T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

qPCR TEMELLİ COVID-19 TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Abdullah Enes DOĞRUSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK

Eş Danışman

Doç. Dr. Oğuz ATA

Temmuz, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

qPCR TEMELLİ COVID-19 TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

Abdullah Enes DOĞRUSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 17.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dilek BALIK Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Oğuz ATA Altınbaş Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Dilek BALIK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşegül SARAL SARIYER, Üye
Artvin Çoruh Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Dilek BALIK ve Dr. Öğ. Üy. Oğuz ATA sorumluluğunda tarafımca hazırlanan qPCR TEMELLİ COVİD-19 TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Abdullah Enes DOĞRUSOY

İmza

Bu çalışma, Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün PB2020-MDBF-7 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Başta danışmanlarım Prof. Dr. Dilek TURGUT-BALIK ve Dr. Öğr. Üyesi Oğuz ATA olmak üzere bu tez çalışmasının yapılmasında sonsuz desteklerini sunan Ar. Gör. Osman Mutluhan UĞUREL hocama; deneysel aşamada yardımlarını eksik etmeyen Erennur UĞUREL ve Tuğba Gül İNCİ hocalarıma, hasta örneklerini edindiğimiz fikir ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi doktorlarından Doç. Dr. Seda YILMAZ SEMERCİ, Uzm. Dr. SELEN ZELİHA MART KÖMÜRCÜ, Uzm. Dr. Neval Topal; İstanbul Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi doktorlarından Doç. Dr. Ramazan GÜVEN, Doç. Dr. Nuran KARABULUT, Doç. Dr. Sema ALAÇAM, Uzm. Dr. Feridun DARDEH hocalarımıza; birlikte yüksek lisans yaptığım arkadaşlarım Maria ORLENCO, Selcan AKAR, Recep Can ATLI, Emrecan YILDIZ'a; Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne, Biyomühendislik Bölümü'ne; sonsuz maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme, ismini sayamadığım bir çok arkadaşıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KISALTMA LİSTESİ vi
ŞEKİL LİSTESİ vii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİLER 5
2.1 İnfluenza Virüsü ve Sebep Olduğu Hastalıklar 6
2.2 RSV ve Sebep Olduğu Hastalıklar 11
2.3 SARS-CoV-2 ve Sebep Olduğu Hastalıklar 14
2.4 SARS-CoV-2, RSV ve İnfluenza Koenfeksiyonları 21
2.5 Viral Tanı Yöntemleri 22
2.6 Veri Tabanları ve Biyoinformatik Araçlar 28
3 YÖNTEM 31
3.1 Materyal 31
3.2 Yöntem 36
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 42
4.1 Bulgular 42
4.2 Tartışma 58
5 SONUÇ 61
5.1 Sonuç 61
5.2 Öneriler 62
KAYNAKÇA 63
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 76

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
COVID-19	Yeni Koronavirüs Hastalığı 2019
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GISAID	Kuş Gribi Verilerini Paylaşma Küresel
IRD	İnfluenza Araştırma Veri Tabanı
kb	Kilobaz
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüs
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testlerinden
ODOTool	Strateji Tabanlı Yerel Hizalama Aracı
RSV	Respiratuvar Sinsityal Virüs
RT-PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 İnfluenza A ve B virüsü yapısı 8

Şekil 2.2 Ocak 2020-Ekim 2022 tarihleri arasında influenza virüsünün dünya geneli tanı sayıları (A: alt tiplere göre influenza A ve B virüsleri; B: influenza virüsü B/Yamagata soyu tanı sayısı) 9

Şekil 2.3 A: RSV genomu ve kodlanan proteinlerin temsili gösterimi; B: RSV'nin genom organizasyonu 12

Şekil 2.4 Alfakoronavirüs ve betakoronavirüslere ait filogenetik ağaç 15

Şekil 2.5 Koronavirüslerin genom organizasyonu (E: zarf, M: membran, N: nükleokapsid, S: spike) 16

Şekil 2.6 8 Mayıs 2023 DSÖ verilerine göre Dünya genelinde en çok COVID-19 vakası görülen 12 ülke. 18

Şekil 2.7 8 Mayıs 2023 DSÖ verilerine göre Dünya genelinde en çok COVID-19 vakası ölüm görülen 12 ülke 19

Şekil 4.1 İnfluenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün HA geninin hizalanması 43

Şekil 4.2 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün M geninin hizalanması 44

Şekil 4.3 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün NA geninin hizalanması 45

Şekil 4.4 Influenza A ve B virüslerinin PB1 geni benzerlik haritası 46

Şekil 4.5 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün PB1 geninin hizalanması 47

Şekil 4.6 RSV A ve B'nin N geninin hizalanması 48

Şekil 4.7 SARS-CoV-2 genomunun hizalanması 49

Şekil 4.8 İlk PCR sonucu jel görüntüsü (M: Marker; 1, 2, 3: 500 µl örnekten 1 µl PCR; 4, 5, 6: 500 µl örnekten 4 µl PCR; 7, 8, 9: 200 µl örnekten 1 µl PCR; 10, 11, 12: 200 µl örnekten 1 µl PCR; 13, 14, 15: 200 µl örnekten 10 µl PCR) 53

Şekil 4.9 Final konsantrayonu 5mM $MgCl_2$ olan PCR sonucu jel görüntüsü 54

Şekil 4.10 Agaroz jel (M: Marker; 1, 2: RSV; 3, 4: İnfluenza A; 5, 6: SARS-COV-2; 7,8: RSV; 9, 10: İnfluenza B) 55

Şekil 4.11 Konvansiyonel PCR'ın agaroz jel görüntüsü (1: RSV, 2: İnfluenza, 3: COVID-19, 4: RSV, 5: İnfluenza, 6: COVID-19) 56

Şekil 4.12 RT-PCR sonuçları (A: Turuncu Kanal, B: Yeşil Kanal, C: Kırmızı Kanal).....57

Şekil 4.13 RSV, SARS-CoV-2 ve influenza virüsü ile enfekte hasta örnekleri üzerinde yapılan RT-PCR çalışması (A: SARS-CoV-2, B: RSV, C: İnfluenza, D: SARS-CoV-2 ve RSV) 58

Şekil 4.14 VIASURE tanı kiti RT-PCR sonuçları.....60

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 İnfluenza A virüsü gen parçalarının sentezlediği proteinler ve fonksiyonları 7

Tablo 2.2 Virüs tanı türlerinin avantaj ve dezavantajları 24

Tablo 2.3 Ticari multiplex kitler ve hedeflediği gen bölgeleri 27

Tablo 3.1 Seçilen influenza A alt tipleri ile influenza B virüsü genleri GenBank erişim numaraları ve suş isimleri 31

Tablo 3.2 RSV A ve B virüsleri N geni GenBank erişim numaraları 33

Tablo 3.3 Deneyler sırasında kullanılan ekipman listesi 35

Tablo 3.4 Farklı kombinasyonlarda yapılan hizalama işlemi listesi 36

Tablo 3.5 Farklı RNA örnekleri içeren PCR içeriği 38

Tablo 3.6 PCR koşulları 39

Tablo 3.7 $MgCl_2$ eklenmiş yeni PCR içeriği 39

Tablo 3.8 Qiagen RT-PCR reaksiyon içeriği 40

Tablo 3.9 BioRad cihazı RT-PCR koşulları 40

Tablo 4.1 Potansiyel oligonükleotit dizileri, %GC oranları ve erime sıcaklıkları 49

Tablo 4.2 Deneysel aşamada kullanılan primer ve prob setleri 52

Tablo 4.3 İzole edilen RNA'nın OD değerleri 52

Tablo 4.4 RNA örneklerinin NanoDrop cihazı ile ölçüm sonuçları 55

ÖZET

qPCR Temelli COVID-19 Tanı Kiti Geliştirilmesi

Abdullah Enes DOĞRUSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Dilek BALIK

Eş-Danışman: Dr. Öğ. Üy. Oğuz ATA

İnsalık, tarih boyunca farklı yüzyıllarda bakteri, virüs gibi çeşitli patojen sebepli epidemiler ve pandemiler yaşamıştır. İlk kez 2019 yılında ortaya çıkarak son dönemde şiddetli akut solunum yolu hastalığına ve COVID-19 pandemisine neden olan SARS-CoV-2 ile benzer semptomlar göstermelerine karşın farklı tedavi süreçleri gerektiren influenza ve RSV bir bireyde koenfeksiyon olarak görülebilmektedir. Doğru ve etkili bir tedavinin uygulanabilmesi adına hassas ve doğru tanılama hayati önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, RSV, SARS-CoV-2 ve influenza virüslerini yüksek doğruluk ve hassasiyette tek bir reaksiyonda tanılayabilecek multipleks bir panel oluşturmak amaçlanmıştır. Biyoinformatik metodolojleri kullanılarak milyonlarca veri barındıran halka açık çeşitli veri tabanlarından elde edilen RSV, SARS-CoV-2 ve influenza virüslerinin gen ve genom dizileri analiz edilerek multipleks qPCR'da kullanılmak üzere potansiyel gösteren 78 oligonükleotit dizisi belirlenmiştir. Her bir virüse özgü primer setleri ve prob olarak kullanılacak 9 oligonükleotit dizisi seçilerek hasta örnekleri üzerinde deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bahsi geçen virüslere özgü geliştirilen primerlerin genom kalıbına bağlanabildiği, probların istenen amplikonlara bağlanma gösterdikleri, primer ve prob setlerinin istenen değerlerde sonuçlar verdiği görülmüştür. Ancak geliştirilen kit içeriğinin koenfeksiyon gösteren hastalarda da

doğru tanılama yapabildiğini açık şekilde gösterilmesi ve hassasiyetin artırılması adına daha fazla hasta örneği ile optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Sonuç olarak, qPCR'da kullanılmak üzere biyoinformatik metodolojilerinden yararlanılarak geliştirilen oligonükleotit dizileri ile potansiyel vadeden multipleks bir panel oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyoinformatik, qPCR, SARS-CoV-2, respiratuvar virüs, tanı kiti

ABSTRACT

Developing COVID-19 Diagnostic Kit Based on qPCR

Abdullah Enes DOĞRUSOY

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Dilek BALIK

Co-supervisor: Dr. Oğuz ATA

Humanity has experienced epidemics and pandemics caused by various pathogens such as bacteria and viruses in different centuries throughout history. Influenza and RSV can be seen as co-infections in an individual with SARS-CoV-2, which first emerged in 2019 and recently caused severe acute respiratory disease and COVID-19 pandemic, although they show similar symptoms and require different treatment processes. Precise and accurate diagnosis is vital to ensure correct and effective treatment. In this dissertation study, we aimed to create a multiplex panel that can diagnose RSV, SARS-CoV-2 and influenza viruses in a single reaction with high accuracy and sensitivity. Using bioinformatics methodologies, gene and genome sequences of RSV, SARS-CoV-2 and influenza viruses obtained from various public databases containing millions of data were analyzed and 78 oligonucleotide sequences showing potential for use in multiplex qPCR were identified. Experimental studies were carried out on patient samples by selecting 9 oligonucleotide sequences to be used as probes and primer sets specific to each virus. It was observed that the primers developed specific to mentioned viruses could bind to the genome template, the probes showed binding to the desired amplicons, and the primer and probe sets gave results at the desired values. However, optimization studies should be carried out with more patient samples in

order to clearly demonstrate that the developed kit content can make accurate diagnoses in patients with co-infection and to increase sensitivity. In conclusion, a promising multiplex panel was created with oligonucleotide sequences developed by utilizing bioinformatics methodologies for use in qPCR.

Keywords: Bioinformatics, qPCR, SARS-CoV-2, respiratory virus, diagnostic kit

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Virüs kaynaklı farklı pandemilere sebep olan hastalıklar her yüzyılda görülebilmektedir. Örneğin, ilk kez milattan önce 412 yılında tanımlanan son derece bulaşıcı influenza virüsünün (Monto & Webster, 2013) 16. yüzyıldan bu yana 13 veya daha fazla pandemiye sebep olduğu düşünülmektedir (Taubenberger & Morens, 2009). İnfluenza virüsü, insanlar ve hayvanlar arasında bulaşabilen RNA virüslerden biridir ve solunum yoluyla yayılmaktadır. Yirmi ve 21. yüzyıl göz önüne alındığında influenza virüsü kaynaklı 1918 İspanyol gribi ve 2009 domuz gribi pandemiye dönüşen influenza A virüsünün H1N1 alt tipinin sebep olduğu hastalıklardır (Krammer vd., 2018).

Benzer şekilde Respiratuvar Sinsityal Virüs (RSV) mevsimsel epidemik solunum yolu patojeni olarak bilinmektedir (Jha vd., 2016). RSV, özellikle genç çocuklarda akut alt solunum yolu enfeksiyonun, 1 yaşından küçük çocuklarda zatürenin en yaygın sebebi olarak bilinmekle birlikte gribe benzer semptomlar gösterebilmektedir. Ayrıca yaşlı bireylerde ciddi alt solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir. RSV, damlacık yoluyla veya temas yoluyla bulaşabilir ve kış aylarında salgınlar şeklinde yayılabilir. (*RSV (Respiratory Syncytial Virus) | CDC*, 2020).

İlk kez 2019 yılında görülen, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi tarafından Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020) yeni tip koronavirüsün sebep olduğu yeni koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) solunum yolu enfeksiyonuna neden olan bir hastalıktır. SARS-CoV-2, damlacık yoluyla veya temas yoluyla bulaşabilir ve insanlar arasında hızla yayılabilmektedir. COVID-19, hafif semptomlardan ciddi akut solunum sıkıntısına kadar değişen geniş bir klinik spektrumda görülebilmektedir. COVID-19, 2019 yılında başlayan ve pandemik boyutlara ulaşan bir salgın halinde dünya genelinde yayılmıştır (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*, t.y.).

Virüslerin tanısında çok çeşitli tanı yöntemleri kullanılmasına karşın COVID-19 ile gerçek zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) uygulamaları altın standart haline gelmiştir (Domnich vd., 2023; Tahamtan & Ardebili, 2020). RSV ve influenza gibi diğer solunum yolu enfeksiyonlarının tanısında da benzer yöntemler kullanılmaktadır.

Benzer semptomlar ile ortaya çıkan influenza, RSV ve COVID-19 gibi solunum yolu viral enfeksiyonları, bir bireyde aynı anda koenfeksiyon olarak görülebilir. Bir çalışmada, COVID-19 pandemisi sırasında influenza, RSV ve SARS-CoV-2 koenfeksiyonlarının sıklığı araştırılmıştır. Kim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RSV, influenza ve SARS-CoV-2 koenfeksiyonlarının nadir görüldüğünü, ancak bazı hastalarda ortaya çıkabildiğini sonucuna ulaşmışlardır (Kim, Quinn, vd., 2020). Farklı çalışmalarda da SARS-CoV-2 ve influenza virüslerinin koenfeksiyon gösterebildiği literatürde yer almaktadır (Islamoğlu & Borku Uysal, 2021; Singh vd., 2020). RSV'nin klinik ve radyolojik bulguları benzer olduğundan SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile karıştırılabilmektedir. Tone ve meslektaşları, ateş, öksürük ve nefes darlığı şikayeti ile hastanelere başvuran ancak yanlış tanılamanın yapılaması ile yanlış tedavi süreci uygulanmış 36 yaşında kadın bir hasta üzerinde çalışma yapmışlar, RSV ayırt edici ve doğru tanılamanın önemini tekrar vurgulamışlardır (Tone vd., 2022).

İnfluenza virüsü, RSV ve SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş bireyler benzer semptomlar gösterselerde farklı tedavi süreçleri gerektirdiğinden enfekte olmuş hastanın hastalık etmenin doğru ve hassas tanısı, bireyin alacağı tedaviyi de belirleyeceğinden son derece önemlidir. Örneğin, Topoulos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada influenza hastaları için oseltamivir ile tedavi uygulanırken yetişkin RSV hastaları için etkili bir tedavi yönteminin limitli olduğunu, bir tedavi rejimi için daha fazla çalışmanın yapılması gerektiğinden bahsetmişlerdir (Topoulos vd., 2019). Buna ek olarak Singh ve meslektaşlarının yaptığı çalışmada COVID-19 tedavisinde hidroksiklorokin gibi çeşitli korkitosteroitler ile azitromisin ve seftriakson, influenza tedavisinde oseltamivir kullandıklarını bildirmişlerdir (Singh vd., 2020).

Yüksek verimli dizileme teknolojileriyle üretilen biyolojik veriler, hızlı ve büyük ölçekte üretildiğinden, veri yönetiminde bir darboğaza neden olmaktadır. Farklı

biyolojik veri türlerini arşivleyen, entegre eden ve genellikle değerli bir kürasyonla paylaşan biyolojik veri tabanlarının sayısı sürekli olarak artmaktadır (Ma vd., 2022). Dünyanın en büyük biyolojik veri depolarından birisi olan Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü'nün (European Bioinformatics Institute, EBI) 2021 Yıllık Raporu'na göre 20 petabayttan (1 petabayt = 10^9 megabayt) fazla küçük molekül, protein, gen ve genom, hücresel yapılar gibi bir çok biyolojik veri barındırmaktadır (*EMBL-EBI Highlights 2021 – EMBL Documents*, t.y.). Bunun yanı sıra GenBank, 504.000 tür için 2.9 milyardan fazla nükleotit dizisi veri seti bulundurmaktadır. GenBank, Kuş Gribi Verilerini Paylaşma Küresel Girişimi (Girişimi Global Initiative for Sharing All Influenza Data, GISAID) gibi çeşitli veri tabanlarında SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüslerinin yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak oluşturulmuş milyonlarca genom verisi bulunmaktadır. Yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak üretilen genom verilerinin ve bu genomların tanımlanması ve çözümlenmesi ile genom dizilemenin ve biyoinformatik metodolojilerinin hastalık tanı çalışmalarında kullanımını artırmıştır (Tiwary, 2022c, 2022a).

1.2 Tezin Amacı

Benzer semptomlar göstermelerine rağmen farklı tedavi süreçleri gerektiren ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan SARS-CoV-2, RSV A/B ve influenza A/B virüsleri insanlar arasında yüksek bulaşma potansiyeline sahip virüslerdir. Doğru yöntem ve ilaçlar ile tedavi aşamasına geçilebilmesi için hasta bireye doğru tanılamanın yapılması önemlidir. Bu tez çalışmasının amacı, biyoinformatik metodolojileri kullanarak SARS-CoV-2, RSV A/B ve influenza A/B virüslerinin gen ve genomlarını analiz ederek multiplekslenebilir oligonükleotit dizileri ile SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüslerinin tanısını tek bir gerçek zamanlı qPCR ile koyabilen, son derece hassas ve yüksek doğruluk oranlarında sonuç veren moleküler bir tanı kiti geliştirmektir.

1.3 Hipotez

Moleküler tanı alanında altın standart haline gelmiş PCR tanı kitleri özellikle pandemi süreçlerinde sıkça kullanılmaktadır. Biyoinformatik metodolojiler ile desteklenmiş Multipleks Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

(RT-qPCR) tanı kitinin geliştirilmesi sayesinde birden fazla virüsün ve virüs alt tiplerinin hızlı ve yüksek doğrulukta moleküler tanılaması yapılabilmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

İnsanlık, tarih boyunca bakteri ve virüs gibi farklı patojen kaynaklı çeşitli hastalık etmenleri sebebi ile epidemik ve pandemik hastalıklar ile karşılaşmıştır. Başlıca salgınlara ebola, HIV/AIDS, İspanyol gribi, kuş giribi, şiddetli akut solunum sendromu (SARS) ve Orta Doğu solunum sendromu (MERS), veba ve kolera örnek olarak verilebilir (Piret & Boivin, 2021; Sampath vd., 2021).

Gram-negatif, çubuk şeklinde, kokobasil bir bakteri olan *Yersinia pestis* bakterisinin neden olduğu Kara Veba salgını, Orta Çağ Avrupa'sında büyük bir felakete yol açmış ve yüz milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine sebep olmuştur (Perry & Fetherston, 1997). Benzer şekilde gram-negatif ve virgül şeklinde bir bakteri olan *Vibrio cholerae* bakterisi birden fazla kolera pandemisine sebebiyet vermiştir (Faruque vd., 1998).

Viral kaynaklı epidemilerde özellikle 20. yüzyıldan itibaren, influenza virüsleri gibi bulaşıcı hastalıkların neden olduğu pandemiler dünya genelinde büyük ölçekli salgınlara sebep olmuştur. Örneğin, 1918 İspanyol Gribi olarak bilinen pandemi, milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine yol açmış ve toplumsal, ekonomik ve politik açıdan büyük etkiler yaratmıştır (Palese, 2004). Bu pandemiye dair yapılan çalışmalar, pandemik hastalıkların küresel düzeydeki etkilerini ve yönetimini anlamamızı sağlamıştır.

Ayrıca, günümüzde ortaya çıkan COVID-19 pandemisi, tüm dünyada büyük bir krize yol açmış ve birçok ülkenin sağlık sistemlerini ve ekonomilerini olumsuz etkilemiştir. Bu pandemiye dair yapılan çalışmalar, virüsün yayılma dinamiklerini, hastalığın klinik özelliklerini, aşı ve tedavi gelişmelerini, toplumsal ve ekonomik etkilerini incelemekte ve pandemi yönetimi konusunda politika yapıcılar için rehberlik sağlamaktadır (Lewnard & Lo, 2020).

Teknolojini gelişmesi ile elde edilen biyolojik veri ve veri tabanlarının sayısı giderek artmaktadır (Ma vd., 2022). Biyoinformatik, biyolojik verileri analiz etmek ve yorumlamak için biyoloji, bilgisayar bilimi, matematik ve istatistiği birleştiren multidisipliner bir alan olarak tanımlanmaktadır. Biyolojik verilerin saklanması,

anlamlı hale getirilerek işlenebilmesi ve görsel hale getirilmesi adına biyoinformatik metodolojilerinden yararlanılmaktadır (Tiwary, 2022b). Yeni nesil dizilemenin hayatımıza girmesi ile elde edilen veriler çeşitli yazılımlar ve biyoinformatik araçlar sayesinde analiz edilerek ilaç hedefleme, yeni ilaç keşfi, insan genomunun analizi (İnsan Genom Projesi), tanı kitlerinin geliştirilmesi, genomik mutasyonların ve varyasyonların tespit edilmesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Tiwary, 2022c, 2022a).

Çeşitli viral patojenlerin tanısına yönelik virüs kültürü, serolojik testler gibi çeşitli teknikler olmasına karşın son zamanlarda COVID-19 pandemisinin de etkisiyle RT-PCR tekniği ile tanılama altın standart haline gelmiştir (Domnich vd., 2023).

2.1 İnfluenza Virüsü ve Sebep Olduğu Hastalıklar

Doğal konak organizmaları evcil hayvanlar, domuzlar, atlar, kümes hayvanları ve yabani kuşlar olan influenza virüsleri, insanlarda akut üst solunum yolu hastalıklarına sebep olan tek iplikli RNA genomuna sahip, *Orthomyxoviridae* ailesine ait virüslerdir (Belshan vd., 2014; Krammer vd., 2018). İnfluenza A, B, C ve D olmak üzere 4 alt tipi bulunmakta olup yalnızca A, B ve C alt tipleri insanlara bulaşabilmektedir. Sezonluk epidemelere neden olmakla birlikte tarih boyunca milyonlarca insanın ölümüne yol açan pandemilere de sebep olmuştur. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (ECDC) göre Avrupa'da her sene 50 milyon bireyde semptomatik vaka gözlenmekte, 15.000 ila 70.000 kişi ise griple ilişkili nedenlerden ölmektedir (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022).

2.1.1 İnfluenza Virüsü Genomu

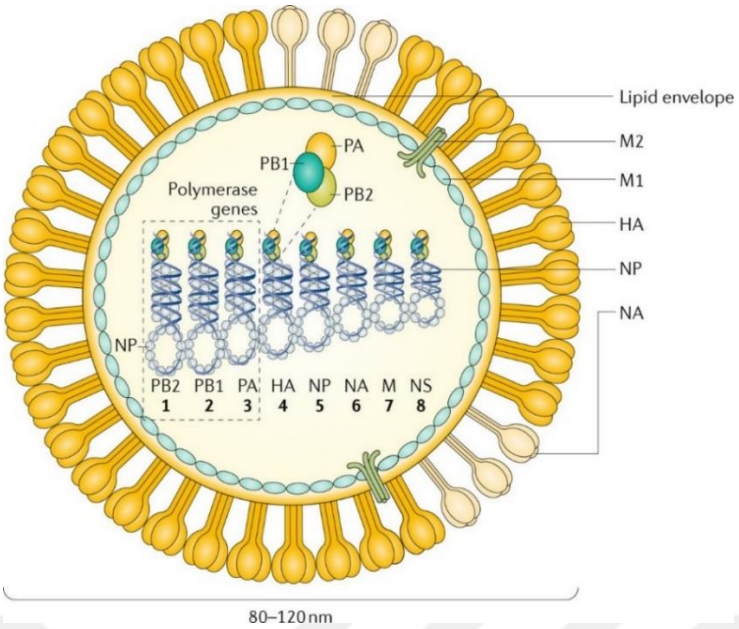
İnfluenza virüsleri A, B, C ve D olmak üzere 4 farklı alt tipe sahip, parçalı (segmentli), negatif polariteli ve tek iplikli RNA genomuna sahip, zarflı virüslerdir. İnfluenza A ve B virüsleri RNA polimeraz alt üniteleri kodlayan polimeraz bazik protein 2 (PB2) ve polimeraz bazik protein 1 (PB1), polimeraz asidik protein (PA); hemaglutinin (HA), nükleoprotein (NP), nöraminidaz (NA), matriks proteinleri (M) ve yapısal olmayan proteinleri (NS) kodlayan parçalar olmak üzere 8 parçalıdır (Belshan vd., 2014; Krammer vd., 2018). Tablo 2.1'de görüldüğü üzere yedinci ve sekizinci parça olan M ve NS genleri sırasıyla makriks protein 1 (M1) ile makriks protein 2 (M2) ve yapısal olmayan protein 1 (NS1) ile nüklear eksport proteini

(NEP veya NS2) proteinlerini kodlamaktadır (Hayden & Palese, 2016). Şekil 2.1'de influenza A ve B virüslerinin yapısı gösterilmektedir. İnfluenza C ve D virüsleri ise 7 parçalı RNA'ya sahiptir. Bunun sebebi, influenza A ve B virüsleri HA ve NA olmak üzere iki ana yüzey glikoproteinine sahipken influenza C ve D virüslerinde NA bulunmamasıdır. Bunun yerine tüm hücreye giriş fonksiyonlarını yerine getiren hemaglutinin-esteraz-füzyon (HEF) olarak adlandırılan bir adet yüzey glikoproteinine sahiptir (Liu vd., 2020).

