

## Viral Enfeksiyonlar ve SARS-CoV-2'nin Tanısında Yeni Teknolojiler

### Emerging Technologies for the Diagnosis of Viral Infections and SARS-CoV-2

Mustafa Altındaş<sup>1</sup>, Bahadır Feyzioğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi viroloji Bilim Dalı, Sakarya, Türkiye

<sup>2</sup> Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi tıp fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ad ve Tıbbi viroloji Bilim Dalı Konya, Türkiye

#### ÖZET

Coronavirus hastalığı 2019 (COVID-19), Şiddetli Akut Solunum Sendromu koronavirus 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu yeni ortaya çıkan bir enfeksiyondür. İnsan enfeksiyonu oranındaki hızlı artışa dayanarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) COVID-19 salgını bir pandemi olarak sınıflandırmıştır. COVID-19 için henüz spesifik bir ilaç veya aşının olmadığı düşünüldüğünde, salgının kontrol altına alınması ve yönetiminde erken teşhis açısından, viruslerin etkin hızlı tanısı oldukça önemli hale gelmiştir. Virusu izole etmenin rutinindeki güçlükleri tanının uzun yıllar daha çok serolojik testlerle yapılmasını zorunlu kılmıştır. Ancak son yıllarda hızlı ve yüksek kaliteli viral tanı bilgileri sağlayan moleküler testler laboratuvarlarda yerini almaya başlamıştır. PCR ve multiplex PCR testleri sonrası sendromik tabanlı PCR testleri de direkt etkeni sorgulayan, tanıyı ve tedaviyi hızlandıran yaklaşımlardır. LAMP PCR teknolojisi de hızla gelişmiş, taşınabilir çok küçük cihazlar ile sahada yada hasta başında tanı zamanını oldukça kısaltmıştır. Yeni teknoloji olarak, CRISPR tanı yöntemleri ve taşınabilir DNA sekanslama cihazları, viral enfeksiyonların tanısında kliniklerde hasta başı hızlı sonuç almada oldukça yararlı olacaktır. Lusiferaz etiketli antijenlerin kullanıldığı immüno-presipitasyon sistemleri ile de virüs tanımlaması, kantitasyonu, antiviral etkinlik izlenmesi mümkün olabilmektedir. COVID-19 salgını yönetimi çok hızlı ve güvenilir testlere olan gereksinimi artırmış ve laboratuvar biyoteknoloji endüstrisini tetiklemiştir. Tüm dünya, yüksek duyarlılığa sahip, ulaşılabilir, taşınabilir yeni tanımlama yöntemlerinin yararlarının sınanacağı dinamik bir pandemi süreci yaşamaktadır. Bu yöntemlere ilişkin onay sürecinde olan çok sayıda başvurunun varlığı, yakın gelecekte SARS-CoV-2 tanı algoritmalarının daha zengin ve üretken çözümlere kavuşacağına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır. Elde edilecek tecrübeler diğer viral enfeksiyonların daha iyi anlaşılması, hasta başı tanı çözümleri oluşturulması ve daha etkin tedaviler sunulmasında yol gösterici olacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Viral tanı, CRISPR, DNA sekanslama, nanopore sekanslama, Lusiferaz Immüno-presipitasyon Sistemleri, VirScan

**Geliş Tarihi:** 17.05.2020

**Kabul Tarihi:** 18.05.2020

#### ABSTRACT

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a newly emerging infection caused by Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Based on the rapid increase in the rate of human infection, the World Health Organization (WHO) has classified the COVID-19 outbreak as a pandemic. Considering that there is no specific drug or vaccine yet for COVID-19, effective rapid diagnosis of viruses has become very important in terms of early detection and control of the outbreak. The routine difficulties of isolating the virus necessitated the diagnosis to be made with more serological tests for many years. However, in recent years, molecular tests that provide fast and high-quality viral diagnosis information have started to take their place in laboratories. Syndrome-based PCR tests after PCR and multiplex PCR tests are also approaches that question the direct factor and accelerate the diagnosis and treatment. LAMP PCR technology has also developed rapidly, and the diagnosis time has been shortened in the field or at the bedside with very small portable devices. As a new technology, CRISPR diagnostic methods and portable DNA sequencing devices will be very useful in the diagnosis of viral infections in the clinic for rapid results per patient. With immunoprecipitation systems using luciferase-labeled antigens, virus identification, quantitation, antiviral efficacy can be monitored. COVID-19 outbreak management increased the need for very fast and reliable tests and triggered the laboratory biotechnology industry. The entire world is experiencing a dynamic pandemic process in which the benefits of new, highly sensitive, accessible and portable identification methods will be tested. The presence of a large number of applications in the approval process for these methods provides strong evidence that SARS-CoV-2 diagnostic algorithms will have richer and productive solutions in the near future. Experiences will be guiding in better understanding of other viral infections, establishing bedside diagnostic solutions, providing more effective treatments.

**Key Words:** viral diagnosis, CRISPR, DNA sequencing, nanopore sequencing, Luciferase Immunoprecipitation Systems, VirScan

**Received:** 05.17.2020

**Accepted:** 05.18.2020

**ORCID IDs:** A.K. M.A. 0000-0003-0411-9669, B.F. 0000-0002-0991-2132

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Mustafa Altındaş MD, PhD Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, Korucuk, Sakarya, Türkiye E-posta: maltindis@gmail.com

©Telif Hakkı 2020 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2020.77>

**GİRİŞ**

Tanısıl viroloji tarihinin, 19. yüzyılın sonlarında Guarnieri tarafından aşı lezyonlarındaki bazı cisimlerin gösterilmesi ile başladığı kabul edilmektedir. Sonraki yüzyılda ise, virüslerin tam olarak keşfedilmesi ile ilgili baş döndürücü gelişmeler yaşandı. 1901'de insanlarda keşfedilen ilk 'filtrelenilebilir ajan' olan Sarı humma virüsünden bugüne kadar çok sayıda virüs tanımlanmıştır. Bunlara her yıl yenileri eklenmektedir ve tüm yeni insan patojenlerinin üçte ikisinden fazlasını oluşturmaktadırlar. Bu keşifler aslında zaman içindeki tanısıl ve teknolojik gelişmelerin bir sonucu olarak da ortaya çıkmıştır. Öte yandan, virüslerin mutasyon mekanizmaları ve insan-hayvan-çevre etkileşimleri yeni hastalık faktörlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bugüne kadar, insanları enfekte edebilecek 23 virüs ailesi tespit edilmiştir. İlk filtreleme tekniklerinden bu yana, gelişmiş moleküler yöntemler kullanan virüs tanımlama teknolojileri günümüzde daha sofistike hale gelmiştir. Sırasıyla, (filtrasyon (1890s), kompleman fiksasyon (1929), doku kültürü (1948), monoklonal antikorlar (1970'ler), polimeraz zincir reaksiyonu (1985) ve son olarak sekanslama (2000'ler) yöntemlerinin oluşturulması viral tanımlama için önemli kilometre taşları olmuştur (1). Bu gelişmelere paralel olarak, her yıl birçok yeni virüs tanımlanırken, insanlarda enfekte olduğu kanıtlanan koronavirüs ailesinin ilk üyesi 1965 yılında keşfedilmiştir.

