Coronaviruslarda, S proteini, virusun reseptörlere bağlanmasını ve membran füzyonunu sağlamaktadır ve bu da konakçı tropizmi ve bulaşma kapasitesini belirlemektedir (Lu ve ark 2020). SARS-CoV-2'nin S gen bölgesi incelendiğinde, daha önce tanımlanan tüm SARS ile ilişkili coronavirusların S gen bölgesinden nükleotit yönünden <%75 oranında daha farklı olduğu bulunmuştur (Zhou ve ark 2020). Buna karşın, RNA'nın paketlenmesi ve/veya proteinlerin birleşmesi, tomurcuklanma, zarf oluşumu ve patogeneze görev alan diğer üç yapısal protein, daha korunaklı bulunmuştur (Udugama ve ark 2020).



SARS-CoV-2'nin hücelere giriş için anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (angiotensin converting enzyme- ACE2) reseptörü ile yüksek affiniteyle etkileşime girdiği görülmektedir (Zhou ve ark 2020). ACE2, akciğerlerin arteriyel ve venöz endotel hücreleri ile arteriyel düz kas hücrelerinde, mide, ince bağırsak, kolon, cilt, lenf düğümleri, karaciğer safra kanalları, böbrek parietal epitel hücreleri ve beyinde bulunmaktadır. Aynı zamanda akciğer alveoler epitel hücrelerinin ve ince bağırsak enterositlerinin yüzeyinde de bulunduğundan bu hücreler de enfekte olmaktadır (Ding ve Liang 2020). Akciğerlerin alt bölgelerindeki hücrelerde ACE2 daha fazla eksprese edildiğinden bilgisayarlı tomografi (BT) taramalarında o bölgelerde daha yoğun opaklık görülmektedir (Udugama ve ark 2020). SARS-CoV-2'nin biyolojik özelliklerini anlamak, daha doğru, hassas ve etkili tespit yöntemlerinin geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir.

### Örneklerin toplanması

#### Şüpheli/hasta tanı örneklerinin toplanması

Uygun numune toplanması ve işlenmesi, laboratuvar teşhisinde en önemli adımlardan birisidir. SARS-CoV-2 enfeksiyonu şüphelenilen hastalardan alınabilecek numuneler oldukça çeşitlidir. Öncelikle, ciddi şekilde etkilenen hastalardan üst solunum yolu ve alt solunum yolu numunelerinin mutlaka tanı için toplanması önerilmektedir (Pan ve ark 2020). Üst solunum yolu örnekleri arasında nazofarengeal ve orofarengeal sürüntü örnekleri ile nazal aspiratlar bulunurken, alt solunum yolu örnekleri balgam, BAL sıvısı ve trakeal aspiratları içermektedir. Viral yüklerdeki değişkenlik göz önüne alındığında, solunum örneklerinin negatif bir test sonucu vermesi hastalığın olmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü bu negatif sonuçlar, örnekleme için uygun yapılmamasından, örnekleme bölgesindeki düşük viral yükten veya viral genomdaki herhangi bir mutasyonlardan kaynaklanabilir. Bu nedenle, yapılan ilk test negatif ise yeniden alınan materyalin test edilmesi gerekmektedir. Ancak, SARS-CoV-2 RNA'sının üst solunum yolu örneklerinde tespit edilemese bile dışkı, kan veya idrarda tespit edilebileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (Pan ve ark 2020, Zhang ve ark 2020b). Bu nedenle alt solunum yolu örneklerinin alınmadığı durumlarda eğer mümkünse dışkı, kan veya idrar örneklerinin alınmasının enfeksiyonunun tespit edilmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir (CDC 2020a).

Numunelerin kalitesini, numunenin toplanması, taşınması ve saklama kriterleri gibi faktörler etkilemektedir. Üst solunum yolu ve balgam örnekleri için örnek kalitesi büyük ölçüde örneği alan kişinin nasıl aldığına bağlıdır. Öncelikle, toplama sırasında plastik şaftlı ve steril kaplı sentetik elyaf çubuklarının kullanılması tavsiye edilirken, virüsleri etkisiz hale getiren ve PCR testini inhibe eden maddeler içerebilecek kalsiyum aljinat çubukları veya tahta şaftlı çubuklar kullanılmamalıdır (CDC 2020a). İkincil olarak, yeterli miktarda

virus ile enfekte hücre elde etmek için sürüntü örneklerinin yeterince derinden alınması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, kombine nasofarengeal ve orofarengeal örneklerin birlikte alınmasının solunum yolu virüslerini tespit etme duyarlılığını artırabileceğini bildirmektedir (Yan ve ark 2020). Bazı durumlarda balgam da teşhis amaçlı olarak kullanılabilir (National Health Commission of China 2019). Sürüntü örnekleri, 2-3 mL viral taşıma medyumunu (VTM) veya steril fizyolojik tuzlu su içeren steril bir tüpe hemen yerleştirilmelidir (CDC 2020b). CDC (2020d) ticari olarak temin edilebilen ürünlere bir alternatif olması amacıyla VTM hazırlama prosedürü yayınlamıştır. Bu prosedüre göre VTM "Hanks dengeli tuz solüsyonu, ısı ile inaktive edilmiş, steril fetal dana serumu, gentamisin sülfat ve amfoterisin B" içermektedir (CDC 2020d). Kontaminasyonu önlemek için, her türlü numune steril kaplarda taşınmalı ve numune stabilitesini sağlamak için depolama koşulları kesinlikle kontrol edilmelidir. Numuneleri alındıktan sonra 72 saate kadar 2-8 °C'de saklanması eğer test için bekleyeceklerse veya teslimde gecikme bekleniyorsa, örnekleri -70°C veya altında saklanması önerilmektedir (CDC 2020a).

Solunum örneklerinde SARS-CoV-2'nin viral kinetiğini gösteren çalışmalara baktığımızda, Zhang ve ark, (2020b) semptomların görülmesinden sonraki ilk örneklemede oral sürüntü örneklerinin sadece % 50'sinin pozitif olduğunu, 5 gün sonra ise oral sürüntü örneklerinin sadece %25'inin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Pan ve ark (2020) saptanabilir viral yükün hastalığın başlamasından sonraki günlere bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Başlangıçtan sonraki ilk 14 gün içinde, SARS-CoV-2 balgamda en güvenilir şekilde tespit edilmiş ve bunu burun sürüntü örnekleri izlemiş ancak, boğaz sürüntü örnekleri semptom başlangıcından 8 gün sonra güvenilir bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda, dışkıda da SARS-CoV-2'nin viral RNA'sı rapor edilmiştir (Pan ve ark 2020, Zhang ve ark 2020b). Ancak, dışkıdaki viral yüklerin kinetiği hala çok açık değildir. Veriler, viral yükün solunum sistemi örneklerinden tespit edilen miktardan az da olsa, hastalığın ilk 2 haftasında doğrulanmış vakaların %53'ünün dışkılarında SARS-CoV-2 RNA'sının tespit edilebildiğini göstermiştir (Pan ve ark 2020). Başka bir çalışmada ise semptomların görülmesinden sonraki ilk örneklemede anal sürüntü örneklerinin sadece %25'inin, 5 gün sonra alınan anal sürüntü örneklerinin ise %37,5'inin pozitif bulunduğu belirtilmiştir (Zhang ve ark 2020b). Bu veriler, erken dönemde oral pozitiflerin, daha sonraki dönemde anal pozitiflerin daha fazla olabileceğini düşündürmektedir (Zhang ve ark 2020b).

