T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TABURCU OLAN COVID-19 HASTALARININ FEKAL ÖRNEKLERİNDE YENİ GELİŞTİRİLEN GERÇEK ZAMANLI TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEMELLİ TANI KİTİ İLE SARS-CoV-2 SALINIMININ ARAŞTIRILMASI

Arzu KOPARAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

Temmuz, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TABURCU OLAN COVID-19 HASTALARININ FEKAL ÖRNEKLERİNDE YENİ GELİŞTİRİLEN GERÇEK ZAMANLI TERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEMELLİ TANI KİTİ İLE SARS-CoV-2 SALINIMININ ARAŞTIRILMASI

Arzu KOPARAN tarafından hazırlanan tez çalışması 26.07.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Emine KARAKUŞ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Mustafa YAMAN, Üye
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi _____

Doç. Dr. Mithat ÇELEBİ, Üye
Yalova Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem BİLEN,
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Emine KARAKUŞ sorumluluğunda tarafımca hazırlananTaburcu Olan Covid-19 Hastalarının Fekal Örneklerinde Yeni Geliştirilen Gerçek Zamanlı Zıt Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Tanı Kiti ile SARS-CoV-2 Salınımının Araştırılması 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.

Arzu KOPARAN

İmza

Bu çalışma, “ Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün: TDK- 2020-3972 ” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Prof. Dr. Ayla Çalımlı'ya

ve

Aileme

TEŞEKKÜR

Kimya /Biyokimya bölümünde doktoraya başlamama büyük öncü olan ve biyokimya bilim dalını sevdiren, akademik tecrübeleriyle beni her zaman yönlendiren, biyokimya dersleri ve bu tez çalışmam sırasında, çalışmamın tüm aşamalarında bana zaman ayıran, beni teşvik eden, bana sonsuz desteği olan çok kıymetli ve değerli danışman hocam Prof. Dr. Emine Karakuş'a,

Tez çalışmam sırasında, Covid-19 hastalığının en yaygın olduğu ve aşısının henüz bulunamadığı dönemde, İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve araştırma hastanesinde kendi sağlığını da riske atarak Covid-19 hastalarıyla ilgilenen ve gaita numunelerin toplanmasını sağlayan, değerli katkıları, yönlendirmeleri ve çalışmalarıyla tez çalışmamda çok büyük emeği olan değerli hocam Arş. Gör. Süreyya Dede'ye,

Tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde tüm olanaklarını sunan ve istatistik hesaplamalarının gerçekleştirilmesini sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Nilgün Işıksaçan ve Doç. Dr. Zuhal Yeşilbağ'a,

Çalışmaların RT-PCR analizlerini gerçekleştirildiği laboratuvar Krosgen Biyoteknoloji Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti.'e ve Kerem Şenvardar'a,

Çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan ve yönlendiren çok değerli ve kıymetli hocalarım Prof. Dr. Barbaros Nalbantoğlu ve Doç. Dr. Mustafa Yaman'a,

Doktora yapmamı çok isteyen, bana bu konuda çok destek veren ve motive eden Ar-Ge direktörüm Zdravka Knezeviç'e,

Doktora tez çalışmam sırasında TDK- 2020-3972 no'lu projeme destek sunan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğüne,

Akademik çalışmalarım sırasında daima bana destek olan kardeşlerim Sevgi Koparan, Ali Rafet Koparan ve Sema Koparan'a, kuzenim Dr. Sevil Nesteren Koçak'a ve yeğenlerim Kerem Eker ve Mehmet Çağın Eker'e ve annem Nezihe Koparan'a,

Teşekkür Ederim.

Arzu KOPARAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR vi
SİMGE LİSTESİ iix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xiv
TABLO LİSTESİ xv
ÖZET xvi
ABSTRACT xviii
1 GİRİŞ 20
1.1 Literatür Özeti 20
1.2 Tezin Amacı 41
1.3 Hipotez 42
2 KURUMSAL TEMELLER 44
2.1 Koronavirüsler 44
2.1.1 Koronavirüslerin Özellikleri ... 44
2.1.2 Koronavirüslerin Genom ve Yapıları ... 45
2.1.3 Koronavirüslerin Yaşam Döngüsü ... 47
2.1.4 İnsan Koronovirüs Enfeksiyonları ... 50
2.1.5 Klinik Bulgular ... 50
2.1.6 Örnek Toplama ... 50
2.2 RT-PCR Analizleri 53
2.2.1 Nükleik Asit Miktar Tayini Testi ... 53
2.2.2 Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ... 54
2.2.3 RNA'nın Kalitesi ... 55
2.2.4 Primer Tasarımı ve Prob Önemi ... 56
2.2.5 qPCR'de DNA Bağlayıcı Boyalara Karşı Hidroliz Probları ... 56
3 DENEYSEL BÖLÜM 62
3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar 62
3.2 Hastaların Belirlenmesi ve Gaita Numunelerinin Toplanması 65
3.2.1 Toplanan Gaita Numunelerinin RNA İzolasyonunu Yapılması ... 66
3.2.1.1 CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kiti Kullanım Öncesi Yapılması Gereken İşlemler ... 66
3.2.2 İzole edilen RNA Örneklerinde RT-PCR Analizi ile SARS-CoV-2 Virüsünün Belirlenmesi ... 68

4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA **73**
4.1 Çalışmaya Katılan Hastaların Demografik ve Temel Özellikleri 73
4.1.1 Hasta Karakteristikleri 73
4.1.2 Olguların Tanımlayıcı Özelliklere Göre Gaita Sonuçlarının Değerlendirilmesi 75
4.1.3 Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi 75
4.1.4 Dışkı Örneklerinde Viral RNA Süresinin Değerlendirilmesi 83
4.1.5 Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları 85
4.2 Tartışma 85
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **88**
KAYNAKÇA **90**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **97**

SİMGE LİSTESİ

nm	Nano metre
kb	Kilobaz
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
n	Tekrar Sayısı
y	Kesme Noktası
%	Yüzdelik
mg	Miligram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
xg	Yerçekimi Kuvvetinin Kaç Katı Olduğunu Belirten İfade
º	Derece
°C	Celcius
U	Test Sayısı
L	Litre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mol	Mol
mmol	Milimol
µmol	Mikromol

KISALTMA LİSTESİ

CoV	Koronavirüs
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
IBV	Bronşit Virüsü
HCoV-229E	İnsan Koronavirüsü 229E
MHV	Fare Hepatit Virüsü
bat-SL-CoVZC45	Yarasa SARS Benzeri Koronavirüs İzolatı
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SARS-CoV	Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
MERS-CoV	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
TMPRSS2	Transmemran Serin Proteaz 2
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRT-PCR	Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T	Salgın Bölgeye Seyahat
C	Onaylanmış Vakalarla Temas
O	Semptomların Başlangıcı
A	Kabul
N+	Nazoferangeal Sürüntü Positif
N-	Nazoferangeal Sürüntü Negatif
N±	Nazoferangeal Sürüntü Zayıf Positif

R±	Rektal Sürüntü Zayıf Pozitif
R-	Rektal Sürüntü Negatif
D	Taburcu Olma Tarihi
#	Başarısız Örnekleme
NT	Test edilmedi
P	Pozitif
N	Negatif
GI	Gastrointestinal Semptomlar
M	Hafif Vaka
PS	Faringeal Sürüntü Örneği
S	Ağır Vaka
SS	Gaita Örneği
UC	Komplike Olmayan Vaka
W	Gastrointestinal Semptomları Olan
WT	Gastrointestinal Semptomlar Olmayan
AGE	Akut Gastroenterit
Ct	Döngü Eşiği
HCoV	İlk İnsan Koronavirüsleri
MERS	Orta Doğu Spiratuvar Sendromu
HE	Hemaglutinin-Esteraz
RdRp	RNA Bağımlı RNA Polimeraz
S	Spike Proteini
M	Membran Proteini
E	Zarf Proteini
N	Nükleokapsid Proteini

ORF	Açık Okuma Çerçeveleri (Open Reading Frames)
TRS	Transkripsiyon Düzenleyici Dizi
ER	Endoplazmik Retikulum
BAL	Bronkoalveolar Lavaj Sıvısı
ND	Mevcut değil (hastalar hastaneden taburcu edilmemiştir)
Nazofarengeal	Burundan alınan sürüntü
Faringeal	Boğaz arkasından alınan sürüntü
OP	Orofaringeal
NP	Nazofaringeal
RdRp- SARSr	Charité primer probu
RNaz	Ribonükleaz
DNaz	Deoksirobonükleaz
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
cq	PCR Döngü Sayısı
Ort	Ortalama
Ss	Standart Sapma
NTC	Negatif Kontrol
PTC	Pozitif Kontrol
WBC	Beyaz Kan Hücresi
CK	Kreatin kinaz
NEU	Nötrofil
HGB	Hemoglobin
PLT	Trombosit
CRP	C-Reaktif protein
AST	Aspartat Aminotransferaz
ALT	Alanin Aminotransferaz

