



COVID-19 TANI TESTLERİ

Prof. Dr. Selçuk KILIÇ

Prof. Dr. İrfan ŞENCAN

Hangi Testler/ incelemeler?

Direkt Tanı Yöntemleri

- Virüs izolasyonu
- Moleküler Testler
- Antijen saptayan testler

Serolojik Tanı Testleri

- Hızlı Ab testleri (IgM, IgG ve IgM/IgG)
- ELISA, CLA ve WB (IgM, IgA ve IgG)

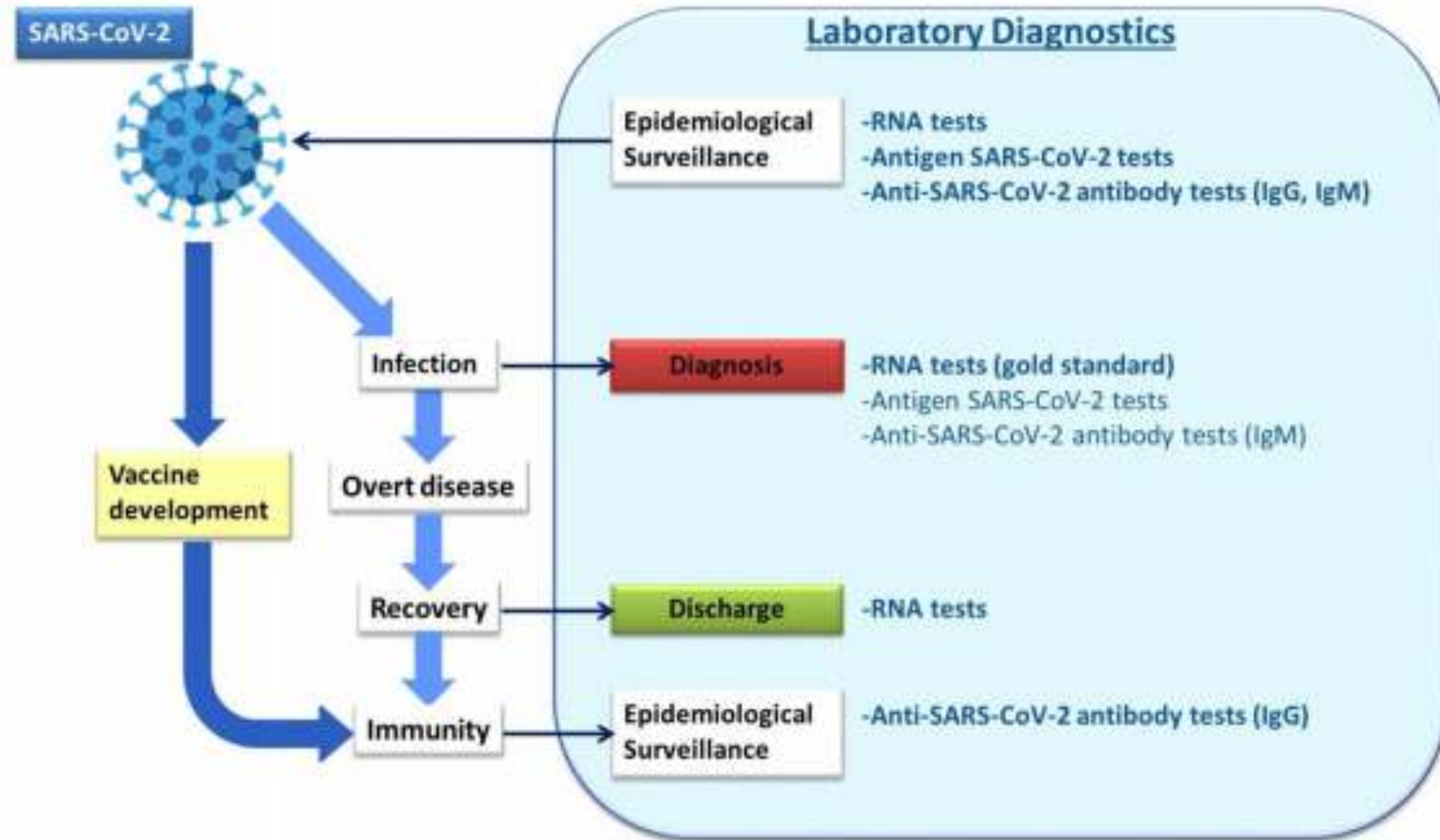
Biyokimyasal ve Hematolojik Testler

- CBC (lenfopeni, ezofopeni) ve Prokalsitonin, Ferritin, CRP, ESH,
- IL-6, Di-dimer, PT, LDH, AST, ALT, Kreatinin

Akciğer Grafisi (Opasite-GGO)

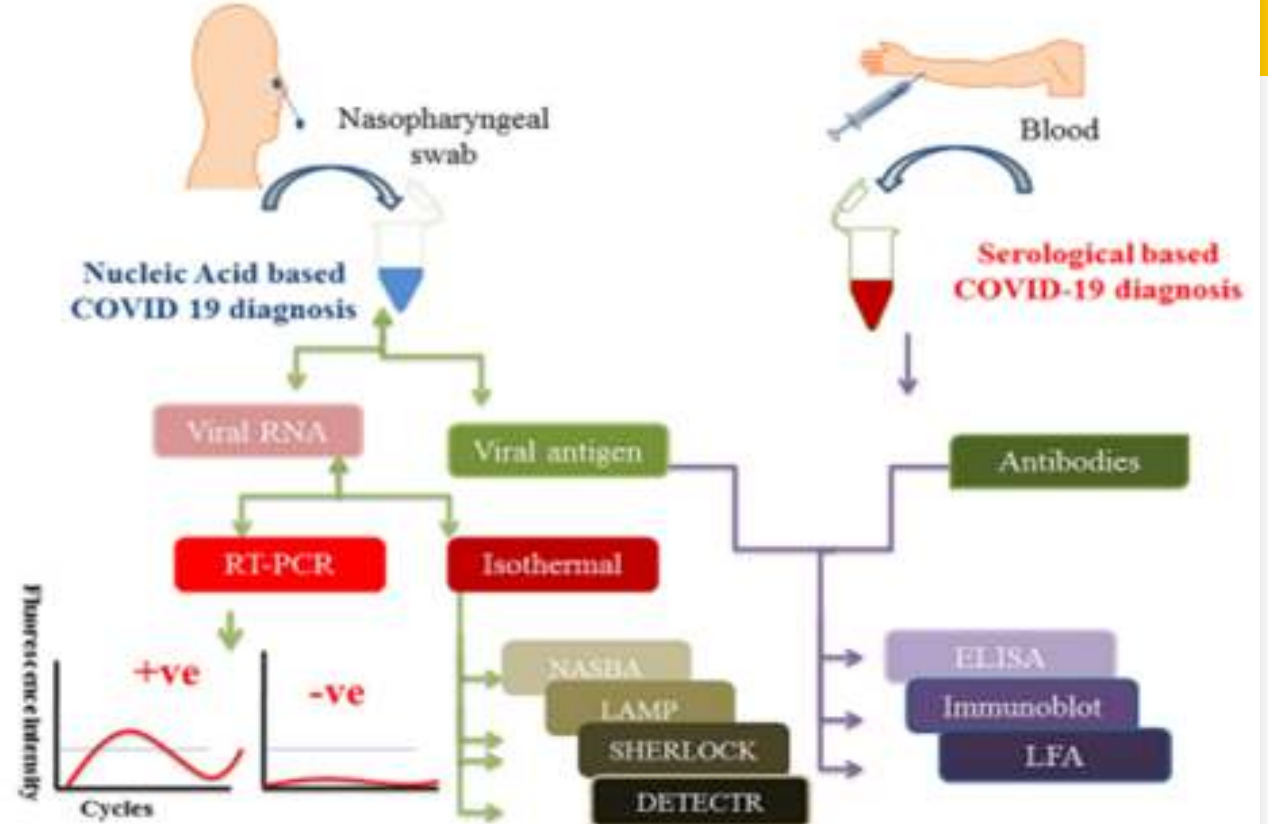
BT (Çoklu yamalı infiltrasyon ve/veya periferel yayımlı interstisyel değişimler)