Kan örnekleri ise hem nükleik asit hem de serolojik testler için kullanılabilir. Özellikle kan örneklerinden virus tespiti, viremiyi izlemek için etkili bir yoldur. Kanda saptanabilir SARS-CoV-2 RNA'sı tespit edilen hastalar şiddetli semptom evresindeki hastalardır ve bu da kandaki viral RNA'nın hastalık şiddeti ile güçlü bir korelasyon içerisinde olduğunu gös-





termektedir (Chen ve ark 2020).

Çin Ulusal Sağlık Komisyonu ve ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), bulaşmayı önlemek için protokoller belirlemiştir. Bu protokollerde en az 24 saat arayla toplanan, iki solunum yolu örneğinin SARS-CoV-2 RT-qPCR testi sonucunda negatif tespit edilmesi, kişinin bulaştırma riskinin olmadığı şeklinde değerlendirilmektedir (CDC 2020c).

### **İzlem amaçlı örneklerin toplanması**

Günümüzde, mevcut COVID-19 tanı testleri, toplum genelinde COVID-19 insidensini hızlı bir şekilde izlemek için yetersiz kalmaktadır. Büyük ölçeklerde tekrarlanan bireysel testler yapmak da mümkün olmadığından, hastalığın yoğun olduğu noktaları bulmak ve oradan izolasyon ve tedaviye başlamak gerekmektedir (Venugopal ve ark 2020). Topluluk genelinde hızlı izlemenin, COVID-19'un (ve gelecekteki diğer viral salgınların) topluluklarda yayılmasının artmakta mı yoksa azalmakta mı olduğunu hızlı bir şekilde belirlemek açısından, büyük uluslararası öneme sahip olabileceği düşünülmektedir (Daughton 2020).

Dışkıda SARS-CoV-2 tespit edilmesi, atık sular da bu virusun olabileceğini kanıtlamıştır (Holshue ve ark 2020, Lodder ve de Roda Husman 2020). Çin, Hollanda, ABD, Fransa ve Avustralya'da enfekte kişilerin dışkılarında SARS-CoV-2 virusunun bulunduğu dair raporlar bulunmaktadır (Holshue ve ark 2020, Lodder ve de Roda Husman 2020, Wu ve ark 2020c). Xu ve ark (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise, SARS-CoV-2 fekal-oral yoldan bulaşmasının muhtemel olduğu belirtilmiş, bu nedenle bu virusun su sistemiyle yayılmasıyla ilgili endişeler gündeme gelmiştir. Virusun, çevresel bulaşın bir parçası olma potansiyeli nedeniyle, içme suyu güvenliği, atık su sanitasyonu ve kanalizasyon konusunda önemli endişeler ortaya çıkmıştır (Lodder ve de Roda Husman 2020).

Çevresel sürveyans, virusun belirli popülasyonlarda yayılma derecesini ve süresini izlemek için kullanılan bir araçtır (Kroiss ve ark 2018). Bu teknik atık su bazlı epidemiyoloji (ASBE) ya da kanalizasyon epidemiyolojisi kavramı ile uyumludur. Nispeten yeni bir alan olan ASBE son 15 yıldır istikrarlı bir şekilde ilerlemektedir ve araştırma çabaları büyük ölçüde Avrupa'da yoğunlaşmıştır (Daughton 2020, Venugopal ve ark 2020). Özellikle asemptomatik COVID-19 vakalarında, kapsamlı ve gerçek zamanlı olarak viral enfeksiyon açısından bölgelerin araştırılması daha kolay olacaktır. Hollanda, ABD, Fransa ve Avustralya'da atık sudaki SARS-CoV-2'nin moleküler tespiti hakkında raporlar bulunmaktadır (Ahmed ve ark 2020, Lodder ve de Roda Husman 2020, Wu ve ark 2020a, Wurtzer ve ark 2020). Ülkemizde de atık sular da SARS-CoV-2'nin taranması ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir ve bu çalışmalar, Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından desteklenmektedir. Yapılan çalışmaların sonucunda, İstanbul'da toplana

nan atık sular da SARS-CoV-2 tespit edilmiştir (Alpaslan-Kocamemi ve ark 2020, Kocamemi ve ark 2020).

Atık sudaki SARS-CoV-2'nin yarı ömrü çok kısa olduğundan (Kitajima ve ark 2020), kullanılacak tespit yönteminin hem enfektif hem de enfektif olmayan partikülleri hesaba katması gerekmektedir. Bu partiküllerin kanalizasyon yüklerini ölçmek için kullanılacak tespit yöntemleri arasında, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), RT-PCR, dijital RT-PCR, multipleks PCR, cDNA mikrodizileri, izotermal nükleik asit amplifikasyonu bazlı yöntemleri veya yeni keşfedilen "paper-based" doğrudan tespit yöntemleri yer alabilmektedir (Daughton 2020, Venugopal ve ark 2020).

### **Tanı yöntemleri**

#### **Günümüzde COVID-19 teşhisi için kullanılan testler**

COVID-19 hastalarında gözlenen semptomlar spesifik semptomlar olmadığı için kesin tanı için birçok tanısal yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Guan ve ark (2020) Çin'deki 1099 COVID-19 hastasının %44'ünün hastaneye girdiklerinde ateşi olduğunu ve geriye kalanın %89'unun da hastanedeyken ateşinin çıktığını bildirmiş, ayrıca hastaların öksürük, yorgunluk, balgam ve nefes darlığı gibi diğer solunum yolu enfeksiyonları ile de ilişkili semptomlarının olduğunu da belirtmişlerdir. Aynı zamanda bazı hastalarda ishal de gözlenmiştir.