LDH	Laktat dehidrogenaz
INR	Protrombin zamanı
NCSS	İstatistik Programı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 α, β ve γ CoV'lerin genomik organizasyon gösterimi 21

Şekil 1.2 SARS-CoV-2 viryon gösterimi 22

Şekil 1.3 SARS-CoV-2 filogenetik ilişkisi 23

Şekil 1.4 SARS-CoV-2 RNA pozitif fekal örneklerine sahip 41 hasta için hastalığın seyri boyunca boğaz sürüntülerinden ve fekal örneklerinden alınan sonuçların zaman çizelgesi, (Ocak – Mart, 2020)..... 25

Şekil 1.5 SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile doğrulanmış n = 10 bağımsız pediyatrik hastanın majör epidemiyolojik olaylarının ve moleküler test sonuçlarının kronolojisi.. 28

Şekil 1.6 Gaita süspansiyonunun Vero hücrelerine aşılanmasından sonra elektron mikroskobu kullanılarak tipik koronavirüs morfolojisine sahip bir virüs parçacığı..... 29

Şekil 1.7 COVID-19'lu 14 hastada viral nükleik asit testi sonuçları (26 Ocak - 09 şubat, 2020) 32

Şekil 1.8 COVID-19 hastalarının örneklerinde viral RNA için RT-PCR testi sonuçlarının zaman süreci..... 36

Şekil 1.9 Çin'in Jiangsu Eyaleti, Wuxi Şehrinde Ocak-Mart 2020 arasında şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-Cov-2) enfeksiyonunun epidemiyolojik bağlantısı ve zaman çizelgesi. RT-PCR, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu 40

Şekil 2.1 Coronavirinae'nin alt ailesinin üyeleri arasındaki filogenetik ilişkileri..... 46

Şekil 2.2 Koronavirüslerin morfolojisi (a), Koronavirüsün şematik gösterimi (b) 47

Şekil 2.3 Koronavirüslerin yaşam döngüsü 49

Şekil 2.4 Real time PCR testinde kullanılan Problar ve Boyalar; a) SYBR Yeşili; b) TaqMan; c) Moleküler İşaret; d) Akrepler (Scorpions)..... 59

Şekil 2.5 Geleneksel ve Gerçek Zamanlı PCR Arasındaki Farklar 60

Şekil 2.6 Gerçek Zamanlı PCR verilerinin temsili grafiği. Baseline (Mavi): Amplifikasyon eğrisi yok (Kırmızı): Amplifikasyon eğrisi 61

Şekil 3.1 CVXTM Viral RNA Ekstraksiyon Kit Protokolü İş Akışı..... 70

Şekil 4.1 Gaita numuneleri için örnek bazı PCR Grafikleri 85

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz–Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klinik Örneklerin Tespit Sonuçları [14] 27

Tablo 1.2 SARS-CoV-2 ile Enfekte Olan Hastanın Farklı Örneklerinde Viral RNA Tespitinin Zaman Çizelgesi [25] 34

Tablo 2.1 qRT-PCR Numune Testinin Sonuçları Ve SARS-CoV-2 İle Enfekte Hastaların Klinik Sonuçları [59] 52

Tablo 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 62

Tablo 3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler 62

Tablo 3.3 CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kiti İçeriği 63

Tablo 3.4 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Realtime PCR Tanı Kiti Teknik Özellikleri 64

Tablo 3.5 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Real Time PCR Tanı Kit İçeriği 64

Tablo 3.6 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Real Time PCR Tanı Kiti Mix İçeriği 65

Tablo 3.7 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Realtime-PCR Tanı Kiti İçeriği ve Miktarları 65

Tablo 3.8 RT- PCR Cihaz Çalışma Protokolü 71

Tablo 3.9 RT-PCR Cihaz Sonuç Değerlendirme Kriterleri 72

Tablo 4.1 Olguların Tanımlayıcı Özelliklerin Dağılımı 73

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri Ve Karşılaştırılmaları 75

Tablo 4.3 Gaita Örnekleri SARS-CoV-2 Sonuçları İçin Pozitif Olan Hastalar 83

ÖZET

Taburcu Olan Covid-19 Hastalarının Fekal Örneklerinde Yeni Geliştirilen Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Tanı Kiti İle SARS-CoV-2 Salınımının Araştırılması

Arzu KOPARAN

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19 hastalığının solunum damlacıkları ve doğrudan temas yoluyla yayıldığı düşünülmektedir. Fekal örneklerde canlı virüslerin bulunması ve hasta bireylerin üst solunum yolu örnekleri negatif sonuç verirken, fekal örneklerin pozitif sonuç vermesi, hastalığın sadece solunum yolu ile değil fekal-oral yol ile bulaşma riskinin olabileceğini göstermektedir. Taburcu olan hastaların fekal örneklerinde virüsün kalabileceği süreyi tespit etmek, SARS-CoV-2 virüsünü hala bulaştırma riski taşıyabilecekleri düşünüldüğünde ve buna bağlı olarak virüsün bulaşma riskinin devam ettiği zaman aralığını ortaya koymak oldukça büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, COVID-19 tedavisi gördükten ve iki üst solunum yolu örneğinin art arda negatif sonuç vermesinden sonra taburcu olan 65 kişiden 7 günlük aralıklar ile gaita numunelerinin sonuçlarının incelenmesi, sonucu pozitif olan

hastalardan 30 gün boyunca gaita numuneleri alınması, yeni geliştirilen tanı kiti kullanılarak RT-PCR analizi ile virüsün varlığının tayin edilmesidir.

Araştırmamızdan elde edilen sonuçlar, ülkemizde ve dünyada COVID-19 hastalığının sadece solunum yolu ile değil fekal-oral yol ile bulaşma riskinin olabileceğinin gösterilmesi ve COVID-19 hastalığın önlemesine yönelik yapılacak çalışmalara katkı sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19 hastalığı, fekal-oral bulaşma, gaita numunesi

ABSTRACT

Investigation of SARS-CoV-2 Shedding with New Developed Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Based Diagnostic Kit in Fecal Samples of Discharged Covid-19 Patients

Arzu KOPARAN

Department of Chemistry

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ

It is considered that COVID-19 disease, caused by the SARS-CoV-2 virus can be spread through respiratory droplets and direct contact. The presence of live viruses and the positive results of the stool samples of patient individuals whose upper respiratory tract samples give negative results, indicate that there is a risk of transmission of the disease not only through the respiratory tract, but also through the fecal-oral route. It is very important to determine the period of time that the virus can remain in the fecal samples of discharged patients, considering that there may still be a risk of transmitting the SARS-CoV-2 virus and, accordingly, to reveal the time interval during which the risk of transmission of the virus continues.

The main objective of this thesis study is to examine at 7-day intervals the stool sample results of 65 patients who were treated for COVID-19 and were discharged after two consecutive negative upper respiratory tract samples, to take stool samples from patients with positive results for 30 days and to determine the presence of the virus by RT-PCR analysis using the newly developed diagnostic kit.