İlk kez soğuk algınlığı ajanı olarak izole edildiğinde, negatif boyama sonrası elektron mikroskopundaki karakteristik saçaklı görünümü nedeniyle bu ajan için koronavirüs (Latin: korona, taç) terimi benimsenmiştir. 2003 yılında SARS'ın ortaya çıkmasına kadar, soğuk algınlığına neden olan HCoV 229E ve OC43, insan patojenleri olarak kabul edilmekteydi. Her ikisi de hafif hastalık etkeni olarak kabul edildiğinden, bu zamana kadar bilimsel araştırmalar için öncelikli etkenler olarak değerlendirilmemiştir. Hafif solunum yolu hastalığına yol açan iki yeni HCoV, NL63 ve HKU-1, SARS-CoV ajanının yeni bir koronavirüs olarak tanımlanmasından hemen sonra bulunmuştur. Bunu 2012 yılında MERS-CoV'un ortaya çıkışı izlemiştir. Son olarak, Covid-19 / SARS-CoV-2, 2019'un sonunda küresel bir pandemik ajan olarak ortaya çıkmıştır. İlk koronavirüsün keşfinden bu yana kullanılan tanımlama yöntemleri önemli ölçüde değişmiştir. Geçmiş gelişmiş yöntemleri bugün için gelenekseldir ve bugün kullandığımız birçok gelişmiş yöntem yenileriyle değiştirilmeye adaydır. Covid-19 salgınının ilk dönemlerinde virüs genom diziliminin bilinmesi, moleküler tabanlı teşhis yöntemlerinin hızlı bir şekilde kullanılmasına izin olanak tanımıştır. İmmünoassayler ise daha sonra kullanıma girmiştir. Bu derlemede, COVID-19 bağlamında, virolojik tanımlama yöntemleri konvansiyonel, mevcut ve gelecek perspektifi ile değerlendirilecek, SARS CoV-2'nin yeni teknoloji geliştirmeyi nasıl tetiklediğine temas edilecektir.

**GELENEKSEL TANI YÖNTEMLERİ ve SARS-CoV-2***Elektron mikroskobu (EM)*

Vücut sıvıları, dışkı veya histopatolojik numunelerdeki viral partiküllerin görüntülenmesi ve sayılması yoluyla virüslerin doğrudan tespiti için uzun süredir etkili bir araç olarak kullanılmaktadır. EM için teknik beceri ve uzmanlık gerektiren örnek hazırlama aşaması söz konusudur. Bu aşama, virüs konsantrasyonunda azalma, hücresel yapı ve organeller gibi benzer yapıların interferansına yol açma gibi dezavantajlara yol açar (2). SARS-CoV-2 için EM ile yapılan araştırma sayısı sınırlıdır. Bu çalışmalarda viral partiküllerin ortalama 70-80 nm'lik yuvarlak bir şekle ve ortalama  $15 \pm 2$  nm'lik zarf çıkıntılına sahip olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile bir koronavirüs parçacığına özgü yuvarlak peplomerik yapılar da biten sap benzeri çıkıntılarının varlığını bildirmişlerdir (3). Bu sınırlı çalışmalar klinik materyallerden yapılan uygulamalardır. Bu nedenle, tipik koronavirus morfolojisinden nispeten daha kısa ve peplomer agregasyonu gösteren viral partiküller elde edilmiştir. Hücre kültürlerinden yapılacak görüntülemenin bu belirsizliği / farkı açıklığa kavuşturacağı düşünülmektedir. Bugüne kadar, ultrastrüktürel sitopatoloji üzerine ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir. Öte yandan, SARS-CoV-2'nin saflaştırılmış zarf spike glikoproteinini gösteren bir kriyoEM çalışması yayınlanmıştır. İmmünoelektron mikroskopi tekniklerinin kullanıldığı klinik örneklerin görüntülenmesi, doğrudan klinik materyalde virüsün tespit sıklığını artırabileceği düşünülmektedir. Tüm bu zorluklarıyla EM uygulamaları, viral hastalık ajanını belirleme amacından ziyade ileri düzey araştırmalar için değerli bir metot olmaya devam etmektedir.

*Hücre kültürü*

İlk kez, Weller (1948) ve Enders (1949) tarafından hücre kültüründe viral izolasyonun gerçekleştirilmesi tanısıl virolojinin modern döneminin başlangıcı olarak kabul edilmektedir (4) (5). O zamandan beri, hücre serilerini kullanmak virüsleri izole etmek için temel yöntemdir. Bir tanı yöntemi olarak hücre kültürlerinden viral izolasyonun önemi zamanla nispeten azalıyor gibi algılsa da fenotipik pek çok karakterizasyon analizi için canlı bir izolat sağlayabilen tek teknik olma özelliği hala değerini korumaktadır. Üstelik klinik örnekten bilinmeyen viral etkenlerin çoklu saptanmasına olanak sağlayan üstün özellikleri de söz konusudur. Virüs büyümesinin kanıtı sitopatik etki (CPE) ve immunofloresan (IF) boyama ile tespit edilebilmektedir. Ancak, CPE'nin doğru yorumlanması için deneyimli personele ve hücre çizgilerini veya patojenik virüsleri işlemek için yeterli olanaklara ihtiyaç duyulur. Bununla birlikte, bazı virüsler hücre kültürlerinde replike olma veya CPE yapmaya uygun olmayabilir. Son yıllarda, hücre kültürlerindeki virüslerin saptanması için gereken süreyi önemli ölçüde azaltan shell vial yöntemi veya virüsün varlığını belirtmek için bir substrat üzerinde etkili olan  $\beta$ -galaktozidaz gibi bir raportör enzimin kullanılabilirdiği modifiye yöntemler geliştirilmiştir.

SARS CoV-2 ve Hücre kültürü uygulamalarına bakılacak olursa; Koronavirüsler solunum yolu tropizmi nedeniyle Calu-3, Primer Bronşiyal, Primer Alveolar gibi insan solunum yolu hücre dizileriyle başarılı biçimde izole edilebilmektedirler (6). Öte yandan, Covid-19 salgının başlangıcından bugüne kadar Vero hücre serileriyle metodolojik başarı elde edilmiştir (7,8). Hücre kültürü uygulamaları SARS-CoV-2 ve hastalık ile ilgili birçok konuda çok önemli katkılar yapmaya adaydır ve şu ana kadarki çalışmalar da bu başlıklar üzerine yoğunlaşmıştır. Bunlar arasında: viral enfeksiyonları bloke edebilecek nötralizan antikorun tespiti için Covid-19'dan iyileşmiş kişilerden elde edilen serum örneklerinin test edilmesi; virüs saçılımının hastalığın farklı dönemlerindeki durumunun belirlenmesi; antiviral etkinlik araştırılması (mevcut veya deneysel antiviral ilaçların Covid-19 enfeksiyonunu tedavi etme veya önleme yeteneğini test etmek için); patogenezi araştırmaları (virüsün bir konağa bulaşabileceği çeşitli yolları, hastalığın şiddetini, vücutta ne kadar virüs üretildiğini ve virüsün vücutta hangi organlara yayılabileceğini belirlemek için), virüsün stabilitesinin araştırılması (virüsün yüzeyler, sıcaklıklar gibi belirli koşullar altında ne kadar süre hayatta kalabileceği); ve elbette aşı geliştirme çalışmaları sayılabilir (9). Viral izolasyon için asgari BSL-3 gerekliliği, teknik alt yapı ve deneyim ihtiyacı nedeniyle, bu araştırmalar için üst düzey organizasyonlar gerektirmektedir.