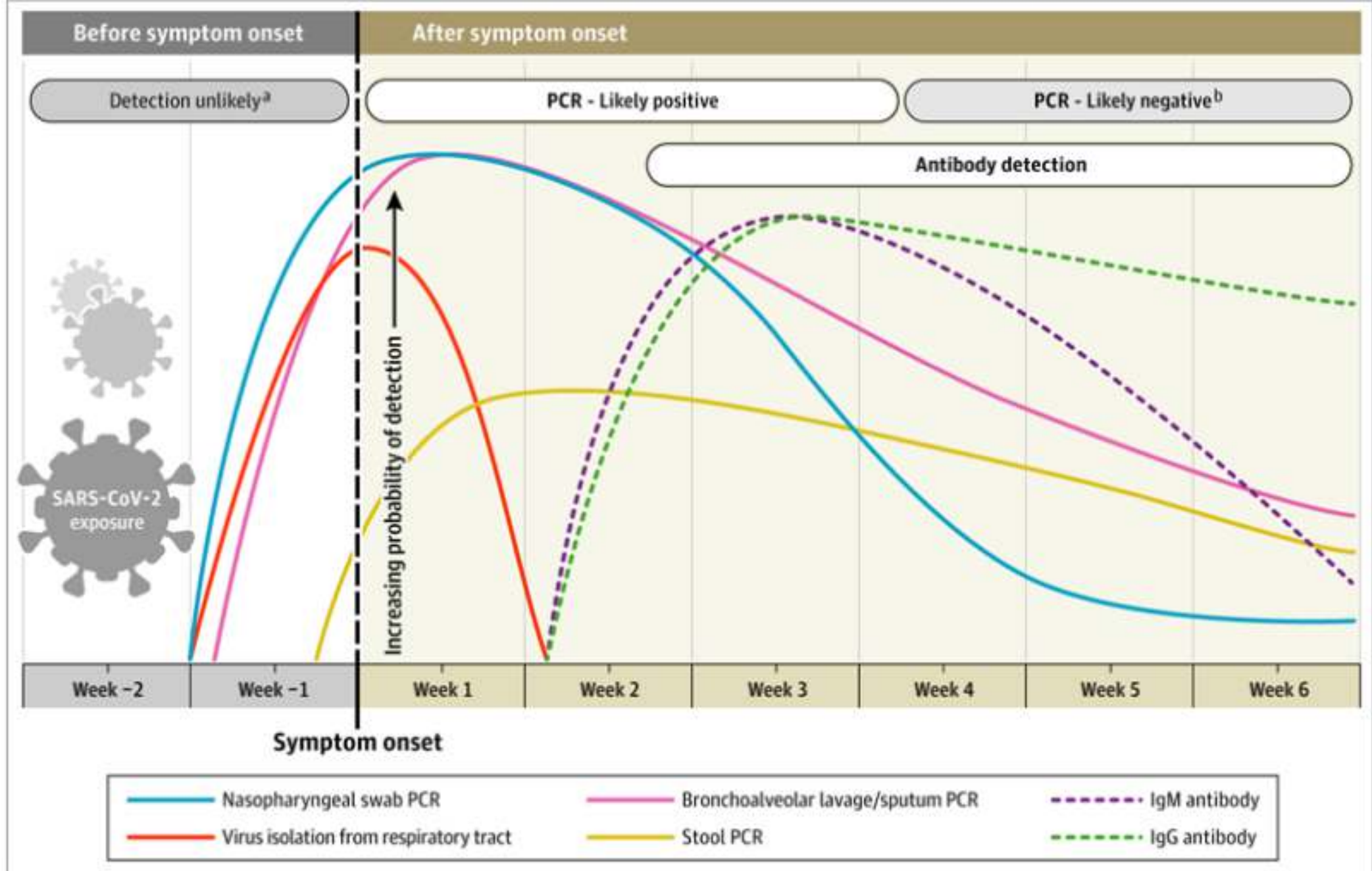
COVID-19 TANI TESTLERİNE GENEL BAKIŞ



COVID-19 TANI TESTLERİNE GENEL BAKIŞ

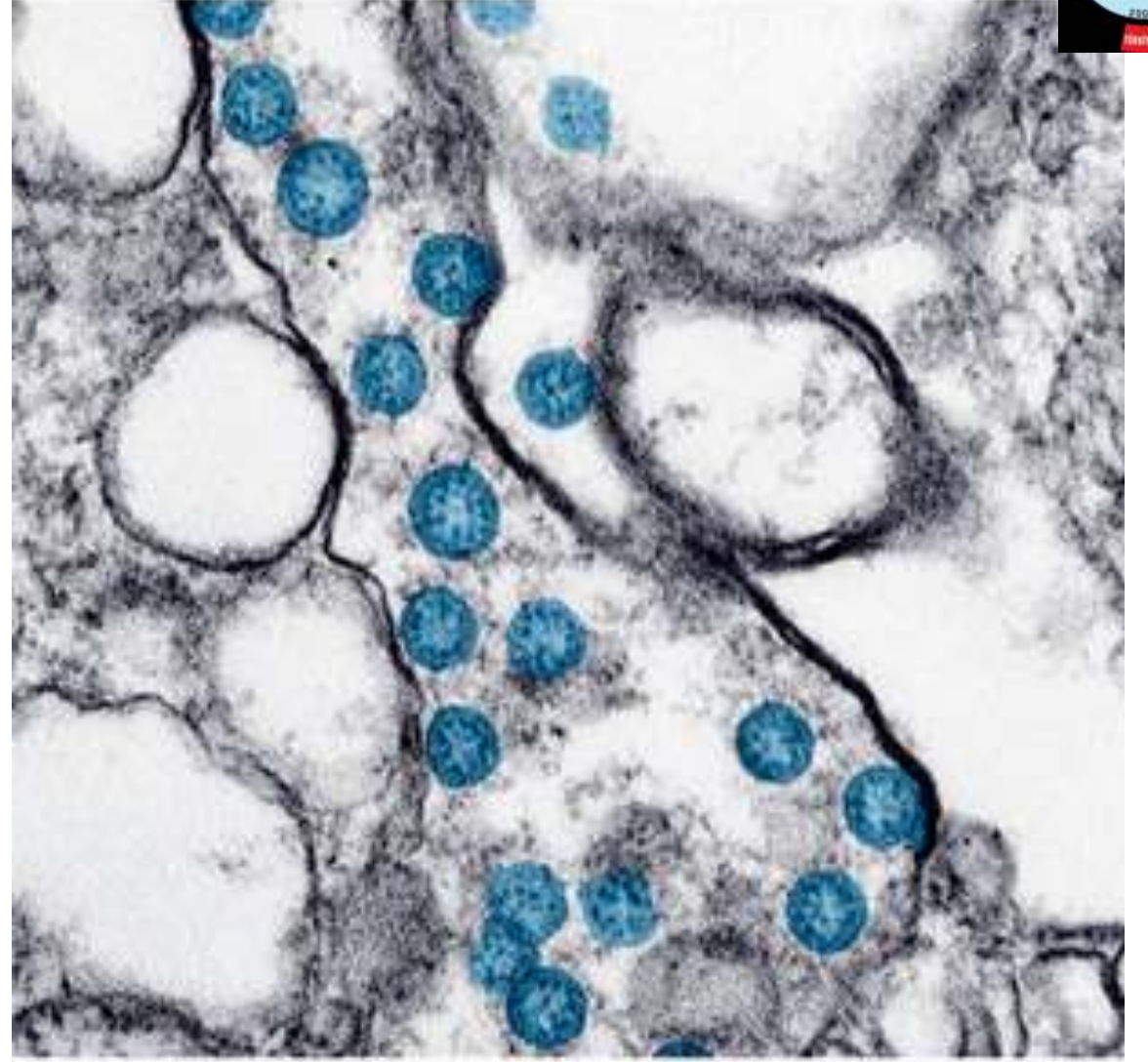
- Virüs İzolasyonu
- Moleküler Tanı Testleri
- Hızlı Tanı Testleri (Antijen ve antikor saptayan teknikler)
- Nanoteknolojik yöntemler ve biosensörler



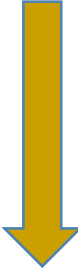


I.VİRÜS İZOLASYONU