Tablo 2.1 İnfluenza A virüsü gen parçalarının sentezlediği proteinler ve fonksiyonları (Hayden & Palese, 2016; Kakkola vd., 2021)

RNA Parçası	Protein	Protein Uzunluğu	Fonksiyon
1	PB2	759	RNA polimeraz, "cap" bağlanma, transkripsiyon ve replikasyon başlatma
2	PB1 PB1-F2	757 87	RNA polimeraz, elongasyon Apoptoz başlatıcı
3	PA PA-X	716 ~260	Proteaz aktivitesi, RNA sentezi ve replikasyonu
4	HA	~560	Reseptörlere bağlanma, membranların füzyonu
5	NP	498	vRNA kapsidasyonu, RNA'nın nükleer transportu
6	NA	~450	NA/sialidaz aktivitesi, virüsün hücreden salımı, tomurcuklanmaya yardımcı
7	M1 M2	252 97	Yapısal protein, RNA'nın nükleer ihracatı, viral viral tomurcuklanma İyon kanalı
8	NS1 NEP (NS2)	~230 121	İnterferon antagonisti, çok işlevli protein RNP nükleer ihracı, RNA sentezinin düzenlenmesi

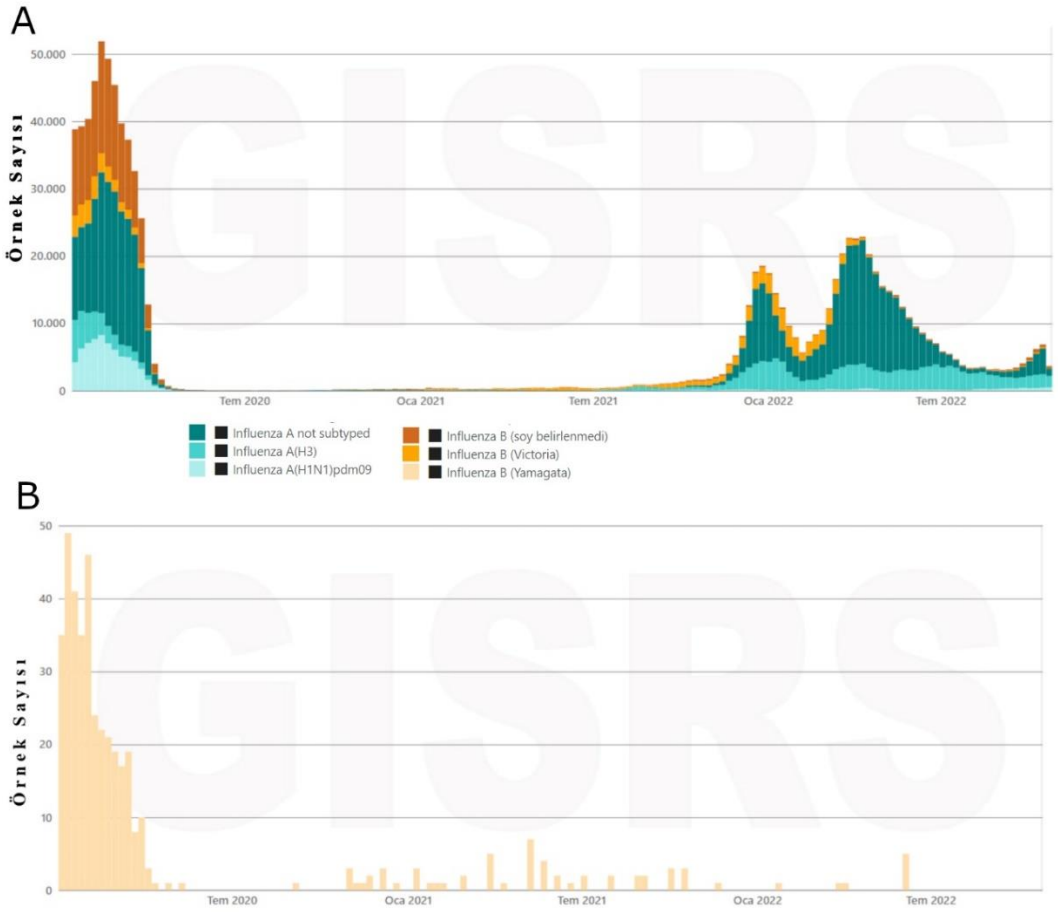
İnfluenza A virüsleri, virüsün yüzeyinde bulunan ve antijenik varyasyonlara sebep olan hemaglutinin ve nöraminidaz proteinlerinin kombinasyonlarına göre H1N1, H3N2, H5N1 gibi alt tiplere ayrılır (Belshan vd., 2014). 18 farklı HA alt tipi, 11 farklı NA alt tipi bulunmakla birlikte doğada 130'dan fazla influenza A alt tipi kombinasyonuna rastlanmıştır (*Types of Influenza Viruses | CDC*, t.y.).



Şekil 2.1 İnfluenza A ve B virüsü yapısı (Krammer vd., 2018)

İnsanları enfekte edebilen influenza alt tipleri A, B ve C olarak bilinmektedir (Gaitonde vd., 2019). Bununla birlikte influenza A, B ve C virüsleri kuş, domuz, at gibi diğer sıcak kanlı hayvanları da enfekte edebilirler. Aynı zamanda yeni soylar oluşturmak üzere konakçı organizmalar arasında geçiş sağlayabilirler (Taubenberger & Morens, 2010).

İnfluenza B virüsleri alt tiplerine göre sınıflandırılmasa da soylara ayrılmaktadır. Dolaşımdaki influenza B virüsleri, B/Yamagata ve B/Victoria olmak üzere 2 soya aittir (Nuwarda vd., 2021). Ancak, COVID-19 pandemisi sürecinde alınan tedbirler sebebi ile B/Yamagata soyunun 2020-2021 yılları itibari ile tükenmeye yakın olabileceği literatürde tartışılmaktadır (Koutsakos vd., 2021). Buna ek olarak Şekil 2.2'de Dünya Sağlık Örgütü verilerinden alınan 2020-2022 yılları arasında influenza virüsü görülme sıklığı verilmiştir.



Şekil 2.2 Ocak 2020-Ekim 2022 tarihleri arasında influenza virüsünün dünya geneli tanı sayıları (A: alt tiplere göre influenza A ve B virüsleri; B: influenza virüsü B/Yamagata soyu tanı sayısı) (Global Influenza Programme. Geneva: WHO, t.y.)

Şekil 2.2'de görüldüğü üzere Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre Temmuz 2020 ile Temmuz 2021 tarihleri arasında influenza A ve B virüsünün görülme sayıları son derece düşmüş, influenza virüsü B/Yamagata soyunun ise görülmesi yok denecek kadar azalmıştır (Global Influenza Programme. Geneva: WHO, t.y.).

2.1.2 İnfluenza Virüsü Kaynaklı Epidemi ve Pandemiler

İnfluenza A virüsü oldukça bulaşıcı, akut üst solunum yolu hastalığına sebep olmaktadır (Belshan vd., 2014). Her sene yaklaşık olarak 290.000 ile 650.000 arasında insan influenza virüsü kaynaklı solunum yolu hastalığı sebebi ile hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir (Iuliano vd., 2018). Geçmişte H1N1, H2N2 ve H3N2 alt tipleri insanlarda pandemik hastalıklara sebep olmuş ve halen sezonluk

epidemilere sebep olmakla birlikte H5N1, H7N7, H9N2 ve H7N9 alt tipleri de insanlara bulaşabilmektedir (Kakkola vd., 2021).

En şiddetli grip salgını olarak bilinen ve dünya çapında yaklaşık olarak 500 milyon kişiyi enfekte etmiş ve 50 milyon ölüm (Spreeuwenberg ve arkadaşlarının çalışmasına göre 50-100 milyon arası (Spreeuwenberg vd., 2018)) (Johnson & Mueller, 2002; Taubenberger & Morens, 2006) ile sonuçlanan, influenza A virüsünün H1N1 alt tipinin sebep olduğu 1918 İspanyol gribi ilk tanımlanan pandemik hastalığa örnek olarak verilebilir (Krammer vd., 2018).

1957 yılında Hong Kong'da başka bir influenza salgını bildirilmiştir. Laboratuvar çalışmaları bir önceki İspanyol giribi salgınına sebep olan A(H1N1) virüsünün antijenik sapma gösterdiğini saptamıştır. Avian influenza (kuş giribi) virüsünün HA, NA ve PB1 kodlayan 3 parçası A(H1N1) virüsüne geçip yeni H2N2 alt tipini oluşturarak yeni bir salgına sebebiyet vermiş (Monto & Webster, 2013) ve tarihe Asya gribi olarak geçmiştir. Benzer şekilde 1968 yılında değişime uğramış (reassortant) H3N2 virüsü, HA ve PB1 olmak üzere kuş kaynaklı 2 gen alarak pandemiye sebep olmuştur (Hayden & Palese, 2016). Bu salgın ise Hong Kong gribi olarak adlandırılmıştır. Bu iki pandeminin her biri yaklaşık olarak 1 milyon ölüm ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir (Kakkola vd., 2021).

1968 yılından 1977 yılına kadar yalnızca A(H3N2) ve influenza B tipleri insanlar arasında dolaşım göstermiştir (Monto & Webster, 2013). Sonrasında, 5 Kasım 1977 tarihinde Moskova'da 22 yaşında erkek bir bireyde grip benzeri virüs için pozitif tanı konulmuştur (Gregg, 1978). Bu tanıyı takiben Rusya'nın diğer şehirlerinde salgınlar ortaya çıkmış ve H1N1 alt tipinin sebep olduğu bu salgın, 1978 yılı Ocak ayı ortalarında sona ererek tarihe Rus gribi olarak geçmiştir (Gregg, 1978; Monto & Webster, 2013).

Geçmişteki pandemi virüslerinin kuş kaynaklı olmasının verdiği deneyimler ve kuş kaynaklaklı influenza virüslerinin insanlara geçişinin söz konusu olmadığı düşüncesi göz önüne alındığında, bir sonraki yeni pandeminin H5N1 veya ondan türemiş bir virüsün neden olabileceği yaygın olarak düşünülmekteydi. Ancak 1997 yılında H5N1 virüsünün kümes hayvanlarından insanlara bulaşması bu algıyı değiştirerek dünya genelinde salgın tehdidi olarak görülmüştür (de Jong vd., 1997). Beklenenin dışında gelişerek 2009 yılında ortaya çıkan H1N1 pandemisi, influenza

virüslerinin sürekli gelişen doğası nedeniyle, pandemi suşunun nereden ve nasıl ortaya çıkacağının önceden tahmin edilebileceği algısını yıkmıştır. Meksika'da ortaya çıkan ve ilk olarak Nisan 2009'da Kaliforniya'da tespit edilen 2009 influenza A H1N1 pandemisine 1918 İspanyol influenza virüsü ile antijenik olarak ilişkili bir H1N1 alt tipi olduğunu sekans analizi ile doğrulanmıştır. Pandemi yaklaşık olarak 18 bin ölüm ile sonuçlanmıştır (Monto & Webster, 2013). 2009 yılından bu yana, 2009 pandemik virüsünden türetilen influenza A H1N1 ve influenza A H3N2 virüsleri ile influenza B virüsünün iki soyu insanlarda arasında dolaşımdadır (Krammer vd., 2018). Antijenik olarak mevsimsel influenza A H1N1 virüsünden farklı olması sebebi ile 2009 domuz gribi, influenza alt tipi A(H1N1)pdm09 olarak adlandırılmıştır (Kakkola vd., 2021).

2.1.3 İnfluenza Tedavi Yöntemleri

İnfluenzaya karşı çeşitli antiviral ilaçlar ve aşılar geliştirilmiştir. Hastalık semptomlarının fark edildiği ilk günlerden itibaren antiviral ilaçların kullanımı tedavi sürecini kısaltmaktadır. Literatürde, influenza virüsüne karşı önerilen, farklı dozaj formlarında antiviral ilaçlar arasında oseltamivir (Tamiflu®), zanamivir (Relenza®) peramivir (Rapivab®) ve baloxavir marboxil (Xofluza®) yer almaktadır (Ikematsu, 2021; Kawai, 2021; Saisho, 2021; Uehara, 2021). Yetişkinler başta olmak üzere oseltamivir 2 haftalıktan büyük, peramivir 6 aylık ve daha büyük, baloxavir 5 yaşından büyük çocuklar ve zanamivir 7 yaş ve daha büyük bireylerin tedavisinde kullanılmaktadır. Yaş sınırına göre günlük kullanım dozajları farklılık göstermektedir (Nicholson vd., 2000; "Recommendations for Prevention and Control of Influenza in Children, 2022–2023", 2022; *What You Should Know About Flu Antiviral Drugs | CDC*, t.y.).

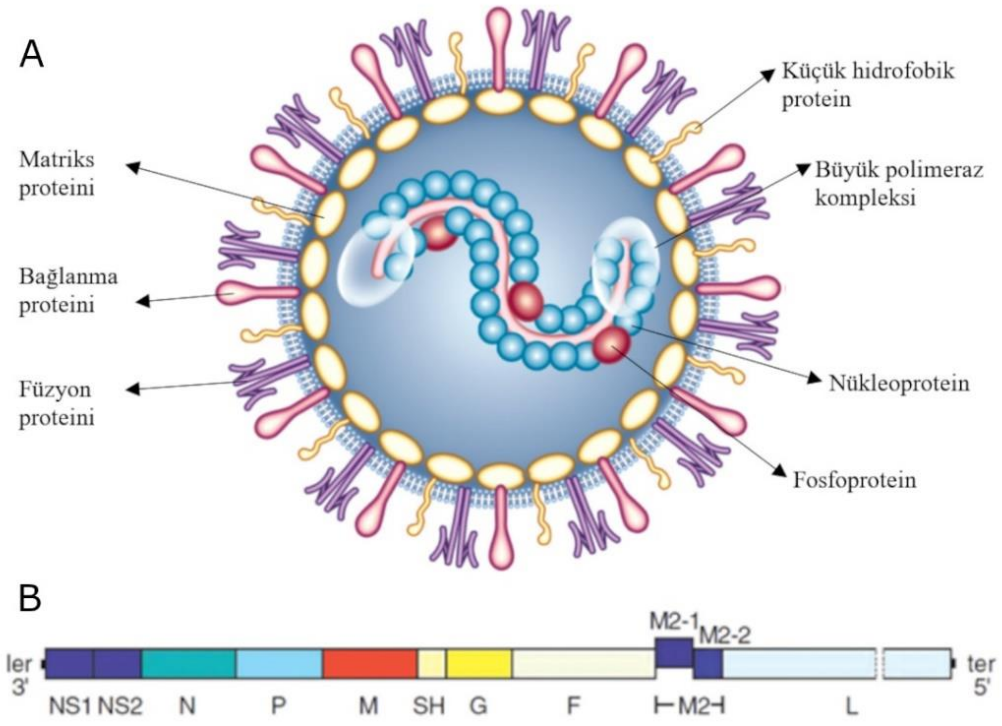
2.2 RSV ve Sebep Olduğu Hastalıklar

İlk kez 1956 yılında üst solunum yolu hastalığı bulunan bir laboratuvar şempanzesinden izole edilen Respiratuvar Sinsityal Virüs, tek iplikli RNA genomuna sahip, özellikle çocuklarda alt solunum yolu hastalığına sebep olan, *Pneumoviridae* ailesine ait bir virüstür (Collins & Graham, 2008; Munoz & Englund, 2020). Tedaviye yönelik özgün olarak uygulanan bir yöntem bulunmamasına karşın 2023 yılında ilk kez, yalnızca 60 yaş ve üzeri bireyler için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug

Administration, FDA) tarafından onaylanmış, Pfizer tarafından geliştirilen Abrysvo (*ABRYSVO | FDA*, t.y.) ve GlaxoSmithKline tarafından geliştirilen Arexvy (*AREXVY | FDA*, t.y.) olmak üzere 2 adet aşı bulunmaktadır.

2.2.1 RSV Genomu

RSV parçasız (segmentsiz), negatif polariteli ve tek iplikli RNA genomuna sahip, zarflı bir virüstür. RSV, A ve B olmak üzere antijenik olarak iki farklı alt gruba ayrılır (Mufson vd., 1985). Genomu 15.000'den fazla nükleotit içeren 10 adet genden oluşmaktadır (Meissner, 2018; Weston & Frieman, 2018). Şekil 2.3'de gösterildiği üzere, virüsün genomundan nükleoprotein (N), fosfoprotein (P), polimeraz (L), maktiks (M), küçük hidrofobik protein (SH), füzyon proteini (F), bağlanma proteini (G), yapısal olmayan proteinlerin (NS-1 ile NS-2) genleri birer adet protein kodlanırken M2 geni M2-1 ve M2-2 olmak üzere 2 protein, toplamda 11 adet protein kodlanmaktadır (Meissner, 2018; Walsh & Hall, 2015).



Şekil 2.3 A: RSV genomu ve kodlanan proteinlerin temsili gösterimi; B: RSV'nin genom organizasyonu (Walsh & Hall, 2015)

2.2.2 RSV Kaynaklı Alt Solunum Yolu Enfeksiyonu

RSV, çocuklar, yaşlı bireyler ve bağışıklığı baskılanmış yetişkinlerde akut solunum yolu enfeksiyonlarına bağlı hastalık ve ölümler ile ilişkilendirilmekte olup küçük

çocuklarda alt solunum yolu hastalığına sebep olan ana etmendir (Munoz & Englund, 2020; Nam & Ison, 2019). Ayrıca, ılıman iklimlerde kış aylarında, tropikal iklimlerde yağışlı mevsimlerde solunum yolu enfeksiyonu salgınları ve RSV aktivitesi zirve değerlere ulaşmaktadır (Bloom-Feshbach vd., 2013).

Büyük partiküllü aerosol veya doğrudan temas yoluyla bulaş sonrası 2 ila 8 günlük bir inkübasyon süresiyle geniz bölgesinde viral replikasyonla sonuçlanmaktadır. Aspirasyon veya hücre içi bulaşma sonucunda bir komplikasyon olarak alt solunum yolu enfeksiyonu ortaya çıkabilmektedir. Bu enfeksiyon akciğerleri ve bronşları etkiler ve öksürük, ateş ve nefes darlığı gibi semptomlara ile birlikte hava yolu direncinde artış, hava sıkışması ve hırıltılı solunuma neden olabilmekte ve klinik belirtileri arasında yer almaktadır. Rinore, öksürük ve düşük dereceli ateş yaygın olarak görülmektedir. Hafif hastalığı olan bebeklerde bile alt solunum yolu enfeksiyonu belirtileri yaygındır (Collins & Graham, 2008; Gatt vd., 2023). 2019 yılında dünya genelinde 5 yaşından küçük çocuklarda 101.400 ölüm ile sonuçlanan 33 milyon RSV ile ilişkili akut alt solunum yolu enfeksiyonu vakası görüldüğü literatürde yer almaktadır (Y. Li vd., 2022).

2.2.3 RSV Tedavi Yöntemleri

RSV tedavisine özgün olarak uygulanan bir tedavi yöntemi henüz bulunmamaktadır. Bu sebeple hastalıktan korunmaya yönelik çalışmalar önem arz (Venkatesan, 2022). Destekleyici tedavi, sağlıklı çocuklarda genellikle kendiliğinden düzelen RSV enfeksiyonu için birincil tedavidir. Bununla birlikte, kemik iliği veya akciğer nakli yapılanlar gibi bazı pediatrik gruplar RSV hedefli tedaviden fayda sağlayabilmektedir. Bu tedaviler semptomları azaltmayı, hastalığı kısaltmayı ve hafifletmeyi ve enfeksiyonun yayılmasını önlemeyi amaçlamaktadır. Test edilen tedavi seçeneklerinden bazıları ribavirin, palivizumab, motavizumab ve RSV-immün globulindir ((Gatt vd., 2023), (“Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants.”, 1998). RSV tedavisinde FDA tarafından onaylı tek antiviral ribavirin olmakla birlikte yalnızca 1 yaşından küçük bebekler için önerilmektedir (Ilyicheva vd., 2022).

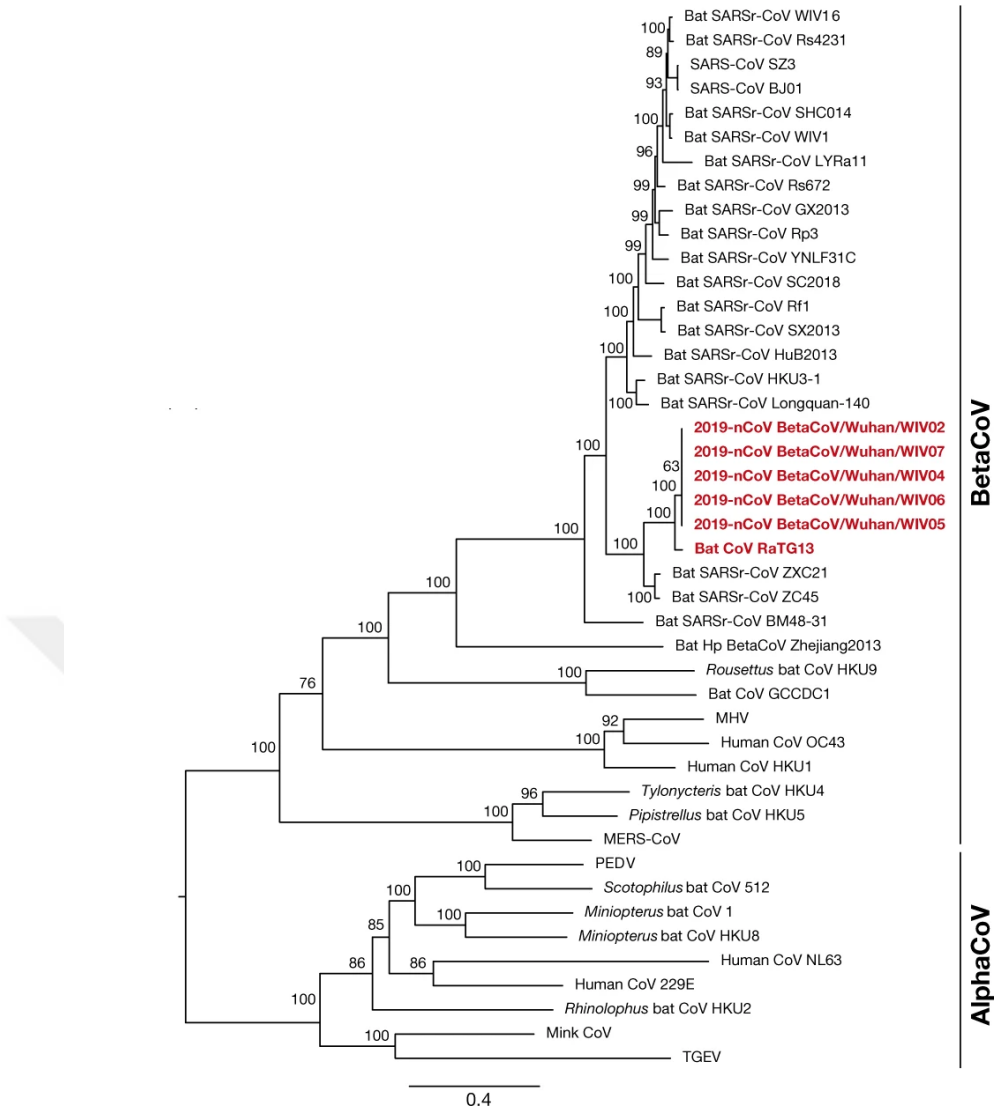
Son yıllarda yapılan, RSV füzyon proteinini hedefleyen bir monoklonal antikor olan nirsevimab uygulanan 994 bebek grubu, 496 bebek plasebo grubu olmak üzere toplam 1490 bebekte yapılan çalışmada nirsevimab için %74,5’lik bir etkinlik

(efikasi) göstermiştir (Hammitt vd., 2022). Bunlara ek olarak RSV'ye karşı ilk kez 2023 yılında FDA tarafından onay alan, ancak yalnızca 60 yaş üzeri bireyler için lisanslanmış Arexvy (*AREXVY | FDA*, t.y.) ve Abrysvo (*ABRYSVO | FDA*, t.y.) olmak üzere iki adet aşı bulunmaktadır.

2.3 SARS-CoV-2 ve Sebep Olduğu Hastalıklar

Filogenetik özelliklerine bağlı olarak koronavirüsler alfakoronavirüsler, betakoronavirüsler, gamakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler olmak üzere 4 cinse ayrılırlar. İnsan koronavirüslerinden olan HCoV-229E ve HCoV-NL63 alfa koronavirüs; SARS koronavirüsü (SARS-CoV), MERS koronavirüsü (MERS-CoV), HCoV-OC43, HCoV-HKU1 ve SARS-CoV-2 betakoronavirüs cinsine ve *Coronaviridae* ailesine ait virüslerdir (Lu vd., 2020; Su vd., 2016; Walls vd., 2020).

İlk kez 2019 yılı Aralık ayında bildirilmiş olup Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi tarafından SARS-CoV-2 olarak adlandırılan (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020) Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2, insanlarda şiddetli akut solunum sendromununa sebep olan pandemiye sebebiyet veren bir hastalığa dönüşerek 21. yüzyılın en şiddetliği hastalığı olarak tarihe geçmiştir. Genom dizilemesi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda filogenetik olarak SARS-CoV ve yarasa kökenli koronavirüslere benzerlik gösterdiği gözlenmiştir (Zhou vd., 2020). Şekil 2.4'de alfakoronavirüs ve betakoronavirüslerin nükleotit dizilemeye dayalı filogenetik ağacı gösterilmiştir.



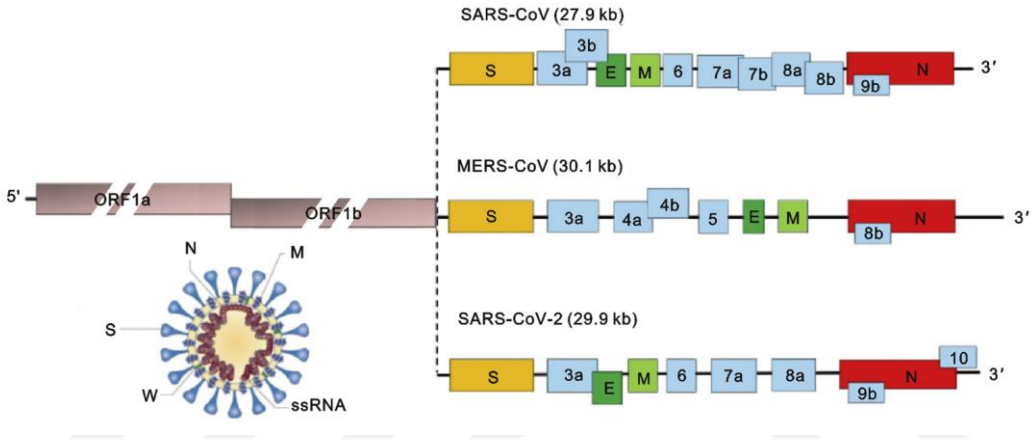
Şekil 2.4 Alfakoronavirüs ve betakoronavirüslere ait filogenetik ağaç (Zhou vd., 2020)

2.3.1 SARS-CoV-2 Genomu

İnsanlarda endemik olarak görülen 4 koronavirüs (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1), SARS ve MERS'e göre daha düşük patojenitelidir (Walls vd., 2020). SARS'ın ortaya çıkmasından bu yana SARS ile ilişkili çok sayıda koronavirüs keşfi yapılmıştır. Zhou ve arkadaşlarının yaptığı Nature dergisinde yayınlanan çalışmada yeni SARS-CoV-2'nin genom dizileri elde edilmiş ve yapılan analizler sonucu SARS ile ortalama %79,6 benzerlik, yarasa kökenli RaTG13 koronavirüsüne ise %96.2 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Zhou vd., 2020). Buna ek olarak, Lu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yarasa kökenli bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC21 olmak üzere iki SARS benzeri koronavirüse %88 özdeşlikle benzer, SARS-CoV'ne yaklaşık olarak %79 ve

MERS-CoV'ne yaklaşık olarak %50 benzerlik göstermektedir (Lu vd., 2020). SARS-CoV-2 kaynağının en olası kökeni yarasalar olduğunu ön gören genetik analiz çalışmaları olmasına rağmen bunu doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Malik vd., 2020).