Günümüzde, COVID-19 tanısı ve taraması için nükleik asit testleri ve BT taramaları kullanılmaktadır. Moleküler teknikler, spesifik patojenleri hedefleyebildikleri ve tanımlayabildikleri için kesin tanı açısından, semptoma dayalı tanı ve BT taramalarından daha uygundur (Jalandra ve ark 2020). Moleküler tekniklerin geliştirilmesi, patojenin protein ve genom yapısının anlaşılmasına veya enfeksiyon sırasında ve sonrasında konakta protein ve gen ekspresyonundaki değişikliklere bağlıdır (Udugama ve ark 2020). SARS-CoV-2'nin ilk genom dizisi, çoklu genomları dizilemek için yüksek verimli bir yöntem olan metagenomik RNA dizilimi ile gerçekleştirilmiştir (Wu ve ark 2020b). O zamandan bu yana, araştırmacılar tarafından "Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID)" ve GenBank'ta 4200'den fazla genom dizisi girişi yapılmıştır (GISAID 2020). Genom dizilimi araştırmacıların PCR ve diğer nükleik asit testleri için primer ve prob dizileri tasarlamaları için oldukça önemlidir. SARS-COV-2 ile enfekte olmuş bireyler virusa karşı antikorlar ürettiklerinden, bu antikorlar da enfekte olmuş bireylerin tanımlanması için kullanılabilir (Jalandra ve ark 2020). SARS-CoV-2'nin genom ve protein yapısı tanımlanmasına karşın, konakçının virusa karşı oluşturduğu yanıt halen araştırılma konusu olmaya devam etmektedir.

Nükleik asit testleri: Kolay metodolojisi ve kapsamlı olarak onaylanmış standart çalışma prosedürü nedeniyle teşhis için RT-PCR en çok tercih edilen ve en yaygın olarak kullanı-



lan yöntemidir (CDC 2020, Jalandra ve ark 2020, Yan ve ark 2020). SARS-CoV-2 için birçok RT-PCR testi geliştirilmiş olmasına rağmen, klinik olarak doğrulanmış vakaların sadece bir kısmında nükleik asit testleri pozitif bulunmaktadır (Yan ve ark 2020). Nükleik asit testlerinde pozitif oranını yükseltmek için standart örnek toplama, sıkı saklama ve taşıma koşulları, uygun ekstraksiyon ve amplifikasyon prosedürleri gerekmektedir (Yan ve ark 2020). Testlerin spesifitesini arttırmak için, ikinci bir genom bölgesinin de test edilmesi önerilmektedir (Chu ve ark 2020). Sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla kullanılacak kontroller de oldukça önem arz etmektedir (Udugama ve ark 2020). CDC, moleküler çalışmalarda, ekstraksiyon için bir negatif ve bir pozitif kontrol, PCR çalışması için bir negatif ve bir pozitif kontrol; aynı zamanda PCR inhibitör maddelerini saptamak için de zayıf bir pozitif kontrol ile çalışmayı önermektedir (CDC 2020a). Aynı zamanda bu harici kontroller dışında plazmid DNA, virus benzeri parçacıklar (VLP), RNase P geni ve beta-aktin gibi hava yolu epitel hücrelerinin genleri de internal kontroller olarak kullanılmalıdır (Yan ve ark 2020).

SARS-CoV-2'yi tespit etmek için birçok ticari ve kurum içi analiz metodolojisi geliştirilmiştir. RT-PCR, SARS-CoV-2 RNA'sının tamamlayıcı DNA (cDNA) ters transkripsiyonunun ardından bu cDNA'nın spesifik bölgelerinin amplifikasyonundan oluşmaktadır (Udugama ve ark 2020). Bu testlerin tasarım süreci genellikle iki ana basamaktan oluşmaktadır: Bunlardan birincisi genom dizilerinin hizalanması ve primer tasarımıdır. Sonraki aşamada ise testin optimizasyonu (kullanılan malzemelerin durumu, inkübasyon süreleri ve sıcaklıklar vb.) ve uygulanması yer almaktadır. RT-PCR, tek aşamalı veya iki aşamalı olarak gerçekleştirilebilir. Tek aşamalı RT-PCR yüksek verimli analiz için hızlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlayabilmektedir. Aynı ayrı tüplerde sırayla yapılan iki aşamalı RT-PCR metodu ise, tek aşamalı RT-PCR'dan daha hassastır, ancak daha fazla zaman alır ve ek parametrelerin optimize edilmesini gerektirir (Udugama ve ark 2020).

Dünya çapında COVID-19'un yayılmasını kontrol etmek amacıyla, uzun analitik adımları basitleştiren, istenen hassasiyet ve özgüllük seviyelerinde kısa sürede sonuç veren hızlı, uygun maliyetli teşhis testlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Kriegova ve ark 2020). SARS-CoV-2 teşhisinin mevcut durumda en sınırlayıcı, zaman alıcı adımı, RT-qPCR'dan önce bir virus taşıma medyumunda örneklenmiş sürüntü örneklerinden viral RNA'nın izolasyonudur (Kriegova ve ark 2020). Bu adım aynı zamanda dikkat gerektirmekte ve hatta bazı örnekler için kontaminasyon riskini de beraberinde getirmektedir (Smyrlaki ve ark 2020). Bu nedenle, hızlı, güvenli, uygun maliyetli ve standart yöntemlerle karşılaştırılabilir hassasiyete ulaşan ve numune alındıktan sonra RNA ekstraksiyonu yapılmadan, doğrudan ısı ile inaktive edilmiş veya parçalanmış örnekler ile uygulanan RT-qPCR testleri geliştirilmektedir (Beltrán-Pavez ve ark 2020, Kriegova ve ark 2020, Smyrlaki ve ark 2020).

Yapılan çalışmalarda SARS ile ilişkili virus genomları arasında korunaklı üç bölge keşfedilmiştir; ORF1ab bölgesindeki RdRp geni; E geni ve N geni (Woo ve ark 2010). Chu ve ark (2020) SARS-CoV-2 <10 kopya/reaksiyonu tespit edebilen ORF1b ve N genini hedefleyen iki adet tek aşamalı qRT-PCR testi geliştirmişlerdir ki bu testlerden N gen testi, pozitif klinik örnekleri saptamada ORF1b gen testinden yaklaşık 10 kat daha duyarlıdır. Corman ve ark (2020) ise E ve RdRp genini hedefleyen, sırasıyla 5.2 ve 3.8 kopya/reaksiyon saptama sınırı (LOD) ile en iyi hassasiyeti elde eden testleri geliştirmişler ancak N genini hedefleyen testin biraz daha az duyarlı olduğunu saptamışlardır. Bunların dışında da farklı ülkelerden çalışma grupları kurum içi geliştirmiş oldukları moleküler analiz protokollerini paylaşmışlardır. Özetleyecek olursak, CDC Çin ORF1ab ve N genini hedefleyen primerler ve problar (CDC 2020b); Almanya'da Charité, tarama testinin ilk adımı olarak E gen testini ve ardından doğrulayıcı test olarak RdRp gen testini (Corman ve ark 2020); Fransa'da Pasteur Enstitüsü RdRp genini hedefleyen testini (Pasteur Institut 2020); Hong Kong Üniversitesi'nden bilim adamları tarama testi olarak N geni RT-PCR'ı ve doğrulayıcı test olarak ORF1b testini (HKU 2019); Tayland Halk Sağlığı Bakanlığı N genini hedefleyen testi (Thailand Department of Medical Sciences Ministry of Public Health 2020); Japonya Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü, ORF1a ve S genini hedefleyen iç içe RT-PCR testi yanı sıra N genini hedefleyen RT-PCR testini (Nao ve ark 2019); CDC ABD ise, SARS-CoV-2'nin N genini hedefleyen üç çift primer içeren testleri önermektedir (US CDC 2020) (Tablo 1). Testlere bakıldığında, hem ticari hem "in-house" testlerin, SARS-CoV-2 genomunun iki veya üç bölgesini tespit etmek için tasarlandığı görülmektedir.