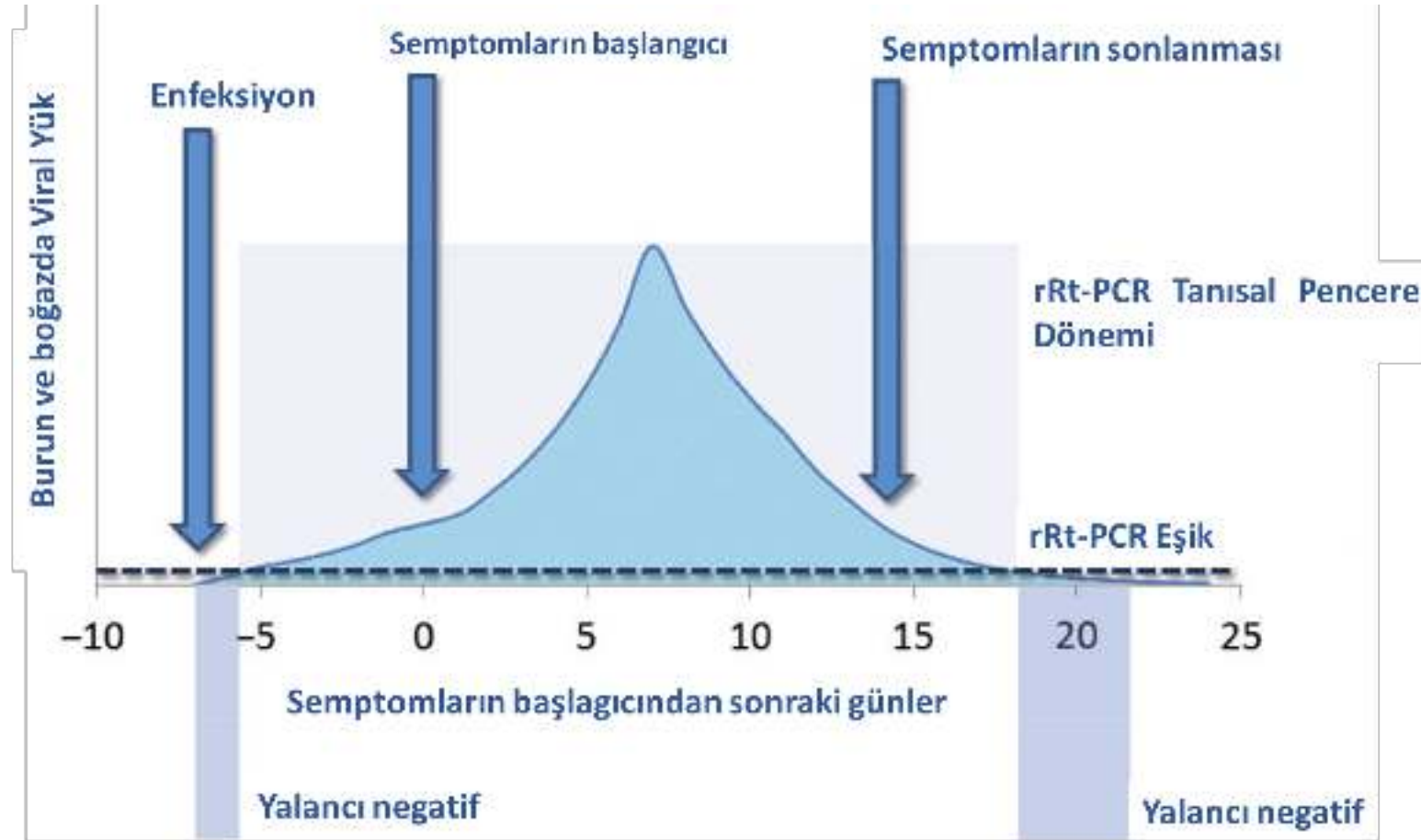
- Biyogüvenlik düzey-3 laboratuvarında yapılması gereklidir.
- COVID-19 rutin tanısında virüs izolasyonu (kültürü) önerilmemektedir.
- **Virüs izolasyonu;**
 - Antiviral araştırma
 - Patogeneze yönelik araştırmalar
 - Virüs stabilite araştırması
 - Nötralizan antikor test çalışmaları
 - Aşı geliştirme çalışmaları