*Kompleman fiksasyon testi (CFT)*

Klinik viroloji tarihindeki en eski yöntemlerden biridir. Kolay, kullanışlı ve ucuz malzeme avantajlarına rağmen, emek yoğunudur ve düşük duyarlılığa sahiptir. Standardizasyonu zor olan bu yöntem ile daha çok OC-43 ile yapılmış eski çalışmalar söz konusudur (10).

*Hemaglutinasyon inhibisyon testi*

Genellikle arbovirüslerin, influenza ve parainfluenza virüsü alt tiplerinin saptanması ve virüs partiküllerinin nispi kantitasyonunu ortaya koymaktadır. Bu yöntem ile yapılan araştırmalar, daha çok insan koronavirüslerinin dışında kalan bazı türler ile sınırlı kalmıştır (11).

*Hayvan modelleri*

Viral enfeksiyon ve patogenezi anlamak için hayvan modelleri kritik öneme sahiptir. Bir aşı veya bir antiviral ajanın geliştirilmesi ve klinik öncesi değerlendirilmesi için hayvan modelleri gereklidir. İdeal bir hayvan modeli, insanlarda viral enfeksiyonu ve hastalıkları morbidite, viral yük, tipik klinik semptomlar, konakçı immün tepkileri ve mortalite gibi birçok açıdan taklit eden modeldir. Bu nedenle, koronavirüs enfeksiyonunun önlenmesi ve kontrol edilmesi için acil ihtiyaç, optimal bir SARS-CoV-2 hayvan modelini gerektirir. Yayınlanan araştırmalarda, SARS-CoV ve MERS-CoV için hayvan modelleri arasında misk kedileri, develer, maymunlar, fareler, hamsterler, yaban gelincığı, tavşanlar ve diğer potansiyel konaklar bulunmaktadır. Primatlarda SARS-CoV viral replikasyonu ve patoloji derecesi türe göre değişirken, immünokompetan genç inbred fareler klinik hastalık olmadan geçici enfeksiyonu desteklemektedir. Misk kedileri, gelincikler ve hamster'lerde kendi kendini sınırlayan hafif klinik hastalık görülürken, tavşanlar ve devegillerde enfeksiyon lehine henüz bir bulgu ya da model oluşturulamamıştır.

Bu hayvan modelleri SARS-CoV-2 için de bir potansiyel taşıyıcı, ağaç faresi, dağ sıçanı, pangolin, sıçan, kobay ve pamuk faresi gibi diğer deneysel hayvan modelleri ve kediler ve köpekler gibi evcil hayvanlar da SARS-CoV-2 enfeksiyonunu desteklemek için potansiyel konaklar olabilir. Biyogüvenlik endişeleri için psödovirüsler iyi bir alternatif vadetmektedirler (12). Covid-19'a karşı çözüm üretmek için kurgulanan pek çok araştırmancının yolunun hayvan modellerinden geçmesi beklenmesi gereken bir durumdur.

## GÜNCEL TANI YÖNTEMLERİ ve SARS-CoV-2

### Serolojik Yöntemler

Klinik örneklerden (kan veya tükürük gibi) SARS-CoV-2'ye karşı oluşan antikorları (IgA, IgM ve IgG) tanımlayan EIA benzeri serolojik testler, moleküler testlerden daha basit ve uygulanabilir olsa da tanı için kullanılma potansiyeli belli koşullara bağlıdır ve henüz tam standardize edilmemiştir. Akut enfeksiyonları belirlemek için faydaları, muhtemelen semptomların başladığı ve viral dökülme ve bulaşma riskinin en yüksek olduğu dönem için sınırlı gözükmektedir. Esaslı, enfeksiyona karşı oluşmuş antikor tepkilerinin güvenilir bir şekilde tespit edilmesi günler ila haftalar arasında bir süreyi gerektirebilir. Bu nedenle, olumsuz sonuçlar, özellikle yakın zamanda virüse maruz kalanlar arasında SARS-CoV-2 enfeksiyonunun varlığını dışlayamaz (13). Ayrıca, antikorun SARS-CoV-2 dışı koronavirüs proteinlerine çapraz reaktivitesi de potansiyel bir sorundur, bu nedenle pozitif sonuçlar geçmişte veya günümüzdeki diğer insan koronavirüslerin yol açtığı bir enfeksiyonun sonucu da olabilir. Serolojik testler, hastaların geç hastalık komplikasyonları yaşadığı dönemlerde daha kullanışlı olabilir, nitekim bu periyotta viral üretimin azalması nedeniyle RT-PCR testinin negatif çıkma olasılığı oldukça yüksektir (14). Geçirilmiş Covid-19 enfeksiyonu ve oluşan bağışıklığı doğru bir şekilde değerlendirebilecek serolojik testlerin geliştirilmesi; epidemiyolojik çalışmalar, sürekli gözetim, aşı çalışmaları ve sağlık çalışanlarının risk değerlendirmesi için gerekli olacaktır. Hâlihazırda pek çok immunoassay yöntem kullanıma girmiştir, özellikle salgın başlangıcında kullanıma sunulan hızlı antijen ve antikor testleri yeterli duyarlılık oranları gösterememiştir. Üretici kaynaklı ciddi farklılıklar söz konusudur. Şu günlerde, standardize edilmiş prosedürler ve otoanalizörler ile çalışılan immunoassayların kullanıma girmiş olması, daha sağlıklı verilerin elde edilmesi yönünde oldukça önemlidir. Diğer taraftan, hem bu ticari sistemlerin tanınal doğruluk ve optimizasyon performanslarını öğrenebilmek hem de salgın epidemiyolojisine dair daha net bilgileri elde edebilmek için daha fazla veriye ihtiyacımız olduğu da bir gerçektir.

### Hızlı Antijen Testleri

Salgının başlangıcından bu zamana kadar immunokromatografik hızlı test formatında farklı üreticiler tarafından üretilmiş antijen testleri sunulurken, ELISA testi için anlatılan sürecinde olan az sayıda ticari ürün söz konusudur (15). Doğrudan klinik örneklerden, solunum yolu virüslerine (sinsityal virüsü influenza virüsü gibi) veya viral gastroenterit etkenlerine ait antijenleri tespit edebilen hızlı testler, yıllardır ticari olarak mevcuttur. Bu testler kolay kullanıma sahiptir ve dakikalar içinde sonuç verebilmektedir. Ancak duyarlılıklarının düşük olması önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durumun Covid-19 antijen testleri için de geçerlidir. Üstelik SARS-CoV ve MERS-CoV benzer testlerin prototipleri onay alamamıştır (16,17). Yakın zamanda SARS-CoV-2 nükleokapsid proteinine karşı monoklonal antikorlar üretilmiştir ve antijen testi için kullanıma sunulmuştur (18). Öte yandan, henüz küresel ölçekte tanınal algoritmalara girebilecek düzeyde ve performansta bir test sunulmamıştır. Üstelik, yakın zamanda tecrübe edilen bazı antijen testlerinin yetersiz olduğu sağlık otoriteleri tarafından da kayda alınmıştır. Salgının küresel ölçekte belli bir süre etkili olacağı varsayılırsa, iyi standardize edilmiş immunoassaylar, hızı ve aktif viral partikülün varlığına gereksinim duyulmaması gibi özellikleri sayesinde tanı algoritmalarında daha belirgin rol oynayabilir.