SARS-CoV-2 pozitif polariteli ve tek iplikli RNA genomuna sahip, zarflı, 26 ila 32 kilobaz (kb) arasında değişen genom uzunluğuna sahip bir virüstür (Britannica, 2022; Lu vd., 2020). Referans genom dizisi GenBank veri tabanı NC_045512 erişim numarası ile verilmiştir. Şekil 2.5'de SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2'ye ait genomlar şematize edilmiştir.



Şekil 2.5 Koronavirüslerin genom organizasyonu (E: zarf, M: membran, N: nükleokapsid, S: spike) (X. Li vd., 2020)

Tüm koronavirüsler, Şekil 2.5'de görüldüğü üzere, genom organizasyonu bakımından benzerlikler göstermektedir. Genomun 5′ ucunda, virüsün replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan yapısal olmayan proteinleri kodlayan büyük bir açık okuma çerçevesi (ORF) bulunmaktadır. ORF1a ve ORF1b tarafından kodlanan 16 yapısal olmayan proteinin (Nsp1 ila Nsp16) bulunmaktadır. Bu Nsp'ler içersinde Nsp3 (papain benzeri proteaz) ve Nsp5 (kimotripsin benzeri, 3C benzeri proteaz), Nsp12 (RNA'ya bağımlı RNA polimeraz, RdRp), Nsp13 (helikaz) ve virüsün transkripsiyonu ve replikasyonunda rol oynayan diğer yapısal olmayan proteinler yer almaktadır. Genomun 3′ ucunda ise, başak (spike, S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsid (N) olmak üzere yapısal proteinler kodlanmaktadır (Arya vd., 2021; Chan, Kok, vd., 2020; X. Li vd., 2020). Başak proteinleri virüsün hücrelere bağlanmasını ve girmesini sağlarken zarf proteinleri virüsün zarfının oluşumuna ve salınmasına katkıda bulunmaktadır. Membran proteinleri virüsün

zarfını stabilize ederek RNA'yı kapsid içinde tutmaktadır. Nükleokapsid proteinleri viral genomik RNA'yı paketler ve viral replikasyon kompleksinin bir parçasını oluşturmaktadır (Arya vd., 2021; Jackson vd., 2022; Walls vd., 2020).

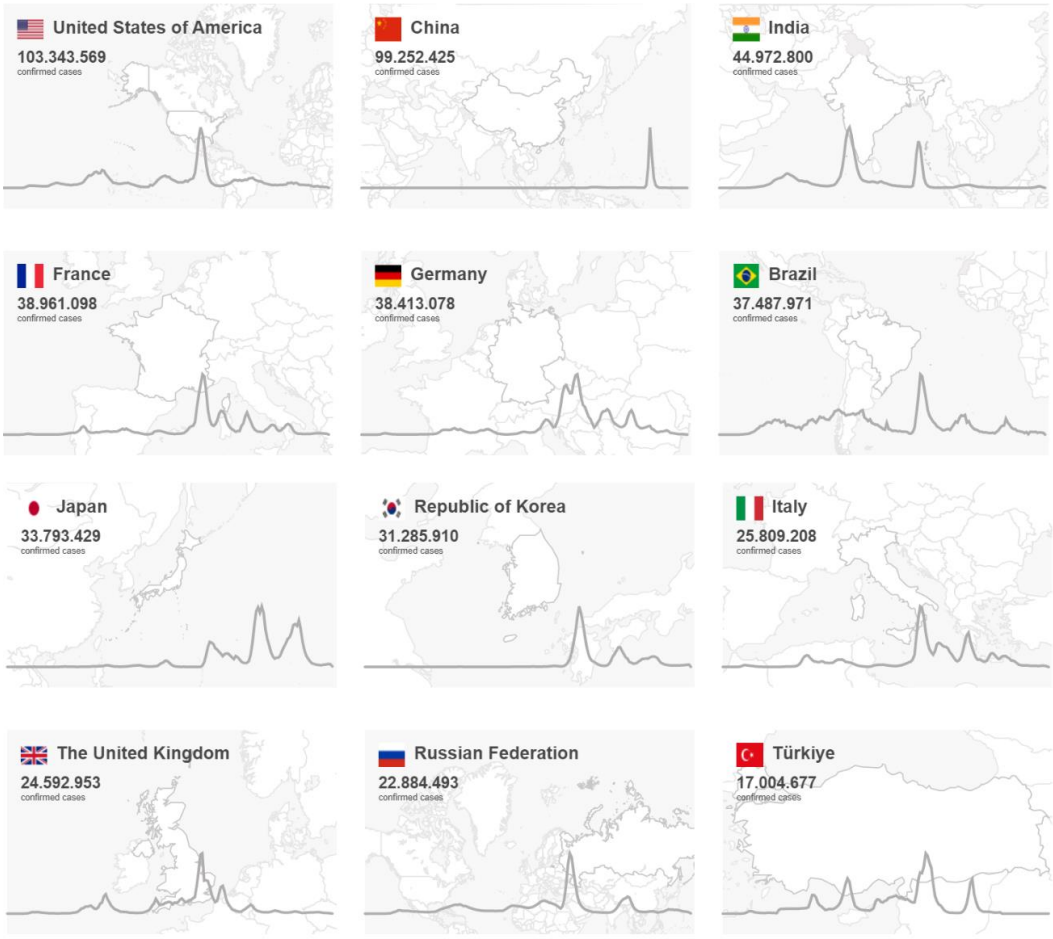
Danışmanlarım tarafından, YTÜ Biyomühendislik Bölümü Rekombinant DNA Teknolojileri Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Dilek BALIK öncülüğünde yürütülen SARS-CoV-2 mutasyon izleme çalışmalarında, Aralık 2019 ila Mart 2021 tarihleri arasında açık erişime sahip veri tabanlarından elde edilen 1 milyondan fazla SARS-CoV-2 genom verisi ile yapılan mutasyonel analiz çalışmasında en sık mutasyon görülen Orf1a bölgesinde yer alan Nsp1, Nsp2, Nsp3 genleri; Orf1b bölgesinde yer alan Nsp12 ve Nsp16 genleri; S geni, Orf3a geni, M geni, Orf8 geni, N geni ve Orf10 geni olarak tespit edilmiştir (UĞUREL vd., 2021).

2.3.2 Yeni Koronavirüs Hastalığı 2019

Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler insan ve memelilerde enfeksiyona sebep olurken gamakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler çoğunlukla kuşları enfekte ederek hastalık oluştururlar (Su vd., 2016).

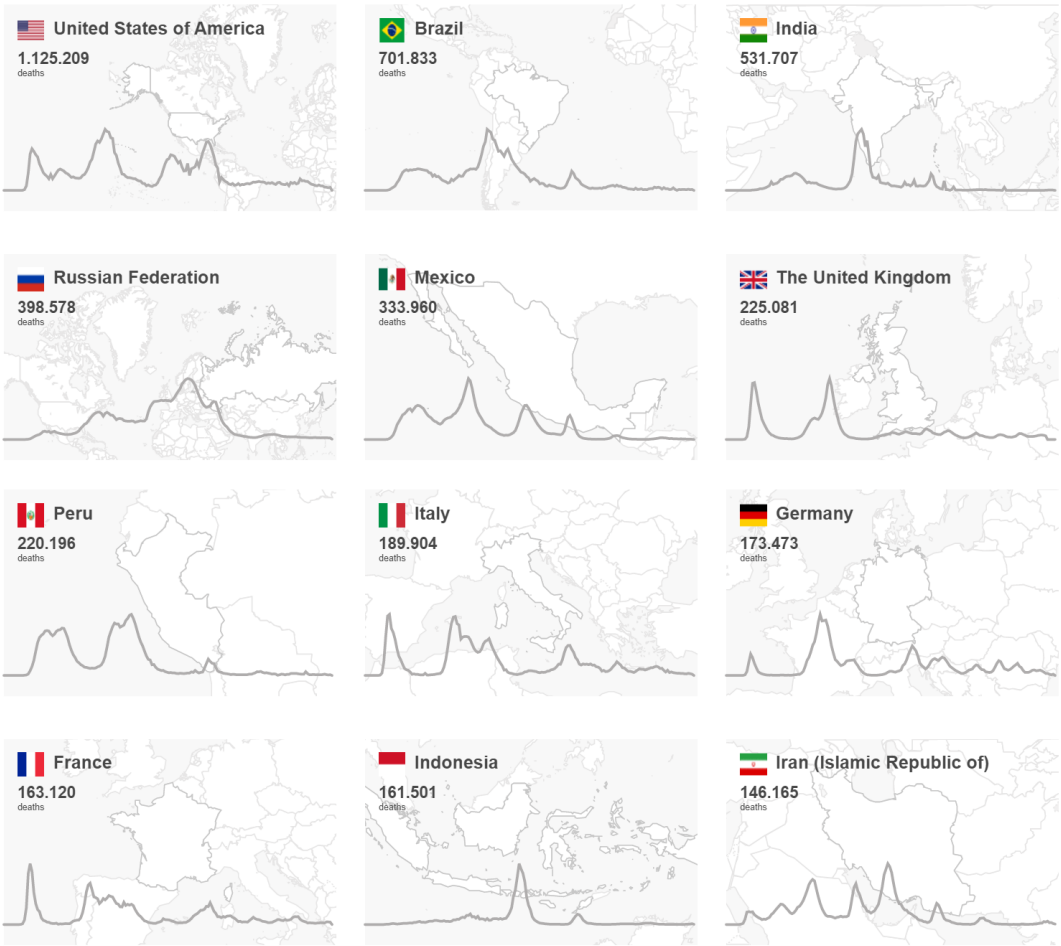
Koronavirüsler insanlarda 2003 yılında SARS (Severe acute respiratory syndrome (SARS), 2003), 2012 yılında MERS olmak üzere son 20 yıl içerisinde çeşitli yüksek ölüm oranlarına sahip hastalıklara sebebiyet vermiştir (Drosten vd., 2003; Zaki vd., 2012). 1 Kasım 2002 ile 31 Temmuz 2003 arasında görülen 8096 SARS vakası sebepli, %9.6 küresel ölüm oranı ile, 774 ölüm raporlanmıştır (*Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003*, t.y.) Yaklaşık olarak 10 yıl sonra ise tanımlaması ilk kez Suudi Arabistan'da yapılan, SARS'a göre daha az bulaşıcı fakat ölüm oranı daha yüksek MERS-CoV sebepli vakaların Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirilen hastalarda %35 ölüm oranı ile sonuçlandığı raporlanmıştır (*Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*, t.y.).

İlk defa 2019 yılında görülen SARS-CoV-2 (F. Wu vd., 2020) ise son zamanların en şiddetli pandemisini yaratan, son derece bulaşıcı ve yüksek mortaliteye sahip bir hastalığa sebebiyet vermiştir. Şekil 2.6'da 8 Mayıs 2023 itibari ile aralarında 17 milyondan fazla vaka sayısı ile Türkiye'nin de bulunduğu pandemi süreci boyunca en çok vaka görülen 12 ülke verilmiştir.



Şekil 2.6 8 Mayıs 2023 DSÖ verilerine göre Dünya genelinde en çok COVID-19 vakası görülen 12 ülke (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*, t.y.).

İnsanlarda ateş, öksürük ve kas ağrısı semptomları gösteren ve genellikle nefes almada güçlüğe sebep olan SARS-CoV-2, son derece bulaşıcı bir üst solunum yolu hastalığına sebep olmaktadır (Britannica, 2022). SARS-CoV-2'nin sebep olduğu pandemik bir hastalık olan COVID-19, 8 Mayıs 2023 tarihi itibari ile dünya çapında 765 milyondan fazla vaka ve 6.9 milyondan fazla ölüme (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*, t.y.) sebep olmuştur. En çok ölüm vakasının görüldüğü 12 ülke Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7 8 Mayıs 2023 DSÖ verilerine göre Dünya genelinde en çok COVID-19 vakası ölüm görülen 12 ülke (*WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data*, t.y.)

Pandemi süresince COVID-19'a neden olan SARS-CoV-2 zaman içinde farklı mutasyonlar geçirmiş ve farklı varyantları ortaya çıkmıştır. Bu varyantların hastalığın şiddeti, aşıların etkinliği ve ekonomik ve sosyal sonuçları üzerinde çeşitli etkileri olmuştur (Goodell, 2020).

Alpha (B.1.1.7) ve Beta (B.1.351) varyantları, insan ACE2 reseptörü için artan afinite göstererek viral girişi kolaylaştırmakla birlikte bulaşmanın ve hastalık şiddetinin artmasına katkıda bulunabilmektedir (Ramanathan vd., 2021). Delta (B.1.617.2) varyantı, 2021'in ortalarında ortaya çıkmış ve virüsün orijinal formundan daha bulaşıcı bir varyant olarak nitelendirilmiştir. Delta, aşılanmış bazı kişilerde enfeksiyonlara, aşılanmamış birçok kişide ise ciddi hastalıklara ve hastaneye yatışa neden olmuştur (Lauring vd., 2022). Bir diğer varyant ise 2021'in sonlarına doğru birçok ülkede virüsün en yaygın türü haline gelen Omicron

(B.1.1.529) varyantı olmuştur. Omicron varyantı Delta suşundan önemli ölçüde daha bulaşıcı olsa da, Omicron çoğu kişide daha az şiddetli hastalığa neden olmuştur. Bununla birlikte, hastaneye yatma riski daha yüksek olan aşılanmamış kişiler için hala ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Britannica, 2022; Lauring vd., 2022).

COVID-19 pandemisi boyunca hastalığın yayılmasını engellemek adına maske kullanımı, sosyal mesafe, hijyen önemleri gibi bir çok önlem alınmıştır. Bu süreç içerisinde diğer solunum yolu patojenlerinin görülme sıklığı azalma göstermiştir. Ancak literatürde SARS-CoV-2'nin ayrıca RSV ve influenza virüsü ile koenfeksiyon olarak da görülebildiğine dair bir çok akademik yayın bulunmaktadır (Maltezou vd., 2023).

Farklı hastalık yapıcı patojenler ile koenfeksiyon gösterebilmesinin yanı sıra, Nature dergisinde yayınlanan bir araştırmada, bilim insanlarına göre SARS-CoV-2'nin gelecekte endemik bir virüs haline gelmesini beklenmektedir (Phillips, 2021). Buna ek olarak, pandeminin başlamasından bu yana geçen 3 sene sonunda, 5 Mayıs 2023 itibari ile DSÖ küresel acil durumun sona erdiğini bildirmiştir (*Coronavirus disease (COVID-19) pandemic,* t.y.).

2.3.3 COVID-19 Tedavi Yöntemleri

COVID-19 pandemisi olarak bilinen ciddi bir solunum yolu hastalığına neden olan SARS-CoV-2'nin hayat döngüsünde önemli roller oynayan birçok protein ve gen yer almaktadır (Chan, Kok, vd., 2020; Kim, Lee, vd., 2020). Bu protein ve genler, potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilmektedir. Remdesivir ve molnupiravir RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) genine hedefli ilaçlara örnek olarak verilebilir. Konakçı hedefli potansiyel tedaviler arasında bir JAK inhibitörü olan baricitinib, bir IL-6R inhibitörü olan tocilizumab, verdinexor ve doğrudan etkili antiviraller olan ensovibep, S-217622, AT-527 ve başak (spike) proteinine yönelik monoklonal antikorlar olan casirivimab ve imdevimab yer almaktadır. Bu bileşiklerin bazıları klinik çalışmalarda test edilmekle birlikte bazıları acil kullanım onayı almıştır. Bu terapötiklerin etki mekanizmaları, SARS-CoV-2'nin yapısal biyolojisi ve konakçı-virüs etkileşimi ile ilişkilidir (McKimm-Breschkin vd., 2022). Beigel ve arkadaşlarının 1062 hasta üzerinde yürüttükleri çalışmada remdesivir antiviralinin plaseboya göre yetişkinlerde iyileşme süresini azalttığını raporlamışlardır (Beigel vd., 2020).

Buna ek olarak, literatürde SARS-CoV-2 ile koenfeksiyon gösteren bireylerde farklı tedavi yöntemleri denenmektedir. Yu ve arkadaşlarının SARS-CoV-2 ve influenza virüslerinin koenfeksiyon gösterdiği bireylerde lopinavir/ritonavir ile tedavinin etkinliği üzere yaptıkları çalışmada, çalışmaya dahil olan 128 COVID-19 hastasından 64 tanesi influenza A/B ile koenfeksiyon gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonucunda lopinavir/ritonavir ile tedavi edilen koenfeksiyonlu hastaların daha hızlı iyileştikleri gözlenmiştir (Yu vd., 2021).

Lauring ve arkadaşlarının alfa, delta ve omikron varyantları üzerinde yaptığı çalışmada mRNA aşılarının COVID-19 ile enfeksiyon sonucu hastaneye yatışlara karşı güçlü bir koruma sağladığı, hastalığın kritik seviyeye ilerlemesi veya ölüm ile sonuçlanmasını azalttığı üç doz mRNA aşısı ile COVID-19'a karşı aşılamanın, toplumda morbidite ve mortaliteye karşı koruma için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (Lauring vd., 2022).

2.4 SARS-CoV-2, RSV ve İnfluenza Koenfeksiyonları

Literatürde SARS-CoV-2 ve diğer respiratuvar patojenlerin koenfeksiyon gösterdiği vakalar üzerine bir çok çalışma mevcuttur. Cong ve arkadaşlarının yaptığı 7892 COVID-19 hastası ve 12 farklı çalışmayı içeren derleme çalışmasında, SARS-CoV-2'nin RSV ve influenza virüsleri ile olan koenfeksiyonlarını ve bu enfeksiyonların bireylerde hastalığın şiddetini, oksijen desteği gerekliliğini, yoğun bakım ünitesine yatışlarını, ventilasyon ihtiyacını ve ölüm oranlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda SARS-CoV-2'nin influenza virüsü ile gösterdiği koenfeksiyonun hastalık şiddetini artırdığı, buna bağlı olarak yoğun bakım ünitesine yatış ve mekanik ventilasyon riski ile ilişkili olduğu çıkarımı yapılmış, ancak ölüm riskini artırdığı ile ilgili ilişki kuramamışlardır. Ek olarak RSV ko-enfekisyonu ile ilgili yeterli bilgi olmaması sebebi ile yoğun bakım ve ventilasyon ile ilgili değerlendirme yapılamamış, yalnızca ölüm riski ile koenfeksiyonun ilişkili olmadığına dair çıkarımda bulunabilmişlerdir (Cong vd., 2022). Swets ve meslektaşları, SARS-CoV-2 enfeksyonlu yetişkin bireyler üzerine yaptığı çalışmada 6965 kişi üzerinde tanı testi yaparak COVID-19 hastaların %8.4'ünde koenfeksiyon gözlemlemişlerdir. Koenfeksiyon patojenlerinin %39'unu influenza virüsünün, %38'ini RSV ve %23'ünü adenovirüsün oluşturduğunu raporlamışlardır (Swets vd., 2022). İslamoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada

influenza pozitif 263 hastada %20.1'u influenza A ve %6.8'i influenza B olmak üzere 87 hastanın SARS-CoV-2 ile koenfeksiyon gösterdiği raporlanmıştır (Islamoğlu & Borku Uysal, 2021). Yu ve meslektaşları yaptıkları çalışmada SARS-CoV-2 ve influenza virüslerinin koenfeksiyon gösterdiği ve ko-enfsiyon olmayan bireylerde lopinavir/ritonavir ile tedavinin etkinliği üzere çalışmışlardır. Çalışmaya dahil olan 128 COVID-19 hastasından 54 tanesi influenza A, 10 tanesi influenza B olmak üzere 64 hasta SARS-CoV-2 ve influenza ko-enfekte olarak bildirilmiştir (Yu vd., 2021).

SARS-CoV-2'nin RSV ve influenza virüslerine ek olarak farklı solunum yolu patojenleri ile de koenfeksiyon oluşturabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin Ling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada COVID-19'lu 250 hastanın 39'u en az bir farklı patojen ile koenfeksiyon göstermiştir. RSV ile ko-enfekte olan 12 (%4,8) hasta, adenovirüs ile ko-enfekte olan 7 (%2.8) hasta, influenza A ile ko-enfekte olan 2 (%0.8) hasta, influenza B ile ko-enfekte olan 1 (%0,4) hasta, *M. pneumoniae* ile ko-enfekte olan 11 (%4.4) hasta, *C. Pneumoniae* ile ko-enfekte olan 13 (%5,2) hasta olduğu raporlanmıştır (Ma vd., 2020).

Pérez-Lazo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 18 yaşından büyük 295 COVID-19 hastası incelenmiş ve 154 (%52,2) hastada bir veya daha fazla solunum patojeni ile koenfeksiyon tespit edilmiştir. Bulgulara göre, koenfeksiyonlar en sık %28,1 *Mycoplasma pneumoniae*, %8,8 *Chlamydia pneumoniae* ve %11,5 her iki bakteriyle oluşmaktadır. Diğer koenfeksiyonlar ise Adenovirus (%1,7), *Mycoplasma pneumoniae*/Adenovirus (%0,7), *Chlamydia pneumoniae*/Adenovirus (%0,7), RSV-B/*Chlamydia pneumoniae* (%0,3) ve *Mycoplasma pneumoniae*/*Chlamydia pneumoniae*/Adenovirus (%0,3) şeklinde saptanmıştır (Pérez-Lazo vd., 2021). Bunun yanı sıra, Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada SARS-CoV-2 virüsünün tüberküloz bakterisi (*Mycobacterium tuberculosis*) ile de koenfeksiyon gösterebildiğini raporlamışlardır (Q. Wang vd., 2022).

2.5 Viral Tanı Yöntemleri

Viral tanı yöntemleri, tanısal test ve kitlerin yaygınlaşması ve hızlanması ile birlikte sürekli olarak gelişmektedir. Yeni nesil sekanslama teknolojileri, hızlı amplifikasyon yöntemleri, antijen tabanlı testler gibi yenilikler, viral tanı kitlerinin

duyarlılık, özgüllük, hız ve kullanılabilirlik açısından daha da iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır (Reta vd., 2020).

Ancak, viral tanı kitlerinin kullanımı ve sonuçların yorumlanması konusunda bazı zorluklar da bulunmaktadır. Farklı kitlerin farklı duyarlılık ve özgüllük seviyelerine sahip olması, yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilmektedir. Ayrıca, kitlerin doğru kullanımı, laboratuvar personelinin tecrübesi ve uygun laboratuvar altyapısı gibi faktörler de sonuçların doğruluğunu etkileyebilmektedir (Louten, 2016; Reta vd., 2020). Bu nedenle, doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için standartlara uygun bir şekilde çalışılması önemlidir. Viral tanı kitleri, moleküler ve antijen tabanlı yöntemler olmak üzere çeşitli tiplere sahip olup, genetik materyalin amplifikasyonu, tespiti veya dizi analizini içeren çalışma prensipleriyle virüs tanısında kullanılan temel araçlardan biridir. Nükleik Asit Amplifikasyon Testlerinden (NAAT) olan PCR ve RT-PCR tabanlı viral tanı kitleri, yüksek duyarlılık, özgüllük ve hızlı sonuçlar elde etme yetenekleri nedeniyle en sık kullanılan kitler arasındadır. Bu kitler, çeşitli virüslerin tespitini yapabildiği gibi, multipleks qPCR kitleri sayesinde birden fazla virüsün veya virüs alt tiplerinin aynı anda tanılanmasına da olanak sağlamaktadır (Dronina vd., 2021).

PCR temelli tanı kitleri, patojenlerin genetik materyallerini amplifiye ederek tespit edilmesini sağlar. Gerçek Zamanlı PCR ve döngüsel PCR olmak üzere iki ana türü bulunmaktadır. Gerçek Zamanlı PCR, amplifikasyon sürecinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlayan bir yöntemdir ve sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlar. Döngüsel PCR ise, ısıya dirençli bir DNA polimeraz ve iki kalıba spesifik oligonükleotit primerler kullanarak birçok döngüde amplifikasyonun gerçekleştirildiği ve sonuçların son amplifikasyon döngüsünde tespit edildiği bir yöntemdir (Al-Hajjar, 2012; Cobo, 2012). Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu RNA hedefli genetik materyalleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik ile, virüslerin RNA materyalini ters transkriptaz enzimi kullanarak DNA'ya dönüştürülür ve ardından amplifikasyonunu gerçekleştirilir RT-PCR tabanlı viral tanı kitleri, SARS-CoV-2 gibi RNA virüslerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Reta vd., 2020).

Bir diğer tanı tekniği olan immünoassay tabanlı antijen testleri, virüslerin yüzeyinde bulunan antijenleri tespit ederek virüs varlığını belirlemektedir. Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA), Western Blot Analizi, İmmünofloresan Testi,

Hemaglütinasyon İnhibisyonu (HI) Testi gibi çeşitli teknikleri bulunmaktadır (Louten, 2016; Reta vd., 2020). Özellikle, hızlı antijen testleri, hızlı sonuçlar elde etme avantajı ve düşük maliyetleri nedeniyle COVID-19 pandemisinde hastalık teşhisi için kullanılmıştır (Hanson vd., 2021; Kevadiya vd., 2021).

Nükleik asit sekanslama, virüslerin genetik materyallerinin tamamının veya belirli bölgelerinin dizi analizini içeren bir yöntemdir. Bu yöntem, virüslerin türünü, alt tipini veya varyantını belirleme ve genetik değişimleri izleme açısından yararlıdır. Yüksek duyarlılık ve özgüllük seviyesine sahip olmasına rağmen, maliyeti ve zaman alıcı olması nedeniyle rutin viral tanıda daha sınırlı bir kullanıma sahiptir (Kevadiya vd., 2021).