Klinik uygulamalarda RT-PCR testleri için farklı iş akışları bulunmaktadır. Çin Ulusal Sağlık Komisyonu hem ORF1ab hem de N'nin olumlu bir sonuç için pozitif test edilmesi gerektiğini önermektedir. Yalnızca bir bölge pozitifse, sonucun yeniden test edilmesi gerekir (National Health Commission of China 2019). ABD'de CDC, pozitif bir sonuç için, N bölgesini hedefleyen tüm testlerin pozitif olması gerektiğini önermektedir. Yalnızca bir hedef pozitifse, sonuç kesin değildir ve tekrar test edilmesi gerekir (CDC 2020a). Bu nedenle, pozitif bir vakayı tanımlamak için test edilen iki veya üç bölgenin hepsinin pozitif olması önemlidir. Corman ve ark (2020), SARS-CoV-2 tanısı için üç aşamalı bir iş akışı önermişlerdir. Bu üç aşamayı tarama, konfirmasyon ve ayırıcı analizler olarak tanımlamaktadırlar. Tanımlanan enfekte hasta sayısını en üst düzeye çıkarmak için ilk adım, E geninin farklı bölgelerini hedefleyerek SARS ile ilgili tüm virusları tespit edilmesidir. Bu test pozitifse, iki farklı primer ve iki farklı prob kullanılarak RdRp geninin saptanmasını önerilmektedir. Eğer, bu sonuçlar da pozitif çıkarsa, iki prob sekansından biriyle ayırıcı test işlemi yapılır (Corman ve ark 2020). Diğer yandan Chu ve ark (2020), biraz daha farklı bir test iş akışı önermektedir. Numuneleri N geni için primerler kullanarak





Tablo 1. SARS-CoV-2 tanısı için kullanılan RT-PCR testleri ve primerleri

Ülke	Hedef bölge	Primer ve probler	Referans
ABD	N1	F:GACCCCAAATCAGCGAAAT R:TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG P:FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1	US CDC, 2020
	N2	F:TTACAAACATTGGCCGCAAA R:GCGCGACATTCCGAAGAA P:FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1	
	N3	F:GGGAGCCTTGAATACACCAAAA R:TGTAGCACGATTGCAGCATTG P:FAM-AYCACATTGGCACCCGCAATCCTG-BHQ1	
Almanya	E	F:ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT R:ATATTGCAGCAGTACGCACACA P:FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Corman ve ark 2020
	RdRp	F:GTGARATGGTCATGTGTGGCGG R:CARATGTTAAASACACTATTAGCATA P2:FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ P1:FAM-CCAGGTGGWACRATCATCMGGTGATGC-BBQ	
Çin	ORF1ab	F: CCCTGTGGGTTTTACACTTAA R: ACGATTGTGCATCAGCTGA P:FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1	CDC, 2020b
	N	F:GGGAACTTCTCCTGCTAGAAT R: CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG P: FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA	
Çin, Hong Kong	N	F: TAATCAGACAAGGAACTGATTA R: CGAAGGTGTGACTTCCATG P: FAM-GCAAATGTGCAATTTGCGG-TAMRA	HKU, 2019
	ORF1b	F: TGGGGYTTTACRGGTAACCT R: AACRCGCTTAAACAAAGCACTC P:FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-TAMRA	
Fransa	RdRp	nCoV_IP2-12669F: ATGAGCTTAGTCCTGTTG nCoV_IP2-12759R: CTCCCTTTGTGTGTTGT nCoV_IP2-12696bP: Hex-AGATGTCTTGTGCTGCCGGTA-BHQ1 nCoV_IP4-14059F: GGTAAGTGTATGATTTTCG nCoV_IP4-14146R: CTGGTCAAGGTTAATATAGG nCoV_IP4-14084P: FAM-TCATACAAACCACGCCAGG-BHQ1	Pasteur Institut, 2020
Japonya	ORF1a	1st-F:TTCCGGATGCTCGAACTGCACC 1st-R:CTTTACCAGCAGGTGCTAGAAGG 2nd-F:CTCGAACTGCACCTCATGG 2nd-R:CAGAAAGTTGTTATCGACATAGC Seq-F:ACCTCATGGTCATGTTATGG Seq-R:GACATAGCGAGTGTATGCC	Nao ve ark 2019
	S	1st-F:TTGGCAAATTCAGACTCACTTT 1st-R:TGTGGTTCATAAAAATTCCTTTGTG 2nd-F:CTCAAGACTCACTTTCTCCAC 2nd-R:ATTTGAAACAAAGACACCTTCAC Seq-F:AAGACTCACTTCTTCCACAG Seq-R:CAAAGACACCTTCACGAGG	
	N	F:AAATTTTGGGGACCAGGAAC R:TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC P:FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ	
Tayland	N	F:CGTTTGGTGGACCTCAGAT R:CCCCACTGCGTTCTCCATT P:FAM-CAACTGGCAGTAACCA-BQH1	Thailand Department of Medical Sciences Ministry of Public Health, 2020

numuneleri taradıktan sonra confirmasyon için ORF1b gen bölgesini kullanmışlardır. Bu test akışında numunenin N gen primeri ile pozitif ve ORF1b gen primerleriyle negatif olması durumunda tanı kesin değildir. Bu tip durumlarda, tanıyı doğrulamak için protein testlerinden (antikor testleri) veya sekanslamadan yararlanılmaktadır.

Serolojik testler: Serolojik testler, nükleik asit testlerinin mümkün olmadığı durumlarda tanı için, devam eden bir salgının araştırılması veya bir salgının derecesini retrospektif olarak değerlendirmek de dahil olmak üzere serolojik araştırmalar için kullanılmaktadır (Yan ve ark 2020). Serolojik testler, nükleik asit testlerinden farklı olarak, iyileşmeden



sonra da hastalığı tespit edebilme avantajına sahip olması sebebiyle, hekimlerin hem hasta hem de iyileşmiş hastaları izlemesini sağlayarak toplam SARS-CoV-2 enfeksiyonlarına yönelik daha iyi bir tahmin olanağı sağlamaktadır (Udugama ve ark 2020). Ancak, antikor serokonversiyonu güvenilir bir enfeksiyon kanıtı sağlasa da bu testler, erken tanı için uygun değildir (Yan ve ark 2020). Örneğin, SARS'da daha yüksek nötralize edici antikor yanıtı, daha uzun süreli hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, MERS-CoV'a karşı oluşan erken antikor yanıtı, azalmış hastalık şiddeti ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, antikorların test edilmesi sürveyans, hastalık sonucunun tahmini ve epidemiyolojik araştırma için yararlıdır, ancak erken tanı için yararlı bulunmamaktadır (Yan ve ark 2020).