### Nükleik Asit Amplifikasyon Testi (NAAT)

Salgının başladığı ilk günlerden bu zamana kadar COVID-19 vakalarının doğrulanması, temel olarak viral RNA'nın saptanması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonları (RT-PCR) gibi nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) yapılmaktadır. Sonuçlar özel durumlar ve olanaklar dahilinde gerektiğinde nükleik asit dizileme yöntemleriyle ile teyit edilmektedir (19). Şimdiye kadar hedeflenen viral genler arasında N, E, S, ORF ve RdRp genleri bulunmaktadır ve farklı ülkelere ait farklı protokoller söz konusudur (20). Test için solunum yolu örnekleri önceliklidir. Bunun için nazofaringeal sürüntü numuneleri ilk tercihtir.

Ancak alternatif olarak orofaringeal, vb diğer üst solunum yolu örnekleri de kabul edilebilmektedir. Numuneler, yeterli hücresel materyal elde etmek için, mümkünse dacron, rayon gibi toplayıcı başlıklı, alüminyum veya plastik milli çubuklar kullanılarak elde edilmelidir. PCR testini inhibe eden maddeler içerebileceğinden kalsiyum aljinat, ahşap veya pamuk içeren çubuklardan kaçınılmalıdır. Bu örnekler bir viral taşıyıcı ortam içerisinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Üst solunum yolu örneklerinden daha fazla duyarlılığa sahip olan, ancak elde edilmesi veya alınması daha zor olan balgam, endotrakeal aspirat veya bronkoalveoler lavaj gibi örnekleri ise işlenmek üzere doğrudan mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilebilmektedir. Serum ve idrar örnekleri ise genellikle hastalık şiddetine bakılmaksızın viral nükleik asit varlığı açısından negatiftir. NAAT için, belirlenmiş bir referans standart henüz yoktur, farklı örnek toplama ve hazırlama yöntemleri söz konusudur ve enfeksiyon süresi boyunca viral dinamikler tam anlaşılmamıştır. Bunlar, SARS-CoV-2 NAAT testlerinin tanınal doğruluğunun tam olarak değerlendirilmesini engelleyen ve önümüzdeki günlerde aşılması gereken sorunlardır (21).

### Viral Dizileme

1. ve 2. jenerasyon dizileme yöntemleri bugüne kadar yüksek maliyet ve zor uygulanabilirlik gibi nedenlerle, ilk basamak virolojik tanı uygulamaları arasında yer almamıştır. Covid-19 salgının başından itibaren, SARS-CoV-2 varlığının onaylanmasını, viral genom mutasyonlarının izlenmesini veya epidemiyolojik çalışmaların yapılmasını amaçlayan 1. ve 2. jenerasyon dizileme çalışmaları, ancak merkezi ve olanakları geniş laboratuvarlarda söz konusu olmuştur (22). Ancak, hız ve ulaşılabilirliğin her zamankinden daha önemli olduğu şu günlerde 3.jenerasyon dizileme yöntemlerinin bu sistemlerin yerine geçtiği bir süreç yaşamaktayız.

## YENİ TANI YÖNTEMLERİ ve SARS-CoV-2

### CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats- Düzenli Aralıklarla Dizilmiş Kısa Palindromik Tekrarlar) Tabanlı Tanı

Her ne kadar semptomatik hastaların tanısı için iyi donanımlı laboratuvarlarda güvenilirlik enstrümanlar mevcut olsa da inkübasyon fazındaki asemptomatik kişilerin taranması veya iyileşme evresindeki hastalarda viral saçılmanın doğru belirlenebilmesi için başka yöntemlere ihtiyaç vardır. Ayrıca, pandemiyi küresel olarak kontrol altına alabilmek için, daha az donanıma sahip, taşınabilir laboratuvarlar gerektiren çözümlerin geliştirilmesi de kritik öneme sahiptir (18). Bu amaçla, havaalanları ve sınır kapıları gibi sınırlı ortamlarda ve sahada kullanılabilecek hızlı, basit, düşük maliyetli, taşınabilir, sıcaklığa dayanıklı testleri geliştirmek Covid-19 pandemisinin kontrolünde önemli hedefler arasında yer alır. Bu bağlamda, gen düzenleme esasına göre çalışan ve nükleik asit esaslı viral saptamayı önemli ölçüde basitleştirme potansiyeline sahip yeni bir teknoloji olan CRISPR yöntemi Covid-19 laboratuvar tanısında yeni ufuklar vadetmektedir (23). Yöntem, ilgilenilen hedef viral nükleik asidi spesifik olarak tanıyan kılavuz RNA (sgRNA olarak adlandırılır) ile birlikte Cas9, Cas13a veya Cas13B gibi CRISPR efektör enzimlerini içeren çok yüksek analitik duyarlılıkla çalışan bir mekanizmaya sahiptir. Son yıllarda, CRISPR teknolojisi insan genom modifikasyonuna olanak sağlayarak, kalıtsal hastalıklar veya organ nakli doku uyumsuzlukları gibi problemlerin aşılmasında terapötik bir unsur olarak dikkat çekmektedir. Diğer taraftan, Cas13a gibi bazı CRISPR enzimlerinin, moleküler hedeflerin tanınmasında yüksek seviyede RNAaz aktivitelerinin gösterilmesi, CRISPR tabanlı teşhisin kapılarını ardına kadar açmıştır. "Moleküler makas" olarak hareket etme kapasitesinin ötesine geçen CRISPR, bir numunedeki spesifik nükleik asitleri saptamak için kullanılabilecek özellikler ortaya koymaktadır. SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UNLOCKING) adı verilen yeni bir teknolojiyle, CRISPR RNAaz aktivitesi sinyal amplifikasyonu ve nükleik asit tespiti için kullanılmaktadır (24). Örneklerde bulunan DNA ve RNA'nın izotermal amplifikasyonu ilk önce potansiyel viral RNA hedefi miktarını arttırmak için rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA) ve ters transkripsiyon (RT) ile gerçekleştirilmektedir. Daha sonra ilgili virüs için spesifik sgRNA'ya sahip Cas13a enzimi ilave edilmektedir. İlgili viral RNA mevcutsa, Cas13a klavuz RNA üzerinden viral RNA'ya bağlanmakta ve bu sırada floresanla etiketlenmiş bir raportörün kollateral yarılmasıyla serbest kalması sonucu okuyucu tarafından ölçülebilen bir ışık sinyali üretilmektedir. Böylece, söz konusu RNA'nın varlığı kesin olarak tespit edilebilmektedir. Gootenberg ve arkadaşları geliştirdikleri bu yöntemle tükürük örneklerinde Zikavirüs ve Deng virüs RNA'sını SHERLOCK metodu ile birkaç saat içinde femtomolar duyarlılıkta saptamayı başarmışlardır (24).