Virüs kültürü ile tanı yönteminde izole edilmesi hedeflenen virüse özgü sonlu veya sürekli bir hücre hattı seçilerek hücrelerin steril bir büyüme ortamında hücrelerin büyütülmesine ve virüsün izolasyouna dayanır. Bu teknikte seçilen hücrenin virüse özgü yüzey reseptörleri eksprese etmesi önemlidir, aksi durumda virüsler hücreye tutunamayıp replike olamamaktadır (Louten, 2016). İnfluenza virüsünün alt tiplerini tespit edebilme gibi özel tanılar için güçlü bir yöntem olmasına karşın zaman alıcı bir yöntem olduğundan Amerika Bulaşıcı Hastalıklar Derneği (Infectious Diseases Society of America, IDSA) tarafından birincil tanı yöntemi olarak kullanımı önerilmemektedir (Uyeki vd., 2019)

Tablo 2.2 Virüs tanı türlerinin avantaj ve dezavantajları (Louten, 2016)

Tanı Türü	Avantajları	Dezavantajları
Virüs Kültürü	• Bilinmeyen virüsleri tespit etmek için kullanılabilir • Moleküler testlerden daha ucuzdur • Bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan virüsü ayırt edebilir • Az miktarda virüsü çoğaltmak için kullanılabilir	• Yavaş (virüsün çoğalması zaman alır) • Uzman teknisyenler gerektirir • Nispeten pahalıdır • Canlı hücreler değişkenliğe yol açar • Özel ekipman ve laboratuvarlar gerektirir • Tüm virüsler hücre kültüründe çoğalmaz
RT-PCR	• Hızlı • Son derece hassas, spesifik, kantitatif • Cansız doku üzerinde gerçekleştirilebilir • Anında sonuç verir	• Pahalı reaktifler ve özel ekipman gerektirir • Primerler ve prob için gerekli sekans bilgisi gerektirir

Tablo 2.2 Virüs tanı türlerinin avantaj ve dezavantajları (Louten, 2016) (devamı)

Immunofluorescence Assays	• Nispeten hızlı gerçekleştirilir • Uzman teknisyen gerektirmez • Virüsü kesin olarak tanımlayabilir	• Özel ekipman gerektirir (floresan mikroskobu) • Tespit edilen virüs için antikorlar mevcut olmalıdır
Yüksek Verimli Dizileme	• Nispeten hızlıdır • Tüm viral sekansı sağlayabilir • Canlı doku gerektirmez • Yakından ilişkili virüsleri ayırt etmek için kullanılabilir • Viral mutasyonları izleyebilir	• Pahalı reaktifler ve ekipman gerektirir • Sonuçları yorumlamak için uzman teknisyenler gerektirir • Üretilen veri miktarı çok fazla olabilir ve kolayca yorumlanamaz

Sıklıkla kullanılan moleküler ve serolojik tesler gibi çeşitli viral tanı teknikleri olmasına karşın nanoteknonoloji, malzeme bilimi, biyoteknoloji gibi disiplinlerin gelişmesi ile araştırmacılar, yapay zeka ve nesnelerin interneti (Internet-of-Things, IoT) destekli teknolojiler, mikroakışkanlar, biyosensörler gibi farklı teknikler de geliştirmektedir (Gradisteanu Pircalabioru vd., 2022).

2.5.1 NAAT Temelli Tanı Kitleri Ve Kantitatif PCR Uygulamarı

Nükleik Asit Amplifikasyon Testi (NAAT), patojenin genetik materyalini tespit eden, viral patojen tanı sürecinde sıklıkla kullanılan bir tekniktir. NAAT ile nükleik asitleri çoğaltmak ve virüsü tespit etmek adına Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar (CRISPR), Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP), Nicking Endonükleaz Amplifikasyon Reaksiyonu (NEAR), RT-PCR gibi birçok farklı yöntem kullanabilir (*Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) | CDC*, t.y.). PCR tabanlı viral tanı kitleri, gerçek zamanlı PCR veya döngüsel PCR yöntemleriyle çalışabilir. Gerçek zamanlı PCR yöntemi, amplifikasyon sürecinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlayan bir yöntemdir ve sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesini sağlar. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR), hedef patojenin genetik materyalinin tek bir reaksiyonda birden çok kez amplifiye edilmesine izin vermesi sebebiyle tanı sürecinde altın standart haline gelen bir NAAT türüdür. Döngüsel PCR ise, birçok döngüde amplifikasyonun gerçekleştirildiği ve sonuçların son amplifikasyon döngüsünde tespit edildiği bir yöntemdir.

Nükleik asit saptamaya dayalı testler son zamanlarda hızlı ve güvenilir sonuç vermesi ve SARS-CoV-2'nin erken tanısında yeterli duyarlılığa sahip olması ile PCR testi altın standard olarak nitelendirilmektedir (Tahamtan & Ardebili, 2020).

Benzer şekilde influenza A virüsü tanısında en yaygın kullanılan yöntem RT-PCR olarak bilinmektedir (Kakkola vd., 2021).

DSÖ raporlarında ve literatürde influenza virüsü tanısına yönelik yapılan NAAT temelli çalışmalarda çeşitli gen bölgeleri hedef olarak kullanıldığı görülmektedir. İnfluenza virüsünün tanısında hedef olarak en sık kullanılan gen bölgeleri M, HA, ve NA olarak genellendirilebilir (Schulze vd., 2010; *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*, 2021; C. Wu vd., 2008). Wu ve arkadaşları M, HA ve NA genlerine spesifik primer dizisi ile çalışmalarını sürdürmüştür. Çalışmada influenza A virüsleri için M geni, H5 alt tipi için HA geni, N1 alt tipi için NA geni, influenza B virüsleri için HA geni hedef alınmıştır (C. Wu vd., 2008). Schulze ve meslektaşları influenza virüsü alt tiplerini ayırt etmek için HA ve NA genlerini kullanarak bir dizi seti oluşturmuşlardır. Alt tiplerden bağımsız influenza A virüsü tespiti ve influenza B virus tespiti için M geni kullanmışlardır (Schulze vd., 2010). Hymas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada influenza A ve B virüsleri için M genini, RSV için polimeraz geninin (L) bölümlerini amplifiye eden primer ve prob dizileri kullandıklarını bildirmişlerdir (Hymas vd., 2010). DSÖ tip ayırt etmeksizin influenza A virüsleri tespitinde kullanıcak RT-PCR reaksiyonunda M genini, H1N1, H3N2 ve H5N1 alt tipleri için HA genini, influenza B virüsü için NS genini, influenza B Victoria ve Yamagata soy virüsleri için ise HA genini hedef almaktadır (*WHO information for the molecular detection of influenza viruses*, 2021).

RSV tanısında da literatürde farklı genlerin hedef alındığı çeşitli PCR tabanlı tanı çalışmaları yapıldığı görülmektedir. Örneğin, Shen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada evrensel primer ve prob setleri olarak M genini hedefleyen, A ve B alt tipleri primerleri için ise F genini hedefleyen primer ve prob setleri kullanmıştır (Shen vd., 2022). Farklı bir çalışmada ise kullanılan RSV A primerlerinin F geni, RSV B primerlerinin ise N geni içinde yer aldığı bildirilmiştir (Bouzas vd., 2018). RSV A ve B ayrımı sağlayarak tanı koymayı hedefleyen başka bir çalışmada primer setleri için N geni hedef alınmıştır (L. Wang vd., 2019). Benzer şekilde, Do ve meslektaşları RSV genleri arasında en çok korunan gen bölgesi N olduğu için viral tanılama çalışmalarında N genini seçtiklerini paylaşmışlardır (Do vd., 2012). PCR tabanlı SARS-CoV-2, influenza A/B ve RSV tanısı eş zamanlı gerçekleştirmek

üzere yapılan bir çalışmada RSV'nin N genini hedef alan primer ve prob setleri oluşturulduğu literatürde yer almaktadır (Chung vd., 2021).

Mancini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada SARS-CoV-2'nin RT-PCR reaksiyonu ile tanısında E ve N2 genlerini hedeflemişlerdir (Mancini vd., 2021). DSÖ protokollerine göre RdRp ve E genleri hedef alınmıştır (V. Corman vd., 2020). Chan ve arkadaşları SARS-CoV-2'nin RdRp/helikaz, S ve N genlerini hedef aldığı bir çalışma yürütmüşlerdir (Chan, Yip, vd., 2020). Chu ve meslektaşları da yaptıkları çalışmada ORF1b ve N genleri hedef alınarak amplikon uzunluklarını sırasıyla 132 ve 110 baz çifti olarak vermişlerdir (Chu vd., 2020). Corman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada amplikon uzunlukları sırasıyla 99, 112, 127 baz çifti olmak üzere hedef genler olarak RdRp, E ve N olarak verilmiştir (V. M. Corman vd., 2020).

Ticari olarak kullanılan tanı kitleri incelendiğinde üç farklı virüs için de çeşitli gen bölgelerinin hedef olarak kullanıldığı görülmektedir. Tablo 2.'de yer alan ticari olarak geliştirilmiş viral tanı kitleri ve hedeflediği virüs gen bölgeleri incelendiğinde SARS-CoV-2 için N ve Orf1a/b genleri, RSV için N geni, influenza virüsü için ise M geni ticari kitlerde sıklıkla hedeflenen gen bölgeleri olarak görülmektedir.

Tablo 2.3 Ticari multiplex kitler ve hedeflediği gen bölgeleri

Ticari Kit Adı	SARS-CoV-2 Hedef Geni	Influenza Hedef Geni	RSV Hedef Geni	Kaynak
COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR (diatheva)	ORF1b ve N geni	M1 ve NS2 geni	M geni	(*COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR*, 2023)
The VirPath Respiratory Multiplex qRT-PCR kit	N geni ve Polimeraz geni (ORF-1)	M geni NS2 geni	N geni	(*COVID 19, Flu, RSV | Respiratory Multiplex qRT-PCR | Nonacus*, t.y.)
SARS-CoV-2/FLU/RSV REALTIME PCR KIT	N ve E geni	Influenza A: M geni Influenza: B NS1 geni	L geni	(*SARS-CoV-2/FLU/RSV REALTIME PCR KIT*, t.y.)

Tablo 2.3 Ticari multiplex kitler ve hedeflediği gen bölgeleri (devamı)

VIASURE SARS-CoV-2, Flu & RSV Real Time PCR Detection Kit	N geni (N1 ve N2)	İnfluenza A ve B: M1 geni	RSV A ve B: N geni	(*VIASURE SARS-CoV-2 Flu RSV - JANT PHARMACAL CORPORATION*, t.y.)
Bosphore SARS-CoV-2/Flu/ RSV Panel Kit	ORF1a/b ve N geni	Bilinmiyor	Bilinmiyor	(*Bosphore SARS-CoV-2/Flu/ RSV Panel Kit - Launch Diagnostics*, t.y.)
RevoDx Flu A&B / RSV / SARS-CoV-2 qPCR Kit	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	(*RevoDx Flu A&B / RSV / SARS-CoV-2*, t.y.)
1COPY™ COVID-19/FLUA/FLUB/RSV QPCR KIT	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor	(*1 copy COVID-19/FluA/FluB/RSV qPCR Kit*, t.y.)

2.6 Veri Tabanları ve Biyoinformatik Araçlar

Yüksek verimli dizileme teknolojileri, biyolojik verilerin hızlı ve büyük ölçekte üretilmesine yol açarak, veri yönetimi konusunda bir zorluk yaratmaktadır. Bu durum, farklı biyolojik veri türlerini içeren ve entegre eden biyolojik veri tabanlarının önemini ve bu veri tabanlarının sayısını giderek artırmıştır. Bu veri tabanları, veri arşivleme, entegrasyon ve çoğunlukla değerli bir kürasyonla paylaşma işlevlerini yerine getirmektedir (Ma vd., 2022).

Genomik veri tabanları, büyük miktarda genetik verileri saklamak ve paylaşmak için tasarlanmıştır. Bu veri tabanları, insan genomu, diğer canlıların genomları, taksonomi, protein yapıları ve biyolojik yolaklar gibi çeşitli veri tipleri için özelleştirilmiştir. Örneğin GenBank 504.000 tür için 2,9 milyardan fazla nükleotid dizisinden 19,6 trilyon baz çifti içeren kapsamlı, halka açık bir veri tabanıdır (Sayers vd., 2023). Genomik verilerin artmasıyla birlikte, verilerin depolanması, yönetimi, analizi ve yorumlanması önemli bir sorun haline gelmiştir. Biyoinformatik araçlar, bu sorunu çözmek için kullanılan araçlar olarak nitelendirilmektedir. Biyoinformatik, bilgisayar ve istatistik yöntemlerinin biyolojik verilerin işlenmesi, analiz edilmesi ve işlenen verilerin görsel hale

getirilmesi için kullanılmasıdır. Bu alanda, genomik veri tabanları ve analiz araçları önemli bir yer tutmaktadır (Leonelli, 2019; Y. Li & Chen, 2014; Marx, 2013; Ren & Krawetz, 2015; Schadt vd., 2010).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), benzerlik arama analizlerinde kullanılan bir yazılımdır. Protein veya DNA dizilerinin bir veri tabanındaki diğer dizilerle karşılaştırılmasına ve benzerliklerin tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Altschul vd., 1990). Birçok araştırmada yaygın olarak kullanılan BLAST, biyoinformatik alanında en sık kullanılan yazılımlardan birisidir.

Çoklu dizilerinin hizalama işlemi için kullanılan CLUSTAL Omega, yeni nesil sekanslama teknolojilerinde ortaya çıkan veri yoğunluğu ile başa çıkmak için optimize edilmiştir. CLUSTAL Omega, birden fazla sekansın hizalanmasında kullanılan en doğru ve en hızlı yöntemlerden birisidir (Madeira vd., 2022; Sievers vd., 2011).

Jalview, çeşitli veri kaynaklarından alınan biyoinformatik verilerin görselleştirilmesi, analizi ve yorumlanmasında kullanılan bir yazılımdır. Jalview, protein ve DNA dizileri, multiple dizinli hizalamalar ve protein yapıları gibi veri türlerini desteklemektedir (Waterhouse vd., 2009).

Nükleotit bazlı intergenomik benzerlik oranlarını genom uzunlukları ve hizalanan genom fraksiyonu ile intergenomik benzerlik değerlerini entegre eden bir ısı haritası şeklinde çıktı alınabilen bir yazılım olan VIRDIC kullanıcı tanımlı intergenomik benzerlik eşiklerine dayanarak virüsleri kümeler halinde gruplandırabilmektedir (Moraru vd., 2020).

Daha önceki çalışmalarda grubumuz tarafından geliştirilerek kullanılan ODOTool (UGUREL vd., 2020) yazılımı sayesinde veri tabanlarından indirilen gen ve genom verileri hizalama işlemine sokulabilir. ODOTool'un bir özelliği de mutasyonel analizler yapabilmesidir. Çeşitli platformlarda ODOTool gibi amaca ve çalışmaya özgün yazılımlar da oluşturulabilir.

Primer tasarımı, PCR'nin başarısı için kritik öneme sahiptir. Primer3 yazılımı, yüksek verimli genomik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan ve açık kaynaklı bir primer tasarım aracıdır. Primer3, açık kaynaklı bir yazılım olarak yıllar içinde geliştirilmiş ve genellikle yüksek verimli genomik çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen bir primer tasarım aracı haline gelmiştir. Özellikle, primer tasarım

sürecinde daha hassas termodinamik modeller kullanarak erime sıcaklığı (T_m) tahminini iyileştirme ve primerlerin saç tokası veya dimer oluşum olasılığını azaltma gibi iyileştirmeler yapılmıştır. Ayrıca, primer yerleşiminin daha hassas kontrolü, parametre ayarlarının kaydedilip yeniden kullanılabilmesi ve tek bir primerin birden fazla primer çiftinde kullanılmaması gibi kullanım kolaylığı sağlayan özellikler eklenerek temiz bir programlama arayüzü sunulmuştur (Untergasser vd., 2012).

Primer ve probların erime sıcaklıklarını Breslauer ve arkadaşları tarafından açıklanan en yakın komşu yöntemine dayanarak hesaplamak adına adapte edilmiş (Breslauer vd., 1986), Thermo Fisher (*Multiple Primer Analyzer | Thermo Fisher Scientific - TR*, t.y.) internet sitesi ve primerlerin farklı kombinasyonlarının potansiyel primer-dimer oluşumunu tahmin eden AutoDimer (Vallone & Butler, 2004) yazılımları seçilen oligonükleotit dizilerinin dimer ve saç tokası oluşturup oluşturmadığını analiz etmeye yardımcı olmaktadır.

3
YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Panel Tasarım ve Oligonükleotit Marker Tespit Çalışmaları

Multiplekslenebilir panel tasarımı oluşturulurken gen ve genom verilerini içeren açık erişimli çeşitli veri tabanları ve biyoinformatik analiz araçları kullanılmıştır.

3.1.1.1 Kullanılan Veri Tabanları ve Nükleotit Girdileri

13.000'den fazla nükleotit dizisine sahip influenza A ve influenza B virüslerinin gen dizisi verileri için İnfluenza Araştırma Veri Tabanı (Influenza Research Database, IRD) kullanılmıştır. Biyoinformatik analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiş influenza A ve influenza B virüslerine ait HA, MP, NA, PB1 genlerinin GenBank erişim numaraları Tablo 3.1'de listelenmiştir.

Tablo 3.1 Seçilen influenza A alt tipleri ile influenza B virüsü genleri GenBank erişim numaraları ve suş isimleri

Virüs	Alt Tip	HA Geni Erişim No.	M Geni Erişim No.	NA Geni Erişim No.	PB1 Geni Erişim No.	Suş İsmi
Influenza A	H1N1	CY083910	CY083911	CY083912	CY083916	A/Aalborg/INS132/2009(H1N1)
		CY176570	CY176571	CY176572	CY176576	A/Aarhus/INS3_653/2011
		MT244098	MT244096	MT244095	MT244093	A/Alabama/02/2020
		GU014774	GU138870	GU014775	GU136026	A/Aichi/202/2009(H1N1)
		CY073725	CY073726	CY073727	CY073731	A/Aalborg/INS283/2009(H1N1)
		KX406251	KX406254	KX406253	KX406249	A/Alaska/03/2016
		HM569659	HM569660	HM569661	HM569665	A/Argentina/07-09GP/2009(H1N1)
		MN826657	MN826660	MN826659	MN826655	A/Daejeon/1455/2018
		GU562450	GU562451	GU562452	GU562456	A/Perm/01/2009(H1N1)

Tablo 3.1 Seçilen influenza A alt tipleri ile influenza B virüsü genleri GenBank erişim numaraları ve suş isimleri (devamı)

		JQ431200	JQ431228	JQ431257	JQ431375	A/Reunion/0116-3-M1E/2009
	H3N2	KX412670	KX412673	KX412672	KX412668	A/Alabama/03/2016
		MT030878	MT030874	MT030872	MT030875	A/Alabama/24/2019
		CY220239	CY220242	CY220241	CY220237	A/Alaska/04/2017
		CY256109	CY256112	CY256111	CY256107	A/California/85/2017
		CY232428	CY232431	CY232430	CY232426	A/Delaware/25/2017
		MK927970	MK927971	MK927972	MK927976	A/Ohio/8983/2019
		MK912462	MK912463	MK912464	MK912468	A/Belgium/8725/2019
		CY093391	CY093394	CY093393	-	A/Belgrade/WRAIR2379N/2010(H3N2)
		CY093407	CY093410	CY093409	CY093405	A/Bogota/WRAIR3457N/2010(H3N2)
		KY926167	KY924931	KY924957	KY925662	A/Bom Retiro do Sul/LACENRS-3406/2013(H3N2)
	H5N1	JQ714246	JQ714249	JQ714248	JQ714244	A/Cambodia/W0112303/2012
		KP702165	KP702168	KP702167	KP702163	A/Egypt/MOH-NRC-7271/2014
		CY098758	CY098761	CY098760	CY098756	A/Hubei/1/2010
		MF598579	MF598582	MF598581	MF598577	A/Nanjing/1/2015
		KP638515	KP638541	KP638522	KP638557	A/Vietnam/UT36282/2010
		KF277182	KF277185	KF277184	KF277180	A/Viet Nam/CM32/2011
		KF918498	KF918501	KF918500	KF918496	A/Cambodia/X0828324/2013(H5N1)
		KP638510	KP638538	KP638521	KP638555	A/Vietnam/UT36250-1/2010
		KF001396	KF001399	KF001398	KF001394	A/Cambodia/X0207301/2013

Tablo 3.1 Seçilen influenza A alt tipleri ile influenza B virüsü genleri GenBank erişim numaraları ve suş isimleri (devamı)

		KP702173	KP702176	KP702175	KP702171	A/Egypt/MOH-NRC-7305/2014
Influenza B		CY018757	CY018758	CY018759	AF102005	B/Victoria/2/87
		CY018765	CY018766	CY018767	AF102006	B/Yamagata/16/88
		CY115183	CY115184	CY115185	CY115189	B/Wisconsin/01/2010
		CY232066	CY232069	CY232068	MW619880	B/Colorado/06/2017-like virus
		FJ766840	CY115152	FJ766841	KC866603	B/Brisbane/60/2008
		JX513102	JX513105	JX513104	JX513099	B/Thailand/CU-B6096/2012
		KR073380	KX269998	KR073549	KX269974	B/Malaysia/U1429/2012
		DQ792897	DQ792900	DQ792899	D00004	B/Lee/40
		CY176001	CY176002	CY176003	CY176007	B/New York/1331/2012
		KR073421	KX269999	KR073590	KX269975	B/Malaysia/U2214/2013

Genomu 15.000'den fazla nükleotit dizisine sahip RSV A/B virüsü gen dizisi GenBank veri tabanı kullanılarak elde edilmiş ve işleme uygun forma getirilmiştir. RSV A ve B'nin N geni GenBank erişim numaraları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 RSV A ve B virüsleri N geni GenBank erişim numaraları

Virüs	Erişim Numarası	Virüs	Erişim Numarası
RSV A	KY684705	**RSV B**	MT040084
	KY684704		LC495297
	KY684703		MK749894
	KY684702		LC385005
	KY684701		MG642043
	KY684700		KY924878
	KY684699		MF001042
	KY684698		KY249658
	KY684697		KF893260
	KX383936		AY353550

Genomu 29.000'den fazla nükleotit dizisi içeren SARS-CoV-2, Mayıs 2022 itibari ile GISAID veri tababınında 10 milyondan fazla genom verisine sahiptir. GISAID veri tabanında erişime açık olan "Endişe Verici Varyantlar" olan Omicron (B.1.1.529), Delta (B.1.617.2), Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P1), "İlgi Varyantları" olarak ayırt edilen Lambda (C.37), Mu GH (B.1.621), "Gözlem Altındaki Varyantlar" olan GH/490R (B.1.640) olmak üzere 8 farklı varyantı bulunmaktadır. Kapsamlı mutasyonel analizlerin yapılabilmesi, daha hassas ve yüksek doğruluk değerlerine sahip bir tanı kitinin geliştirilebilmesi adına Kasım 2021 ile çalışmanın yapıldığı tarih olan Şubat 2022 tarihleri arasındaki GISAID veri tabanından elde edilen güncel SARS-CoV-2 verileri kullanılmıştır.

3.1.1.2 Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Panelin tasarımı esnasında elde edilen verilerin işlenmesi adına bir çok yazılıma ek olarak biyoinformatik araçların olduğu internet siteleri kullanılmıştır. İnfluenza virüsünün gen verileri IRD veri bankasından, RSV'nin gen verileri GenBank veri tabanından SARS-CoV-2'nin genomik verileri GISAID veri tabanlarından elde edilmiştir.

İnfluenza A/B virüslerine ait gen bölgelerinin benzerlik oranları karşılaştırarak alt tip ayırt etmeksizin tanısına yönelik geliştirilecek kit içeriğini saptamak için VIRDIC yazılımı ile gen bölgelerinin benzerlik ısı haritası oluşturulmuştur.

Elde edilen RSV ve influenza virüsüne ait gen verileri CLUSTAL Omega ile hizalama işlemine tabi tutulmuştur. SARS-CoV-2 genom verileri ODOTool sayesinde işlemeye hazır hale getirilerek mutasyonel analizleri yapılmış ve hizalama işlemi uygulanmıştır. Hizalama işleminin çıktısını görüntülemek adına Jalview yazılımı kullanılmıştır. Bu sayede primer ve prob setlerinde kullanılmak üzere potansiyel oligonükleotit dizileri seçilmiştir.

Seçilen oligonükleotit dizilerinin konak organizmada, başka bir patojende, fırsatçıda veya kontaminantta amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için BLAST aracı kullanılmıştır. Sonrasında Primer-Blast, ThermoFischer ve AutoDimer yazılımları sayesinde oligonükleotit dizilerinin %GC oranları, T_m değerleri kontrol edilerek multiplekslenme aşamasında dimer ve saç tokası oluşturup oluşturmadığını kontrol edebilmek adına *in silico* kontrolleri bu aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Deneysel Çalışmalar

Potansiyel gösteren oligonükleotit dizileri arasından uygun erime sıcaklığı, %GC oranı, dimer ve saç tokası oluşturmayan multiplekslenebilir kombinasyonlar seçilerek hasta örnekleri üzerinden deneysel çalışmalar yürütülmüştür.

3.1.2.1 Klinik Örnekler

Çalışma kapsamında kullanılan hasta örnekleri Altınbaş Üniversitesi Klinik Araştırmalar Yerel Etik Kurulu'nun 2020/30 numaralı kararı ile Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi tarafından 30 adet SARS-CoV-2 örneği, 13 adet influenza A ve B örneği, 17 adet RSV A ve B örneği olmak üzere toplam 60 adet hasta örneği elde edilmiştir.

3.1.2.2 Kullanılan Sarflar ve Cihazlar

Deneysel yöntemde kullanılmak üzere cDNA sentez kiti olarak A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity) (Katalog No: C03-01-20) (Atlas Biotechnologies, Turkey), RT-qPCR kiti olarak A.B.T.™ 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (without ROX) (Katalog No: Q03-01-01) (Atlas Biotechnologies, Turkey) ve tek adımlı A.B.T.™ 2X One-Step qRT-PCR Probe MasterMix (Katalog No: Q13-01-01) (Atlas Biotechnologies, Turkey), viral RNA izolasyon kiti olarak WizPrep™ Viral DNA/RNA Mini Kit (V2) (Katalog No: W73052-300) (Wizbiosolutions Inc., South Korea) kullanılmıştır. Deneysel aşamada kullanılan ekipman listesi aşağıdaki Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3 Deneyler sırasında kullanılan ekipman listesi

Ekipman	**Marka/Model**	**Kullanım Amacı**
Hassas Terazi	Ohaus	Yatay Elektroforez
Yatay Elektroforez Sistemi	Biorad	
Mikrodalga Fırın	Beko	
Real Time PCR	QIAGEN - RotorGene	Revers Transkripsiyon PCR
Real Time PCR	BioRad	
Vorteks	Heidolph	Hasta örneklerinin RNA izolasyonu
Mikrosantrifüj	Sigma	
UV Visible Spektrofotometre	Thermo Scientific	

3.2 Yöntem

3.2.1 Panel Tasarım ve Oligonükleotit Marker Tespit Çalışmaları

Tanı kiti tasarımında biyoinformatik metodolojileri kullanılarak her bir virüs ve virüs alt tipi için farklı yaklaşımlar ve araçlar kullanılarak analizler gerçekleştirilmiş ve multipleks tanı kitinin içeriği tasarlanmıştır. Çalışma esnasında GISAID veri tabanında erişilebilir olan Omicron (B.1.1.529), Delta (B.1.617.2), Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P1), Lambda (C.37), Mu GH (B.1.621) ve GH/490R (B.1.640) olmak üzere SARS-CoV-2 varyantlarının genomuna ait elde edilen büyük veri ODOTool (UGUREL vd., 2020) ile işlenmeye uygun formata getirildikten sonra elde edilen büyük gen verisine mutasyon analizi ve hizalama işlemi yapılmıştır. Bu sayede SARS-CoV-2 için mutasyonlardan korunmuş gen bölgeleri tespit edilerek tanı kitinin geliştirilmesinde kullanılacak olan hedef gen bölgesi ve potansiyel oligonükleotit dizileri belirlenebilmiştir.