2. SARS-CoV-2 RNA TESTİ (RT-PCR)

- **Altın standart nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT)**
 - En yaygın kullanılan gerçek zamanlı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR).
 - NAA testleri yüksek duyarlık ve özgüllüğe sahiptir.
 - NAAT için üst ve alt solunum yolundan alınan örnekler tercih edilir.
 - Bronkoalveolar lavaj,
 - ETA, Balgam,
 - Nazofarengeal sürüntü
 - Oro-farengeal sürüntü
- 
- A large yellow arrow pointing downwards, indicating a flow or continuation of information.

Viral Yük



Çalışmalar, SARS-CoV-2 RNA'nın

- RNA klirensi, özellikle çok ağır olgularda artan antikor konsantrasyonları ile her zaman ilişkili değildir.
- Viral atılımın özellikle uzun süre semptomatik kalan hastalarda, ağır olgularda, >60 yaş ve erkeklerde daha uzun süreli
- Gaita ile atılım süresi ÜSY numunelerine göre 7 gün (4-11 gün) daha devam eder.

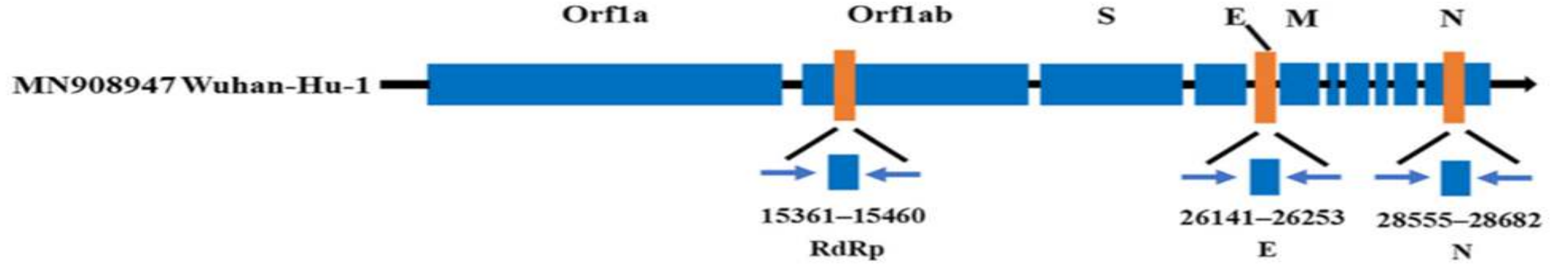
Viral Saçılım !

COVID-19'un yayılma potansiyeli ile ilgili önemli bir soru;

RNA-pozitif bireylerin bulaşıcı virüs yayıp yaymadıklarıdır.

viral replikasyonun semptomların başlamasından 7-10 gün sonra durduğu, ancak hastaların bu noktadan sonra PCR ile 1-2 hafta RNA-pozitif olarak saptandığını göstermiştir.

Ticari RT-qPCR Kitlerinin Deęerlendirme Sonuęları

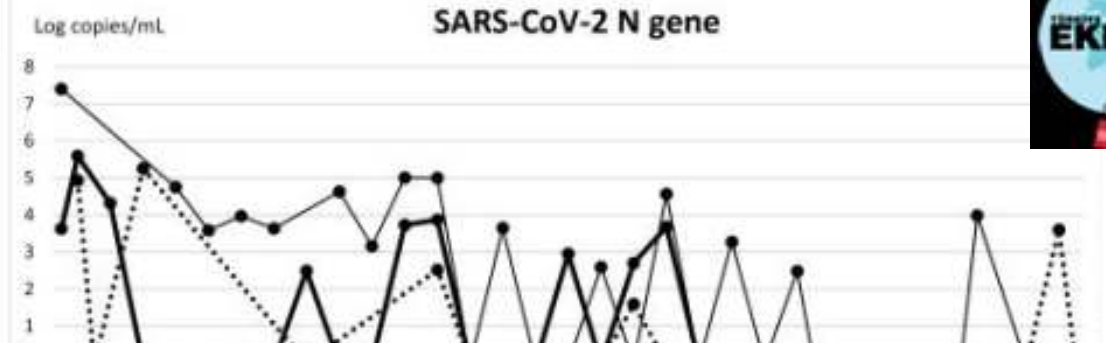
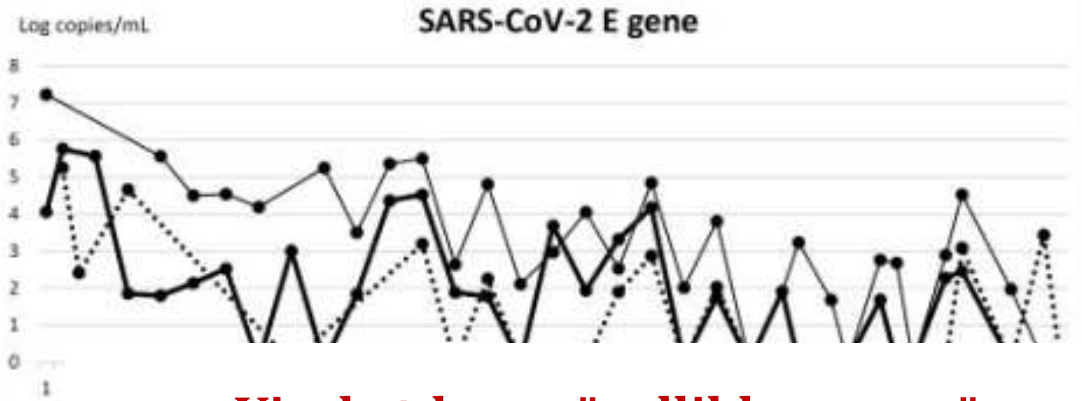


