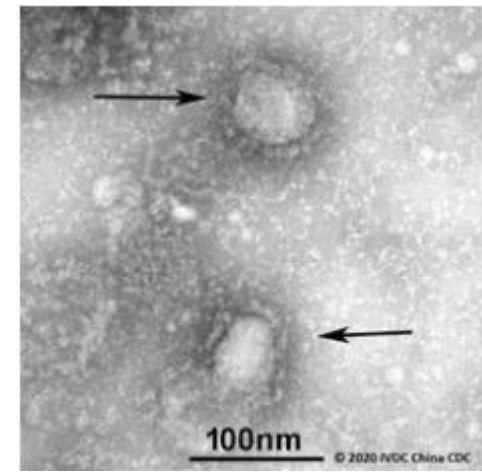


# SARS-CoV-2 Laboratuvar Tanısı Hakkında Merak Edilenler



<https://www.gisaid.org>

*Doç. Dr. Gülay KORUKLUOĞLU (04.04.2020) ve Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER'in (11.04.2020) KLİMUD tarafından gerçekleştirilen Canlı Instagram yayınlarından Uzm. Dr. Hilal BÖLÜKBAŞI tarafından derlenmiştir*



16.04.2020

# Ülkemizde mikrobiyolojik tanı için hangi testler kullanılmaktadır?

- Gerçek zamanlı RT-PCR testi
  - Bu test kiti yerli üretimdir ve Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilen laboratuvarlara dağıtılmaktadır
  - Bio-Speedy® COVID-19 RT-qPCR Tespit Kiti (Bioeksen Ar-Ge Tekn. Ltd. Şti.)
- Hızlı PCR testi
  - Manüel ekstraksiyon basit ve kısadır
  - Çin menşeli Coyote marka kit
  - Coyote marka cihaz ve Coyote marka kit ile uyumlu birkaç cihazda çalışılmaktadır
- Hızlı antikor testi (immünokromatografik test)
  - Anti-COVID-19 IgM ve IgG'yi ayrı ayrı veya total antikor olarak saptayan kitler
  - Çin üretimi farklı markalarda kitler bulunmaktadır
- ELISA ve immünokromatografik yöntemle çalışan antikor testleri için yerli kit üretim çalışmaları sürmektedir

# SARS-CoV-2 mikrobiyolojik tanısı için hangi örnekler alınabilir?

- **PCR** çalışmak için **üst ve alt solunum yolu örnekleri** uygundur
- Alt solunum yolu bulguları yoksa veya örnek almak mümkün değilse **üst solunum yolu örnekleri** alınmalıdır
  - Üst solunum yolu için ilk tercih nazofarengeal sürüntü örneğidir
  - Bu mümkün değilse orofarengeal sürüntü, burun sürüntü ve nazofarengeal yıkama örneği alınabilir
- **Alt solunum yolu için** trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj sıvısı, balgam, plevral sıvı ve akciğer dokusu uygundur
- **Hızlı antikor testi** için parmak ucu kanı, serum ve plazma kullanılabilir (dondurulan örnekler çözülüp tekrar çalışılmamalıdır)

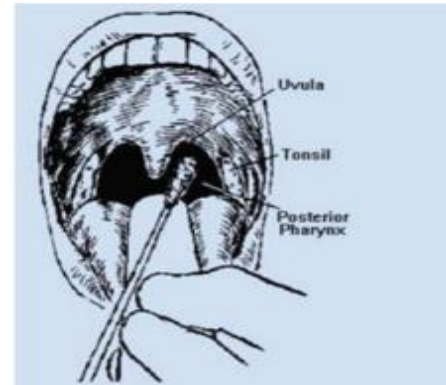
# Eksitus vakalarından örnek nerelerden alınabilir?

- Burun sürüntü ve alınabiliyorsa boğaz sürüntü örnekleri
- Açık otopsi yapılmışsa akciğer dokusu veya trakea, bronş sıvılarından sürüntü örnekleri

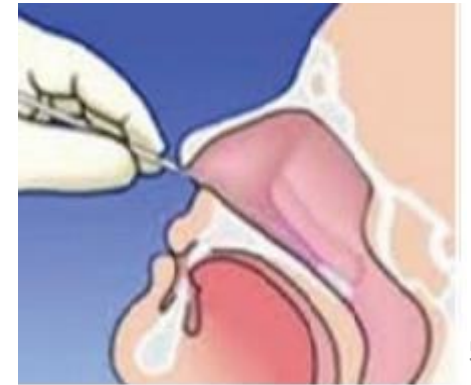
# Üst solunum yolu örnekleri nasıl alınmalıdır?