VIRDIC yazılımı ile influenza A virüsü H1N1, H3N2 ve H5N1 alt tipleri ile influenza B virüslerinin HA, NA, M ve PB1 gen bölgeleri analiz edilmiştir. İnfluenza A ve B virüslerinde ortak bölgeler belirlenmiştir. Buna ek olarak, belirlenmiş influenza A alt tipleri ve influenza B virüsleri için seçilmiş genlere veri tabanlarından elde edilen veriler ile CLUSTAL Omega yazılımı kullanılarak hizalama işlemi uygulanmıştır. Bu durumda her gen ve oligonükleotit dizisi virüse ve virüs alt tipine özgü olduğundan hizalama işlemleri Tablo 3.4'de görüldüğü üzere farklı kombinasyonlarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4 Farklı kombinasyonlarda yapılan hizalama işlemi listesi

Hizalama Numarası	Hizalama Yapılan Kombinasyon	Hizalama Numarası	Hizalama Yapılan Kombinasyon
1	H1N1 alt tipi HA geni	12	Seçilen birer adet H1N1, H3N2 ve H5N1 suşu NA geni
2	H1N1 alt tipi M geni	13	H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü HA geni
3	H1N1 alt tipi NA geni	14	H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü M geni

Tablo 3.4 Farklı kombinasyonlarda yapılan hizalama işlemi listesi (devamı)

4	H3N2 alt tipi HA geni	15	H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü NA geni
5	H3N2 alt tipi M geni	16	İnfluenza B virüsü HA geni
6	H3N2 alt tipi NA geni	17	İnfluenza B virüsü M geni
7	H5N1 alt tipi HA geni	18	İnfluenza B virüsü NA geni
8	H5N1 alt tipi M geni	19	Seçilen tüm H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü suşları HA geni
9	H5N1 alt tipi NA geni	20	Seçilen tüm H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü suşları M geni
10	Seçilen birer adet H1N1, H3N2 ve H5N1 suşu HA geni	21	Seçilen tüm H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü suşları NA geni
11	Seçilen birer adet H1N1, H3N2 ve H5N1 suşu M geni	22	Seçilen tüm H1N1, H3N2, H5N1 ve influenza B virüsü suşları PB1 geni

Hizalama işlemi sonrasında virüse ve gene spesifik olacak forward ve revers primer adayları seçilmiştir. Daha sonra NIH Primer-Blast aracı (Ye vd., 2012) ile seçilen her bir primer adayının uygun reaksiyon koşullarında çalışabilmesi için gerekli parametreleri sağladığından emin olunması adına gerekli işlemler uygulanmıştır. Bu sayede potansiyel primer adayları seçilmiştir. Ayrıca belirlenen bu diziler, konak organizmada, başka bir patojen, fırsatçı veya kontaminantta amplifiye olmayacak şekilde tasarlanabilmesi için NCBI Nucleotide BLAST (Altschul vd., 1990) aracı ile *in silico* kontrolleri bu aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadaki konak organizma için BLAST parametreleri olan veri tabanı, organizma, optimizasyon sırasıyla Nucleotide collection (nr/nt), *Homo sapiens* (taxid:9606), son derece benzer sekanslar (megablast) seçilerek işlemler uygulanmıştır. Algoritma parametreleri değiştirilmeden kullanılmıştır. Diğer patojen veya fırsatçıların amplifiye olmadığını doğrulamak için ise organizma parametresi değiştirilerek diğer influenza A alt tipleri, influenza C (taxid:11552) ve D (taxid:1511084), bakteri (taxid:2) seçilmiştir. Buna ek olarak seçilen primer adaylarının saç tokası ve dimer formları oluşturmadığından emin olunması gerekmektedir. AutoDimer yazılımı ve ThermoFisher internet sitesi ile

oligonükleotit dizilerinin %GC oranı, T_m değerleri, saç tokası oluşturma, dimer ve komplementer olma durumları analiz edilmiştir.

Bu analizler doğrultusunda uygun görülen oligonükleotit dizileri ile deneysel aşamaya geçilerek tasarlanan primer çiftleri ve prob dizileri qPCR ile test edilmiştir.

3.2.2 Deneysel Çalışmalar

Hasta numuneleri üzerinde seçilen primer setlerinin denenmesi ve multiplekslenebilmesi için ilk adım olarak Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden alınan nazofaringeal sürüntü örneklerinin genomik materyal (viral RNA) izolasyonu yapılmıştır. İlk aşamada 2 adet COVID-19 hasta örneğinden, sırasıyla birinci örnekten 200 µL ve ikinci örnekten 500 µL, kit yardımı ile RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında 200 µL alınan örneklerden 40 µL, 500 µL alınan örnekten 20 µL elüsyon yapılmıştır. Yapılan izolasyonun yeterli miktarda RNA barındırdığından emin olabilmek için UV Spektrofotometresi ile optik yoğunluk (optical density, OD) yani absorbans değerleri kontrol edilmiştir. OD 260/280 oranı genellikle saf DNA için yaklaşık olarak 1.8; saf RNA için ise yaklaşık olarak 2.0 olarak kabul edilir. OD değerleri 10 µl RNA örneği 990 µl otoklavlanmış su ile dilüe edilerek alınmıştır.

PCR'da kullanılmak üzere saflaştırılan RNA'lardan cDNA sentez kiti ile cDNA'lar elde edilmiştir. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde 10X Reaksiyon Buffer 2 µl, dNTP mix 1µl, Random Hexamer (50µM) 2µl, Reverse Transkriptaz (200U/µl) 1 µl, RNase inhibitör 0.5 µl, RNA örnekleri sırasıyla 1 µl, 4 µl ve 10 µl, RNase içermeyen su ise 20 µl'ye tamamlanacak şekilde kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları, kit içeriğindeki protokolde yer aldığı şekli ile 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk olarak ayarlanmıştır.

Elde edilen cDNA'lardan farklı miktarlarda RNA kullanılarak Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da verilen reaksiyon koşulları ve içeriğinde PCR yapılmıştır.

Tablo 3.5 Farklı RNA örnekleri içeren PCR içeriği

dH_2O	16,25 µl	12,25 µl	7,25 µl
10x PCR Buffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
2mM dNTPmix	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

Tablo 3.5 Farklı RNA örnekleri içeren PCR içeriği (devamı)

Forward Primer	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Reverse Primer	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Kalıp	1 µl	5 µl	10 µl
Taq DNA Polimeraz	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	25 µl	25 µl	25 µl

Tablo 3.6 PCR koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	30 döngü
Bağlanma	50 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	5 dakika	1 döngü

Reaksiyon sonrası PCR ürünü %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Jel görüntüleri elde edildikten sonra bantların görünürlüğünü artırmak için $MgCl_2$ eklenerek reaksiyondaki magnezyum içeriği artırıldı. Kit içeriğindeki 1,5 mM Mg içeriği 3 mM olacak şekilde aşağıda verilen (3.1) hesaplamaya göre reaksiyona 1.5 µl $MgCl_2$ eklendi.

$$M_1.V_1 = M_2 \,.V_2$$
$$2.5\ \mu l\,.\ 15\ \mu M\ +\ V_1.25 =\ 3\,.\ 25 \qquad (3.1)$$
$$V_1 = 1.5\ \mu l$$

Bu durumda $MgCl_2$ yeni PCR içeriği aşağıda verilen Tablo 3.7'de görüldüğü üzere güncellenmiştir.

Tablo 3.7 $MgCl_2$ eklenmiş yeni PCR içeriği

dH_2O	**7,25 µl**	**5,25 µl**	**11,25 µl**
10x PCR Buffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
2mM dNTPmix	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
$MgCl_2$	0	1,5 µl	1,5 µl

Tablo 3.7 $MgCl_2$ eklenmiş yeni PCR içeriği (devamı)

Forward Primer	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Reverse Primer	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Kalıp	10 µl	10 µl	4 µl
Taq DNA Polimeraz	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	25 µl	25 µl	25 µl

Yeni hasta örnekleri ile daha net sonuçlar alabilmek adına RNA konsantrasyon ölçümü kör olarak su kullanılarak NanoDrop cihazı ile ölçümü yapılmış ve sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir. Sonrasında ise Tablo 3.8'de reaksiyon içeriği verilen ve Bekleme 50 °C, 25dk; 2. Bekleme 95 °C, 5dk; Döngü ise 95 °C'de 30sn, 60 °C'de 60sn 45 Döngü olacak şekilde ayarlanmış RT-PCR koşulları ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.8 Qiagen RT-PCR reaksiyon içeriği

For 20 µl PCR Reaction	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
A.B.T.™ 2X One-Step qRTPCR Probe MasterMix	10 µl	1X
Forward Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	1 µM
Fluorescence Labeled Probe	1 µl	1 µM
RNA Kalıbı	Değişken	<500 ng/rxn
RNase-Free Distilled Water	Değişken	-

Bu deneyi takiben alınan sonuçların tutarlılığının kontrol edilmesi adına İstanbul Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi'nde Tablo 3.9'da reaksyion koşulları verildiği üzere farklı bir cihaz ve reaksiyon koşulları ile deney tekrarlanmıştır.

Tablo 3.9 BioRad cihazı RT-PCR koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	52 °C	3 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	1 döngü
Uzama	95 °C	1 saniye	11 döngü

Tablo 3.9 BioRad cihazı RT-PCR koşulları (devamı)

Bağlanma	67 °C	10 saniye	
Denatürasyon	95 °C	1 saniye	34 döngü
Uzama	55 °C	10 saniye	

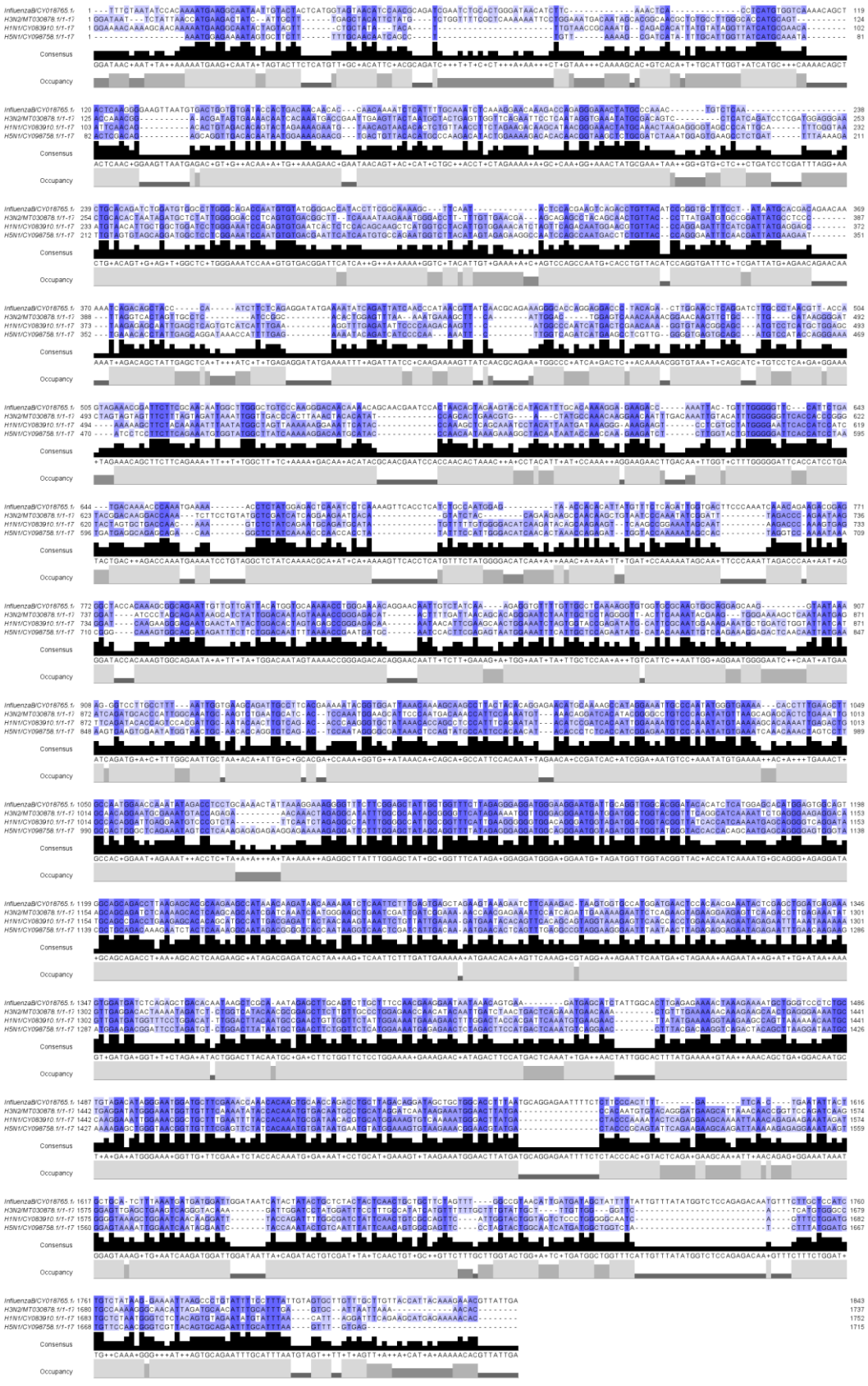
Son qPCR çalışması 3 COVID-19, 3 RSV ve 3 influenza hastası olmak üzere toplam 9 farklı hasta örneği ve 1 negatif kontrol olarak kurgulanmıştır. Hasta örnekleri içerisinde RSV ve SARS-CoV-2 koenfeksiyonu, influenza ve SARS-CoV-2 koenfeksiyonu gösteren hasta örnekleri de bulunmaktadır.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

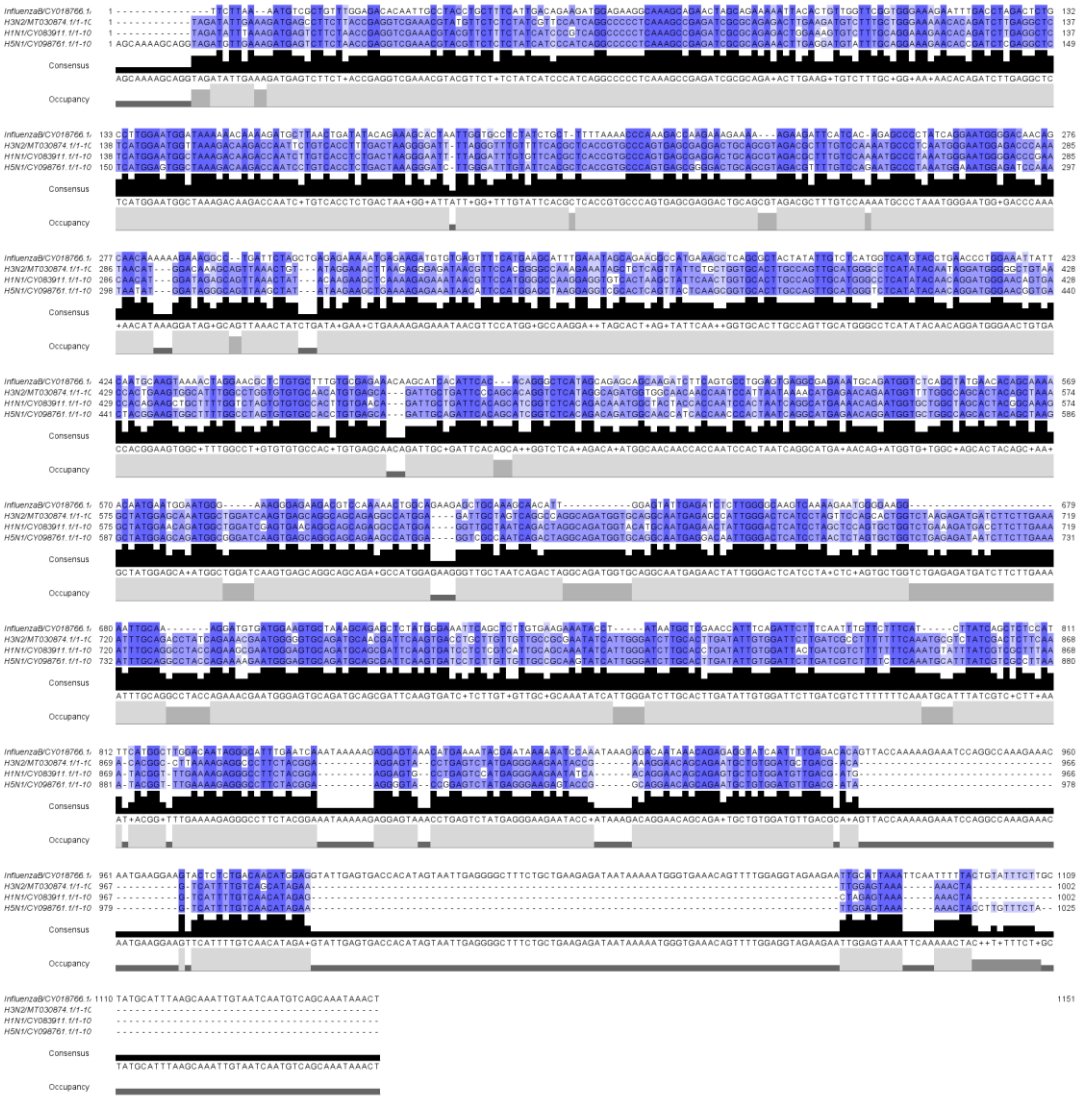
4.1 Bulgular

Literatür taraması ışığında pandemiye sebep olan ve yüksek bulaş riski barından influenza A virüsünün H1N1, H3N2, H5N1 alt tipleri kit tasarımı için kullanılacak alt tipler olarak belirlenmiş ve 10'ar adet suşu seçilmiştir.

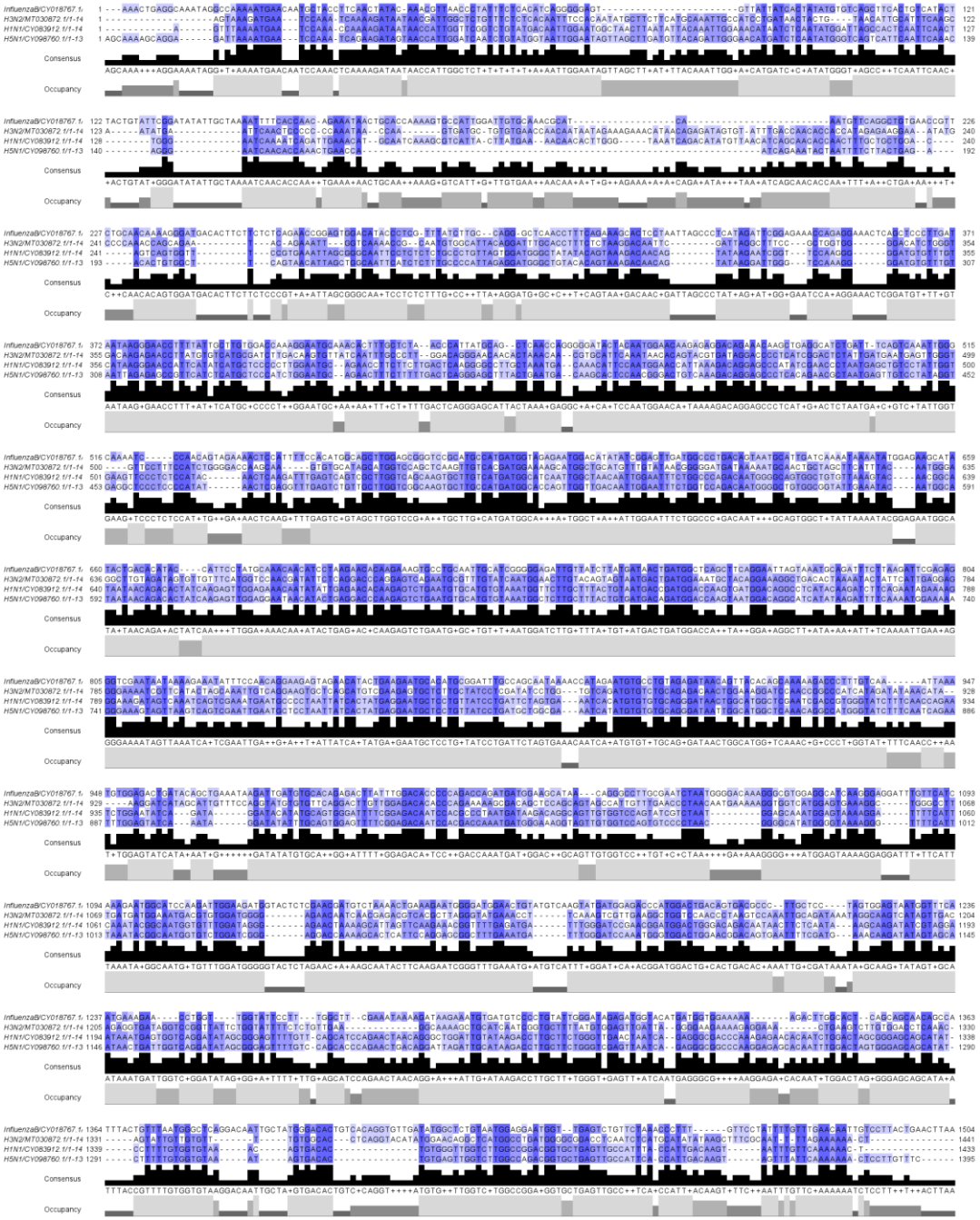
Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te görüldüğü üzere CLUSTAL Omega ile hizalama işlemi yapılan SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüslerinin Jalview ekran görüntüleri verilmiştir. Hizalama işlemi sonrası seçilen primer adaylarının reaksiyon koşullarına uygun olması ve doğru sonuç verebilmesi için, Tablo 4.1'de görüldüğü üzere, %GC oranı, erime sıcaklığı (T_m) gibi değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.1 İnfluenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün HA geninin hizalanması



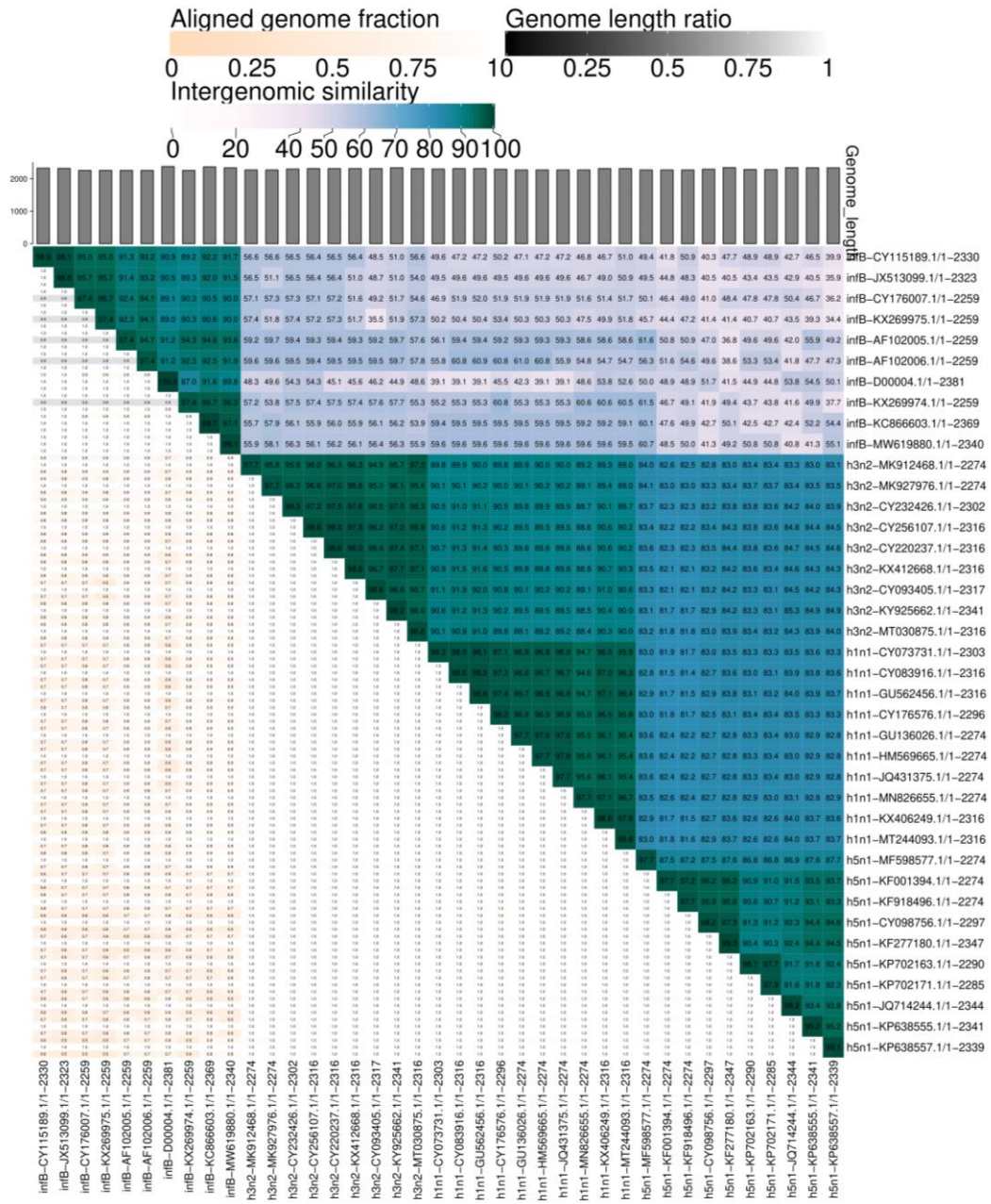
Şekil 4.2 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün M geninin hizalanması



Şekil 4.3 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün NA geninin hizalanması

Nükleotit bazlı intergenomik benzerlik oranlarını ısı haritası şeklinde çıktı alabilen bir yazılım olan VIRDIC (Moraru vd., 2020) aracı kullanılarak oluşturulmuş influenza A ve B virüslerinin HA, NA, M ve PB1 genlerinin benzerlik haritaları, H1N1, H3N2, H5N1 alt tipleri ile influenza B virüsü gen dizilimleri kullanılarak yapılmıştır. Bu haritalara göre en çok benzerlik gösteren gen bölgesinin PB1 olduğu

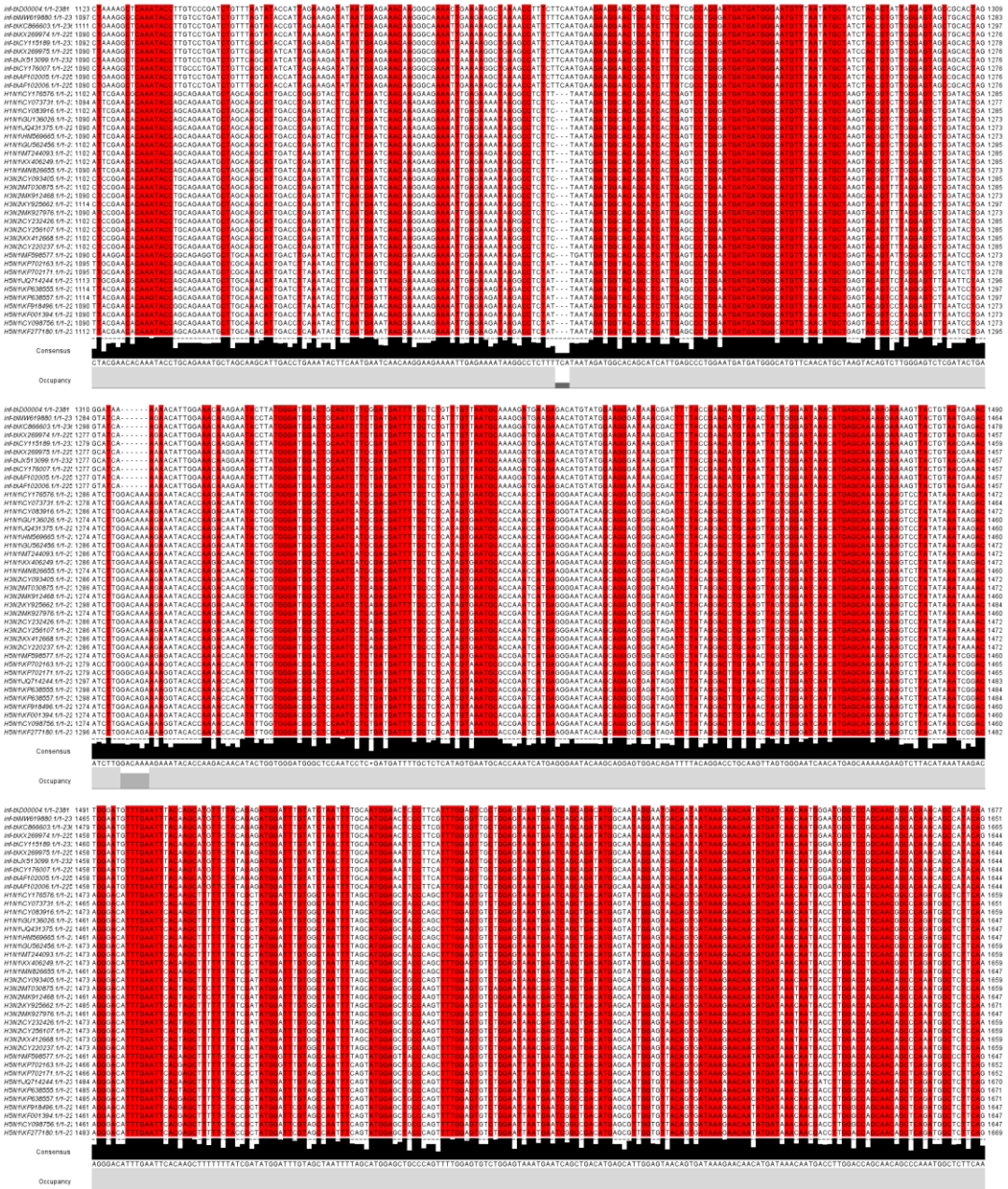
tespit edilmiştir. Diğer ısı haritalarının ekran görüntüleri eklenmemiş olup ortalama benzerlik değerleri, HA geni için %1-%10, NA geni için %0-%3 olup M geni için hiçbir benzerlik bulunamamıştır.