Nükleik asit testlerinin negatif olduğu ve COVID-19 enfeksiyonuyla güçlü bir epidemiyolojik bağlantı olduğu durumlarda, çift serum örneklerinin (akut ve iyileşen fazda) onaylanmış serolojik testler ile test edilmesinin tanıyı destekleyebileceği önerilmektedir (WHO 2020a). SARS-CoV-2 serolojisi için DSÖ, ilk serum örneğinin hastalığın 1. haftasında toplanmasını ve ikincisinin 2 ila 4 hafta sonra toplanmasını önermektedir (WHO 2020a).

Serolojik testlerde temel konu antijenin kaynağıdır. Bu yöntemlerden bazıları (nötralizasyon vb) sadece duyarlı hücre kültürlerine ve canlı virusa ihtiyaç duyduklarından uygun ve hızlı metotlardır. Buna karşın, bu metotlar için Biyogüvenlik Seviye 3 Laboratuvarı (BSL-3) gerekir ki bu da serolojik testlerin yaygın kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, pseudovirusa dayalı virus nötralizasyon testi (pVNT) ve "Surrogate" virus nötralizasyon testi (sVNT) gibi, BSL-3 gerektirmeksizin BSL-2'de uygulanabilen; hem araştırma hem de klinik uygulamalar için daha fazla erişilebilirlik sağlayan testler geliştirilmektedir (Nie ve ark 2020, Tan ve ark 2020). Pseudovirus, ana yapısı ve zarf proteinleri farklı virüslerden elde edilmiş rekombinant bir viral partiküldür (Li ve ark 2018). Pseudovirusun çok yönlülüğü, zarf proteinlerini sağlayan virusun infeksiyözitesini taklit etmesinden kaynaklanmaktadır (Nie ve ark 2020). VSV psödovirus üretim sistemine dayalı olarak, SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorları değerlendirmek için psödovirus tabanlı BSL-2 laboratuvarlarında uygulanabilen bir nötralizasyon testinin validasyonu yapılmıştır. Tan ve ark (2020) ise, yine BSL-2 laboratuvarında 1-2 saatte tamamlanabilen, herhangi bir canlı virus veya hücreye ihtiyaç duymadan, SARS-CoV-2 nötralizan antikorlarını saptayan bir sVNT testini geliştirmişlerdir.

Serolojik testlerde dikkat edilmesi gereken bir diğer konu da, CoV'lar arasındaki korunmuş sekans yapısı nedeniyle çapraz reaksiyon meydana gelmesi olasılığıdır (WHO 2020b). Lv ve ark (2020) yaptığı çalışmada 15 COVID-19 hastasından alınan SARS-CoV-2 ve SARS-CoV S proteinine karşı plazma örneklerini test etmiş ve yüksek oranda çapraz reaksiyon gözlemişlerdir.

Günümüzde, serolojik testler geliştirilmeye devam etmektedir. Örneğin, Zhang ve ark (2020), COVID-19 hastalarının serumundan immunoglobulin G ve M (IgG ve IgM) tespit etmek için SARS-CoV-2 Rp3 N proteinini kullanarak bir ELISA testi geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada RT-PCR ile doğrulanmış 16 SARS-CoV-2 pozitif hasta örneğini test etmişler ve bu antikorların seviyelerinin semptom başladıktan sonraki ilk 5 gün içinde arttığını tespit etmişlerdir. Sıfırıncı günde, hastaların % 50'si ve % 81'i sırasıyla IgM ve IgG yönünden pozitif bulunmuş, ancak bu oran 5. Günde % 81'e ve % 100'e yükselmiştir (Zhang ve ark 2020b). Freeman ve ark (2020) da S proteininin kullanarak bir SARS-CoV-2'ye özgü ELISA testinin optimizasyonunu ve validasyonunu yapmışlardır.

Bilgisayarlı tomografi (BT): BT, PCR testi negatif COVID-19 hastalarında, erken dönemde duyarlı bir tanısal yaklaşımdır. Çin, kitlerin eksikliği ve RT-PCR'ın yanlış negatif sonuç oranları nedeniyle, geçici olarak COVID-19 için klinik tanı olarak BT taramalarını kullanmıştır (Yang ve Yan 2020). Ülkemizde de COVID-19 testinin bulunmadığı, kaynakların kısıtlı olduğu durumlarda veya test sonuçlarının negatif olduğu durumlarda, hastalığı tespit etmek amacıyla BT'den yararlanılmaktadır (T.C. Sağlık Bakanlığı 2020).

Göğüs BT taramaları invaziv değildir ve kesit görüntüleri üretmek için hastanın göğsünde farklı açılardan birçok X-ışını ölçümü alınmalıdır (Udugama ve ark 2020). Elde edilen görüntülerin, radyologlar tarafından dikkatlice analiz edilmesi gerekmektedir çünkü COVID-19'un neden olduğu vakalarda BT görüntüleri oldukça çeşitlidir ve semptomların başlamasından sonra enfeksiyon aşamasına bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, Bernheim ve ark (2020) hastalığın erken evrelerinde (0-2 gün) daha sıklıkla normal BT bulguları görünürken, semptomların başlamasından yaklaşık 10 gün sonra akciğer tutulumu maksimuma ulaştığını saptamışlardır. COVID-19'un en yaygın ayırt edici özelliği, bilateral ve periferik buzlu-cam opasiteleri ve akciğer konsolidasyonudur (Bernheim ve ark 2020). COVID-19 enfeksiyonu ilerledikçe ek olarak, düzensiz kaldırım paternleri (düzensiz şekilli döşeli taş paterni) gelişir ve ardından akciğerlerin konsolidasyonu artar. Bu görüntüleme özelliklerine dayanarak yapılan birkaç retrospektif çalışma, BT taramalarının RT-PCR'a kıyasla daha yüksek bir duyarlılığa ve daha az yanlış negatif oranlara sahip olduğunu ortaya koymuştur (Fang ve ark 2020). COVID-19 günümüzde RT-PCR metoduyla ve BT taramaları ile teşhis edilmektedir, ancak her tekniğin kendine özgü dezavantajları bulunmaktadır. BT sistemleri pahalıdır, teknik uzmanlık gerektirir ve görüntüleme özellikleri diğer viral pnömoni bulgularıyla örtüştüğü için spesifitesi düşüktür (%25) (Ai ve ark 2020).