Öte yandan benzer amaçlarla, Doudna laboratuvarı tarafından Cas12a'nın DNaz aktivitesinin kullanıldığı, DETECTR (DNA Endonuclease Hedefli CRISPR Trans Reporter) yöntemi tanımlanmış ve HPV tespitinde başarıyla kullanılmıştır (25). Şu anda bu iki yöntem, Covid-19 dahil olmak üzere bulaşıcı hastalıkları hızlı, ucuz ve doğru biçimde tespit etmek için CRISPR'ı bir gen düzenleme aracı olarak değil, bir moleküler tanı aracı olarak kullanabilmektedir. Bu yöntemler, tüm enzimlerin düşük sıcaklıklarda çalışabilmesi ve nükleik asit amplifikasyonu için özel ekipman ihtiyacının bulunmaması avantajlarına sahiptir. Test başına reaktiflerin maliyeti oldukça düşüktür. Reaktifleri kağıt üzerinde dondurarak kurutmak, tanı testlerinin uzak konumlarda uygulanmasına olanak sağlamaktadır. CRISPR sisteminin benzersiz özgüllüğü, herhangi bir virüs için modüler ve hızlı bir şekilde hassas tanı testlerinin geliştirilmesine olanak tanırken, çoklu enfeksiyon panelinin aynı anda değerlendirilmesine de izin vermektedir. Buna çarpıcı bir örnek olarak, SARS-CoV-2 ve HIV'in aynı anda hızlı ve duyarlı tespitinin yapıldığı bir araştırma yakın zamanda yayımlanmıştır. (26).

Ekstraksiyonu takiben yapılan izotermal amplifikasyonla (ters transkripsiyonu takip eden, döngü aracı izotermal amplifikasyon (LAMP), çoğaltılan hedefe ait amplikon, Cas enzimi (13a/12a) + SARS-CoV-2 özgün klavuz RNA kompleksi ile muamele edilir ve raportör molekülün ayrılması virüsün varlığını ortaya koyar. Oluşan reaksiyonun gözlemlenmesi lateral flow stripler yardımıyla belirlenir. Mammoth Biosciences'in geliştirdiği DETECTR yönteminde SARS-CoV-2 E ve N gen bölgeleri 70 kopya/µl hassasiyetle ve 30 dk içinde belirlenirken, Sherlock Biosciences, benzer bir Covid-19 spesifik protokolünde Orf1ab ve S gen bölgelerini 10 kopya/µl hassasiyetle ve 60 dk da tespit edebilmektedir. Hasta başı kullanım olanaklarıyla pandemi döneminde yüksek yarar vadeden bu yöntemlerin onaylanma aşaması devam etmektedir (27, 28). Yine CRISPR tabanlı "Combinatorial Arrayed Reactions for Multiplexed Evaluation of Nucleic acids (CARMEN)" gibi mikro akışkan çiplerin kullanıldığı ve aynı anda binlerce hedefin çalışılabilirdiği testler de sürece dahil olma aşamasındadır (29).

#### *Izotermal Amplifikasyon Ve Hasta Başı Moleküler Tanımlama*

PZR'ye alternatif olarak, nükleik asitlerin izotermal amplifikasyonu, nükleik asitlerin sabit sıcaklıklarda amplifikasyonuna izin verir. PZR'deki termal döngü sürecini atlar, böylece test süresini ve ekipman maliyetini önemli ölçüde kısaltır. Enfeksiyon etkenlerinin tanısı için geliştirilmiş ve uygulanmakta olan çoklu izotermal amplifikasyon teknolojileri mevcuttur. "Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), Helicase Dependent Amplification (HDA), Rolling Circle Amplification (RCA), Nicking Enzyme Amplification Reaction (NEAR) ve Strand Displacement Amplification (SDA)" gibi pek çok yöntem söz konusudur. Bunlar arasında Covid-19 tanısı için RT-LAMP, üzerinde yoğunlaşan çalışmalar vardır. Düşük maliyet ve kolay uygulanabilme avantajları bu yöntemleri hasta başı testleri için güçlü adaylara dönüştürmüştür (30). Ancak reaksiyon koşullarını optimize etmek ve diziye özgü primerlerin tasarlanması gibi güçlükleri vardır. Bu durum, yazılım araçları ile aşılmaya çalışılmaktadır. Primerlerin karmaşıklığı ve çokluğu, spesifik olmayan amplifikasyonlara yol açabilir. Performansı arttırmak için amplifiye edilmiş geni tanımlamak için bir tespit yönteminin entegrasyonu bu duruma çözüm olarak sunulmuştur. Umut vaat eden bir çözüm, CRISPR tabanlı oldukça spesifik Cas proteinlerinin kullanılmasını içermektedir (31). FDA'den acil kullanım izni almış SARS-CoV-2 tespiti için RdRp Gen bölgesini hedefleyen LAMP tabanlı ticari bir test, 0.125 kopya/µL hassasiyet ve 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç verebilmektedir (28). Covid-19 tanısı için, IVD, RUO onayı almış veya henüz araştırma aşamasında olan onlarca ticari sistem göze çarpmaktadır. Covid-19 tanısı almış hastaların ve sağlıklı kontrollerin orofarinks sürüntü örneklerinin kullanıldığı bir çalışmada, araştırmacılar örnek alımından sadece 1 saat sonra %100 analitik duyarlılık ve özgünlükle SARS-CoV-2 varlığı tespit etmişlerdir (32). Tüm bu yönleriyle başta RT-LAMP olmak üzere izotermal amplifikasyon seçeneklerinin hasta başı uygulamalar olarak önümüzdeki dönemlerde daha fazla kullanıma girmelerini öngörebiliriz. Pandeminin bu anlamda hızlı, güvenilir ve taşınabilir tanı sistemlerine olan gereksinimi tetiklediği söylenebilir.

#### *Lusiferaz İmmünopresipitasyon Sistemleri (LIPS)*

Lusiferaz etiketli antijenler ve yüksek kantitatif immünopresipitasyon sistemleri ile, virüs tanımlaması, antiviral tedavilerin izlenmesi ve virüsle ilişkili enfeksiyonların kategorize edilmesi mümkün olabilmektedir. Yöntem için, memeli ekspresyon vektörleri kimerik lusiferaz-viral füzyon proteinlerini eksprese etmek için kullanılır. Gaussia, Nanolusiferaz ve Renilla gibi farklı lusiferazlar, yüksek analitik hassasiyet ve düşük arka plan interferans değerleri sağlayan raportörler olarak kullanılmaktadırlar.