- İdeal olarak nazofarengeal sürüntü örneği önerilir
- Nazofarengeal bölgeden örnek alınmasına uygun olmayan eküvyonlar kullanılacaksa orofarengeal veya burun örnekleri alınmalıdır
- Her iki burun deliğinden mümkün olduğunca içeri girilerek örnek alınmalıdır
- Alınan örnekler aynı taşıma kabına konulmalıdır
- Örnekler epitel hücreleri toplamaya yönelik, mümkün olduğunca bastırarak ve eküvyon bir iki kez döndürülerek alınmalıdır

Orofarengeal sürüntü alınması



Nazofarengeal sürüntü alınması



# Üst solunum yolu örnekleri için uygun eküvyon nasıl olmalıdır?

- Nazofarengeal örnekler fırçalı, ince/esnek saplı eküvyon ile alınabilir
- Nazal ve orofarengeal örnekler için plastik saplı polyester eküvyon (rayon, dakron) kullanılır
- **Pamuk uçlu, tahta saplı eküvyonlar, kalsiyum aljinat eküvyonlar PCR inhibisyonuna neden olmaları sebebiyle kesinlikle uygun değildir, bu şekilde gelen örnekler reddedilmelidir**

# Uygun transport besi yerleri nelerdir?

- Alt solunum yolu örnekleri steril kapta besi yeri olmadan gönderilir
- Nazal yıkama örnekleri steril viral taşıma sıvısı ile gönderilir
- Üst solunum yolu sürüntü örnekleri için 2-3 mL Viral Transport Medium (VTM), Biospeedy marka ekstraksiyon kiti içerisinde çıkan R1 solüsyonu (Ribosaver), Viral Nükleik Asit Tamponu (VNAT) kullanılabilir. VNAT kullanımı ile ekstraksiyon aşaması kısaltılmıştır
- Yukarıda söz edilen transport sıvıları temin edilemiyorsa Cary Blair besi yeri veya dengeli tuz solüsyonu (salin) ile transport sağlanabilir
- **Stuart besi yerinin kullanımı uygun değildir**

# Örnek transportu nasıl olmalıdır?

- Örnekler enfeksiyon kontrol ve korunma prosedürlerine uyararak, üçlü taşıma sistemi ile soğuk zincir kurallarına uygun olarak gönderilmelidir
- Örnekler **2-8°C**'de gönderilmelidir. Bu süre 72 saati geçmemelidir
  - R1 sıvısına alınan örnekler oda ısısında muhafaza edilebilir
  - Aynı hastane içindeki laboratuvara kısa sürede yollanacak örnekler oda ısısında taşınabilir
- Daha uzun süreli saklamalar  $-70^{\circ}\text{C}$  ve daha aşağı sıcaklıklarda olmalıdır



# Balgamın yoğun olduğu durumlarda ne yapılabilir?

- 1-2 mL VTM, VTM yoksa R1 solüsyonunda pipet ucu ile karıştırılıp homojenize edilmeye çalışılabilir, kısa süreli santrifüj edilerek süpernatant kullanılabilir

# PCR testleri ne zaman pozitifleşebilir?

- Pozitiflik semptomlardan 1-2 gün önce başlar
  - Semptomların ilk haftasında farenkste virüs miktarı fazladır
  - İlerleyen dönemde virüs alt solunum yolunda daha fazla bulunur
- Orta derece seyirli hastalarda 7-12 gün, ağır vakalarda 2 haftaya kadar pozitiflik saptanabilir
- Asemptomatik vakalarda 14 güne kadar pozitiflik olabilir

# PCR hedef gen bölgeleri hangileridir?

- Yerli üretim Bio-Speedy® kitinde hedef bölge **Wuhan-RdRp** genidir
- Coyote marka kitte 2 hedef bölge vardır:
  - Bunlar **N** ve **ORF1ab** genleridir
  - Bu iki genin ikisi birden pozitif saptanırsa test pozitif raporlanmalıdır. Tek bir gen bölgesi çoğalmışsa test tekrarı yapılmalıdır

# Süreçte PCR hedef primer değişikliği oldu mu?

- Farklı sekansa sahip suşlar ortaya çıktıkça yeni gen dizilimleri oluşturulmuştur
- Yeni oligonükleotit setleri ile çalışmalar başarılı sonuç vermiştir
- Bundan sonra bu yeni setler kullanılacaktır

# PCR için kirli ve temiz oda kavramları nedir?

- **Kirli oda** ekstraksiyonun yapıldığı odadır
  - Ekstraksiyon Sınıf 2A 1 ve üzeri özellikte kabinlerde yapılmalıdır
  - Solunum maskesi, yüz koruyucu, önlük/tulum kullanılmalıdır
- **Temiz oda** PCR mikslerinin ve ekstraksiyon solüsyonlarının hazırlandığı odadır
  - PCR miksleri temiz bir tezgah üstünde hazırlanabilir, ayrıca kabine gerek yoktur
  - Negatif kontrolün bu odada konması önerilir
- **RNA ekstraktları, pozitif kontrol ve PCR miksleri kirli ve temiz alanlardan ayrı bir bölgede buluşturulmalıdır**
  - Bu imkan yoksa ürün, pozitif kontrol ve miksleri birleştirme ekstraksiyon odasında gerçekleştirilebilir
- **PCR cihazı temiz odaya yerleştirilmemelidir**

# PCR çalışmadan önce örneğe ısı ile virüs inaktivasyonu yapmak uygun mudur?

- Viral nükleik asidi de etkileyebileceęinden önerilmez
- R1 solüsyonu ve VNAT içinde inaktivasyon/lizis yapan kimyasallar zaten bulunmaktadır