### COVID-19 için geliştirilen tanı testleri

DSÖ'ye göre, COVID-19 diyagnostik araştırmalarının acil önceliği, nükleik asit ve protein testlerinin geliştirilmesi ve





bu testlerin hastaneler, acil bakım klinikleri, sağlık ocakları, gezici klinikler gibi bakım noktalarında yapılabilmesidir (Khunti 2010). Daha uzun vadeli plan ise, bu testleri çoklu panellere entegre etmektir (Udugama ve ark 2020). Bu alanda, sürveyans çabalarını iyileştirmek için hem nükleik asit testlerine hem de serolojik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Hızlı tanı testleri, merkezi tesislerin dışındaki hastaları teşhis etmek için kullanılan uygun maliyetli, elle tutulabilen araçlardır (Shephard 2013). Bu tip testlerin küçük sağlık merkezlerinde kullanılmaya başlamasıyla, klinik laboratuvarlar üzerindeki yük azaltılabilir.

Tanısal teknoloji gelişimi dört aşamada tanımlanabilir. İlk aşama, araştırmacıların kavramı doğrulamak için sentetik hedefler kullandıkları, kavram kanıtı aşamasında olan teknolojileri; ikinci aşama, az sayıda hasta örneğini (yaklaşık <100 numune) analiz eden teknolojileri; üçüncü aşama da büyük bir hasta topluluğu ile klinik çalışmalara ilerleyen teknolojileri ifade etmektedir. Son olarak dördüncü aşama ise, geliştirilen teknolojinin ticarileştirildiği ve hastalarda kullanıldığını belirtmektedir. Bu yeni teknolojiler gelecekteki salgınların tespitinde rol oynayabilir (Udugama ve ark 2020).

Alternatif nükleik asit testleri: RT-PCR, kaynakların sınırlı olduğu bölgelerde bulunamayabilecek birtakım ekipmanlar ile yapılmaktadır. Bu sıkıntılar, alternatif izotermal amplifikasyon yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu yöntemlere örnek olarak, transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA), iplik yer değiştirme amplifikasyonu (Strand Displacement Amplification, SDA), döngü aracılı izotermal amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA), izotermal rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA) ve rolling-circle amplifikasyonu (RCA) verilebilir (Fakruddin ve ark 2013). İzotermal amplifikasyon teknikleri basit, hızlı, spesifik ve hassastır (Fakruddin ve ark 2013). Ayrıca, bu testler PCR'a benzer şekilde analitik hassasiyet sağlamak için özel laboratuvar ekipmanları yerine, sadece sabit bir sıcaklığı koruyabilen bir ısıtma bloğuna veya su banyosuna ihtiyaç duymaktadır (Yan ve ark 2014). SARS-CoV ve MERS-CoV için geliştirilmiş oldukça hassas izotermal amplifikasyon testleri bulunmaktadır. Örneğin, RT-PCR ile karşılaştırıldığında, SARS-CoV için kullanılan bir RT-LAMP testinin 100 kat daha fazla hassasiyet gösterdiği ortaya konulmuştur (Thai ve ark 2004). Yine, SARS-CoV için bir RT-RCA testi, SARS viral genomunun beş kopyasını tespit edebilmektedir (Wang ve ark 2005). MERS-CoV için, N genini hedefleyen bir RT-RPA yöntemi, virus kopyasını 10 kopya/reaksiyon hassasiyetiyle tespit edebilmektedir (Abd El Wahed ve ark 2013). Bu tip izotermal amplifikasyon kullanan nükleik asit testleri günümüzde SARS-CoV-2 için geliştirilmektedir. Birkaç laboratuvar da SARS-CoV-2 için RT-LAMP testleri geliştirilmiş ve klinik olarak test edilmiştir (Huang ve ark 2020, Park ve ark 2020).

İzotermal amplifikasyonlara ek olarak, SARS-CoV-2 tespiti için kullanılacak başka nükleik asit testleri de bulunmaktadır. SHERLOCK, RNA'yı algılamak için Cas13a ribonükleaz kullanan bir tespit stratejisidir (Gootenberg ve ark 2017). Viral RNA'dan cDNA sentezlenir ve ters polimeraz amplifikasyonu kullanılarak izotermal olarak amplifiye edilir. Amplifiye edilen ürünler tekrar RNA'ya dönüştürülür. Amplifiye edilmiş RNA ürününe bağlanan bir RNA kılavuz sekansı ile Cas13a birleşir ve hedef bağlantı üzerinde Cas13a etkinleştirilir. Daha sonra, Cas13a floresan sinyali üretmesi için "flo-rofor-söndürücü" problemleri ayırır (Gootenberg ve ark 2017). SARS-CoV-2'yi tespit etmek için bir SHERLOCK protokolü yayınlanmıştır ancak, gerçek hasta numuneleri ile doğrulanmadığından, klinik amaçlar için kullanılması önerilmemektedir (Zhang ve ark 2020a). Broughton ve ark (2020) ise, SARS-CoV-2'nin saptanması için "DNA Endonükleaz Hedefli CRISPR Trans Reporter (DETECTR)" olarak adlandırılan CRISPR-Cas12 tabanlı bir test geliştirmişlerdir. Bu teknik, üç gen hedeflemektedir: N geni (SARS-CoV-2'ye özgü), E geni (SARS-CoV, yarasasars benzeri-CoV ve SARS-CoV-2) ve P gRNA (kontrol). Bu testin protokolü, RT-LAMP kullanılarak ekstrakte edilmiş RNA'nın izotermal amplifikasyonu sonrasında Cas12 enzim inkübasyonu ve son olarak da yatay akış şeridi kullanılarak sonucun görselleştirilmesinden oluşmaktadır. Bu yöntem, SARS-CoV-2 ve diğer coronaviruslar arasında ayırım yapabilmektedir.

Hızlı tanı kitleri: Hızlı tanı kitleri, merkezi tesislere numune göndermeden hastaları teşhis etmek için kullanılmaktadır ve laboratuvar altyapısı olmayan yerlerde enfekte olmuş kişilerin tespit edilmesini sağlamaktadır (Shephard 2013). Bu kitlere örnek olarak için yatay akış (lateral flow) antijeni tespiti metodu verilebilir ve bu tip tanı kitleri COVID-19 için geliştirilmektedir. Ticari yatay akış hızlı tanı kitlerinde, kağıt benzeri bir membran şeridi iki çizgi ile kaplanır. Çizgilerin birinde altın nanoparçacık-antikor konjugatları bulunurken ve diğerinde yakalayıcı "capture" antikorlar bulunur. Hastanın numunesi (kan, idrar vb.) membran üzerinde damlatılır ve proteinler kılcal hareketle şerit boyunca süzülür. İlk çizgiyi geçince, antijenler altın nanoparçacık-antikor konjugatlara bağlanır ve kompleks birlikte membran boyunca ilerler. İkinci çizgiye ulaştığında kompleks yakalayıcı antikorlar tarafından tutulur ve "kırmızı" ya da "mavi" bir renk gözlenir. Tek başına altın nanoparçacıkları kırmızı renktedir, ancak kümelmiş altın nanoparçacıklarını içeren çözelti, plazmon bantının bağlanması nedeniyle mavidir (Udugama ve ark 2020). Yapılan bir çalışmada yatay akış deneyinin klinik duyarlılık, özgüllük ve doğruluk için gösterdiği oranlar sırasıyla, IgM için % 57, % 100 ve % 69; IgG için ise % 81, % 100 ve % 86 olarak hesaplanmıştır (Xiang ve ark 2020). Hem IgM'yi hem de IgG'yi tespit eden bir testin % 82'lik bir klinik duyarlılık sahip olduğu belirlenmiştir (Xiang ve ark 2020). Nükleik asit testleri de yatay akış testine dahil edilebilir. Örneğin, daha önce yapılmış bir çalışmada, MERS-CoV'yi saptamak için RT-LAMP testi yatay akış testi ile birleştirilmiştir (Huang ve ark 2018).