The results obtained from this research demonstrate that there is a risk of transmission of COVID-19 disease not only through the respiratory tract, but also through the fecal-oral route. Furthermore, the results of this study will contribute to the studies to be carried out for the prevention of COVID-19 disease in our country and in the world.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19 disease, fecal- oral transmission, stool sample

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

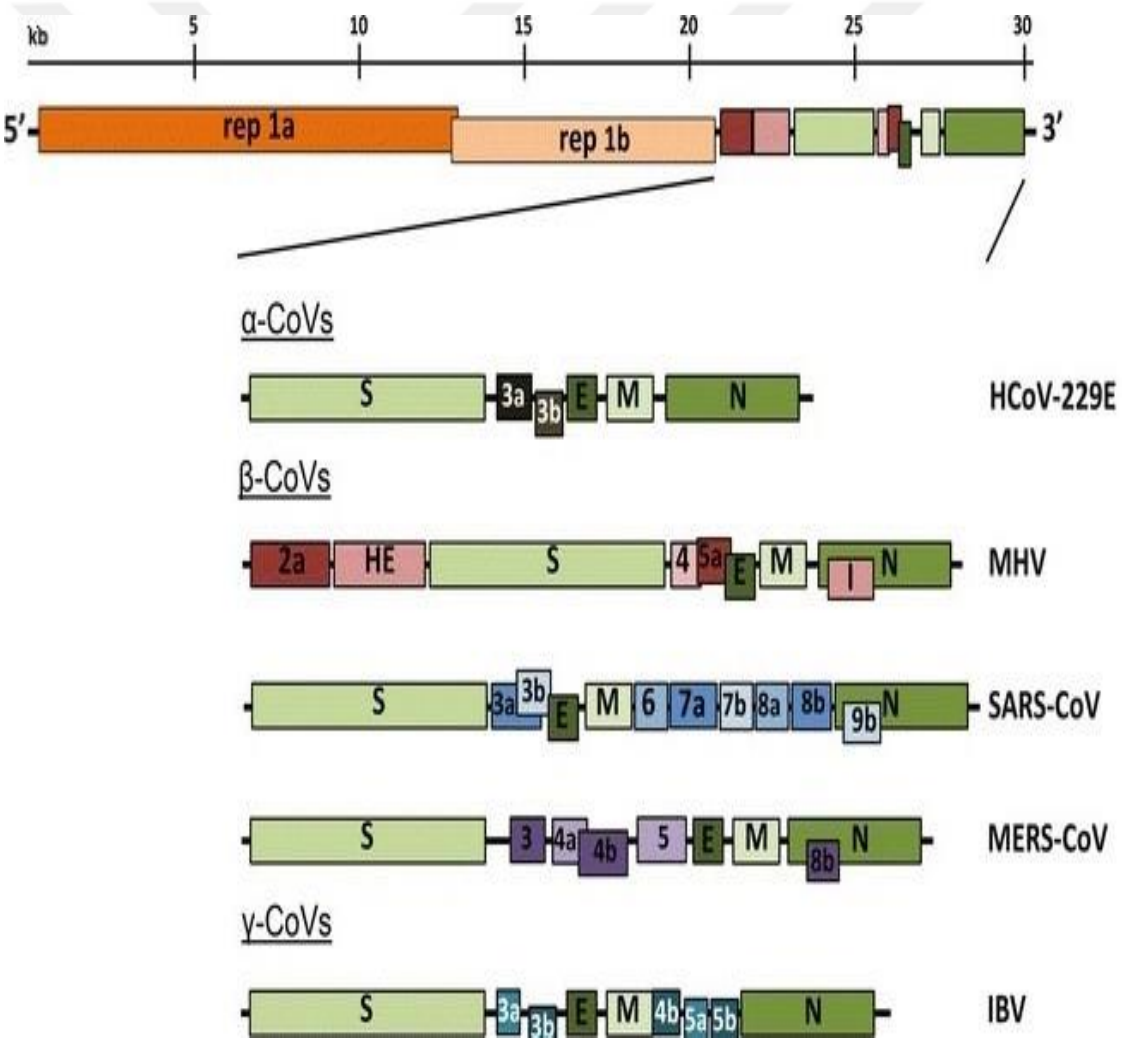
2019'yılı aralık ayının sonunda, Çin'in Hubei eyaletindeki Wuhan'da akut solunum yolu hastalığının ortaya çıkmasına neden olan ve SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni tip bir koronavirüs tanımlandı. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, bu koronavirüsün neden olduğu hastalık Covid-19 hastalığı olarak tanımlanırken hasta olan bireylerin hiçbir belirti göstermeyeceği gibi çok şiddetli zatürre (pnömani), septik şok ve ölüme yol açabilecek çoklu organ yetmezliğine kadar değişen klinik belirtiler sergileyebileceği belirtildi. Mart 2020'de, durumun ciddiyetini vurgulamak ve tüm ülkeleri enfeksiyonu saptamada ve yayılmayı önlemede harekete geçmelerini sağlamak için hastalık, DSÖ tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir. Virüsün ilk ortaya çıktığı tarihten günümüze kadar geçen sürede, tüm dünyada, 5 Temmuz 2023 tarihinde DSÖ Koronavirüs (Covid-19) Kontrol Paneli'inden alınan bilgilere göre, 767.726.861 kişi enfekte olmuş ve 6.948.764 kişi hayatını kaybetmiştir [1]. Bu sayılar her geçen gün artış göstermektedir.

Koronavirüsler, soğuk algınlığı gibi daha hafif seyreden hastalıklardan daha şiddetli hastalıklara kadar çeşitli hastalıkların meydana gelmesine neden olduğu bilinen büyük bir virüs ailesidir. Bu koronavirüsler 60 nm ila 140 nm çapında değişen pozitif polariteli, zarflı RNA virüslerdir. Koronavirüsler, RNA'ya bağımlı olan RNA polimeraz enzimi içermezler çünkü pozitif polaritelidirler. Ancak genomlarında bu enzimi kodlarlar. Yüzeylerinde sivri uçlu çıkıntılar ile elektron mikroskobu altında taç benzeri bir görünüm verirler. Bu çıkıntılara latincedeki "corona" yani taç anlamından yola çıkılarak bu virüslere koronavirüs "taçlı virüs" adı verilmiştir. İlk olarak Beaudette ve Hudson tarafından 1937 yılında, solunum hastalığı olan tavuklardan bulaşıcı bronşit virüsü (IBV), koronavirüs olarak izole edilmiştir.

Koronavirüsler, içiçe (nido) bir mRNA seti kullanılarak çoğaltılan Nidoviraller, pozitif polariteli, tek sarmallı RNA virüslerinin üyeleri olarak sınıflandırılmıştır [2].

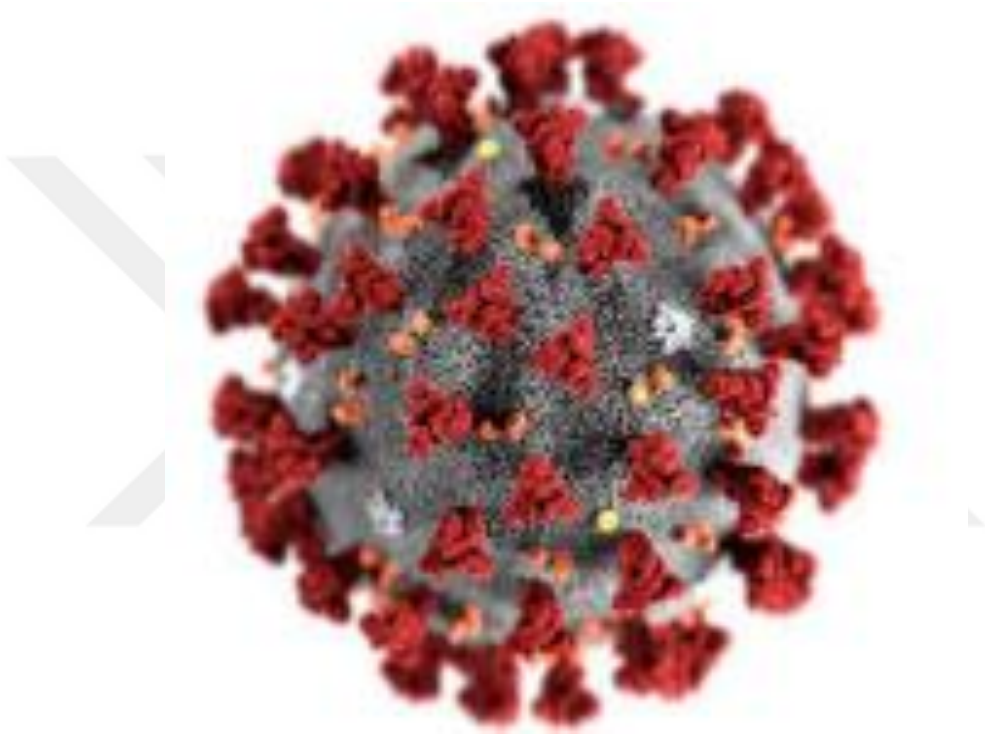
Koronavirüsler; Roniviridae, Arteriviridae, Coronaviridae, Mesoniviridae ve ailelerini içeren Nidoviraller düzenine ait en büyük virüs grubunu oluşturmaktadır. Coronaviridae ailesi, Coronavirinae ve diğeri Torovirinae olmak üzere iki alt aile içermektedir.