Hedef Gen	Saptama limiti (kopya/Rxn)	Duyarlılık	Özgüllük
E	1-50	%92-100	%97-100
ORF-1a	1-10	%100	%96-100
RdRp	1-100	%90-100	%100
N	1-10	%98-100	%98-100
S	1-10	%92-100	%100



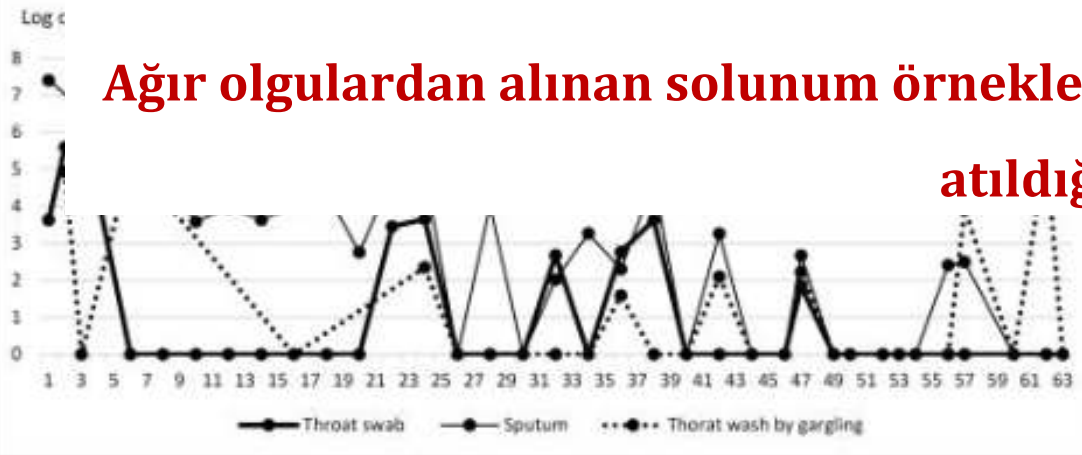
COVID-19 PCR test sonuçları nasıl değerlendirilmelidir?

- Pozitif PCR testi kişinin enfekte olduğunu göstermektedir.
- Yalnızca viral RNA'nın varlığını gösterir ve mutlaka *canlı* (replike olan) virüsün varlığını göstermez.
- Hastalarda viral saçılım *dalgalanmalar* gösterebilir.
- Özellikle hastanede izlemi gerektirmeyen olgularda semptomların başlamasından ortalama **7-10 gün** sonrasında *nadiren* hücre kültüründe üretilebilen aktif virüs saçılımı görülür.
- Ancak, ağır olgularda ve immün baskılanmış bireylerde virüs saçılım süresi *daha uzundur*.



Viral atılımın özellikle uzun süre semptomatik kalan hastalarda semptomların başlangıcından 25-50 gün sonrasına kadar tespit edilebilir düzeylerde kalabileceğini gösterilmiştir

Ağır olgulardan alınan solunum örneklerinde hafif hastalığı olanlara göre daha uzun süre atıldığı saptanmıştır.





ŞÜPHELİ PCR SONUCU

- Bazı qPCR kitleri ile yüksek Ct değerlerinde yanlış sinyaller alınabileceği için zayıf pozitif sonuçlarının dikkatli yorumlanması gereklidir.
- Test sonuçlarının geçersiz veya şüpheli olduğu ortaya çıktığında;
 - **Yeni örnek alınmalı ve**
 - **Farklı gen bölgesini hedefleyen bir NAAT ile tekrar test edilmeli veya**
 - **Nükleik asit dizi analizi ile doğrulama yapılmalıdır.**



NEGATİF PCR SONUCU

- Klinik bulguları veya temas öyküsü varsa 24-48 saat sonra test tekrar edilmelidir.
- Akciğer tutulumu varsa alt solunum yolu örneği ile test tekrar edilmelidir.
- İkinci PCR test sonucu negatif gelen COVID-19 şüpheli hastalarda **antikor testleri** (semptomların başlangıcından itibaren en erken 14 gün sonra olmak şartı ile) ile tanı desteklenebilir.

Bir veya daha fazla negatif NAAT sonucu olası COVID-19 tanısını ekarte ettirmez.

PCR Testleri ile %5-30 oranında yalancı negatif sonuçlar alınabilir!



1. Numuneye ait faktörler:

- ✓ Uygun olmayan materyal ile numune alınması (PCR için inhibisyon etkisi olan pamuk, kalsiyum alginat ve ahşap yapıdaki eküvyonlar kullanılması)
- ✓ Numune kalitesinin düşük olması (çok az hasta materyali içermesi)
- ✓ Uygun olmayan anatomik bölgeden numune alınması
- ✓ Numune uygun şekilde işlenmemesi ve/veya taşınmaması

2. Hastalığın çok erken döneminde numune alınması, asemptomatik, hafif semptomlu veya taburcu hastalardan numune alınması (**düşük viral yük**)

3. PCR **inhibisyonu**

4. Mutasyona bağlı primer ve hedef dizi arasında **uyumsuzluk** sonucu



PCR TESTİ KİMLERE YAPILMAMALIDIR?

- İzolasyonu sonlandırmak için PCR testi *gerekli değildir*.
- Hastalık geçirenlerde ya da son aşı dozundan sonra ilk 3 ay içinde COVID-19 ile uyumlu bulgu ve belirtiler gelişmediği sürece PCR testi yapılmaz.
- *Sağlık çalışanı dışında temaslı izleminde semptomatik olmayan olguların PCR testi ile değerlendirilmesi gerekli değildir.*
- Yüksek riskli hasta gruplarının bulunduğu alanlarda çalışan sağlık personelinin izolasyon süresinin sonunda PCR ile değerlendirilmesi önerilmektedir.