Üzerinde çalışmalar yapılan bir diğer hızlı tanı kiti örneği mikro-akışkan cihazlardır. Bu cihazlar, reaksiyon bölmeleri ve mikrometre boyutunda kanallar ile oyulmuş avuç içi boyutunda bir çipten oluşmaktadır. Çip, sıvı numuneleri elektrokinetik, kılcal, vakum ve / veya diğer kuvvetler kullanarak karıştırır ve ayırır. Bu çipler, polidimetil sülfoksit, cam veya kağıt gibi malzemelerden yapılabilmektedir. Mikro-akışkan kullanmanın temel avantajları arasında minyatürleştirme, küçük numune hacmi, hızlı tespit süreleri ve taşınabilirlik sayılabilir (Udugama ve ark 2020). Günümüzde SARS-CoV-2 için geliştirilmiş bir prototip mevcuttur ve sonuçlar umut vaatmektedir (Roy ve ark 2020).

### Öneriler

Küreselleşmeye birlikte, bulaşıcı hastalıkların tüm dünyaya yayılması kolaylaşmaktadır. Salgınlarla mücadele etmenin ilk anahtarı da erken keşiftir. Laboratuvar testleri, enfekte kişilerin erken saptanmasında, enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde ve bulaş yolunun kesilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Yan ve ark 2020). Geliştirilmiş teşhis teknolojilerinin mevcudiyeti araştırmacılara COVID-19 tespitinde kolaylıklar sağlamıştır. Optimize edilmesi yıllarca süren teknolojiler, günümüzde COVID-19'un yayılımının belirlenmesinde ve kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin, elektron mikroskopisi, virusun morfolojisini tanımlamak için kullanılırken, virusun identifikasyonu için genom diziliminden yararlanılmış ve bu dizi verileri, PCR'da primerlerin ve probaların tasarımına yardımcı olmak için kullanılmıştır. Geçmişe bakıldığında, SARS-CoV'nin tanımlanması 5 ay sürmüştü, aynı tekniklerle SARS-CoV-2'yi identifiye etmek sadece 3 hafta sürmüştür (Wu ve McGoogan 2020). SARS-CoV-2'nin bu denli hızlı identifikasyonu ve sekanslanması, nükleik asit testlerinin de hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamıştır. Bu tip yaklaşımlar bir salgına karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bir sonraki adımı ise, serolojik testler oluşturmaktır. Ayrıca, günümüzde hızlı tanı kitleri ve multipleks testlerin geliştirilmesine de talep vardır. İzotermal amplifikasyon, barkodlama ve mikroakışkan teknolojiler gibi 2. ve 3. fazları birleştiren teknolojilerin, kullanıma hazır sistemler haline gelebilmeleri ve bir salgın durumunda hızla uygulanabilmeleri için daha da geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca, teşhis yöntemlerinin günümüzde oldukça yaygın kullanım alanına sahip akıllı telefonlar ile kombinasyonu ile daha fazla iletişim ve sürveyans sağlanabilir. Ayrıca, ASBE'nin, popülasyondaki virus seviyesini ölçmek, kitlesel sürveyans ve gelecekte potansiyel bir salgın öncesinde erken uyarı sağlamak için etkili ve hassas bir izleme aracı olarak hizmet edeceği düşünülmektedir. COVID-19 pandemisinin bize öğrettiği üzere, büyük salgınlarda ilgili uluslararası sürveyansı, işbirliğini, koordinasyonu ve iletişimi geliştirmeye devam etmek ve gelecekteki yeni halk sağlığı tehditlerine yanıt vermek için daha da hazırlıklı olmak çok önemlidir.

### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

### Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

### Kaynaklar

- Abd El Wahed A, Patel P, Heidenreich D, Hufert et al., 2013. Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Detection of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *PLoS Curr* 5.
- Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, et al., 2020. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *Sci Total Environ* 728, 138764.
- Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, et al., 2020. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology* 296, E32–E40.
- Alpaslan-Kocamemi B, Kurt H, Sait A, Sarac F, et al., 2020. SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges. *medRxiv*
- Beltrán-Pavez, C, Márquez CL, Muñoz G, Valiente-Echeverría F, et al., 2020. SARS-CoV-2 detection from nasopharyngeal swab samples without RNA extraction. *bioRxiv*
- Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, et al., 2020. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology* 295, 200463.
- Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, et al., 2020. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 38, 870-874.
- CDC, 2020a. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Erişim Tarihi: 07.08.2020
- CDC, 2020b. CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Erişim Tarihi: 07.08.2020
- CDC, 2020c. Discontinuation of Transmission-Based Precautions and Disposition of Patients with COVID-19 in Healthcare Settings (Interim Guidance) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/disposition-hospitalized-patients.html>. Erişim Tarihi: 07.08.2020
- CDC, 2020d. Preparation Of Viral Transport Medium <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf> Erişim Tarihi: 07.10.2020
- Chen W, Lan Y, Yuan X, Deng, X et al., 2020. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the fur-