# PCR testi için örneği dondur/çözdür yapmak çalışmayı etkiler mi?

- Örneklerin özellikle mümkünse hemen çalışılması ve tekrarlayan dondurup çözdürmeden kaçınılması uygundur
  - Virüs yüküne olumsuz etkisi olabilir
- -20 veya -70°C'de saklanmış örnek bir kez çözdürölüp çalışılabilir
- Birden fazla dondur çözdürden kaçınmak için örneğin gerekiyorsa alikotlanması önerilmektedir

# PCR miksleri ile ilgili nelere dikkat etmek gerekir?

- PCR miksleri her çalışmada yeniden hazırlanmalıdır, alikota lanıp saklanmamalıdır
- Miksler soğuk blok üstünde hazırlanmalıdır
- Ekstraktların miks içeren tüplere aktarılması yine soğuk blok üstünde yapılmalıdır



# PCR testi için örnek dilüsyonu yapmanın faydası var mı?

- PCR testi için örnek dilüsyonu önerilmez
- Yüksek viral yük çalışmayı olumsuz etkilemez, ancak
  - Eğrileri değerlendirirken düşük pozitiflikleri değerlendirmeyi zorlaştırabilir
  - Bu durumda örnekleri teker teker okumak faydalı olabilir, bu yapıldığında düşük reaksiyon görülen bazı eğrilerin gerçek pozitiflik olduğu anlaşılabilir

# PCR testi solunum yolu dışı örnekleri için uygun mu?

- Ülkemizde kullanılan PCR testleri diğer vücut örnekleri için (BOS, kan vs.) valide değildir
- Bioeksen firması diğer vücut örnekleri için kit üretim aşamasında olduklarını iletmektedirler

# PCR testinde diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyon oluyor mu?

- Ülkemizde daha önce başka kitlerle saptanmış, SARS-CoV-2 olmayan diğer koronavirüslerle çalışıldığında çapraz reaksiyon olmadığı görülmüştür

# PCR testinin yanlış negatif olma sebepleri neler olabilir?

- Virüs kinetiği henüz net değildir, birkaç gün ara ile alınan örneklerin biri pozitif diğeri negatif olabilmektedir
- Virüs bilindiği kadarıyla 7. gün civarı üst solunum yolundan alt solunum yoluna inmektedir
  - Bu süre sonrasında alınan üst solunum yolu örneğinde virüs yakalanmıyor olabilir
  - Virüs miktarının, testin analitik duyarlılığının altında olması durumunda yalancı negatif sonuç alınabilir
- Örneğin düzgün alınmaması, yanlış eküvyon kullanımı, kullanılan transport besi yeri uygunsuzluğu, transport hataları, ekstraksiyon hataları, miks hazırlama hataları gibi teknik hatalar yanlış negatifliklere sebep olabilir

# PCR testinde zayıf reaktivlikler neden olur?

- Örnek içindeki viral yük az olabilir
- Örnek iyi alınmamış olabilir (internal kontrolde de zayıf sinyal)
- Kısmi inhibisyon olabilir (internal kontrolde kısmi baskılanma)
- Non-spesifik ışımaya olabilir
- Kontaminasyon olabilir (bu durumun kontrolü için negatif kontrol sayısı artırılmalıdır)

# Ülkemizde SARS-CoV-2 genom analizi yapıldı mı?

- Ulusal Viroloji Laboratuvarı'nda Ct (Cycle threshold) değeri yüksek bir suşun genom analizi ve GISAID'e girişi yapılmıştır
- Bu suş L tipi olarak bulunmuştur
- Yeni genom analizleri yapılmaya devam edilecektir

# Mutasyonla oluşmuş farklı SARS-CoV-2 suşları ile farklı klinikler arasında bağ var mı?

- Mutasyonla oluşmuş farklı SARS-CoV-2 suşları vardır ancak oluşmuş farklı suşlar ve farklı klinikler arasında ilişki olup olmadığı henüz net bir şekilde ortaya konulamamıştır

# Hızlı antikor testlerini ne zaman kullanalım?

- Temaslı takibinde
- Sağlık çalışanları başta olmak üzere kalabalık popülasyonların taranmasında
- PCR testlerini tamamlayıcı olarak
- İlerleyen dönemde seropozitiflik oranını tespit etmede
- **Sağlık Bakanlığı HSGM COVID-19 Rehberinde sunulan algoritmalarda yer almamaktadır (15.04.2020)**
- **NOT: HIZLI ANTİKOR KİTİ ARTIK DAĞITILMAYACAKTIR  
(Gülay Korukluoğlu güncel bilgi-17.04.2020)**



# SARS-CoV-2 antikorları ne zaman pozitifleşir?

- **IgM**
  - Enfeksiyonun 7-10. günü
  - Semptomların 3-4. günü
- **IgG**
  - Enfeksiyonun 11-14. günü
- **Serokonversiyon**
  - >7. gün: %50



# Hızlı antikor testi çalışırken kişisel koruyucu ekipman gerekir mi?

- Tıbbi maske, eldiven, önlük, gözlük yeterlidir
- Biyogüvenlik kabinine ihtiyaç yoktur