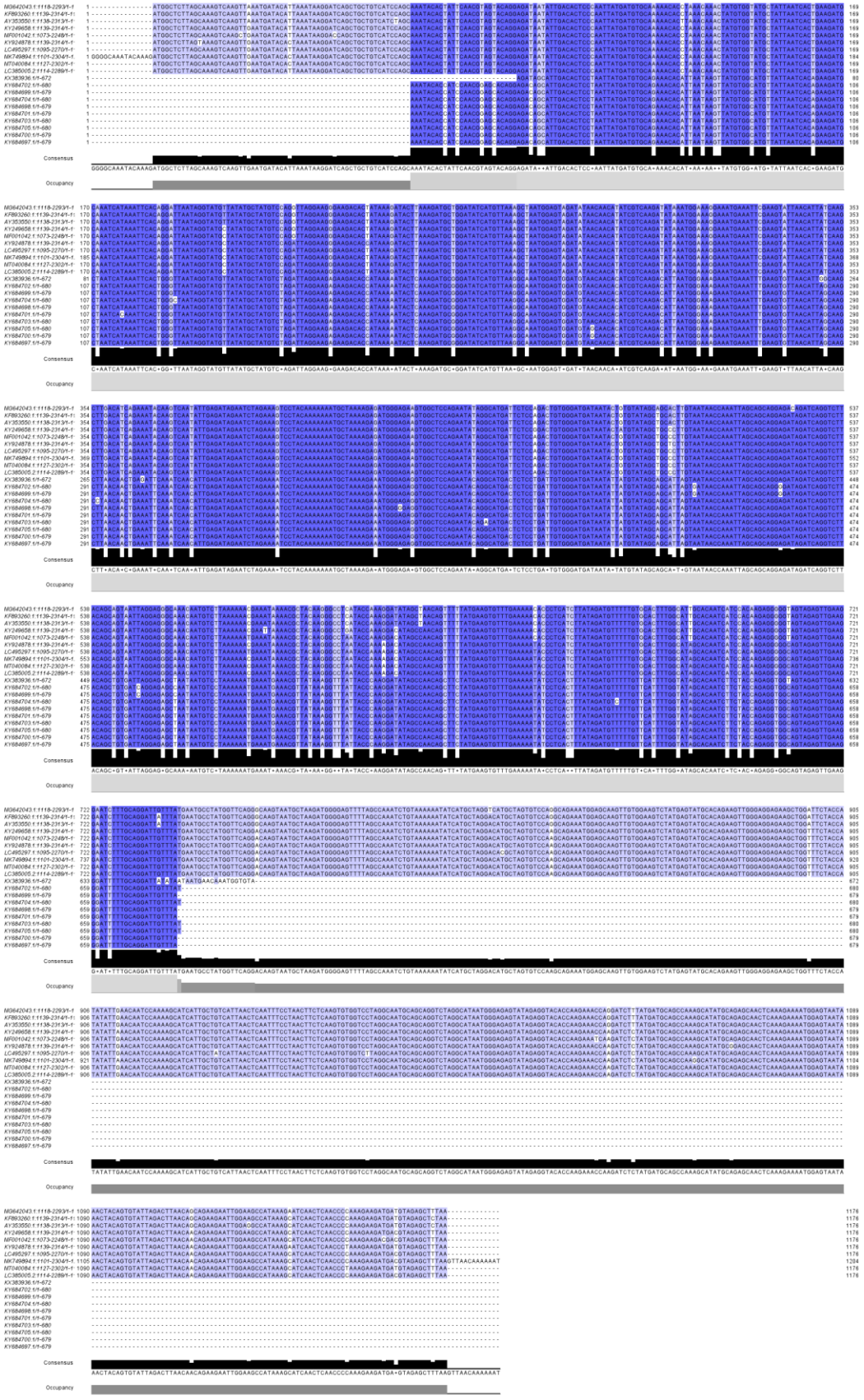
Şekil 4.4 Influenza A ve B virüslerinin PB1 geni benzerlik haritası

Benzerlik haritasında görüldüğü üzere (Şekil 4.4) PB1 geni influenza A ve influeza B virüsü arasında ortalama %40 ile %60 arasında benzerlik oranında korunmuştur. Bu analiz ışığında, Şekil 4.5'te bir kısmı görüldüğü üzere influenza A H1N1, H3N2 ve H5N1 alt tipleri ve influenza B virüslerinin PB1 geni üzerinde bir

hizalama işlemi uygulanmış olup PB1 genine spesifik hedeflenen PCR'da kullanılmak üzere primer ve prob dizileri seçilmiştir. Benzerlik oranının %95 ve üzerinde olduğu bölgeler kırmızı renk ile işaretlenmiştir. Buna ek olarak Şekil 4.6'da görüldüğü üzere RSV'nin qPCR tabanlı tanısı için N geni hedeflenmiş ve hizalama işlemi yapılmıştır.

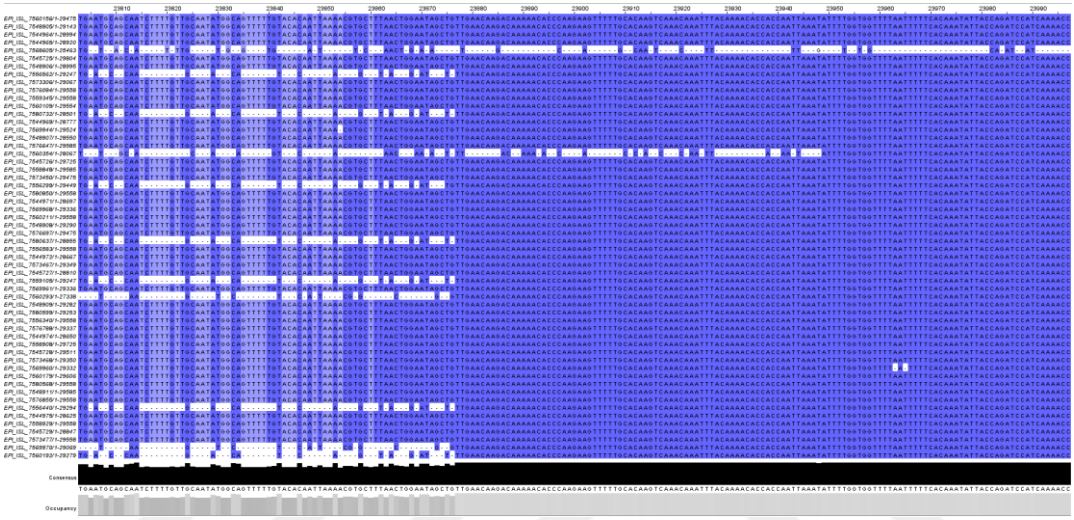


Şekil 4.5 Influenza A alt tipleri ve Influenza B virüsünün PB1 geninin hizalanması



Şekil 4.6 RSV A ve B'nin N geninin hizalanması

ODOTool yazılımı ile SARS-CoV-2 genom verileri GISAID açık erişimli veri tabanından toplu olarak indirilip istenilen formata getirerek gen hizalama işlemine sokulmuştur. Aynı zamanda mutasyonel analizler de bu aşamada gerçekleştirilmiş olup en iyi E geninin korunduğu görülmüştür. Bu analizler sonucunda qPCR'da kullanılmak üzere E geni hedeflenmiş ve oligonükleotitler bu gen üzerinde seçilmiştir. Şekil 4.7'de SARS-CoV-2 genomunun hizalanmış bir bölümünün Jalview yazılımından alınan ekran görüntüsü paylaşılmıştır.



Şekil 4.7 SARS-CoV-2 genomunun hizalanması

Yukarıda belirtilen koşullar göz önüne alınarak elde edilen diziler arasında biyoinformatik araçlar yardımı ile yapılan SARS-CoV-2, influenza A/B, RSV A/B virüsleri genom analizleri sonucunda her bir virüs için forward primer, revers primer ve prob dizileri olmak üzere Tablo 4.1'de görüldüğü üzere toplam 78 adet potansiyel oligonükleotit dizisi primer çiftleri seçilirken oligonükleotitlerin komplementerlik göstermeme, saç tokası oluşturmama, birbirine yakın en optimum T_m değerlerine sahip çiftler belirlenip deneysel aşamaya geçilmiştir.

Tablo 4.1 Potansiyel oligonükleotit dizileri, %GC oranları ve erime sıcaklıkları

Dizi Numarası	Oligonükleotit Dizisi	%GC Oranı	Erime Sıcaklığı (T_m)
dizi_1	TTCTCCTGCTAGAATGGCTG	50.0	62.5
dizi_2	CTGATTAGTTCCTGGTCCCC	55.0	62.7
dizi_3	ATCTGCTGCTGAGGCTTCTA	50.0	62.3
dizi_4	AAGACGGCATCATATGGGTT	45.0	63.5
dizi_5	CAGCCATTCTAGCAGGAGAA	50.0	62.5
dizi_6	CAAGGAACAACATTGCCAAA	40.0	63.9
dizi_7	AAAGACGGCATCATATGGGT	45.0	63.5

Tablo 4.1 Potansiyel oligonükleotit dizileri, %GC oranları ve erime sıcaklıkları (devamı)

dizi_8	AAGCCTTTTGGCAATGTTGT	40.0	63.7
dizi_9	GCAATCCTGCTAACAATG	44.4	57.3
dizi_10	GCTACTACCGAAGAGCTACC	55.0	57.8
dizi_11	AACCCATATGATGCCGTCTT	45.0	63.5
dizi_12	CTCAGTCCAAGATGGTATTT	40.0	56.2
dizi_13	ACACTAGCCATCCTTACTGC	50.0	59.0
dizi_14	AGACCAGAAGATCAGGAACTC	47.6	59.4
dizi_15	CGTACTGCTGCAATATTGTTA	38.1	58.5
dizi_16	ATTCTATGTCTGGTTTTCG	36.8	54.7
dizi_17	TGACCTAAGGGAGG	57.1	49.0
dizi_18	ACACTAATAGATGCTCTATTG	33.3	50.9
dizi_19	ATTCTATGTCTGGTTTTCGC	40.0	58.8
dizi_20	CTCCATCGAGGATCTG	56.3	55.1
dizi_21	ATGCAGTACCAAACGGAA	44.4	59.7
dizi_22	GGCTTGTAGATAGTGTTGTT	40.0	54.0
dizi_23	ACAATGGCTACTGCTG	50.0	53.1
dizi_24	TATCCTGGTGTCAGATGT	44.4	53.9
dizi_25	CACAATAAGCTCGCAAA	41.2	56.4
dizi_26	GTATGATTATCCAATCCATCA	33.3	56.8
dizi_27	CCTGCTTAGACAGGATA	47.1	51.2
dizi_28	TCTATTGGCACTTGAGAG	44.4	54.2
dizi_29	AACCAGACCTGCTTAGA	47.1	53.5
dizi_30	GATTTGCCAGCAATAA	37.5	53.2
dizi_31	CTTGACATACAGTTCC	43.8	45.5
dizi_32	ATGATGGAAGCATAACAG	38.9	53.8
dizi_33	GCAAGTCAAAAGAATGGG	44.4	58.8
dizi_34	GTTTCTTTGGCCTGGA	50.0	57.6
dizi_35	TTCATGGCTTGGACAATA	38.9	58.1
dizi_36	AATGATGCAATCCAC	40.0	50.0
dizi_37	CTTCTCTCTCTTTGAGGA	44.4	52.2
dizi_38	GTAACTGCAACACCAAGTGT	45.0	58.2
dizi_39	GCAATCAAAGCGTCATTAC	42.1	58.8
dizi_40	ACCACTGACTGTCCAGC	58.8	57.6
dizi_41	CAGACATATGTTAACATCAG	35.0	50.8
dizi_42	GATATCATGTTAAGGCAA	33.3	51.2
dizi_43	ACTAATGCTGCTATACATAA	30.0	49.9
dizi_44	ATTGAGATAGAATCTAGAAA	25.0	47.7
dizi_45	TATCATGCTAGGTCATGC	44.4	55.0
dizi_46	GTTGCTCTGCATATGCT	47.1	55.2
dizi_47	ACTCAATTTCCTAACTTCTC	35.0	52.2
dizi_48	AGTTGCATGGGTCTCATAT	42.1	57.5
dizi_49	ATAGCCTTAGCTGTAGTGCT	45.0	55.6
dizi_50	CAGCACAGGTCTCATAG	52.9	52.5
dizi_51	TTCTAACCGAGGTCGAAA	44.4	58.9
dizi_52	ATATGAGACCCATGCAACT	42.1	57.5
dizi_53	TTCACGCTCACCGTGCCCAG	65.0	74.3

Tablo 4.1 Potansiyel oligonükleotit dizileri, %GC oranları ve erime sıcaklıkları (devamı)

dizi_54	ACAACATTCCCTTATACTGG	40.0	56.1
dizi_55	TCATTGTCTTCGGGTAATGG	45.0	62.7
dizi_56	TCATGGAACGGGAACAGG	55.6	65.2
dizi_57	ATGATGATGGGCATGTT	41.2	57.6
dizi_58	AAACATGCTGGTAAATTCAA	30.0	57.7
dizi_59	ATAAACATGAGCAAAAAGAA	25.0	54.7
dizi_60	ATAACCAAATTAGCAGCAGG	40.0	58.8
dizi_61	TTCAACTCTACTGCCACCTCT	47.6	61.0
dizi_62	TATGAAGTGTTTGAAAAA	22.2	49.2
dizi_63	CACTCCTAATTATGATGTGCA	38.1	58.2
dizi_64	CCTGCTGCTAATTTGGTTAT	40.0	58.8
dizi_65	GCTAAAAGAGATGGGAGAAGTGG	47.8	64.3
dizi_66	TACAGATGCAACCAACAACA	40.0	60.7
dizi_67	TTACATGCTTGCTCCACTC	47.4	59.5
dizi_68	TTTGTCTGTGATGCTGAATT	35.0	58.8
dizi_69	GAGTGGAGCAAGCATGTAA	47.4	59.5
dizi_70	GTAAGGACTAAGTAAACTTCAG	36.4	51.6
dizi_71	ACTATATTAAAAACTTATGT	15.0	42.4
dizi_72	ATGGACTACGATGCGGT	52.9	59.6
dizi_73	CATAGCCTCAAGCATGCT	50.0	59.7
dizi_74	AGTGTTGCAACCTTTTTGAG	40.0	59.9
dizi_75	ATTTACTCCAGCAACCCCAA	45.0	63.6
dizi_76	GACAACACTAAGTGGAATGA	40.0	55.6
dizi_77	TTCTTTTTGCTCATGTTGAT	30.0	57.9
dizi_78	ATGATGATGGGCATGTTCAAC	44.4	59.8

Her bir virüs için potansiyel primerler ve probe dizileri arasında multiplekslenme kabiliyeti en yüksek Tablo 4.2'de verilen toplam 9 adet dizi seçilmiş ve deneysel çalışmalar bu diziler üzerinden yürütülmüştür.

Tablo 4.1'de verilen 78 adet oligonükleotit içerisinde influenza A virüsü H1N1, H3N2, H5N1 alt tiplerine spesifik HA, NA ve M genlerini; influenza B virüsü HA, NA ve M genlerini hedef alan primer dizilerini içermekle birlikte influenza virüsü alt tiplerini ayırt edebilecek şekilde seçilmiş forward ve revers primerler ile prob dizileri bulunmaktadır. Ancak Tablo 4.2'de verilen 9 oligonükleotit dizisi influenza virüsü A/ B ile RSV A/B alt tiplerini ayırt etmeksizin ortak tanılamasına yönelik seçilen oligonükleotitlerdir.

Tablo 4.2 Deneysel aşamada kullanılan primer ve prob setleri

Virüs (Hedef Gen)	Dizi Adı	Dizi
İnfluenza A ve B (PB1)	Forward Primer	5’ GACAACACTAAGTGGAATGA 3’
	Reverse Primer (Negative sense)	5’ TTCTTTTTGCTCATGTTGAT 3’
	Prob	5'*Cy5-ATGATGATGGGCATGTTCAAC-BBQ650*3'
RSV A ve B (N)	Forward Primer	5’ CACTCCTAATTATGATGTGCA 3’
	Reverse Primer (Negative sense)	5’ CCTGCTGCTAATTTGGTTAT 3’
	Prob	5'*TexasRed-GCTAAAAGAGATGGGAGAAGTGG-BHQ2*3'
SARS-CoV-2 (E)	Forward Primer	5’ ACACTAGCCATCCTTACTGC 3’
	Reverse Primer (Negative sense)	5’ AGACCAGAAGATCAGGAACTC 3’
	Prob	5'*FAM-GTGCGTACTGCTGCAATATTGTTA-BHQ1*3'

Bu primer setleri ile hedeflenen genlerdeki amplikon uzunlukları SARS-CoV-2 için 139, RSV için 420, influenza virüsü için 530 olarak hesaplanmıştır.

Hasta örneklerinden izole edilen viral RNA’nın UV spektrofotometre cihazı ile 230, 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri aşağıdaki Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3 İzole edilen RNA’nın OD değerleri

OD	1.Örnek (200)	1.Örnek (500 µl)	2.Örnek (200 µl)	2. Örnek (500 µl)
230 nm	0,073	0,179	0,046	0,011
260 nm	0,012	0,070	0,001	0,001
280 nm	0,011	0,052	0	0,003
260/280	1,09	1,35	-	0,33

Değerlerin elde edilmesinden sonra µg/ml içerisindeki RNA miktarı hesaplaması aşağıdaki formüle (4.1) göre yapılmıştır. (1 OD_{260} Birim = 40 µg/ml ssRNA)

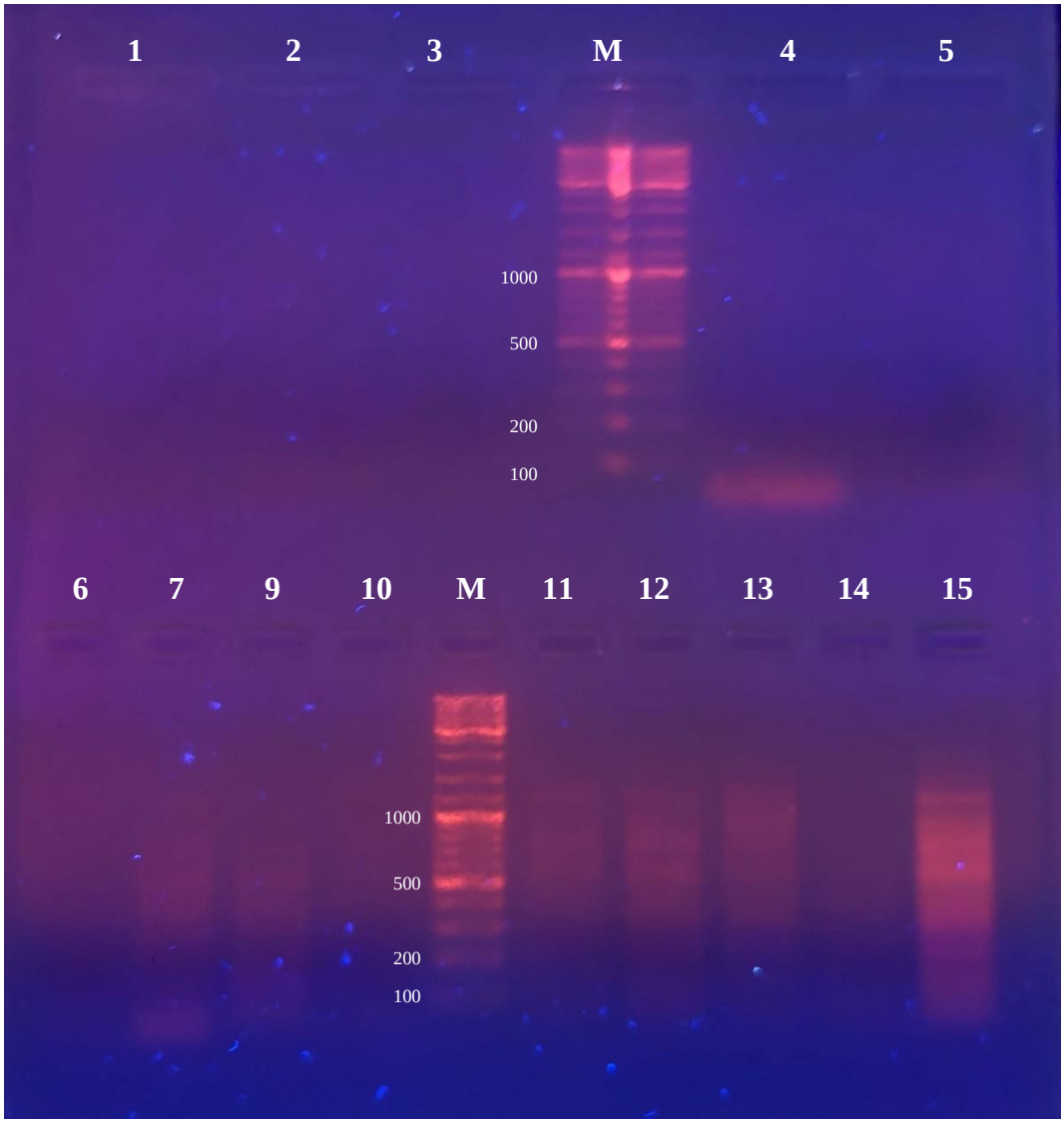
$$\mathrm{OD}_{260} \times Df \times Sk = \mu\mathrm{g/ml\ ssRNA} \quad (4.1)$$

$$0{,}012 \times 100 \times 40 = 48\ \mu\mathrm{g/ml\ ssRNA} \quad (4.2)$$

$$0{,}070 \times 100 \times 40 = 280\ \mu\mathrm{g/ml\ ssRNA} \quad (4.3)$$

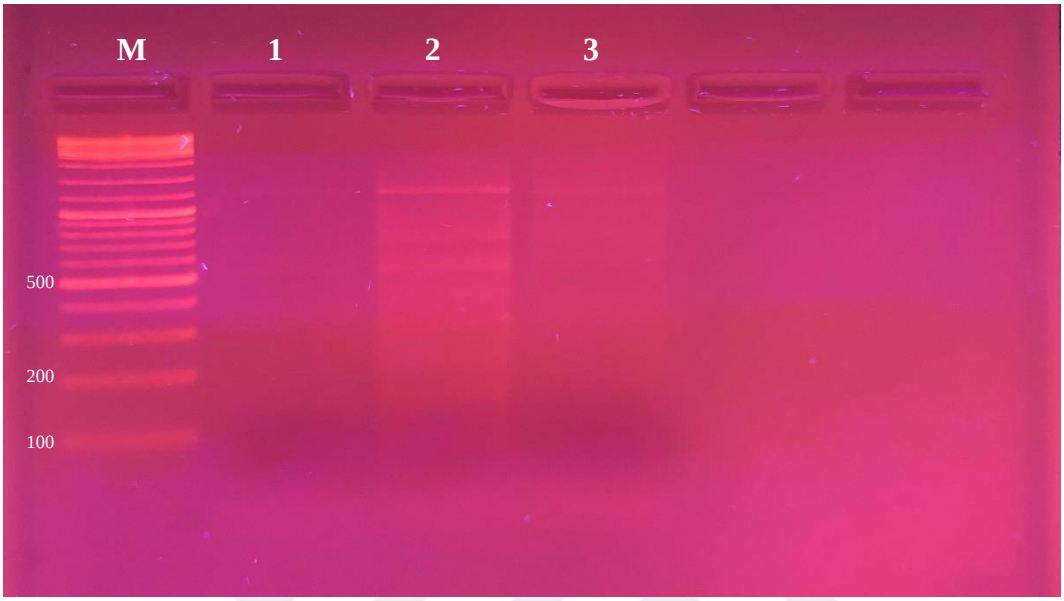
Dilüsyon Faktörü (*Df*) 100, RNA için standart katsayı (*Sk*) 40'tır. 200 µl örnek için hesap sonucu (4.2), 500 µl örnek için hesap sonucu (4.3)'te görülmektedir.