PCR KAPASİTESİNİ İYİLEŞTİRMEK İÇİN

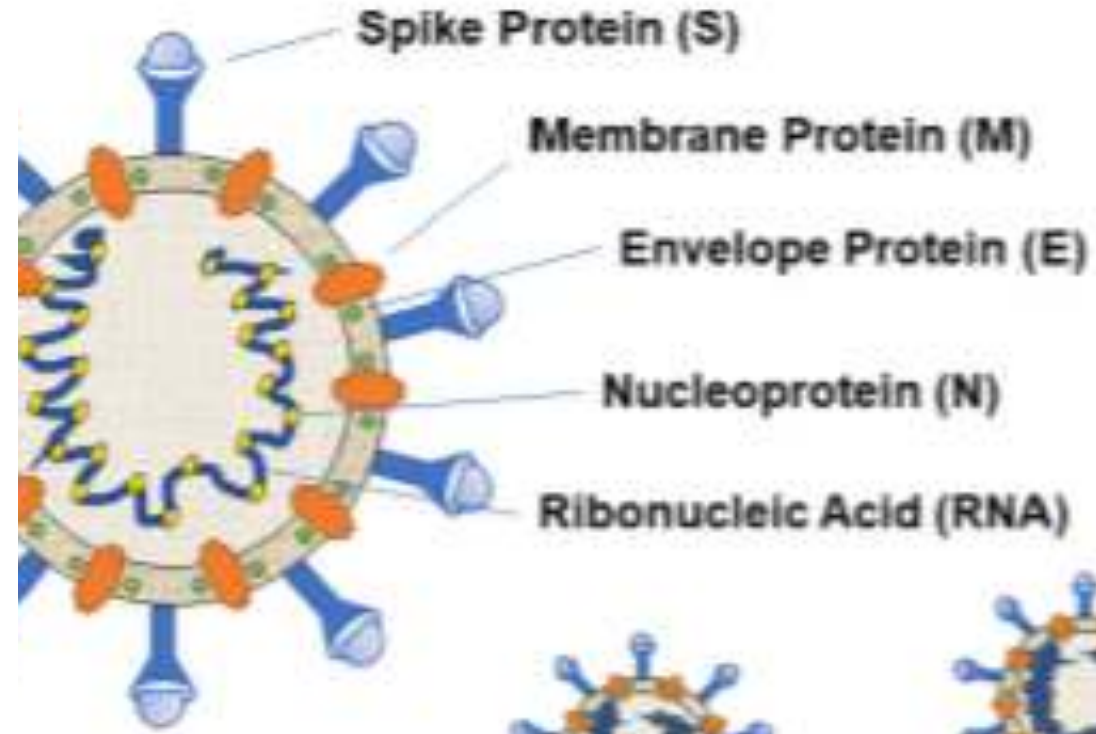


- Alt solunum yolu örnekleri almak mümkün değilse, NAAT'ın **pozitif oranını iyileştirmek** için daha sonraki hastalık döneminde dışkı ve kan örnekleri (serolojik tanı) alınmalı,
- Test **özellüğünü** geliştirmek için birden fazla hedef bölgeye yönelik NAAT kullanılmalı,
- Tanısal **duyarlılığını artırmak için**; izolasyona alınan örnek hacmi ve teste alınan örnek hacmi artırılmalı,
- Numune taşıma esansında RNA'yı **korumak** ve virüsü **inaktif etmek** için örnekler, TRIZOL, TRIZOL LS veya AVL tamponu gibi guanidin tuzu içeren reaktiflere konulmalı,
- NAAT test sonuçlarının güvenilirliği için izolasyon ve çoğaltma reaksiyonunda uygun pozitif, negatif ve inhibisyon **kontrolleri** kullanılmalıdır.

3. COVID-19 TANISINDA ANTİJEN TESTLERİNİN YERİ?

- *Ülkemizde antijen testleri COVID-19 vaka yönetim algoritmasında yer almamaktadır.*
- Antijen testlerinin doğru yorumlanması için hastalığa ait yerel, bölgesel ve ülke çapında **prevalans** verisinin bilinmesi gereklidir.
- PCR testlerine ulaşamadığı veya hızlı ön değerlendirmenin gerekli olduğu durumlarda antijen testlerinden **yararlanılabilir**.

HIZLI ANTİJEN TESTLERİ



- Üst solunum yolu örneklerinden virüsün replikasyonu esnasında açığa çıkan antijenik yapıları saptayacak şekilde dizayn edilmişlerdir.

Hızlı tanı için Hedef Antijenik Yapılar:

- **Spike glikoprotein (S)**, Zarf (E:envelope), Membran (M) ve **Nükleokapsid (N protein)** dört yapısal protein
- **N protein antijeni** diğer yapısal antijenlere göre daha kolay üretilmesi ve SARS-CoV-2 için S- glikoproteine göre daha yüksek oranda korunmuş olduğu için **en fazla kullanılan hedef antijendir.**



Hızlı Antijen Testleri-2

Hızlı antijen testleri için minimum performans değerlerinde (**$\geq\%80$ duyarlılık ve ≥ 97 özgüllük**) olmak üzere;

- A. Semptomlar başladıktan **5-7 gün** içerisinde aktif olguların saptanması amacıyla kullanılabilir.
- B. Tanı kapasitesinin yetersizliği ve kapasitenin yaygınlaştırılması (de-santralizasyon):
 - PCR testine erişimin sınırlı olması (kırsal bölge, kapalı yapı ve toplum vb),
 - Sağlık sisteminin aşırı yük nedeniyle şüpheli vakaların tümünü NAAT ile test etmenin mümkün olmadığı durumlarda veya test geri bildirim sürelerinin uzun olması,
 - Toplumsal bulaşın yüksek olduğu durumlarda olay yönetimi/salgına hızlı yanıt vermek için hızlı antijen testleri kullanılabilir.



Hızlı Antijen Testleri-3

- C.** Kapalı veya yarı kapalı toplumlarda (Okul, bakım evleri, hapishane, yurt, gemi, iş yeri vb) salgın incelenmesinin desteklenmesi ve salgın NAAT ile doğrulanması durumunda *risk gruplarının taranmasında* kullanılabilir.
- D.** Toplumsal bulaştırıcılığın yüksek olduğu bölge ve yapılarda (sağlık merkezleri, bakım evleri, hapishane, okul vb) *erken tanı konulması* ve *temaslı takibi* için antijen testleri kullanılabilir.