Rekombinant lusiferaz-etiketli viral antijeni içeren özütler saflaştırılmadan kullanılır ve serum / plazma veya antikor içeren diğer vücut sıvılarıyla inkübe edilirler. Lusiferaz-etiketli viral antijene bağlı anti-viral antikorlar içeren immunkompleksler daha sonra protein A / G kaplı boncuklarla presipite edilir ve yıkama işlemi yapılır. Ortaya çıkan lusiferaz aktivitesi bir luminometre kullanılarak ölçülür. Lusiferaz aktivitesinin miktarı, virüse yönelik antikor miktarıyla orantılıdır (33). LIPS aslında, virüslerin tam veya kısmi proteomlarına karşı immünoreaktivitenin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu diğer katı faz yöntemlerinde tam sağlanamayan bir durumdur. LIPS ile HIV, HCV, HTLV-1 ve Herpesvirüsler için çoklu antikor yanıtının değerlendirilmesinde faydalı sonuçlar elde edilmiştir (34). Bu yönüyle sadece mevcut hastalığın tanısında değil, tedavi izlemi, kronik hastalıklarda değişen antikor profili, farklı bireylerde ve farklı virüslerde immünoreaktivitenin düzeyleri gibi pek çok dinamik çıktılar sunmaktadır. Örneğin HIV ART tedavisiyle beraber BOS da belli HIV antikorlarının seviyelerindeki azalma tedavi etkinliği açısından bir gösterge olarak kullanılabilmiştir (35). Son zamanlarda insanlarda HIV enfeksiyonunu tespit etmek için LIPSTICKS adı verilen ve test süresini 1 dakikaya indiren LIPS'in manyetik boncuk kullanan modern bir versiyonu geliştirilmiştir (36). Dizileme yöntemlerinde son yıllarda yaşanan gelişmeler vektör aracı rekombinant antijen üretim stratejilerini kolaylaştırmıştır. Nitekim MERS-CoV ve HKU-CoV gibi viral etkenler için keşiflerden hemen sonra LIPS tabanlı tanı testleri geliştirilmiştir (37). Bu çalışmalarda koronavirüs türleri arasında olabilecek çapraz reaksiyonların bertaraf edilmesi açısından LIPS'in başarısına atıfta bulunulmuştur. Covid-19 tanısında LIPS kullanımıyla ilgili oldukça yeni yapılan bir çalışmada, 15 farklı SARS-CoV-2 antijeni kullanılmış ve 11'ne karşı antikor tespit edilmiştir. Araştırmacılar ORF3b ve ORF8 antijenlerine yönelik spesifik, antikorların göreceli olarak enfeksiyonun erken döneminde saptanabildiğini ve Covid-19 hastalarında N antijeninin baskınlığının söz konusu olduğunu dile getirmişlerdir. Hastalığın erken döneminde S (spike) antijeninin yeterli antikor yanıtı oluşturmadığını, ancak ORF3b, ORF8 ve N antijenlerine karşı gelişen antikorların tanısal amaçla kullanılabilirliğini bildirmişlerdir (38). Yazarlar ayrıca, bağışıklık fonksiyonlarına aracılık edebilecek yeni immünojenler olarak NSP1, ORF3b, ORF7a ve ORF8'in araştırılmasının önemini vurgulamışlardır. Bu araştırma Covid-19 ve immünoreaktivite açısından kritik sonuçlar sunmuştur. LIPS uygulamalarının etkene yönelik tanı ve immünolojik perspektif açısından kullanılabilirliği yönünde de ciddi bilgiler içermektedir. Bu sistemin önümüzdeki günlerde SARS-CoV-2 antikor bazlı araştırmaların merkezinde yer alması beklenilebilir bir durumdur.

#### *VirScan serolojik profillemeye*

Viral enfeksiyonları saptamak için mevcut antikor bazlı yöntemler tipik olarak bir seferde sınırlı sayıda virüsten birkaç viral proteinin test edilmesini içerir. VirScan adı verilen yeni bir sekanslama yaklaşımı yüzlerce insan virüsünü aynı anda profilemek için bir faj immünopresipitasyonunu içerir (39). Yöntemin ilk aşaması, bilinen insan virüslerine ait nispeten kısa polipeptid sekanslarının T7 bakteriyofaj sisteminde eksprese edilmesiyle başlar. Böylece yüzeylerindeki viral peptitleri ayrı ayrı kodlayan ve eksprese eden kapsamlı bir T7 faj kütüphanesi elde edilir (206 farklı virüs için). Bu faj miksi anti-viral antikorlar içeren serum örnekleri ile inkübe edilir. Faj yüzeyindeki viral peptitler serum antikorları ile bağlanır, oluşan immunkompleksler hareketleştirilmiş protein AG kaplı boncuklar üzerinde fikse edilir ve ardından bağlanmamış fajların elenmesi için yıkama işlemi yapılır. Uygun antikora bağlı T7 fajının insert DNA'sının amplifikasyonu ve yüksek verimli sekanslanma sonrası yapılan biyoenformatik analiz ile, yakalanan faja karşılık gelen virüslerin kimliği belirlenir. Böylece belirli bir birey için kapsamlı bir viral profil sağlanmış olur (40). Bu teknik ile, belirli bir birey enfekte eden virüslerin tamamını belirlemek ve bir seferde yüzlerce farklı virüse karşı humoral yanıtların tanımlanması mümkün kılınmıştır. Bununla kalmayıp HIV örneğinde olduğu gibi tedavi edilen ve edilmeyen bireyler arasındaki immünreaktif peptid farklılıklarını da ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca farklı popülasyonlardaki çoklu virüs seroprevalansı hakkında da katalog bilgi sunma avantajlarını içermektedir. VirScan yönteminin kullanımı ile ilgili yayınlanmış çok az rapor vardır, bu nedenle sonuçlarını ve teknolojiyi bağımsız olarak doğrulamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Spesifik viral enfeksiyonların tanımlanmasında, enfeksiyöz, hastalığın gerçek etyolojik faktörünün/faktörlerinin belirlenmesinde veya virüs maruziyetini kataloglayarak, kanser, nörodegeneratif ve otoimmün hastalıklar gibi birçok kronik hastalık ile ilişkili olabilecek yeni bilgiler elde edilmesinde VirScan kritik rol oynayabilir.

Bu bağlamda Covid-19 enfeksiyonunun tanısında başka etkenlere ait çapraz reaksiyonların oluşturduğu karmaşa ya da salgın boyunca bireylerde oluşabilecek diğer viral enfeksiyonların tanımlanmasında yaşanabilecek yanlış belirlemeler pandemi boyunca masada duracak önemli sorunlardır. Teknik olanaklar açısından yaygın kullanımı henüz mümkün görünmese de, Covid-19 pandemisi sırasında bu yöntemle elde edilebilecek tecrübelerin, yakın gelecekteki virolojik tanı uygulamalarına ışık tutacağı yadsınamaz bir gerçektir.

#### Taşınabilir hızlı dizileme araçları

Üçüncü kuşak dizileme teknolojileri, genomları, transkriptomları ve metagenomları benzeri görülmemiş bir çözünürlükte inceleyebilen yeni bir devrim niteliğindedir. İkinci jenerasyon dizilemelerin aksine bu teknolojiler doğrudan tekli DNA moleküllerini hedefleyerek gerçek zamanlı sıralamayı mümkün kılmaktadır. Burada okumalar sıralayıcıdan geçer geçmez analiz için kullanılabilir. Bu sistemlerin kazandırdığı üç önemli gelişme vardır: (1) okuma uzunluğunda onlarca bazdan okuma başına on binlerce baza kadar artış; (2) sekanslama süresinin günlerden saatlere indirilmesi (veya gerçek zamanlı uygulamalar için dakikalara); ve (3) PCR amplifikasyonu ile oluşan sekanslama sapmalarının azaltılması veya ortadan kaldırılması (41).