Coronavirinae ailesi ise, α, β, γ ve δ koronavirüsler olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Bu cinsler altındaki virüsler, insan, yarasa, domuz, kedi, köpek, kemirgen ve kanatlılarda bulunabilmektedir. Nidoviraller sıralamasında yer almakta olan tüm virüsler, zarflı ve pozitif polariteli bölümlere ayrılmamış RNA virüsleridir. Tüm RNA virüsleri için çok büyük genomlar içerir, bazı virüsler en büyük tanımlanmış RNA genomlarına sahiptir ve 33.5 kilobaz (kb) genom içerirler [3] Şekil 1.1'de α, β ve γ CoV'lerin genomik organizasyon gösterimi yapılmıştır. Aşağıdaki genişletilmiş bölgeler, MHV, SARS-CoV, HCoV-229E, IBV, MERS-CoV'nin 3' bölgelerindeki yardımcı ve yapısal proteinleri göstermektedir. IBV bulaşıcı bronşit virüsünü, MHV fare hepatit virüsünü, HCoV-229E insan koronavirüsünü, MERS-CoV orta doğu solunum sendromu koronavirüsünü ve SARS-CoV şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsünü göstermektedir.



Şekil 1.1 α, β ve γ CoV'lerin genomik organizasyon gösterimi [3]

Bu yeni koronovirüs, koronavirüs ailesinin tipik özelliklerine sahiptir ve betakoronavirüs 2b soyunda yer almaktadır. SARS-CoV şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü ve MERS-CoV orta doğu solunum sendromu koronavirüsü aynı gruptadır. Yarasa SARS benzeri koronavirüs izolatı bat-SL-CoVZC45 ile bu koronavirüs genomlarının ilişkilerinin yakın olduğu gösterilmiştir [4, 5]. Bu yeni koronavirüsün resmi sınıflandırılması şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs SARS-CoV-2 olarak yapılmıştır [6]. Şekil 1.2'de yeni koronavirüsün viryon gösterimi, Şekil 1.3'de ise virüsün filogenetik ilişkisi gösterilmiştir.

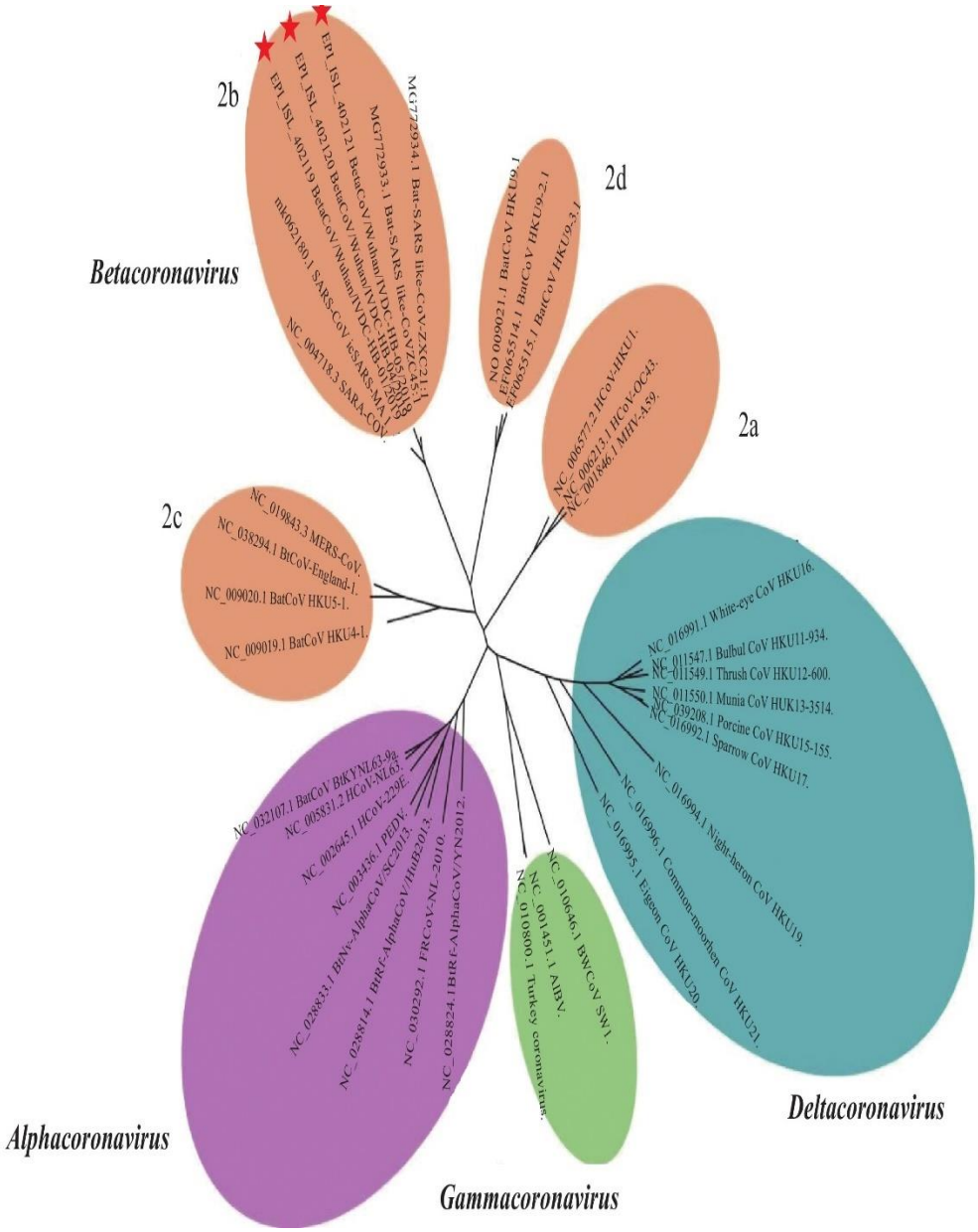


Şekil 1.2 SARS-CoV-2 viryon gösterimi [5]

Bu virüsün 2003 yılında ortaya çıkan ve daha önceden tanımlanmış olan bir koronavirüs olan SARS'ın genomu ile benzer olduğunu bulunmuştur [7].

Bir virüsün yaşam amacı, taşıdığı viral genomun DNA veya RNA üretilebilmesidir. Virüs enfekte edeceği hücredeki reseptörlere bağlandıktan sonra hücre içine girerek kendisini saran yapıdan kurtulur ve kendi viral genomunun üretilmesini sağlar. Daha sonra olgunlaşan virüsler hücre dışına çıkarak yeni hücreleri enfekte ederler ve konakçı yapısında hızla üremeye devam ederler. Virüslerin bir hücreye girebilmeleri için konak hücrede uygun reseptörlerinin bulunması gerekmektedir. SARS-CoV-2 virüsünün hedef

hücrelerin içine girebilmesi için, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2; ACE2 reseptörünü ve 2019-nCoV S hazırlığı için hücresel proteaz TMPRSS2; transmemran serin proteaz 2 bulunmuştur [8]. ACE2 reseptörleri insanlarda özellikle akciğer tip 2 alveol hücrelerinde bulunurken kalp, böbrek, yemek borusu, ince bağırsak ve üriner sistem hücrelerinde de bulunurlar [9].