PCR sonrası %1'lik agaroz jelde 1 saat yürütülmüş örneklerin jel görüntüsü Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8 İlk PCR sonucu jel görüntüsü (M: Marker; 1, 2, 3: 500 µl örnekten 1 µl PCR; 4, 5, 6: 500 µl örnekten 4 µl PCR; 7, 8, 9: 200 µl örnekten 1 µl PCR; 10, 11, 12: 200 µl örnekten 1 µl PCR; 13, 14, 15: 200 µl örnekten 10 µl PCR)

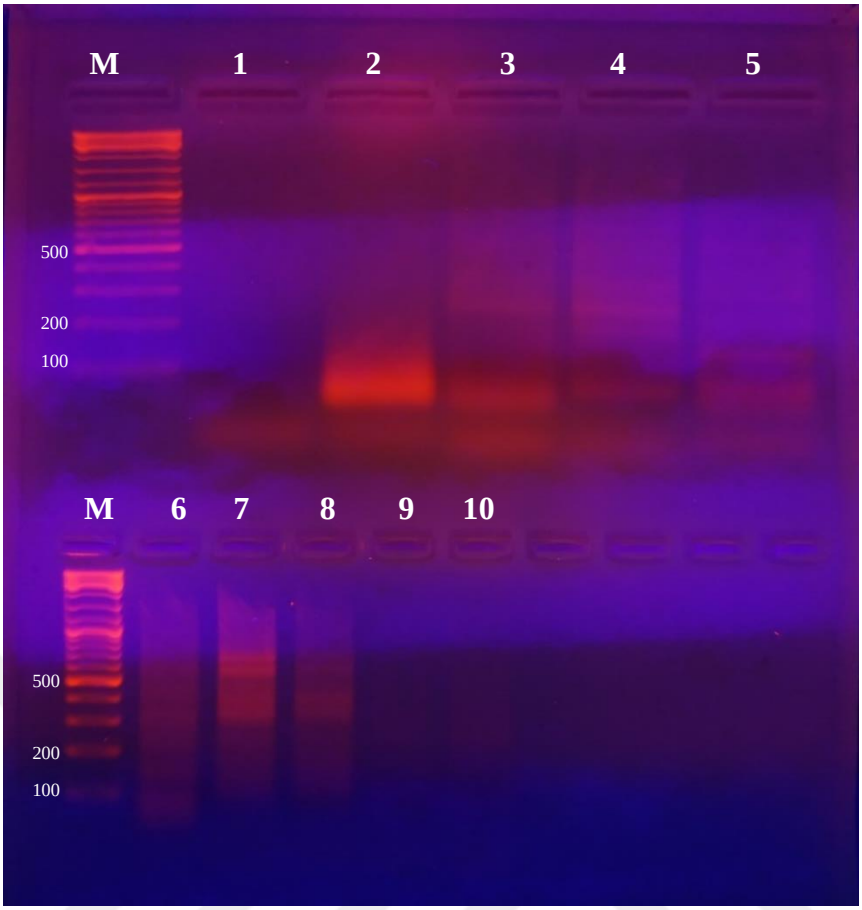
8 numaralı reaksiyon PCR sürecinde tüpün cihaz içinde kapağının açılması sonucu reaksiyon tamamlanamamış ve dolayısıyla jelde yürütülememiştir. Bantların jel üstünde daha net görülebilmesi adına $MgCl_2$ eklenen PCR'ın agaroz jelde yürütülmüş görünütüsü Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9 Final konsantrayonu 5mM $MgCl_2$ olan PCR sonucu jel görüntüsü

Şekil 4.9'da M, marker ifade ederken 1 numara kit içeriğindeki tampon ile hazırlanan örnekten 10 µl kalıp ile oluşturulan PCR, 2 ve 3 numaralı örnekler 3 mM final $MgCl_2$ konsantrasyonuna sahip sırasıyla 10 µl ve 4 µl kalıp ile oluşturulan PCR sonuçlarının agaroz jelde yürütülmüş görüntüsü verilmiştir.

İçlerinde influnza B'nin de olduğu yeni hasta örnekleri ile oluşturulan PCR'ın agaroz jel ekran görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10 Agaroz jel (M: Marker; 1, 2: RSV; 3, 4: İnfluenza A; 5, 6: SARS-COV-2; 7,8: RSV; 9, 10: İnfluenza B)

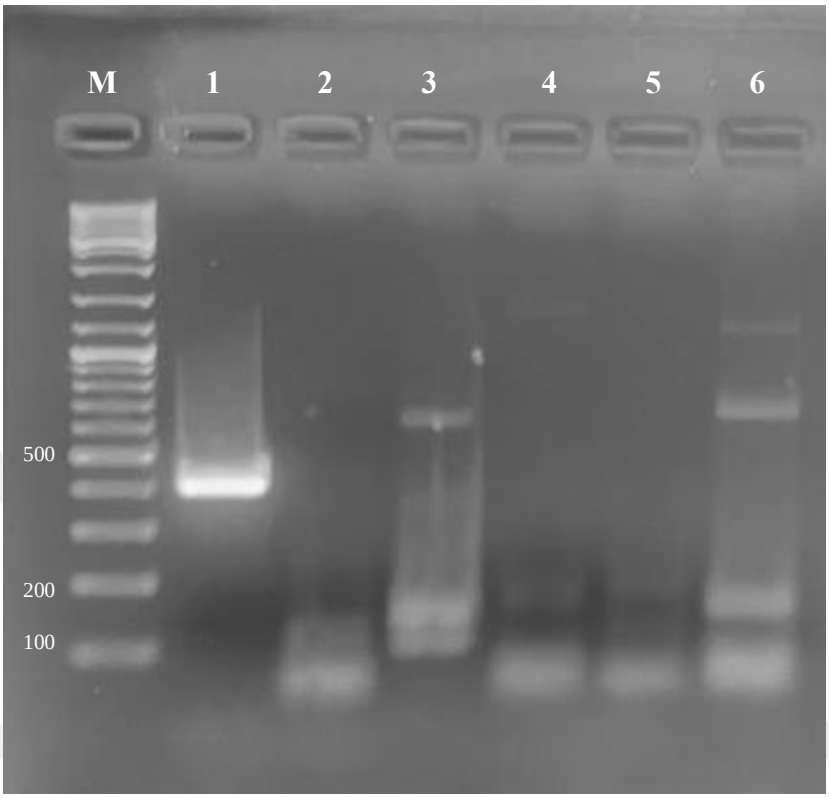
Kör olarak su seçilen RNA örneklerinin NanoDrop cihazı ile ölçüm Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4 RNA örneklerinin NanoDrop cihazı ile ölçüm sonuçları

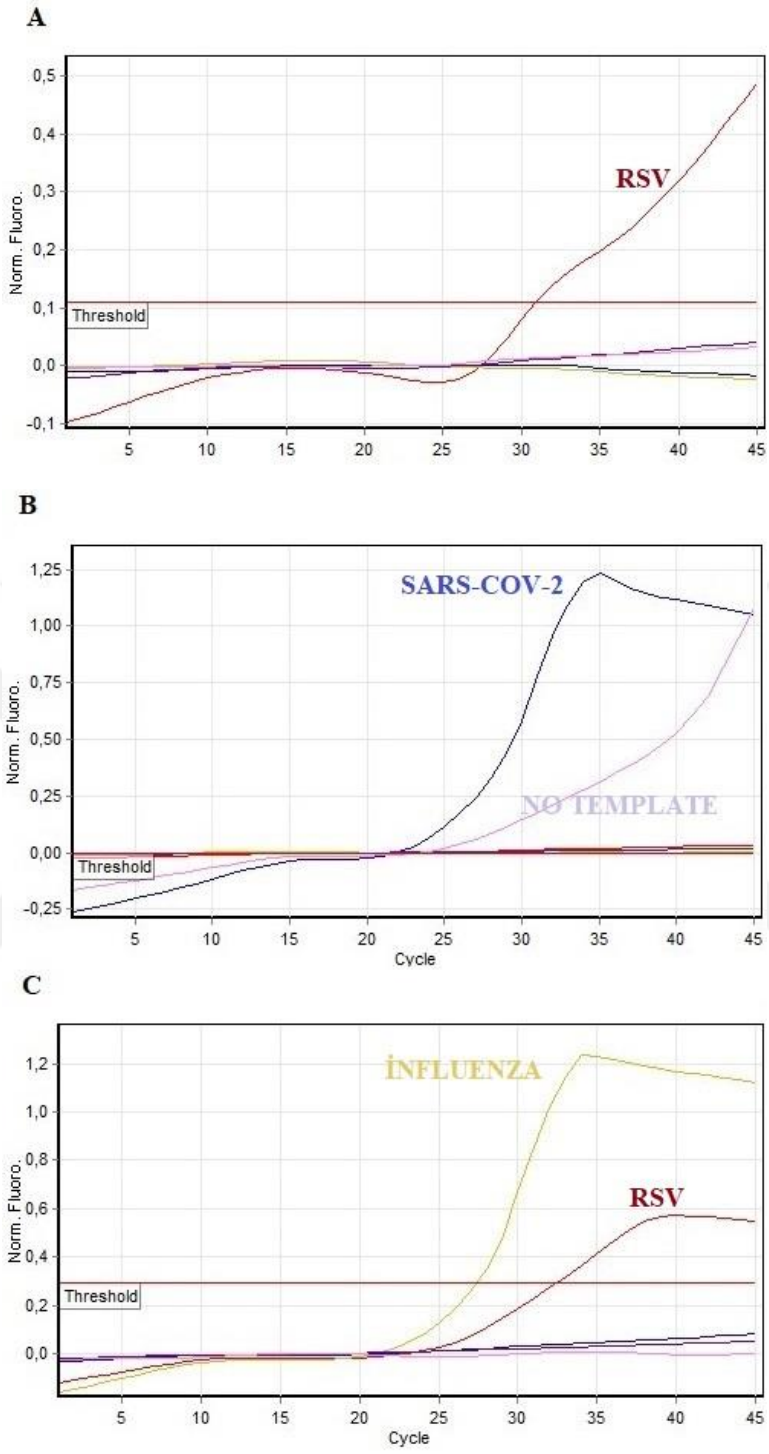
OD	RSV	İnfluenza	SARS-CoV-2
230 nm	04,405	5,003	4,757
260 nm	0,494	0,735	0,785
280 nm	0,303	0,511	0,515
260/280	3,18	2,70	2,67
Konstantrasyon (ng/ µl)	11,19	14,24	17,27

Örneklerin konsantrasyon değerleri hesaplandıktan sonra aşağıda verilen RT-PCR koşullarında reaksiyon oluşturulmuş ve sonuçlar Şekil 4.11'de verilmiştir

Konvansiyonel PCR ile her bir virüse özgü primerlerin ayrı ayrı reaksiyonlarda çalıştığı gözlendiğinden bir sonraki aşama olarak gerçek zamanlı PCR ve multipleks PCR denemeleri yapılmıştır.



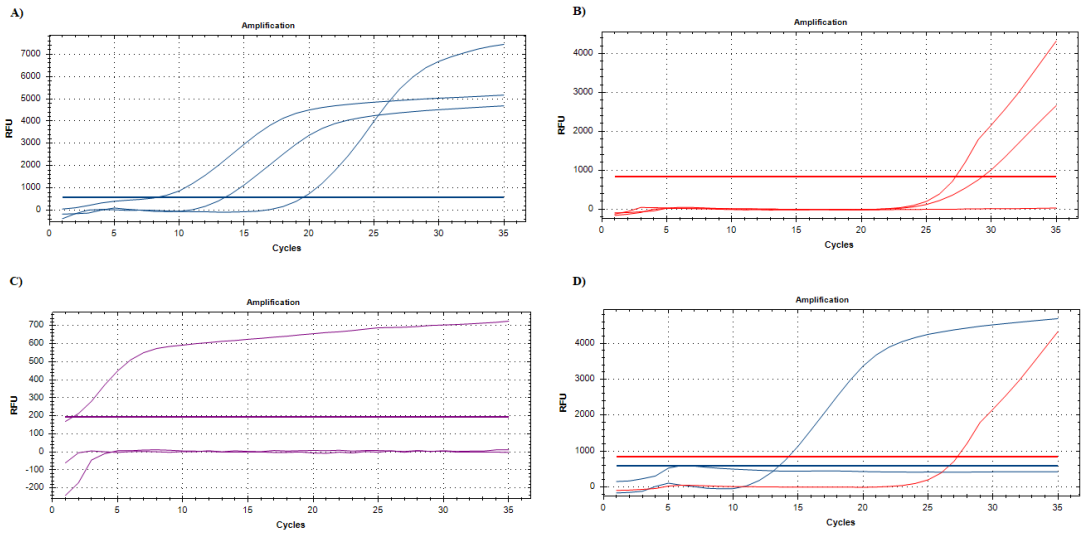
Şekil 4.11 Konvansiyonel PCR'ın agaroz jel görüntüsü (1: RSV, 2: İnfluenza, 3: COVID-19, 4: RSV, 5: İnfluenza, 6: COVID-19)



Şekil 4.12 RT-PCR sonuçları (A: Turuncu Kanal, B: Yeşil Kanal, C: Kırmızı Kanal)

Şekil 4.12'de görüldüğü üzere turuncu kanalda (Şekil 4.12.A) C_t değeri 30, yeşil kanalda (Şekil 4.12.B) SARS-CoV-2 için C_t değeri 21, DNA kalıbı olmayan negatif kontrol (kalıpsız) için C_t değeri yaklaşık olarak 23, kırmızı kanalda (Şekil 4.12.C)

RSV için C_t değeri 32, iken influenza için C_t değeri 27 olarak RT-PCR çıktısı elde edilmiştir.



Şekil 4.13 RSV, SARS-CoV-2 ve influenza virüsü ile enfekte hasta örnekleri üzerinde yapılan RT-PCR çalışması (A: SARS-CoV-2, B: RSV, C: İnfluenza, D: SARS-CoV-2 ve RSV)

SARS-CoV-2 ile enfekte hasta örnekleri üzerinde yapılan çalışmada (Şekil 4.13, A) FAM kanalında üç örneğin verdiği C_t değerleri sırasıyla 8, 14 ve 20 şeklindedir. TexasRed kanalında (Şekil 4.13, B) üç RSV hastası örneği üzerinde yapılan gerçek zamanlı qPCR çalışması sonucunda SARS-CoV-2 ile enfekte hasta örneğinden bir C_t değeri alınamamıştır. Diğer iki örnek ise yaklaşık olarak 27, ve 28 C_t değerlerine sahiptir. Şekil 4.13, C'de görüldüğü üzere Cy5 kanalında üç influenza hastası örneği üzerinde yapılan çalışmada ise C_t değerleri elde edilememiştir. Şekil 4.13, D grafiğinde 27 C_t değerindeki RSV ve 14 C_t değerinde SARS-CoV-2 örnekleri aynı anda gösterilmiştir.

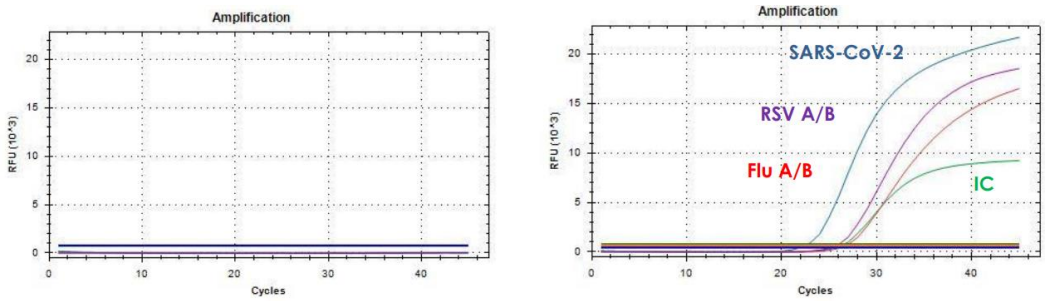
4.2 Tartışma

Literatür ve ticari kitlerin içerikleri incelendiğinde SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüslerinin qPCR ile tanısına yönelik farklı çalışmalarda farklı gen bölgelerinin hedeflendiği açıkça görülmektedir. Bu çalışmada geliştirlen kit içeriğinde kullanılmak üzere hedeflenen gen bölgeleri biyoinformatik metodolojileri ile yapılan analizler göz önüne alınarak seçilmiştir.

İnfluenza A virüslerinin geçmişte H1N1, H2N2 ve H3N2 alt tiplerinin pandemilere ve halen sezonluk epidemilere sebep oldukları bilinmektedir. Ayrıca H5N1 alt tipi insanlarda yüksek patojenite gösteren bir alt tip olarak bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında tanı kiti tasarımında influenza A virüsleri için alt tipler H1N1, H3N2 ve H5N1 olarak seçilmiştir. Şekil 2.2'de görüldüğü üzere influenza B virüslerinin insanlarda görülmesinde gözle görünür düşüş sebebi ile kit içeriği, influenza A alt tipleri ve influenza B olarak ayırt etmeksizin, ortak tanısını koymaya yönelik olarak tasarlanmıştır. Biyoinformatik analizler doğrultusunda şekil 4.4'te görüldüğü üzere influenza virüsünün PB1'geni influenza A ve influenza B virüslerinde birbirlerine en çok benzerlik gösteren gen bölgesi olarak görülmektedir. Bu sebeple influenza A/B virüsleri ortak tanısına yönelik hedef gen olarak PB1 geni hedeflenmiştir.

Benzer şekilde SARS-CoV-2 ve RSV için yapılan farklı çalışmalarda farklı gen bölgeleri hedeflenmiştir. SARS-CoV-2 için hedeflenen genler sıklıkla Orf1a/b ve N bölgeleri olmasına karşın en sık mutasyon görülen bölgeler olarak da yapılan analizler sonucu ortaya konmuştur. Bu sebeple, bu çalışmada, yaptığımız analizler ve literatür taraması sonucu SARS-CoV-2 için en düşük mutasyonel değişim gösteren E geni, RSV genleri arasında en çok korunan gen bölgesi olan N geni hedef gen olarak seçilmiştir.

VIASURE Kiti, SARS-CoV-2 için 20 genom kopyası/ reaksiyon, Flu A için 5 genom kopyası/ reaksiyon, Flu B için 20 genom kopyası/reaksiyon ve RSV için 10 genom kopyası/ reaksiyon tespit limitine (LoD) sahip olmakla birlikte Bio-Rad CFX96 RT-PCR sisteminde yürütülen örneklerin sonuçları aşağıdaki şekilde verilmiştir. (*VIASURE SARS-CoV-2 Flu RSV - JANT PHARMACAL CORPORATION,* t.y.). VIASURE Kiti için net dir C_t değeri verilmemesine karşın Şekil 4.13 ile Şekil 4.14 karşılaştırıldığında SARS-CoV-2 için geliştirmiş olduğumuz oligonükleotit dizileri bazı ticari tanı kitlerinden daha erken pik verebilmektedir.



Şekil 4.14 VIASURE tanı kiti RT-PCR sonuçları (*VIASURE SARS-CoV-2 Flu RSV - JANT PHARMACAL CORPORATION*, t.y.)

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen primer setleri için yürütülen konvansiyonel PCR çalışmaları, her üç virüs için de oligonükleotit dizilerinin ayrı ayrı çalışabildiğini göstermektedir. Her primer ve prob setlerinin multipleks çalışıp çalışmadığını kontrol etmek adına sonraki aşamada RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hasta örnekleri çalışmanın yapıldığı günlerden daha önce elde edilerek saklandığı ve viral yükleri bilinmediği göz önüne alındığında agaroz jel görüntülerinin çok net görülmemesi beklenen olası bir sonuçtur.

SARS-CoV-2'nin E geni için hedeflenen primer ve probe seti her iki RT-PCR'da da iyi sonuçlar vermiştir. İnfluenza virüsünün PB1 geni için hedeflenen oligonükleotit dizileri BioRad cihazı ile gerçekleştirilen RT-PCR'da sonuç vermemesine karşın Qiagen cihazı ile gerçekleştirilen RT-PCR'da (Şekil 4.12.C) reaksiyon beklendiği gibi çalışmıştır. Her iki RT-PCR denemesinde de RSV'nin N geni için hedeflenen primer ve prob setlerinin beklenen değerlerde pik vermesi ile bu oligonükleotit dizilerinin istenildiği şekilde çalıştığı, primerlerin kalıba, probların amplikona bağlandığı söylenebilir. Ancak Şekil 4.13.B'de görüldüğü üzere SARS-CoV-2 ile koenfeksiyon gösteren hasta örneğinde bir değer elde edilememesi oligonükleotit dizisinin multipleks çalışabilmesi adına optimizasyon gerekliliği doğurmaktadır. Şekil 4.12.B'de görüldüğü üzere DNA kalıbı içermeyen negatif kontrol örneğinin pik göstermesi kontaminasyon kaynaklı veya enzim kaynaklı bir hata olabileceğini göstermektedir.

5
SONUÇ

5.1 Sonuç

COVID-19'un gelecekte influenza sebepli grip gibi mevsimsel bir hastalığa dönüşebileceği literatürde tartışılmaktadır. Buna ek olarak DSÖ'nün 5 Mayıs 2023'te SARS-CoV-2 için küresel acil durumun sona erdiğini bildirmiştir. Ayrıca SARS-CoV-2, influenza virüsü ve RSV'nin hasta bireyi aynı anda enfekte ederek koenfeksiyon gösterebildiği bilinmektedir. Doğru tedavi sürecinin uygulanması, hastalık seyrinin kontrol altına alınması ve immünitenin sağlanması gibi konularda hassas ve etkin bir tanılama süreci hayati önem taşımaktadır. Bu hastalıklara karşı uygulanacak olan tedavinin seçimi ve etkinliği için doğru tanılamanın oldukça önemli olduğu göz önüne alındığında *in silico* temelli, yüksek doğruluk ve hassasiyete sahip multipleks bir tanı kiti geliştirmek adına biyoinformatik metodolojileri kullanılarak bir multipleks tanı paneli geliştirmek hedeflenmektedir.

Bu çalışmada yaklaşık olarak 30kb genoma sahip SARS-CoV-2, yaklaşık olarak 13kb genoma sahip infleunza A/B virüsü ve 15kb'dan fazla nükleotit dizisine sahip RSV A/B virüslerinin GISAID, Influenza Research Database (IRD) ve GenBank gibi açık erişimli veri bankalarından erişilen en güncel SARS-CoV-2 genom verileri ile sistematik olarak seçilmiş influenza A/B ve RSV A/B virüsü gen ve genom verileri analiz edilmiştir. Bu bağlamda, oldukça benzer semptomlar gösteren SARS-CoV-2, RSV A/B ve influenza A/B virüslerine özgün oluşturulmuş, prob ve primer setlerinden oluşan 78 adet multiplekslenebilir oligonükleotit dizisi belirlenmiştir. Belirlenen dizilerden hassaslık, özgünlük ve doğruluk değerleri en yüksek olabilecek 9 potansiyel dizinin hasta örnekleri ile deneysel çalışmaları yapılmıştır. Yapılan konvansiyonel PCR ve RT-PCR çalışmaları sonucunda, SARS-CoV-2, RSV ve influenza virüslerine özgü probların istenen amplikonlara bağlanma gösterdikleri, primerlerin genom kalıbına bağlanabildiği çıkarımları yapılarak bu oligonüklotit dizilerinin istenen şekilde çalışabildikleri gösterilmiştir.

Farklı cihazlarda yapılan RT-PCR çalışmalarında SARS-CoV-2'nin E geni için hedeflenen primer ve prob setleri 14, 20 ve 21 C_t değerlerinde, RSV'nin N geni hedeflendiği primer ve prob setleri 27, 28 ve 30 C_t değerlerinde, influenza

virüsünün PB1 geni için hedeflenen primer ve prob setlerinin 27 C_t değerlerinde verdiği sonuçlar ileriye dönük çalışmaların yapılması adına ümit vaateden sonuçlardır.

5.2 Öneriler

Çalışmaların ilk aşamada iyi sonuçlar vermesine karşın doğruluk ve hassasiyet değerlerinin artırılması, multipleks reaksiyonların daha optimize ve dengeli sonuçlar verebilmesi, daha düşük C_t değerlerinin elde edilmesi adına bazı optimizasyon çalışmaları ve daha fazla hasta örneği ile akredite bir viroloji laboratuvarında validasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Buna ek olarak, SARS-CoV-2'nin koenfeksiyon gösterebildiği bakteri ve virüs gibi diğer solunum yolu patojenleri için benzer biyoinformatik metodolojileri ve laboratuvar çalışmaları ile kit içeriğine multiplekslenebilir primer ve prob setleri eklenerek tanı kitinin kullanım alanı genişletilebilir.