DNA iplikliğinin biyolojik bir gözenekten geçirilmesi ve üretilen elektrik iletkenliğindeki değişikliklerin ölçülerek DNA bazlarının tanımlanması esasına göre çalışan MinION sistemi, nanopore teknolojisini kullanan ilk ticari dizileme olarak, 2014 yılında Oxford Nanopore Technologies (ONT) tarafından piyasaya sürüldü. Taşınabilirliği, satın alınabilirliği ve veri üretimindeki hızı, onu gerçek zamanlı uygulamalar için cazip bir konuma taşımıştır (42). salgının başlangıcından itibaren yapılan çalışmalarda nanopore teknolojisi bir dizileme aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır (43).

Ocak ayında ÇİN CDC 3. nesil' sıralama teknolojisinin virüsün mutasyon geçirip geçirmediğini anlamalarını sağladığını belirtirken, CDC dizileme için nanopore uygulamalarını teyid etmiştir.

Sonrasında ilan edilen Baviera ve Avustralya genomları da nanopore dizileme ile tanımlanmıştır. Enfeksiyon pandemi seviyesine ulaştığında artık pek çok ülke nanopore uygulamalarıyla ilgili çok sayıda projeyi ilan etmiştir (44). Başta Oxford Nanopore Minion Teknolojisi olmak üzere 3. jenerasyon dizileme araçları, salgının ilk üç aylık periyodunda virüsün hastalık etkeni olarak tanımlanmasına yüksek duyarlılıkla olanak tanırken, sonraki zaman diliminde alt türlerin varlığının ortaya konması, mutasyon haritasının çıkarılması, hücre kültürü çalışmalarının doğrulanması ve aşı çalışmalarının desteklenmesi gibi faydalarıyla da ön plana çıkmıştır. Bir gün içerisinde (~7 saat) hızlı sonuç verme ve küçük boyutlu taşınabilir özelliğinin bulunması bu yöntemin küresel ölçekte yaygın biçimde kullanılmasının önünü açmıştır. Bugün dünyanın her yerinden araştırmacılar tarafından SARS-CoV-2 için elde edilen binlerce nanopore dizileme verisi GISAID, GenBank ve elsewhere gibi veri tabanlarında mevcuttur. Ayrıca, Ebola, Kızamık, Grip gibi salgınların gerçek zamanlı epidemiyolojik haritalanması ve irdelenmesini amaçlayan ARTIC-network sistemi kullanılarak, 'bavul içinde laboratuvar' olarak adlandırılan nanopore teknolojisiyle elde edilen SARS-CoV-2 saha verilerinin Covid-19 pandemisi için etkin olarak kullanılması mümkün olmuştur (45). Şu anda dünya üzerinde pek çok araştırmacı taşınabilir MinION sistemini kullanmaktadır. Büyük ve yerleşik laboratuvarlar için daha büyük GridION sistemi ve ultra yüksek üretim yapabilen PromethION sistemleri de aynı üretici tarafından kullanıma sunulmuştur. Öte yandan, çok daha küçük olması planlanan Flongle sistemiyle elde edilmiş erken çalışma sonuçlarının yakın zamanda yayımlanması beklenmektedir (44,45).

Yeni teknolojik gelişmeler ve Covid-19 pandemisinin oluşturduğu dinamik gereksinimler ışığında yeni kullanıma sunulmuş veya yakın zamanda kullanılacak yöntemler Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** Yeni Virolojik Tanı Teknolojileri ve Covid-19(Kaynak 33'den geliştirilmiştir)

Teknoloji	Kullanım potansiyeli
<b>CRISPR</b>	Sabit sıcaklıkta ve nükleik asit amplifikasyonu için özel ekipman ihtiyacı bulunmayan yüksek özgül bir yöntem. Kağıt üzerinde transfer edilebilir özelliğine sahip ve test başına reaktiflerin maliyeti oldukça düşük. Lateral flow okumalı CRISPR uygulamaları 10 kopya/μl duyarlılıkla ve 1 saatin altında bir süreyle Covid-19 tanısında başarılı olmuştur. Sistem istenirse çoklu enfeksiyon (All-In-One) paneli oluşturulmasına da müsaade etmektedir. Onay alacak ticari sistemlerin yaygınlaşması beklenmektedir.
<b>İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri</b>	Nükleik asitlerin sabit sıcaklıklarda amplifikasyonuna izin verir. PZR'deki termal döngü sürecini atlar, böylece test süresini ve ekipman maliyetini önemli ölçüde kısaltır. Primerlerin karmaşıklığı ve çokluğu, spesifik olmayan amplifikasyonlara yol açabilir. CRISPR tabanlı spesifik Cas proteinlerinin kullanımı amplifiye edilmiş geni tanımlamak için kullanılabilir. SARS-CoV-2 tespiti için acil kullanım izni almış LAMP tabanlı ticari bir test, 0.125 kopya/μl hassasiyet ve 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç verebilmiştir. Özellikle hasta başı uygulamalarında önümüzdeki dönemlerde daha fazla kullanılmaları muhtemeldir.
<b>LIPS</b>	Virüslerin tam veya kısmi proteomlarına karşı immünoaktivitenin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. SARS-CoV-2'nin farklı antijenlerine karşı oluşan antikorların aynı anda çoklu analizini içeren ön çalışmalar, hedef antijene karşı hangi antikorların baskın veya yetersiz olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu bilgiler, Covid-19 tanısı ve immünojenik perspektif açısından oldukça önemlidir. Önümüzdeki günlerde SARS-CoV-2 için antikor bazlı araştırmaların merkezinde yer alması beklenilebilir bir durumdur.
<b>VirScan</b>	Yöntem yüzeylerindeki her bir virüs için spesifik viral peptitleri ayrı ayrı kodlayan ve eksprese eden kapsamlı bir T7 faj kütüphanesi esasına dayanır. Viral maruziyetin antikor bazlı kataloglanmasını mümkün kılan bu yöntemin Covid-19 tanısı ve tedavi planlamasındaki yeri henüz yaygın kullanım için mümkün görünmese de, pandemi sırasında bu yöntemle elde edilebilecek tecrübelerin, yakın gelecekteki virolojik tanı uygulamalarına ışık tutacağı yadsınamaz bir gerçektir.
<b>Taşınabilir hızlı dizileme araçları (MinION)</b>	Doğrudan tekli DNA moleküllerini hedefleyerek gerçek zamanlı sıralamayı mümkün kılmaktadır. On binlerce bazlık okuma uzunluğu, saatlere indirilmiş dizileme süresi ve PCR kaynaklı dizileme sapmalarından arındırılmış olma avantajlarına sahiptir. Yüksek veri üretebilen ve taşınabilen Oxford Nanopore MinION ticari dizileme cihazının en önemli temsilcisi olarak Covid-19 salgınının başından beri etkenin tanımlanması ve mutasyon haritasının çıkarılmasında yaygın biçimde kullanılmıştır. 'Bavul içinde laboratuvar' olarak adlandırılan nanopore teknolojisiyle tüm dünyada elde edilen SARS CoV-2 saha verileri ARTIC-network'ü üzerinden güncel ve merkezi olarak takip edilebilmektedir. Kullanımının giderek daha da yaygınlaşması beklenmektedir.