Şekil 1.3 SARS-CoV-2 filogenetik ilişkisi [4]

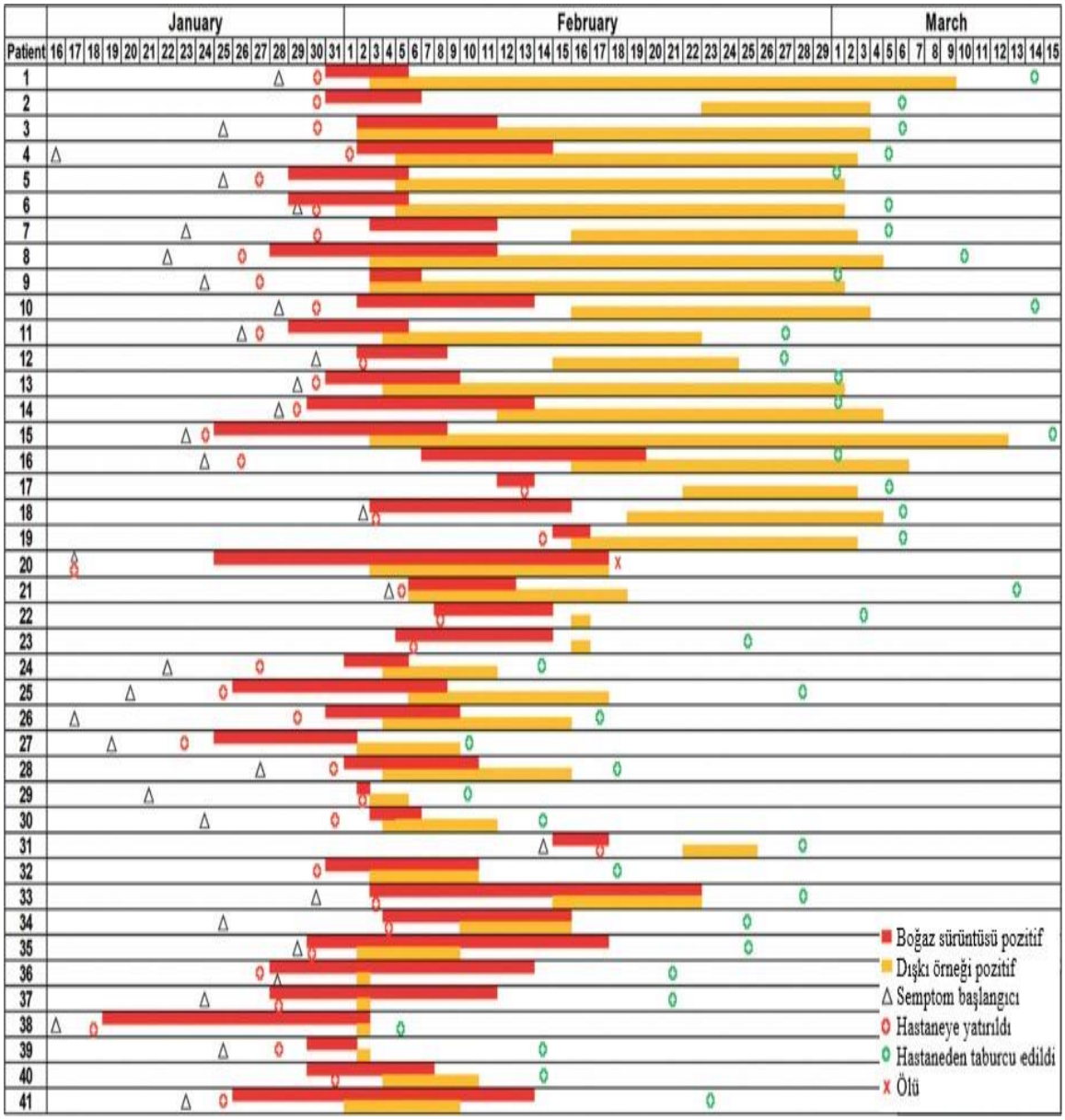
SARS-CoV-2 virüsünün teşhis edilmesi hem ülkemiz hem de dünyadaki diğer tüm ülkelerde hastalığın yayılmasını engellemede en önemli kriterlerden biri olarak görülmektedir. Virüsün teşhis edilmesinde iki temel yöntem büyük önem arz etmektedir. Bunlar çeşitli PCR çalışmaları ve immünolojik testlerdir. Burun ve ağızın arka kısmından alınan örnekler (Nazofarengeal sürüntü) ile yapılan kantitatif Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi COVID-19'un en ideal tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. PCR testlerinin yüksek hassaslığa sahip olması büyük bir avantaj olsa da test sonuçlarının 4-6 saatte alınması, PCR kitlerini uygulamada ve cihazın kullanımında deneyimli personel ihtiyaç duyulması büyük bir dezavantajdır. Çok hızlı bir biçimde yayılan bir virüse karşı zaman büyük bir önem kazanmaktadır. Bu sebep ile daha hızlı sonuç veren antikor test kitleri üretilmiştir. Ancak bu testlerin pozitif vakaları belirlemede %13 yanlış negatif verme ihtimali bulunmaktadır [10].

Covid-19'a neden olan virüsün enfekte olan kişinin hapşırması ve öksürmesi sonucunda, doğrudan temas yoluyla ya da solunum damlacıkları ile yayıldığı düşünülmektedir [6].Virüsün temel bulaşma yolunun hasta bireylerin solunum damlacıkları olduğu en yaygın görüş olsa da hasta bireylerin temas ettiği yüzeylerin hastalığın yayılmasında bir başka yol olarak değerlendirildiği görülmektedir. Bakır yüzeyde 4 saat, aerosollerde 3 saatten fazla, plastik ve paslanmaz çelik yüzeylerde 72 saat süreyle, kartonda 24 saat, SARS-CoV-2'nin canlı kalabildiği belirlenmiştir [11].

SARS-CoV-2 ile aynı virüs ailesinden olan ve Çin ve Suudi Arabistan'da birçok insanın hayatını kaybetmesine sebep olan SARS-CoV ve MERS-CoV'un fekal-oral bulaşmaya neden olması, SARS-CoV-2'un da bu yol ile bulaşma gösterme ihtimalini düşünmeye neden olmaktadır.

Wu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, SARS-CoV-2 olduğundan şüphelenilen 98 hastadan, iki ardışık solunum yolu örneği alarak ve bu numunelerden çıkan pozitif sonuçları doğrulayarak çalışmalarına başlamışlardır. 16 Ocak-15 Mart 2020 arasında hastaların %76'sından hem solunum hem de gaita numuneleri almışlardır. Hastalık seyirlerini izlemek amacıyla, SARS-CoV-2 pozitif olan 41 hastadan fekal numuneler alınmıştır. İlk hastanın solunum numuneleri negatif bulunduktan sonra, devamlı olarak 33 gün boyunca pozitif gaita numunelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Dördüncü hastanın ise, SARS-CoV-2 test sonucu, ilk semptom görüldükten sonra 47 gün boyunca pozitif çıkmıştır. Elde ettikleri bu veriler, hastanın solunum numunelerinde SARS-CoV-

2 RNA test sonucunun negatif çıkmasından sonra, yaklaşık 5 hafta boyunca gaitada numunelerinde viral RNA çıkabileceği olasılığını göstermektedir. Bu nedenle, bir hastanın solunum numunelerinde viral RNA temizlendikten sonra rRT-PCR gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu ile rutin gaita örneği testine devam edilmesini tavsiye etmişlerdir ve SARS-CoV-2'nin yaşayabilirliği, enfektivitesi hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamışlardır (Şekil 1.4) [12].



Şekil 1.4 SARS-CoV-2 RNA pozitif fekal örneklerine sahip 41 hasta için hastalığın seyri boyunca boğaz sürüntülerinden ve fekal örneklerinden alınan sonuçların zaman çizelgesi (Ocak - Mart, 2020) [12]

Birçok bilim insanı ve kuruluş gaita numunelerinde analiz yapılmasını gerekliliğini vurgulamaktadır [13]. Fekal-oral yol ile bulaşma konusu ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar aşağıda detaylı olarak incelenmiştir.

W. Wang ve arkadaşları tarafından 2020 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, SARV-CoV-2'i, 205 COVID-19 hastasının birden fazla bölgesinden alınan numunelerinde tespit etmişlerdir. Ortalama yaşı 44 (dağılım, 5-67 yaş) ve %68'i erkek olan COVID-19 205 hastadan toplam 1070 numune toplanmıştır. Hastaların çoğunda ateş, kuru öksürük, halsizlik ve %19' unda ise ağır COVID-19 hastalığı tespit edilmiştir.

SARV-CoV-2 virüsün en yüksek oranda tespit edildiği numune yüksek bronkoalveoler lavaj sıvısı numuneleridir. Hastaların %93'ünde bu virüs tespit edilmiştir. Bunu takiben, balgam numunelerinde hastaların %72'sinde, nazofarengeal sürüntü numunelerinde hastaların %63'ünde, fibrobronkoskop biyopsi fırça numunelerinde hastaların %46'sında, faringeal sürüntü numunelerinde hastaların %32'sinde, gaita numunelerinde hastaların %29'unda ve kan numunelerinde hastaların %3 ünde bu virüsü tespit etmişlerdir. İdrar numunelerinde ise SARV-CoV-2 virüsüne rastlanmamıştır.

Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz–Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klinik Örneklerin Tespit Sonuçları Tablo 1.1'de verilmiştir.

Bu çalışmada, gaita numunelerinde de SARS-CoV-2'in tespit edilmesinden sonra bu virüsün fekal yolla da bulaşabileceğini vurgulamışlardır [14]. Tablo 1.1'de Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz–Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klinik Örneklerin Tespit Sonuçları verilmiştir.

T. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Çin'in Tianjin şehrinde 3 Şubat-17 Şubat 2020 tarihleri arasında teşhis edilen 3 enfekte çocuk vakası üzerine çalışmışlardır. Covid-19 hastalığı hafif seyreden bu üç çocuk, tedavi sonrasında iyileştikleri görülmüştür. Boğazlarından alınan sürüntü numunelerinde görülen SARS-CoV-2 RNA, tanıdan sonra 7, 11, 14 gün içinde negatif'e dönmüştür. Bununla birlikte, çocuklar taburcu olduktan sonra, boğazlarından alınan sürüntü numunelerinde SARS-CoV-2 RNA negatif çıkmasına rağmen, gaita numunelerinde 10 gün sonunda SARS-CoV-2 RNA pozitif olduğu test edilmiştir. Bu nedenle, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun fekal-oral bulaşma olasılığının, çocuklarda dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır [15].

Tablo 1.1 Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz–Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klinik Örneklerin Tespit Sonuçları [14]

Örnekler ve Değerler	**Bronkoalveoler lavaj sıvısı (n = 15)**	**Fibrobronkoskop biyopsi fırça (n = 13)**	**Balgam (n = 104)**	**Nasal Sürüntü (n = 8)**
Positif test sonucu (%)	14 (93)	6 (46)	75 (72)	5 (63)
	Faringeal Sürüntü (n = 398)	**Gaita (n = 153)**	**Kan (n = 307)**	**İdrar (n = 72)**
	126 (32)	44 (29)	3 (1)	0

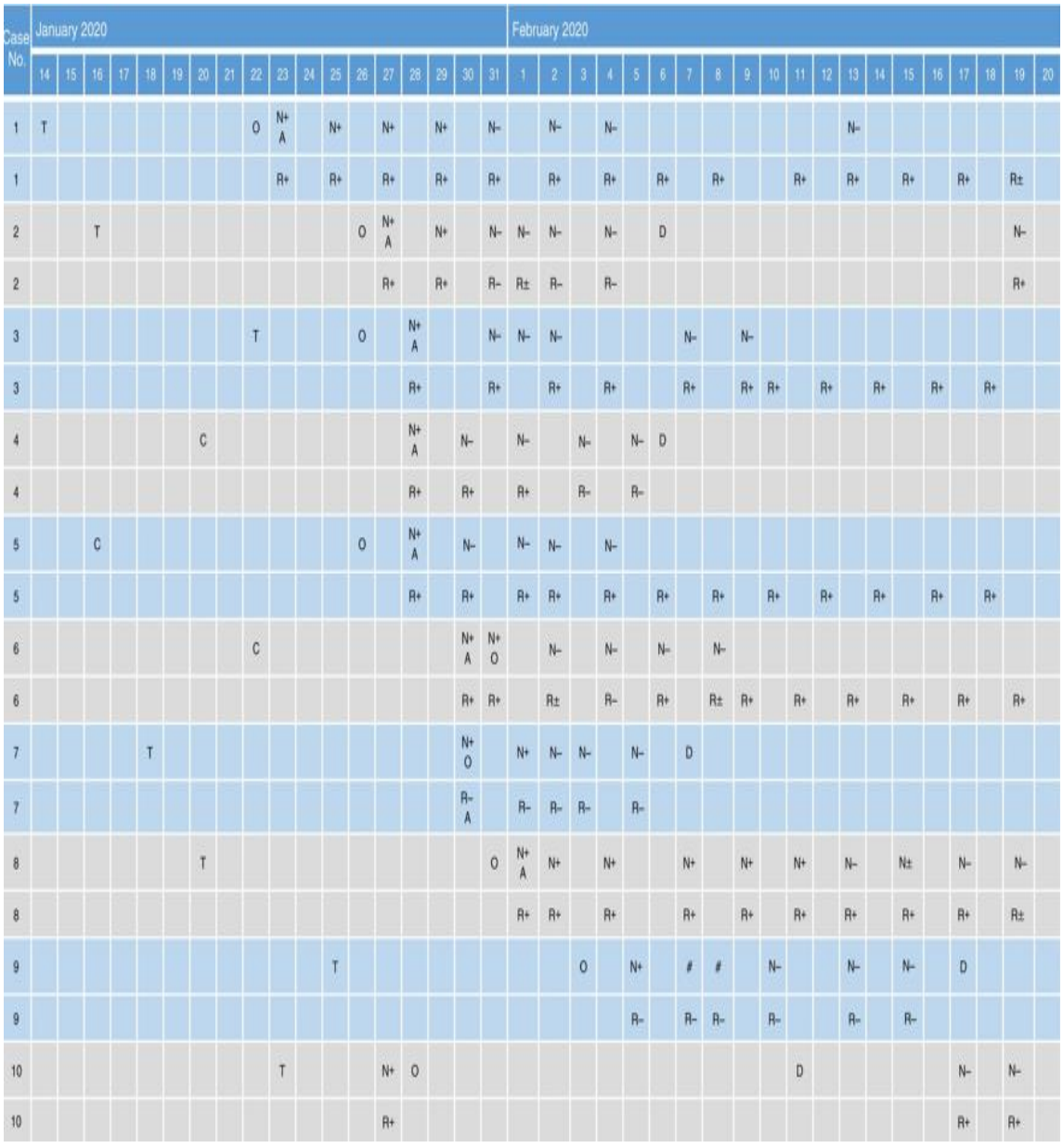
Y. Xu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2 RNA'nın rRT-PCR testi ile doğrulanan on pediyatrik SARS-CoV-2 enfeksiyonu vakası üzerinde epidemiyolojik ve klinik araştırmalar yapmışlardır. Bu vakalardaki semptomlar spesifik olmadığı belirlenmiştir. Göğüs röntgenleri, yetişkin vakalarda enfeksiyonun tanımlayıcı bir özelliği olan pnömoni belirtilerini göstermemiştir ve hiçbir çocukta solunum desteği veya yoğun bakıma ihtiyacına gerek duyulmamıştır.

Özellikle, sekiz çocukta nazofarengeal sürüntü test sonuçları negatif olarak bulunduktan sonra bile, rektal sürüntü ile alınan numunelerde, SARS-CoV-2'nın RNA sonuçlarının pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.5).

Bu durumun rektal-oral bulaşma olasılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Bu bulguları ile, rektal sürüntü testinin karantina sonlandırma zamanını belirlemek ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek için, nazofarengeal sürüntü ve testinden daha yararlı olabileceğini vurgulamışlardır [16].

Y. Zhang ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan diğer bir çalışmada, SARS-CoV-2'yi laboratuvar tarafından onaylanmış şiddetli pnömoni geçiren bir COVID-19 vakasının gaita örneğinden izole etmişlerdir. Son numune alma ve başlangıç numune alma günleri arasında 15 gün bırakmışlardır.