TARAMA AMAÇLI ANTİJEN TESTİ KULLANIMI

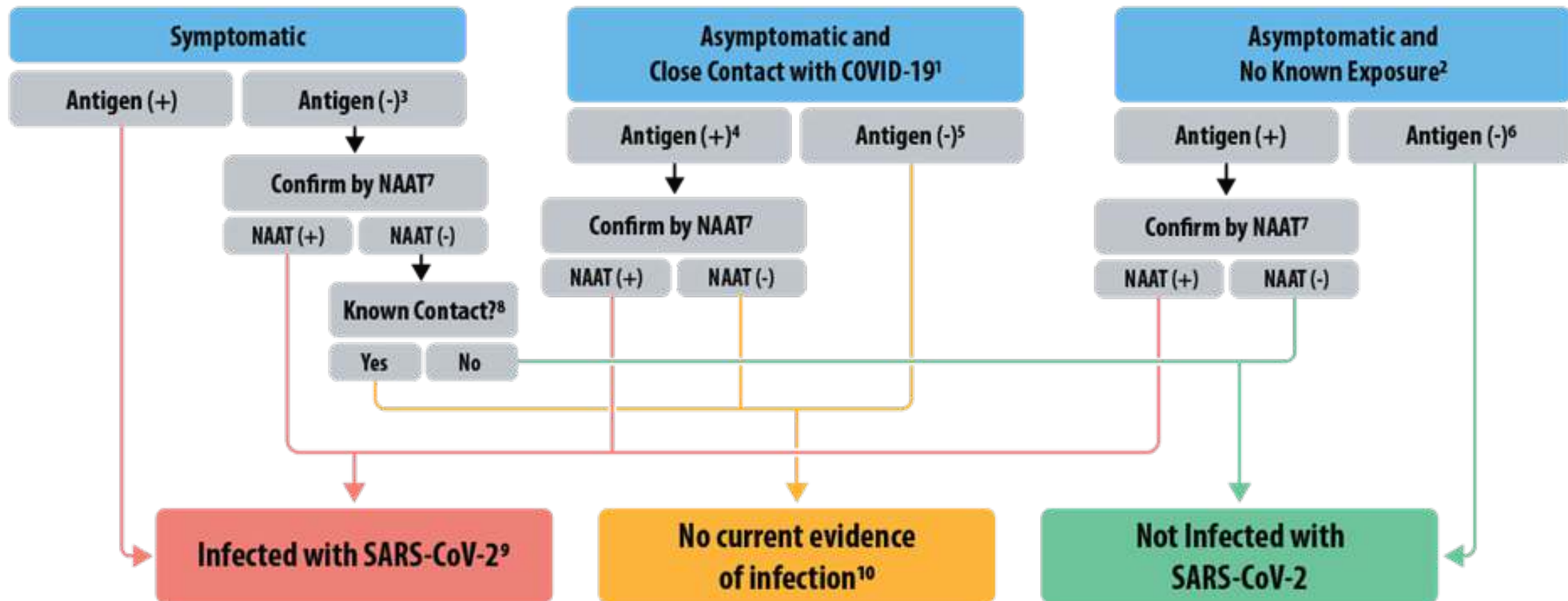
- Pozitiflik olasılığı yüksek olan epidemiyolojik olarak bağlantılı gruplarda (örneğin *izlenmesi kolay* olan sağlık çalışanları gibi) asemptomatik kişilerin taramasında kullanılabilir.

Ancak, negatif sonuç mutlaka RT-PCR ile doğrulanmalıdır.

- Taramalarda antijen testi ile pozitif bulunan olgular RT-PCR testi ile doğrulanmalıdır.

Yüksek prevalans varlığında doğrulama testinin yapılması gerekli olmayabilir.

Antijen Test Algoritması (CDC)





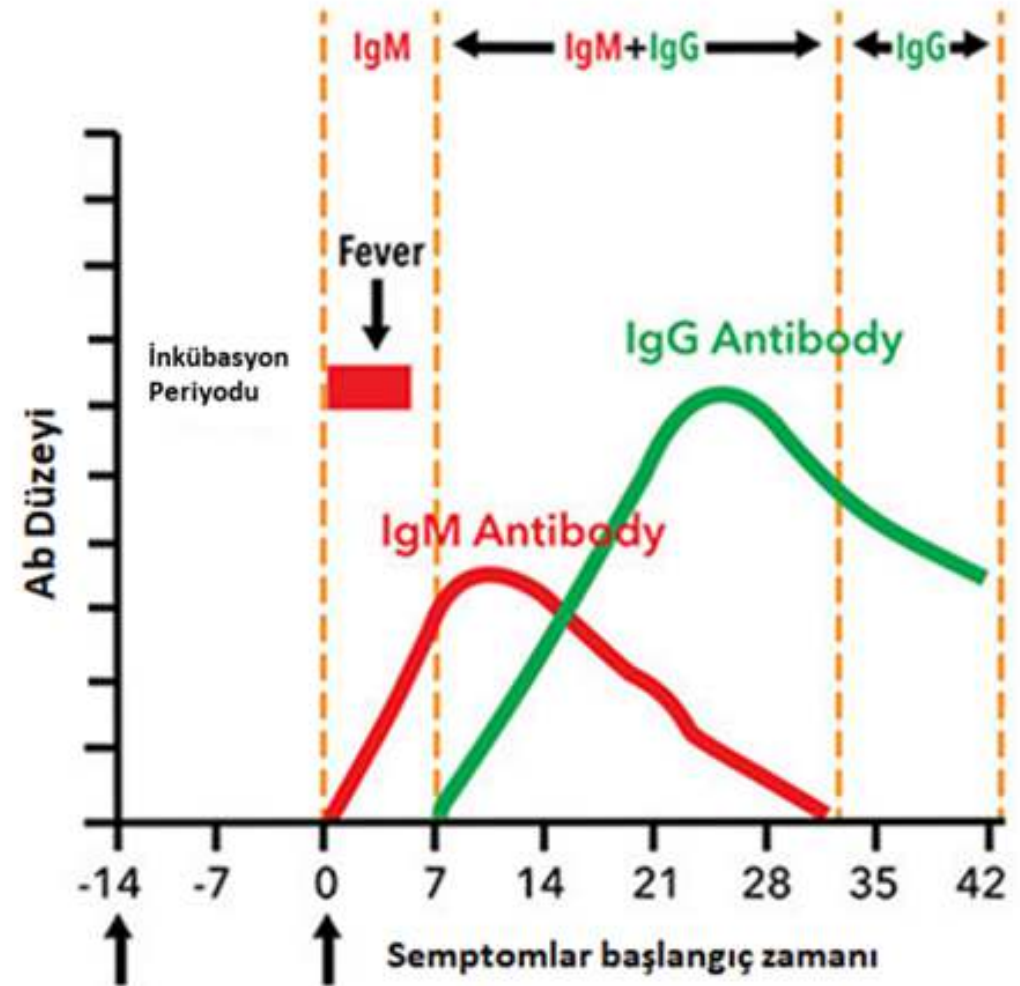
SARS-CoV-2 için Antijen Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SARS-CoV-2 için bir antijen testinin sonuçları değerlendirilirken;

- Kullanılan test kitinin özellikleri (analitik performans değerleri),
- Kullanım amacı (örneğin klinik tanı veya tarama),
- Belirli topluluktaki SARS-CoV-2 enfeksiyonunun prevalansı (önceki 7-10 gün içindeki pozitiflik oranı veya toplumdaki vakaların oranı)
- Test edilen kişinin klinik ve epidemiyolojik özellikleri (semptomların varlığı ve süresi, pozitif kişi ile temas, enfeksiyon bölgesine seyahat vb) dikkate alınmalıdır.

SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNDA ANTİKOR YANITI

- S ve N proteinlerine karşı antikor yanıtı genellikle **10-21 günde,**
- Serokonversiyon tipik olarak **ilk 3 hafta** içinde gelişir.
- Genel olarak antikorlar **2-3.** ayda düşmeye başlar.





SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNDA ANTİKOR YANITI

- COVID-19'a özgün antikorların ne kadar süre tespit edilebilir kaldığı ve uzun süreli korumayla ilişkili olup olmadığı *bilinmemektedir*.
- Orta-ağır şiddetli enfeksiyon geçirenlerde **>%90** saptanabilir Nötralizan antikor oluşur ve enfeksiyondan sonra birkaç ay boyunca nispeten yüksek titrelerde kalır.
- Hastaların küçük bir yüzdesinde, özellikle genç erişkin ve hafif seyirli olgularda COVID-19 antikorları *geliştirmemektedir*.



SARS-CoV-2 Enfeksiyonunda Antikor Yanıtı

- Spike protein reseptör bağlanma alanına (RBD) ve nükleokapsid proteine karşı gelişen antikorlar *nötralizan* aktivite ile ilişkilidir.
- Nötralizan antikorların sağladığı koruma süresi bilinmemektedir.
- Hastalarda nükleokapsid proteinine ve spike proteininin reseptör bağlanma alanına karşı yüksek IgM ve IgG antikor konsantrasyonlarına rağmen *RNA-pozitif kalabildiğini göstermiştir*.
- CoV enfeksiyonlarında gelişen hücresel immün yanıtı ait veriler çok sınırlıdır.

DeneySEL çalışmalarda; solunum yolu mukozasındaki T hücreleri ile korunma arasında direk ilişki gösterilmiştir.

ANTİKOR TESTLERİNİN KULLANIM ALANLARI

Seroloji;

- Klinik olarak **akut** vakaları tanımlamak,
- Tedavinin takibi veya
- Temaslı izleme amacıyla **bağımsız** bir tanı aracı olarak ***kullanılmamalıdır.***



Antikor Testlerinin Kullanım Alanları-2

- Hastalığın geç döneminde (semptomların başlangıcından **≥2 hafta**) ortaya çıkan hastalıkta, özellikle virüs atılımının zamanla azalmasına bağlı RT-PCR yalancı negatifliği durumunda anlamlıdır.
- Epidemiyolojik amaçlı;
 - serosürveyans, atak hızı, olgu ölüm hızı ve toplumdaki bağışıklık durumunun saptanması ve sağlık personelinin risk değerlendirmesi.
- Yüksek insidanslı bir bölgeden dönen turist, iş veya okula dönüş durumunda **tarama** amaçlı kullanılabilir.



Antikor Testlerinin Kullanım Alanları-3

- *Plazma* tedavisinde donörden alınan plazmadaki antikor düzeylerinin belirlenmesi amacıyla,
- *Aşı geliştirme* çalışmalarında istenen bağışıklık yanıtı oluşturup oluşturmadığını (antikor düzeyi ve epitoplari) belirlemek amacıyla,
- Aşıya bağlı gelişen yanıt ile *gerçek* enfeksiyonu ayırt etmek için farklı antijenik yapılara karşı gelişen antikorları belirlemek için kullanılabilir.



SARS-CoV-2 için Antikor Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

- Antikorlar genellikle semptomların başlamasından iki hafta sonrasında saptanmaya başlar.
- Antikor oluşumu bağışık yanıtı gösterir, ancak her zaman enfeksiyona karşı koruyuculuğu göstermeyebilir.
- Hastalığın prevalansın düşük olduğu toplumlarda *yalancı pozitif test sonucu* göz önünde bulundurulmalıdır.
- IgM ve IgA testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü IgG'ye göre daha düşüktür.
- **Kantitatif** sonuçların anlamı henüz *bilinmemektedir*.
- **Kantitatif veya semi-kantitatif değerler;** aşı uygulama ve koruyuculuk düzeyini belirlemek için kullanılamaz.

Moleküler ve serolojik test sonuçlarının yorumlanması

Test Sonucu			Klinik Önemi
RT-PCR	IgM	IgG	
+	-	-	Enfeksiyonun pencere döneminde olabilir
+	+	-	Enfeksiyonun erken dönemi
+	+	+	Enfeksiyonun aktif dönemi
+	-	+	Geç veya rekürrent evresi
-	+	-	Erken dönemde olabilir. RT-PCR'da yalancı negatiflik
-	-	+	Geçirilmiş enfeksiyon ve iyileşme
-	+	+	İyileşme dönemi veya RT-PCR'da yalancı negatiflik



Hızlı Antikor Testlerinin Analitik Performansları:

- Kohort gruplarının seçimindeki eksiklik nedeniyle oldukça değişkenlik göstermektedir
 - ✓ hafif ve orta ila şiddetli hastalığı olan hastalar,
 - ✓ genç ve yaşlı hastalar,
 - ✓ numune alma zamanlarındaki farklılıklar,
 - ✓ kullanılan hedef viral proteinler
- Firma verilerine göre; relatif özgüllük %100 (yalancı pozitif sonuç YOK), semptomlarda 4-10 içerisinde test yapıldığında duyarlılık %81 ve >10 gün sonra test yapıldığında ise %97 olarak bildirim
- Yapılan çalışmalardan elde edilen analitik performans verileri arasında oldukça büyük değişkenlikler söz konusu

Aşılama sonrası antikor bakılmalı mıdır?



Kitlesel aşılamalarda aşılama öncesi ve sonrasında antikor bakılması önerilmemektedir.