- her clinical severity. *Emerg Microbes Infect* 9, 469-473.
- Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, et al., 2020. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia *Clin Chem* 66, 549-555.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, et al., 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* 25, 1-8.
- Daughton, C, 2020. The international imperative to rapidly and inexpensively monitor community-wide Covid-19 infection status and trends. *Sci Total Environ* 726, 138149.
- Ding S, Liang TJ, 2020. Is SARS-CoV-2 also an enteric pathogen with potential fecal-oral transmission? A COVID-19 virological and clinical review. *Gastroenterology* 159, 53-61.
- Fakruddin M, Mannan K Bin, Hossain M, Islam S, et al., 2013. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharm Bioallied Sci* 5, 245.
- Fang Y, Zhang H, Xie J, Lin M, et al., 2020. Sensitivity of Chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology* 296, E115-E117.
- Fehr AR, Perlman S, 2015. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis, in: *Coronaviruses: Methods and Protocols*. Ed: Maier HJ, Bickerton E, Britton P. Humana Press, New York, NY, pp. 1-23.
- Freeman B, Lester S, Mills L, Rasheed MAU, et al., 2020. Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and serosurveillance. *bioRxiv*
- GISAID, 2020. Genomic epidemiology of hCoV-19, <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/> Erişim Tarihi: 07.08.2020
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, et al., 2017. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* 356, 438-442.
- Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, et al., 2020. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382, 1708-1720.
- HKU, 2019. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Erişim Tarihi: 08.08.2020
- Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, et al., 2020. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *N Engl J Med* 382, 929-936.
- Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, et al., 2018. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV. *Front Microbiol* 9, 1101.
- Huang WE, Lim B, Hsu C, Xiong D, et al., 2020. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 13, 950-961.
- ICTV, [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/222/coronaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae) Erişim Tarihi: 03.08.2020
- Jalandra R, Yadav AK, Verma D, Dalal N, et al., 2020. Strategies and perspectives to develop SARS-CoV-2 detection methods and diagnostics. *Biomed Pharmacother* 129, 110446.
- Kriegova E, Fillerova R, Kvapil P, 2020. Direct-RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 without RNA extraction as part of a COVID-19 testing strategy: from sample to result in one hour. *Diagnostics* 8, 605.
- Khunti K, 2010. Near-patient testing in primary care. *Br J Gen Pract* 60, 157-158.
- Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, et al., 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 739, 139076.
- Kocamezi BA, Kurt H, Hacıoğlu S, Yarah C, et al., 2020. First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey. *medRxiv* 2-11.
- Kroiss SJ, Ahmadzai M, Ahmed J, Alam MM, et al., 2018. Assessing the sensitivity of the polio environmental surveillance system. *PLoS One* 13, e0208336.
- Li Q, Liu Q, Huang W, Li X et al., 2018. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev Med Virol* 28, e1963.
- Lodder W, de Roda Husman AM, 2020. SARS-CoV-2 in wastewater: potential health risk, but also data source. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 533-534.
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, et al., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565-574.
- Lv H, Wu NC, Tsang OT-Y, Yuan M, et al., 2020. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. *Cell Rep* 31, 107725.
- Nao N, Shirato K, Harutaka K, Shutoku M, et al., 2019. Detection of second case of 2019-nCoV infection in Japan. Erişim Tarihi: 08.08.2020
- National Health Commission of China., 2019. COVID-19: Laboratory Testing Guideline 2019, 1-8. Erişim Tarihi: 09.08.2020
- Nie J, Li Q, Wu J, Zhao C, et al., 2020. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 9, 680-686.
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, et al., 2020. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 20, 411-412.
- Park G-S, Ku K, Baek S-H, Kim S-J, et al., 2020. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagnostics* 22, 729-735.
- Pasteur Institut, 2020. Protocol : Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. Erişim Tarihi: 12.08.2020
- Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, et al., 2020. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis* 20, 1-7.
- Roy N, Kashyap J, Verma D, Tyagi RK, et al., 2020. Prototype of a Smart Microfluidic Platform for the Evaluation of SARS-Cov-2 Pathogenesis, Along with Estimation of the Effectiveness of Potential Drug Candidates and Antigen-Antibody Interactions in Convalescent Plasma Therapy. *Trans. Indian Natl Acad Eng* 5, 241-250.
- Shephard M, 2013. Point-of-Care Testing in Australia. *Point Care J. Near-Patient Test. Technol* 12, 41-45.
- Smyrliaki I, Ekman M, Lentini A, de Sousa NR, et al., 2020.





- Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun* 11, 4812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>
- Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, et al., 2020. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nat Biotechnol* 9, 1-6.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, 2020. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji Ve Tanı. <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/38597/0/covid-19rehberigenelbilgileripidemiyojivetanipdf.pdf>. Erişim Tarihi: 08.08.2020.
- Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, et al., 2004. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Clin Microbiol* 42, 1956–1961.
- Thailand Department of Medical Sciences Ministry of Public Health, 2020. Diagnostic detection of novel coronavirus 2019 by real time RT-PCR. <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rtpcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-nat-inst-health-t.%0Apdf> Erişim Tarihi: 08.08.2020
- Udugama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, et al., 2020. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano* 14, 3822–3835.
- US CDC, 2020. 2019–Novel Coronavirus ( 2019-nCoV ) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes, Division of Viral Diseases. Centers for Disease Control and Prevention.
- Venugopal A, Ganesan H, Sudalaimuthu Raja SS, Govindasamy V, et al., 2020. Novel wastewater surveillance strategy for early detection of coronavirus disease 2019 hotspots. *Curr Opin Environ Sci Heal* 17, 8–13.
- Wang B, Potter SJ, Lin Y, Cunningham AL, et al., 2005. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J Clin Microbiol* 43, 2339–2344.
- WHO, 2020a. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases, Interim Guidance. Erişim Tarihi: 14.08.2020
- WHO, 2020b. Water , sanitation , hygiene , and waste management for SARS-CoV-2 , the virus that causes COVID-19. Erişim Tarihi: 14.08.2020
- WHO, 2020c. Novel-coronavirus-2019. Situation report. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> Erişim Tarihi: 14.08.2020
- Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen K-Y, 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses* 2, 1804–1820.
- Wu F, Xiao A, Zhang J, Gu X, et al., 2020a. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *medRxiv*.
- Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, et al., 2020b. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269.
- Wu Y, Guo C, Tang L, Hong Z, et al., 2020c. Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 5, 434–435.
- Wu Z, McGoogan JM, 2020. Characteristics of and Important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in china. *JAMA* 323, 1239-1242.
- Wurtzer S, Marechal V, Mouchel J-M, Maday Y, et al., 2020. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters. *medRxiv*.
- Xiang J, Yan M, Li H, Liu T, et al., 2020. Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold- immunochromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19). *MedRxiv*.
- Xu Y, Li X, Zhu B, Liang H, et al., 2020. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat Med* 26, 502–505.
- Yan L, Zhou J, Zheng, Y, Gamson AS, et al., 2014. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* 10, 970.
- Yan Y, Chang L, Wang L, 2020. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol* 30, 1–14.
- Yang W, Yan F, 2020. Patients with RT-PCR-confirmed COVID-19 and normal chest CT. *Radiology* 295, E3–E3.
- Zhang F, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Sciences C, et al., 2020a. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics, Bioarchive. [https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20\(updated\).pdf](https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20(updated).pdf) Erişim Tarihi:11.08.2020
- Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, et al., 2020b. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect* 9, 386–389.
- Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, et al., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, et al., 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382, 727–733.

#### Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Tasarım: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Denetleme/Danışmanlık: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Veri Toplama ve/veya İşleme: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Analiz ve/veya Yorum: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Kaynak Taraması: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Makalenin Yazımı: İlke Karayel Hacıoğlu  
 Eleştirel İnceleme: İlke Karayel Hacıoğlu

**CITE THIS ARTICLE:** Karayel Hacıoğlu İ, 2020. COVID-19 için tanısal yaklaşımlar. *Eurasian J Vet Sci, Covid-19 Special Issue*, 30-40