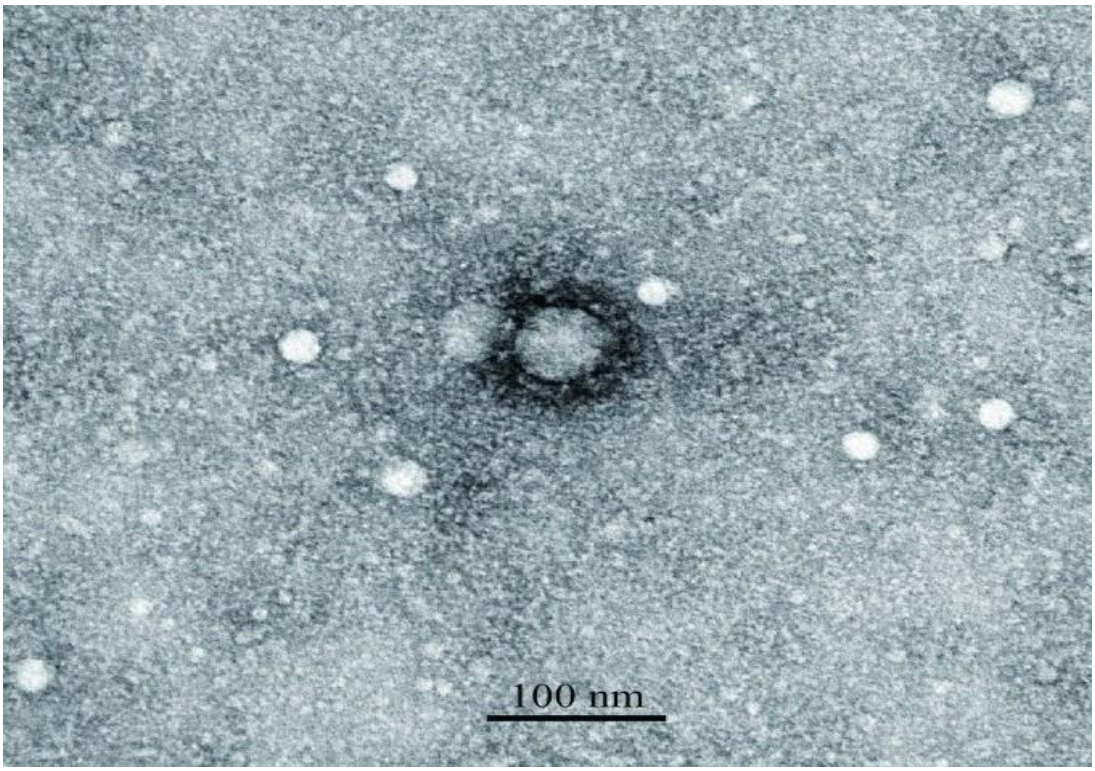
Bu izole edilen virüsün genom dizisi, Çin'de Wuhan kentinde çıkan koronavirüs ile yüksek nükleotit benzerliğine (%99.98) sahip olduğunu göstermiştir. Virüsün morfolojisinin izole edildikten sonra elektron mikroskobu ile incelendikten sonra tipik bir koronavirüs morfolojisine sahip olduğunu belirlemişlerdir (Şekil 1.5).



T, salgın bölgeye seyahat; C, onaylanmış vakalarla temas; O, semptomların başlangıcı; A, Kabul; N+, Nazoferangeal sürüntü pozitif; N-, Nazoferangeal sürüntü negatif; N± Nazoferangeal sürüntü zayıf pozitif; R+, Rektal sürüntü pozitif, R±, Rektal sürüntü zayıf pozitif; R-, Rektal sürüntü negatif; D, Taburcu olma tarihi; # Başarısız örnekleme

Şekil 1.5 SARS-CoV-2 enfeksiyonu doğrulanmış n = 10 bağımsız pediyatrik hastanın majör epidemiyolojik olaylarının ve moleküler test sonuçlarının kronolojisi [16]

Bu sonuçlar, COVID-19 hastalarının gaita numunelerinde de canlı koronavirüs bulunduğunu, bu durumun da 2019-nCoV'in yakın temasta ve hastaların solunum sekresyonları ile temasa ek olarak, potansiyel rekal-oral yoldan da bulaşabileceğini göstermektedir. Bu çalışma ayrıca, 2019-nCoV nükleik asitlerinin gaita numunelerinden tespit edilebildiğini de doğrulamıştır [17].



Şekil 1.6 Gaita süspansiyonunun Vero hücrelerine aşılanmasından sonra elektron mikroskobu kullanılarak tipik koronavirüs morfolojisine sahip bir virüs parçacığı [17]

Chan ve arkadaşları kurutulmuş SARS-CoV virüsünün pürüzsüz yüzeylerde farklı sıcaklıklardaki ve bağıl nemlerdeki stabilitesini araştırmışlardır. Kurutulmuş olan virüsün 22-25°C ve %40-50 bağıl nemde 5 güne kadar yaşayabildiğini ve daha sonra virüs bulaşmasının kademeli bir düşüşle devam ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, 4 saat sonra 38°C'de ve %80-90 bağıl nemde de SARS-CoV-2 virüsünün canlılığının azaldığını vurgulamışlardır [18].

Van Doremalen ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, MERS-CoV'in de düşük sıcaklık, düşük nem koşullarında yaşayabildiğini belirtmişlerdir. %40 bağıl nemde ve 20°C'de ve bu virüsün 48 saat boyunca farklı yüzeylerde yaşayabildiğini, ancak %80 bağıl nem koşullarında ve 30°C'de virüsün canlılığının 8 saate azaldığını açıklamışlardır [19].

Bu çalışmalarda, SARS-CoV ve MERS-CoV'nin çeşitli koşullar altında yaşayabilirliği ve ortamdaki uzun süre varlığı, koronavirüslerin temas veya fomitler yoluyla bulaşma potansiyeli gösterdiği bildirilmiştir [18, 19].

Yeo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, gelecekteki araştırmaların SARS-CoV-2'nin fekal-oral bulaşma olasılığı ile ilgili çevresel çalışmaları içermesi gerektiğini bildirmişlerdir.

SARS-CoV-2 RNA'nın gaita konsantrasyonlarının hastalığın ciddiyeti ve gastrointestinal semptomların varlığı veya yokluğu ile korele olup olmadığını, gaitada SARS-CoV-2'nin enterik tutulumu ve viral atılımına ilişkin çalışmaların gerekli olduğunu bildirmişlerdir. [20].

K.S. Cheung ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olan diğer bir çalışmada, yayınlanmış gastrointestinal semptomlar ve gaitada virüs tespiti için sistematik bir inceleme, meta-analiz gerçekleştirmişlerdir. Covid-19 hastalarından oluşan bir kohorttan Hong Kong'da elde edilen sonuçları özetlemişlerdir.

Virüs RNA'sının, solunum numunelerinde negatif sonuç vermesinden sonra bile, %48.1 hastanın gaita numunelerinde bu virüs RNA'sının pozitif sonuç verdiğini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu nedenle, sağlık çalışanlarının COVID-19'lu hastalarda fekal numunelerin toplanmasında veya endoskopik prosedürlerin uygulanmasında hasta iyileşse bile dikkatli olmaları gerektiğini vurgulamışlardır [21].

Y. Tian ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş olan bir çalışmada, COVID-19'un fekal yolla bulaşma olasılıkları üzerinde durulmuş, Çin'deki en son tedavi protokolünün, bir hastanın hastaneden taburcu edilmesinden önce, 24 saat aralıkla yapılan solunum numunelerinin ikisinin rRT-PCR testinin sonucunun negatif olması ve taburcu olduktan sonra 14 gün boyunca izole edilmesi olarak belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Taburcu olan kişinin gaita numunelerinin hala pozitif olabileceği düşünüldüğünde, tuvaletleri, lavaboları iyice dezenfekte etmenin önemini ve tuvaletleri aile üyeleriyle paylaşmamanın gerektiğini, hastanın izolasyon sırasında el hijyeni için ayrıntılı bir protokol uygulaması gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, bir hasta izolasyondan serbest bırakılmadan önce fekal numune alınarak nükleik asit testi yapılmasını önermişlerdirler.

Endoskopi yapan sağlık personelinin izole iyileşmiş hastalar için, gastrointestinal tüm hastaların doğrulanmış vakalar olduğunu düşünmesi gerektiğini ve buna bağlı olarak çalışırken daha sıkı koruyucu önlemler alması gerekliliğini vurgulamışlardır. Endemik

bölgelerde de tuvaletlerin uygun şekilde dezenfeksiyonu öneminden bahsetmişler; aksi takdirde sanitasyon tesislerinin 'virüs tuzaklarına' dönüşebileceğini bildirmişlerdir [22].

J. Zhang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, laboratuvar onaylı COVID-19 hastalığı olan 14 hastanın 27 Ocak 2020-9 Şubat 2020 tarihlerindeki hastane verileri kullanılmıştır. 4 Şubattan itibaren de PCR kitlerinin temininin artması ile birlikte gaita numuneleri toplanmaya başlamışlardır. 14 COVID-19 hastasının beşinde (%35.7) gaita numunesinde nükleik asit olduğunu ve gaita numuneleri pozitif olan bu hastaların da en az bir gün önce farengeal sürüntü numuneleri test sonuçlarının pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Gaita numuneleri negatif olan hastaların da en az ilk 2 gün boyunca farengeal sürüntü test sonuçlarının negatif olduğunu gözlemlemişlerdir. (Şekil 1.7) Gaita numune testi pozitif olan hastaların gastrointestinal semptomlar yaşamadığını ve akciğer enfeksiyonunun şiddeti ile bu testlerin ilgisinin olmadığını tespit etmişlerdir [23].