## SONUÇ

SARS CoV-2 virüsünün yaptığı COVID-19 enfeksiyon pandemisi, ölçeği ve hızlı yayılması göz önüne alındığında, büyük bir halk sağlığı sorunu haline geldiği görülmektedir. Dolayısıyla, etkeni erken saptamak, hastalığın tanısını erken koyabilmek ve zamanında tedavi sağlamak, ayrıca enfeksiyon kontrolünü kolaylaştırmak ve filyasyona hızlı destek sağlamak için COVID-19'un teşhisinde, hızlı, güvenilir, kesin tanıya katkı sağlayan, tanı yöntemlerine hemen ihtiyaç vardır. Bilim dünyamız, analitik duyarlılıktan ödün vermeksizin, günlerden saatlere, saatlerden dakikalara indirilmiş süreleri vadeden, ulaşılabilir, taşınabilir ve uygun maliyetli yeni tanımlama yöntemlerinin, hem ciddi yarar sağlayacağı hem de sinanacağı dinamik bir pandemi sürecini yaşamaktadır. Bu yöntemlere ilişkin onay sürecinde olan çok sayıda başvurunun varlığı, yakın gelecekte SARS-CoV-2 tanı algoritmalarının daha zengin ve üretken çözümlere kavuşacağına dair güçlü kanıtlar sunmaktadır (46).

## Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

## KAYNAKLAR

- Woolhouse M, Scott F, Hudson Z, Howey R and Chase-Topping M. Human viruses: discovery and emergence. *Phil. Trans. R. Soc.* 2012; B367:2864–2871
- Souf S. Recent advances in diagnostic testing for viral infections, *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 2016; 9: hzw010.
- Prasad S, Potdar V, Cherian S, Abraham P, Basu A, ICMR-NIV NIC Team. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2. *Indian J Med Res [serial online]* 2020;151:241-3.
- Weller TH, Enders JF. Production of hemagglutinin by mumps and influenza A viruses in suspended cell tissue cultures. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1948; 69:124-8.
- Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science.* 1949;109:85-7.
- Jonsdottir, HR, Dijkman, R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Virology.* 2006; 13: 24.
- Mantlo E, Bukreyeva N, Maruyama J, Paessler S, Huang C. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection. *Antiviral Res.* 2020;179:104811.
- Harcourt J, Tamin A, Lu X, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with 2019 Novel Coronavirus Disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(6).
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/grows-virus-cell-culture.html>(Erişim 15 Mayıs 2020).
- Harold S. Kaye, Wilma B. Yarbrough, Carol J. Reed, et al. Antigenic Relationship between Human Coronavirus Strain OC 43 and Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus Strain 67N of Swine: Antibody Responses in Human and Animal Sera. *The Journal Of Infectious Diseases.* 1997; 135:2.
- Bărboi G, Pîrvulescu M. Hemagglutination inhibition test for the diagnosis of coronavirus infection in cattle. *Virologie.* 1986;37:253-6.
- Yuan L, Tang Q, Cheng T, Xia N. Animal Models for Emerging Coronavirus: Progress and New Insights. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 7: 1-26.
- Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine.* 2020.
- Guo L, Ren L, Yang S, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020.
- <http://www.finddx.org/covid-19/pipeline/> Accessed 14 May 2020.
- Lau SK, Woo PC, Wong BH, et al. Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in SARS patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2884-9.
- Chen Y, Chan KH, Kang Y, et al. A sensitive and specific antigen detection assay for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4:e26.
- Cheng MP, Papenburg J. et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome Related Coronavirus-2. *Ann Intern Med.* doi:10.7326/M20-1301 ,
- WH(2020e). Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. 2020. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>. Accessed 14 May 2020.
- WHO (2020f) Guidelines for the safe transport of infectious substances and diagnostic specimens. In: WHO. [https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO EMC\\_97\\_3\\_EN/en/](https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO EMC_97_3_EN/en/). Accessed May 2020.
- Liu Y, Yan LM, Wan L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19 [Letter]. *Lancet Infect Dis.* 2020. [PMID: 32199493]
- Saxena SK(ed.), *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), Medical Virology: from Pathogenesis to Disease Control*, [https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_16).
- Chertow DS, Next-generation diagnostics with CRISPR. *Science*, 2018; 360: 381–2.
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017;356:438-42.
- Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, Doudna JA. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* 2018;360:436-9.
- Ding X, Yin K, Li Z, Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv* 2020.03.19.998724;
- Feng Zhang OA, Gootenberg JS. "A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics" can be found under.2020. <https://www.broadinstitute.org/files/publications/special/COVID-19%20detection%20%28updated%29.pdf>.
- Santiago, I. Trends and innovations in biosensors for COVID-19 mass testing. *ChemBioChem.* Accepted Author Manuscript. 2020 doi:10.1002/cbic.202000250.
- Ackerman, C.M., Myhrvold, C., Thakku, S.G. et al. Massively multiplexed nucleic acid detection using Cas13. *Nature.*2020.
- Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab Chip.* 2012;12:2469-86.
- Broughton, J.P., Deng, X., Yu, G. et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* (2020).
- Ding X, Yin K, Li Z, Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv* 2020.03.19.998724;
- Burbelo PD, Lebovitz EE, Notkins AL. Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Transl Res.* 2015;165:325-35
- Burbelo PD, Price RW, Hagberg L, et al. Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies in the Cerebrospinal Fluid: Evidence of Early Treatment Impact on Central Nervous System Reservoir? *J Infect Dis.* 2018;217:1024-32.
- Burbelo PD, Gunti S, Keller JM, et al. Ultrarapid Measurement of Diagnostic Antibodies by Magnetic Capture of Immune Complexes. *Sci Rep.* 2017;7:3818.
- Alagaili AN, Briesse T, Mishra N et al., Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio*, 2014 5: e00884–14.
- Zhou P, Fan H, Lan T et al., Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature.*2018;556: 255–8.
- Hachim A, Kavian N, Cohen CA et al. Beyond the Spike: identification of viral targets of the antibody response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.20085670>.
- Xu GJ, et al. Viral immunology. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science*, 2015; 348: aaa0698.
- Burbelo PD, Iadarola MJ, Chaturvedi A. Emerging technologies for the detection of viral infections. *Future Virol.* 2019;14:39-49.
- Kono, N, Arakawa, K. Nanopore sequencing: Review of potential applications in functional genomics. *Develop Growth Differ.* 2019; 61: 316– 26.
- Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14:265-79.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* 2020;382:727-33.
- <https://nanoporetech.com/about-us/news/covid19-community/> Accessed 15 May 2020
- <https://artic.network/about.html> Accessed/15 May 2020
- [https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag\\_tab](https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/?section=molecular-assays#diag_tab) Accessed 15 May 2020