KAYNAKÇA

1 copy COVID-19/FluA/FluB/RSV qPCR Kit. (t.y.). Geliş tarihi 12 Haziran 2023, gönderen https://clinomicseurope.com/products-and-services/1drop/1copy-covid-19-flua-flub-rsv-qpcr-kit/

ABRYSVO | FDA. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/abrysvo

Al-Hajjar, S. (2012). Laboratory Diagnosis of Viral Disease. Içinde *Textbook of Clinical Pediatrics* (ss. 923-928). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02202-9_75

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

AREXVY | FDA. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/arexvy

Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, *433*(2), 166725. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024

Beigel, J. H., Tomashek, K. M., Dodd, L. E., Mehta, A. K., Zingman, B. S., Kalil, A. C., Hohmann, E., Chu, H. Y., Luetkemeyer, A., Kline, S., Lopez de Castilla, D., Finberg, R. W., Dierberg, K., Tapson, V., Hsieh, L., Patterson, T. F., Paredes, R., Sweeney, D. A., Short, W. R., … Lane, H. C. (2020). Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. *New England Journal of Medicine*, *383*(19), 1813-1826. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764

Belshan, M. A., Knoop, F. C., & Huggett, K. N. (2014). Influenza A☆. Içinde *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05098-4

Bloom-Feshbach, K., Alonso, W. J., Charu, V., Tamerius, J., Simonsen, L., Miller, M. A., & Viboud, C. (2013). Latitudinal Variations in Seasonal Activity of Influenza and Respiratory Syncytial Virus (RSV): A Global Comparative Review. *PLoS ONE*, *8*(2), e54445. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054445

Bosphore SARS-CoV-2/Flu/ RSV Panel Kit - Launch Diagnostics. (t.y.). Geliş tarihi 12 Haziran 2023, gönderen https://www.launchdiagnostics.com/product/anatolia-geneworks-bosphore-sars-cov-2-flu-rsv-pcr-panel-kit/

Bouzas, M. L., Oliveira, J. R., Queiroz, A., Fukutani, K. F., Barral, A., Rector, A., Wollants, E., Keyaerts, E., van der Gucht, W., van Ranst, M., Beuselinck, K., de Oliveira, C. I., van Weyenbergh, J., & Nascimento-Carvalho, C. M. (2018). Diagnostic accuracy of digital RNA quantification versus real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from children with acute respiratory infection. *Journal of Clinical Virology*, *106*, 34-40. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.07.003

Breslauer, K. J., Frank, R., Blöcker, H., & Marky, L. A. (1986). Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(11), 3746-3750. https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746

Britannica. (2022). coronavirus. Içinde T. Editors of Encyclopaedia (Ed.), *Britannica*. Encyclopedia Britannica. https://www.britannica.com/science/coronavirus-virus-group

Chan, J. F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.-W., Yuan, S., & Yuen, K.-Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 221-236. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902

Chan, J. F.-W., Yip, C. C.-Y., To, K. K.-W., Tang, T. H.-C., Wong, S. C.-Y., Leung, K.-H., Fung, A. Y.-F., Ng, A. C.-K., Zou, Z., Tsoi, H.-W., Choi, G. K.-Y., Tam, A. R., Cheng, V. C.-C., Chan, K.-H., Tsang, O. T.-Y., & Yuen, K.-Y. (2020). Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated *In Vitro* and with Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(5). https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20

Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., Wan, C. K. C., Yang, P., Wang, Q., Peiris, M., & Poon, L. L. M. (2020). Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*, *66*(4), 549-555. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029

Chung, H.-Y., Jian, M.-J., Chang, C.-K., Lin, J.-C., Yeh, K.-M., Chen, C.-W., Chiu, S.-K., Wang, Y.-H., Liao, S.-J., Li, S.-Y., Hsieh, S.-S., Tsai, S.-H., Perng, C.-L., Yang, J.-R., Liu, M.-T., Chang, F.-Y., & Shang, H.-S. (2021). Novel dual multiplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus using the BD MAX open system. *Emerging Microbes & Infections*, *10*(1), 161-166. https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1873073

Cobo, F. (2012). Application of Molecular Diagnostic Techniques for Viral Testing. *The Open Virology Journal*, *5*(1), 104-114. https://doi.org/10.2174/1874357901206010104

Collins, P. L., & Graham, B. S. (2008). Viral and Host Factors in Human Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis. *Journal of Virology*, *82*(5), 2040-2055. https://doi.org/10.1128/JVI.01625-07

Cong, B., Deng, S., Wang, X., & Li, Y. (2022). The role of respiratory co-infection with influenza or respiratory syncytial virus in the clinical severity of COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*, *12*, 05040. https://doi.org/10.7189/jogh.12.05040

Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., & Zambon Public Health England, M. (2020). *Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR*. https://virologie-ccm.charite.de/en/

Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G.,

Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., … Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, *25*(3). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, *5*(4), 536-544. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z

Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19

COVID 19, Flu, RSV | Respiratory Multiplex qRT-PCR | Nonacus. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://nonacus.com/covid-19-flu-rsv-multiplex/

COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR. (2023). https://www.diatheva.com/pdf/kit/MBK_MBR/DMBK0097-IFU-COVID-FLU-EN.pdf

de Jong, J. C., Claas, E. C. J., Osterhaus, A. D. M. E., Webster, R. G., & Lim, W. L. (1997). A pandemic warning? *Nature*, *389*(6651), 554-554. https://doi.org/10.1038/39218

Do, L. A. H., van Doorn, H. R., Bryant, J. E., Nghiem, M. N., Nguyen Van, V. C., Vo, C. K., Nguyen, M. D., Tran, T. H., Farrar, J., & de Jong, M. D. (2012). A sensitive real-time PCR for detection and subgrouping of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*, *179*(1), 250-255. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.012

Domnich, A., Bruzzone, B., Trombetta, C.-S., De Pace, V., Ricucci, V., Varesano, S., Garzillo, G., Ogliastro, M., Orsi, A., & Icardi, G. (2023). Rapid differential diagnosis of SARS-CoV-2, influenza A/B and respiratory syncytial viruses: Validation of a novel RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology*, *161*, 105402. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105402

Dronina, J., Samukaite-Bubniene, U., & Ramanavicius, A. (2021). Advances and insights in the diagnosis of viral infections. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 348. https://doi.org/10.1186/s12951-021-01081-2

Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A. M., Berger, A., Burguière, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., … Doerr, H. W. (2003). Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1967-1976. https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747

EMBL-EBI Highlights 2021 – EMBL Documents. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.embl.org/documents/document/embl-ebi-highlights-2021/

European Centre for Disease Prevention and Control. (2022, Nisan 12). *Factsheet about seasonal influenza*. https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/facts/factsheet

Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(4), 1301-1314. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1301-1314.1998

Gaitonde, D. Y., Moore, F. C., & Morgan, M. K. (2019). Influenza: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, *100*(12), 751-758.

Gatt, D., Martin, I., AlFouzan, R., & Moraes, T. J. (2023). Prevention and Treatment Strategies for Respiratory Syncytial Virus (RSV). *Pathogens*, *12*(2), 154. https://doi.org/10.3390/pathogens12020154

Global Influenza Programme. Geneva: WHO. (t.y.). *FluNet*. WHO. Geliş tarihi 28 Ekim 2022, gönderen https://www.who.int/tools/flunet

Goodell, J. W. (2020). COVID-19 and finance: Agendas for future research. *Finance Research Letters*, *35*, 101512. https://doi.org/10.1016/j.frl.2020.101512

Gradisteanu Pircalabioru, G., Iliescu, F. S., Mihaescu, G., Cucu, A. I., Ionescu, O. N., Popescu, M., Simion, M., Burlibasa, L., Tica, M., Chifiriuc, M. C., & Iliescu, C. (2022). Advances in the Rapid Diagnostic of Viral Respiratory Tract Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.807253

Gregg, M. B. (1978). The Russian Flu. *JAMA*, *240*(21), 2260. https://doi.org/10.1001/jama.1978.03290210042022

Hammitt, L. L., Dagan, R., Yuan, Y., Baca Cots, M., Bosheva, M., Madhi, S. A., Muller, W. J., Zar, H. J., Brooks, D., Grenham, A., Wählby Hamrén, U., Mankad, V. S., Ren, P., Takas, T., Abram, M. E., Leach, A., Griffin, M. P., & Villafana, T. (2022). Nirsevimab for Prevention of RSV in Healthy Late-Preterm and Term Infants. *New England Journal of Medicine*, *386*(9), 837-846. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2110275

Hanson, K. E., Altayar, O., Caliendo, A. M., Arias, C. A., Englund, J. A., Hayden, M. K., Lee, M. J., Loeb, M., Patel, R., El Alayli, A., Sultan, S., Falck-Ytter, Y., Lavergne, V., Mansour, R., Morgan, R. L., Murad, M. H., Patel, P., Bhimraj, A., & Mustafa, R. A. (2021). The Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Antigen Testing. *Clinical Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1093/cid/ciab557

Hayden, F. G., & Palese, P. (2016). Influenza Virus. Içinde *Clinical Virology* (ss. 1009-1058). ASM Press. https://doi.org/10.1128/9781555819439.ch43

Hymas, W. C., Mills, A., Ferguson, S., Langer, J., She, R. C., Mahoney, W., & Hillyard, D. R. (2010). Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for detection of influenza A, influenza B, RSV and typing of the 2009-H1N1 influenza virus. *Journal of Virological Methods*, *167*(2), 113-118. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.020

Ikematsu, H. (2021). *How to Use Anti-influenza Drugs: Laninamivir Octanoate* (ss. 161-169). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9109-9_16

Ilyicheva, T. N., Netesov, S. V., & Gureyev, V. N. (2022). COVID-19, Influenza, and Other Acute Respiratory Viral Infections: Etiology, Immunopathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Part 2. Other Acute Respiratory Viral Infections. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *37*(3), 107-116. https://doi.org/10.3103/S0891416822030053

Islamoğlu, M. S., & Borku Uysal, B. (2021). Influenza and SARS-CoV-2 Coinfection During the COVID-19 Pandemic. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, *78*(3), 373-378. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2021.92489

Iuliano, A. D., Roguski, K. M., Chang, H. H., Muscatello, D. J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J. M., Schanzer, D., Cowling, B. J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L. W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., … Mustaquim, D. (2018). Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, *391*(10127), 1285-1300. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2

Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3-20. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x

Jha, A., Jarvis, H., Fraser, C., & Openshaw, P. J. (2016). Respiratory Syncytial Virus. *SARS, MERS and other Viral Lung Infections*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442240/

Johnson, N. P. A. S., & Mueller, J. (2002). Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918-1920 "Spanish" Influenza Pandemic. *Bulletin of the History of Medicine*, *76*(1), 105-115. https://doi.org/10.1353/bhm.2002.0022

Kakkola, L., Ikonen, N., & Julkunen, I. (2021). Influenza A Viruses (Orthomyxoviridae). Içinde *Encyclopedia of Virology* (ss. 551-560). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00046-1

Kawai, N. (2021). *How to Use Anti-influenza Drugs: Zanamivir and Oseltamivir* (ss. 149-159). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9109-9_15

Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A. M., Gorantla, S., McMillan, J., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurumurthy, C. B., Reid, S. P. M., Punyadeera, C., Chang, L., & Gendelman, H. E. (2021). Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature Materials*, *20*(5), 593-605. https://doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z

Kim, D., Lee, J.-Y., Yang, J.-S., Kim, J. W., Kim, V. N., & Chang, H. (2020). The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, *181*(4), 914-921.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011

Kim, D., Quinn, J., Pinsky, B., Shah, N. H., & Brown, I. (2020). Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *JAMA*, *323*(20), 2085. https://doi.org/10.1001/jama.2020.6266

Koutsakos, M., Wheatley, A. K., Laurie, K., Kent, S. J., & Rockman, S. (2021). Influenza lineage extinction during the COVID-19 pandemic? *Nature Reviews Microbiology*, *19*(12), 741-742. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00642-4

Krammer, F., Smith, G. J. D., Fouchier, R. A. M., Peiris, M., Kedzierska, K., Doherty, P. C., Palese, P., Shaw, M. L., Treanor, J., Webster, R. G., & García-Sastre, A. (2018). Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1), 3. https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y

Lauring, A. S., Tenforde, M. W., Chappell, J. D., Gaglani, M., Ginde, A. A., McNeal, T., Ghamande, S., Douin, D. J., Talbot, H. K., Casey, J. D., Mohr, N. M., Zepeski, A., Shapiro, N. I., Gibbs, K. W., Files, D. C., Hager, D. N., Shehu, A., Prekker, M. E., Erickson, H. L., … Self, W. H. (2022). Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: prospective observational study. *BMJ*, e069761. https://doi.org/10.1136/bmj-2021-069761

Leonelli, S. (2019). The challenges of big data biology. *eLife*, *8*. https://doi.org/10.7554/eLife.47381

Lewnard, J. A., & Lo, N. C. (2020). Scientific and ethical basis for social-distancing interventions against COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(6), 631-633. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30190-0

Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(2), 102-108. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001

Li, Y., & Chen, L. (2014). Big Biological Data: Challenges and Opportunities. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *12*(5), 187-189. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.10.001

Li, Y., Wang, X., Blau, D. M., Caballero, M. T., Feikin, D. R., Gill, C. J., Madhi, S. A., Omer, S. B., Simões, E. A. F., Campbell, H., Pariente, A. B., Bardach, D., Bassat, Q., Casalegno, J.-S., Chakhunashvili, G., Crawford, N., Danilenko, D., Do, L. A. H., Echavarria, M., … Walker, G. (2022). Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10340), 2047-2064. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00478-0

Liu, R., Sheng, Z., Huang, C., Wang, D., & Li, F. (2020). Influenza D virus. *Current Opinion in Virology*, *44*, 154-161. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.08.004

Louten, J. (2016). Detection and Diagnosis of Viral Infections. Içinde *Essential Human Virology* (ss. 111-132). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800947-5.00007-7

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., … Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, *395*(10224), 565-574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8

Ma, L., Wang, W., Le Grange, J. M., Wang, X., Du, S., Li, C., Wei, J., & Zhang, J.-N. (2020). Coinfection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 13*, 3045-3053. https://doi.org/10.2147/IDR.S267238

Ma, L., Zou, D., Liu, L., Shireen, H., Abbasi, A. A., Bateman, A., Xiao, J., Zhao, W., Bao, Y., & Zhang, Z. (2022). Database Commons: A Catalog of Worldwide Biological Databases. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.12.004

Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkac240

Malik, Y. S., Sircar, S., Bhat, S., Sharun, K., Dhama, K., Dadar, M., Tiwari, R., & Chaicumpa, W. (2020). Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)—current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Veterinary Quarterly*, *40*(1), 68-76. https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1727993

Maltezou, H. C., Papanikolopoulou, A., Vassiliu, S., Theodoridou, K., Nikolopoulou, G., & Sipsas, N. V. (2023). COVID-19 and Respiratory Virus Co-Infections: A Systematic Review of the Literature. *Viruses*, *15*(4), 865. https://doi.org/10.3390/v15040865

Mancini, F., Barbanti, F., Scaturro, M., Fontana, S., di Martino, A., Marsili, G., Puzelli, S., Calzoletti, L., Facchini, M., di Mario, G., Fabiani, C., Bella, A., Riccardo, F., Pezzotti, P., Stefanelli, P., Rezza, G., Ciervo, A., Villa, L., Fortini, D., … Severini, F. (2021). Multiplex Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assays for Diagnostic Testing of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Seasonal Influenza Viruses: A Challenge of the Phase 3 Pandemic Setting. *The Journal of Infectious Diseases*, *223*(5), 765-774. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa658

Marx, V. (2013). The big challenges of big data. *Nature*, *498*(7453), 255-260. https://doi.org/10.1038/498255a

McKimm-Breschkin, J. L., Hay, A. J., Cao, B., Cox, R. J., Dunning, J., Moen, A. C., Olson, D., Pizzorno, A., & Hayden, F. G. (2022). COVID-19, Influenza and RSV: Surveillance-informed prevention and treatment – Meeting report from an isirv-WHO virtual conference. *Antiviral Research*, *197*, 105227. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105227

Meissner, H. C. (2018). Respiratory Syncytial Virus. Içinde *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (ss. 1162-1165.e1). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00225-5

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov)

Monto, A. S., & Webster, R. G. (2013). Influenza pandemics: History and lessons learned. Içinde *Textbook of Influenza* (ss. 20-34). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118636817.ch2

Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M. (2020). VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses. *Viruses*, *12*(11), 1268. https://doi.org/10.3390/v12111268

Mufson, M. A., Orvell, C., Rafnar, B., & Norrby, E. (1985). Two Distinct Subtypes of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of General Virology*, *66*(10), 2111-2124. https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2111

Multiple Primer Analyzer | Thermo Fisher Scientific - TR. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html

Munoz, F. M., & Englund, J. A. (2020). Respiratory syncytial virus. Içinde *Maternal Immunization* (ss. 213-234). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814582-1.00011-5

Nam, H. H., & Ison, M. G. (2019). Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ*, l5021. https://doi.org/10.1136/bmj.l5021

Nicholson, K., Aoki, F., Osterhaus, A., Trottier, S., Carewicz, O., Mercier, C., Rode, A., Kinnersley, N., & Ward, P. (2000). Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *The Lancet*, *355*(9218), 1845-1850. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02288-1

Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) | CDC. (t.y.). Geliş tarihi 10 Haziran 2023, gönderen https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/naats.html

Nuwarda, R. F., Alharbi, A. A., & Kayser, V. (2021). An Overview of Influenza Viruses and Vaccines. *Vaccines*, *9*(9), 1032. https://doi.org/10.3390/vaccines9091032

Palese, P. (2004). The great influenza The epic story of the deadliest plague in history. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(2), 146-146. https://doi.org/10.1172/JCI22439

Palivizumab, a Humanized Respiratory Syncytial Virus Monoclonal Antibody, Reduces Hospitalization From Respiratory Syncytial Virus Infection in High-risk Infants. (1998). *Pediatrics*, *102*(3), 531-537. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724660

Pérez-Lazo, G., Silva-Caso, W., del Valle-Mendoza, J., Morales-Moreno, A., Ballena-López, J., Soto-Febres, F., Martins-Luna, J., Carrillo-Ng, H., del Valle, L. J., Kym, S., Aguilar-Luis, M. A., Peña-Tuesta, I., Tinco-Valdez, C., & Illescas, L. R. (2021). Identification of Coinfections by Viral and Bacterial Pathogens in COVID-19 Hospitalized Patients in Peru: Molecular Diagnosis and Clinical Characteristics. *Antibiotics*, *10*(11), 1358. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111358

Perry, R. D., & Fetherston, J. D. (1997). Yersinia pestis--etiologic agent of plague. *Clinical Microbiology Reviews*, *10*(1), 35-66. https://doi.org/10.1128/CMR.10.1.35

Phillips, N. (2021). The coronavirus is here to stay — here's what that means. *Nature*, *590*(7846), 382-384. https://doi.org/10.1038/d41586-021-00396-2

Piret, J., & Boivin, G. (2021). Pandemics Throughout History. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.631736

Ramanathan, M., Ferguson, I. D., Miao, W., & Khavari, P. A. (2021). SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 spike variants bind human ACE2 with increased affinity. *The Lancet Infectious Diseases*, *21*(8), 1070. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00262-0

Recommendations for Prevention and Control of Influenza in Children, 2022–2023. (2022). *Pediatrics*, *150*(4). https://doi.org/10.1542/peds.2022-059274

Ren, G., & Krawetz, R. (2015). Applying computation biology and "big data" to develop multiplex diagnostics for complex chronic diseases such as osteoarthritis. *Biomarkers*, *20*(8), 533-539. https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1105499

Reta, D. H., Tessema, T. S., Ashenef, A. S., Desta, A. F., Labisso, W. L., Gizaw, S. T., Abay, S. M., Melka, D. S., & Reta, F. A. (2020). Molecular and Immunological Diagnostic Techniques of Medical Viruses. *International Journal of Microbiology*, *2020*, 1-19. https://doi.org/10.1155/2020/8832728

RevoDx Flu A&B / RSV / SARS-CoV-2. (t.y.). Geliş tarihi 12 Haziran 2023, gönderen https://www.idilbiotech.com/flu-ab-rsv-sars-cov-2/

RSV (Respiratory Syncytial Virus) | CDC. (2020). https://www.cdc.gov/rsv/clinical/index.html

Saisho, Y. (2021). *How to Use Anti-influenza Drugs: Peramivir* (ss. 181-190). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9109-9_18

Sampath, S., Khedr, A., Qamar, S., Tekin, A., Singh, R., Green, R., & Kashyap, R. (2021). Pandemics Throughout the History. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.18136

SARS-CoV-2/FLU/RSV REALTIME PCR KIT. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://en.vircell.com/media/filer_public/bd/13/bd134dc5-7975-4b54-9c95-74b2a7bfa245/realtime_pcr_sars-cov-2_flu_rsv_en_pme1070222.pdf

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2023). GenBank 2023 update. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D141-D144. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1012

Schadt, E. E., Linderman, M. D., Sorenson, J., Lee, L., & Nolan, G. P. (2010). Computational solutions to large-scale data management and analysis. *Nature Reviews Genetics*, *11*(9), 647-657. https://doi.org/10.1038/nrg2857

Schulze, M., Nitsche, A., Schweiger, B., & Biere, B. (2010). Diagnostic Approach for the Differentiation of the Pandemic Influenza A(H1N1)v Virus from Recent Human Influenza Viruses by Real-Time PCR. *PLoS ONE*, *5*(4), e9966. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009966

Severe acute respiratory syndrome (SARS). (2003). *Releve epidemiologique hebdomadaire*, *78*(12), 81-83.

Shen, Z., Zhang, Y., Li, H., & Du, L. (2022). Rapid typing diagnosis and clinical analysis of subtypes A and B of human respiratory syncytial virus in children. *Virology Journal*, *19*(1), 15. https://doi.org/10.1186/s12985-022-01744-y

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/msb.2011.75

Singh, B., Kaur, P., Reid, R.-J., Shamoon, F., & Bikkina, M. (2020). COVID-19 and Influenza Co-Infection: Report of Three Cases. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.9852

Spreeuwenberg, P., Kroneman, M., & Paget, J. (2018). Reassessing the Global Mortality Burden of the 1918 Influenza Pandemic. *American Journal of Epidemiology*, *187*(12), 2561-2567. https://doi.org/10.1093/aje/kwy191

Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, *24*(6), 490-502. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003

Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003

Swets, M. C., Russell, C. D., Harrison, E. M., Docherty, A. B., Lone, N., Girvan, M., Hardwick, H. E., Investigators, I., Visser, L. G., Openshaw, P. J. M., Groeneveld, G. H., Semple, M. G., & Baillie, J. K. (2022). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. *Lancet (London, England)*, *399*(10334), 1463. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00383-X

Tahamtan, A., & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *20*(5), 453-454. https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the Mother of All Pandemics. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(1), 15-22. https://doi.org/10.3201/eid1201.050979

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2009). Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, *28*(1), 187-202. https://doi.org/10.20506/rst.28.1.1879

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2010). Influenza: The Once and Future Pandemic. *Public Health Reports*, *125*(Suppl 3), 16. https://doi.org/10.1177/00333549101250s305

Tiwary, B. K. (2022a). Clinical Bioinformatics. Içinde *Bioinformatics and Computational Biology* (ss. 163-182). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4241-8_9

Tiwary, B. K. (2022b). Introduction to Bioinformatics and Computational Biology. Içinde *Bioinformatics and Computational Biology* (ss. 1-9). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4241-8_1

Tiwary, B. K. (2022c). Next-Generation Sequencing. Içinde *Bioinformatics and Computational Biology* (ss. 117-135). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4241-8_7

Tone, K., Gochi, M., & Kuwano, K. (2022). Respiratory syncytial virus pneumonia in an immunocompetent adult: an important differential diagnosis of COVID-19. *QJM: An International Journal of Medicine*, *115*(12), 868-869. https://doi.org/10.1093/qjmed/hcac205

Topoulos, S., Giesa, C., Gatermann, S., Fussen, R., Lemmen, S., & Ewig, S. (2019). Analysis of acute respiratory infections due to influenza virus A, B and RSV during an influenza epidemic 2018. *Infection*, *47*(3), 425-433. https://doi.org/10.1007/s15010-018-1262-x

Types of Influenza Viruses | CDC. (t.y.). Geliş tarihi 27 Nisan 2022, gönderen https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm

Uehara, T. (2021). *How to Use Anti-influenza Drugs: Baloxavir Marboxil* (ss. 171-179). https://doi.org/10.1007/978-981-15-9109-9_17

UGUREL, O. M., ATA, O., & TURGUT-BALIK, D. (2020). An updated analysis of variations in SARS-CoV-2 genome. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, *44*(3), 157-167. https://doi.org/10.3906/biy-2005-111

UĞUREL, O. M., ATA, O., & TURGUT-BALIK, D. (2021). Genomic chronicle of SARS-CoV-2: a mutational analysis with over 1 million genome sequences. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, *45*(SI-1), 425-435. https://doi.org/10.3906/biy-2106-8

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115-e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596

Uyeki, T. M., Bernstein, H. H., Bradley, J. S., Englund, J. A., File, T. M., Fry, A. M., Gravenstein, S., Hayden, F. G., Harper, S. A., Hirshon, J. M., Ison, M. G., Johnston, B. L., Knight, S. L., McGeer, A., Riley, L. E., Wolfe, C. R., Alexander, P. E., & Pavia, A. T. (2019). Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenzaa. *Clinical Infectious Diseases*, *68*(6), e1-e47. https://doi.org/10.1093/cid/ciy866

Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, *37*(2), 226-231. https://doi.org/10.2144/04372ST03

Venkatesan, P. (2022). Nirsevimab: a promising therapy for RSV. *The Lancet Microbe*, *3*(5), e335. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00097-0

VIASURE SARS-CoV-2 Flu RSV - JANT PHARMACAL CORPORATION. (t.y.). Geliş tarihi 12 Haziran 2023, gönderen https://www.jantdx.com/product/viasure-sars-cov-2-flu-rsv/

Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058

Walsh, E. E., & Hall, C. B. (2015). Respiratory Syncytial Virus (RSV). Içinde *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (ss. 1948-1960.e3). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00160-0

Wang, L., Piedra, P. A., Avadhanula, V., Durigon, E. L., Machablishvili, A., López, M.-R., Thornburg, N. J., & Peret, T. C. T. (2019). Duplex real-time RT-PCR assay for detection and subgroup-specific identification of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods*, *271*, 113676. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.113676

Wang, Q., Guo, S., Wei, X., Dong, Q., Xu, N., Li, H., Zhao, J., & Sun, Q. (2022). Global prevalence, treatment and outcome of tuberculosis and COVID-19 coinfection: a systematic review and meta-analysis (from November 2019 to March 2021). *BMJ Open*, *12*(6), e059396. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-059396

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, *25*(9), 1189-1191. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033

Weston, S., & Frieman, M. B. (2018). Respiratory Viruses. Içinde *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66161-5

What You Should Know About Flu Antiviral Drugs | CDC. (t.y.). Geliş tarihi 10 Haziran 2023, gönderen https://www.cdc.gov/flu/treatment/whatyoushould.htm

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. (t.y.). Geliş tarihi 03 Haziran 2023, gönderen https://covid19.who.int/

WHO information for the molecular detection of influenza viruses. (2021). https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/molecular-detention-of-influenza-viruses/protocols_influenza_virus_detection_feb_2021.pdf?sfvrsn=df7d268a_5

Wu, C., Cheng, X., He, J., Lv, X., Wang, J., Deng, R., Long, Q., & Wang, X. (2008). A multiplex real-time RT-PCR for detection and identification of influenza virus types A and B and subtypes H5 and N1. *Journal of Virological Methods*, *148*(1-2), 81-88. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.023

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265-269. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Yu, C., Zhang, Z., Guo, Y., Shi, J., Pei, G., Yao, Y., Liao, W., & Zeng, R. (2021). Lopinavir/ritonavir is associated with pneumonia resolution in COVID-19 patients with influenza coinfection: A retrospective matched-pair cohort study. *Journal of Medical Virology*, *93*(1), 472-480. https://doi.org/10.1002/jmv.26260

Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, *367*(19), 1814-1820. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721

Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., … Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*(7798), 270-273. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

Ugurel O.M., Doğrusoy A.E., Ata O., Turgut-Balik D., Designing Primer and Probes for Multiplex Real-Time PCR for SARS-CoV-2, Influenza and Respiratory Syncytial Virus. (2022). The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences, *s:101 ISBN: 978-625-00-9240-8*

Projeler

COVID-19+ qPCR Tespit Kiti", Altınbaş Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje No: PB2020-MDBF-7, Araştırmacı, 2021-.

Ulusal Patent

Virüs Etkenlerinin Tanısında Kullanılan Moleküler Belirteç, Türk Patenet Enstitüsü, (2023). (Patent başvurusu sürecinde olup tarifname kontrol aşamasındadır).