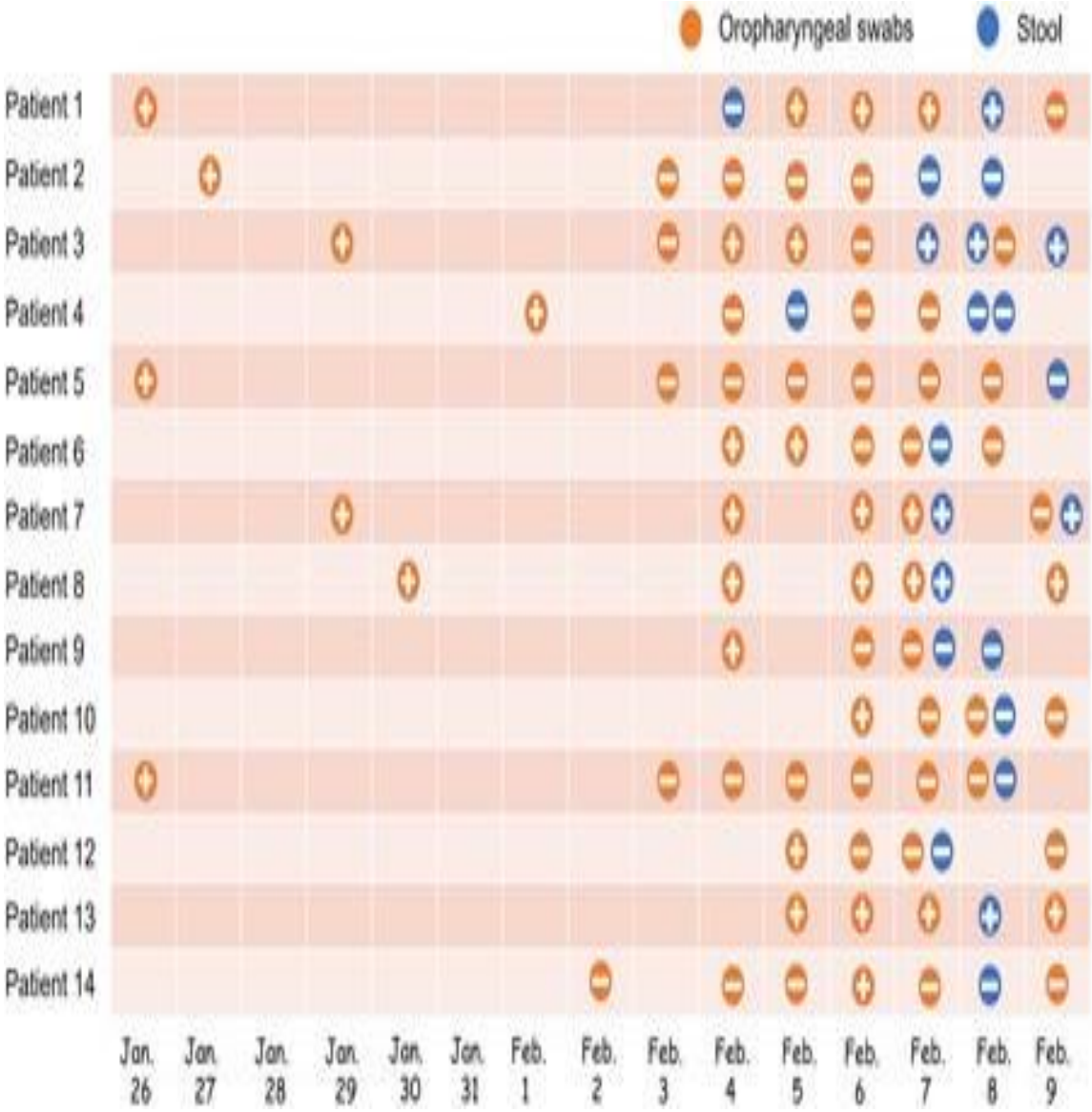
Y. Ling ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, COVID-19 olduğu onaylanan 292 vakadan, 66 hastanın tedaviden sonra iyileştiğini ve çalışmalarına bu iyileşen hastaları aldıklarını belirtmişlerdir. Bu hastaların ortalama yaşı 44.0 (34.0-62.0) olup, %42.4 kadın ve %57.6'nin erkektir.

Hastalardan numuneleri 20 Ocak ve 10 Şubat tarihleri arasında toplamışlardır. rRT-PCR ile farengeal sürüntü testleriyle, iyileşen hastalar için semptomların başlamasından sonra ilk negatif sonuçlarına kadar geçen süreyi 9.5 (6.0-11.0) gün olarak bulmuşlardır. 10 Şubat 2020'ye kadar, 11 iyileşen hastanın (%16.7) gaita numunlerinde viral RNA pozitif olarak görmüşlerdir.

İyileşen diğer 55 hastanın gaita numunelerini, semptom başlangıcından sonraki ortalama 11.0 (9.0-16.0) gün sonra 2019-nCoV için negatif bulmuşlardır. Bu iyileşen 55 hastadan, 43'ünde gaita numunelerinin, boğaz sürüntü numunelerine göre negatif (viral RNA için) olma süresinin daha fazla olduğunu (ortalama gecikme 2.0 (1.0-4.0) gün) belirtmişlerdir. Ayrıca viral RNA'nın, %81.8 (54/66) hastanın gaitasında, boğaz sürüntü numune sonuçları negatif çıksa bile gaita numune sonuçlarının pozitif olduğunu tespit ettiklerini vurgulamışlardır.

Gaitadaki viral RNA tespit edilmesi, virüs içeren aerosollerden yeniden bulaşabileceğini ve virüsün sindirim sistemi yoluyla da bulaşabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, daha fazla bulaşma riskini azaltmak için Covid-19 hastalarının fekal yayılma sürecinde standartlaştırma yapılmasının gerektiğini belirtmişlerdir. Tüm bunların yanında, Covid-

19'lu hastalarda fekal numunelerde viral RNA saptamasının, iyileşme döneminde bile düzenli olarak uygulanması gerektiğinin altını çizmişlerdir [24].



Şekil 1.7 Covid-19 hastalığı ola 14 kişide viral RNA testi sonuçları (26 Ocak - 09 Şubat, 2020) [23]

Xiao ve arkadaşları, 1 Şubat ile 14 Şubat 2020 tarihleri arasında, SARS-CoV-2 ile enfekte olan ve hastanede yatan 73 hasta ile çalışmışlardır. Hastaların 25'i erkek ve 14'ü kadın olmak üzere 39'unda (% 53.42) gaita SARS-CoV-2 RNA pozitif olarak tespit etmişlerdir.

Yaşları 10 ay ile 78 arasında değişen hastaların gaita numunelerinde hastaların SARS-CoV-2 RNA pozitif tespit edilmiştir. Gaita numunelerinde pozitif kalma süresinin 1 ila 12 gün arasında değiştiğini belirtmişlerdir. 17 Hastanın (% 23.29), solunum numuneleri

negatif çıktıktan sonrada, gaita numunelerinin pozitif çıkmaya devam ettiğini görmüşlerdir (Tablo 1.2).

Gaita numunesinden viral RNA'nın sürekli pozitif tespit edilmesinin, enfeksiyöz virionların virüsle enfekte olmuş gastrointestinal hücrelerden salgılandığını gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, gaita numunelerinden rRT-PCR ile SARS-CoV-2 RNA testinin Covid-19 hastalarında rutin olarak yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Gaita numuneleri test sonuçları rRT-PCR testi ile pozitif çıkarsa, hastaneye yatırılan SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastalar için önlemlerin devam etmesi gerekliliğini vurgulamışlardır [25].

Chen ve arkadaşları çalışmalarında, gaita numunesinde SARS-CoV-2 RNA'nın pozitif ve negatif sonuçlar çıkan hastalar arasında demografik, klinik, laboratuvar ve radyolojik bulguların farklı olmadığını göstermişlerdir. 10 hastanın idrar numunelerinde Viral RNA'ya rastlanmamıştır.

Elde edilen bu veriler, Covid-19 hastalarının gaita numunelerinde viral RNA'nın olduğunu göstermiştir. Bu durum SARS-CoV-2'nin fekal-oral yoldan bulaşma olasılığını ortaya koymuştur [26]. Şekil 1.8'de Covid-19 hastalarının örneklerindeki viral RNA için RT-PCR testi sonuçlarının zaman süreci gösterilmiştir.

L. Chen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, bir fekal numunenin pozitif çıktığı ve farengeal, balgam sürüntü numunelerinin virüs RNA sonuçlarının ise negatif çıktığı bir COVID-19 vakasını göstermişlerdir. 25 yaşındaki bir kadın, Wuhan, Çin'in salgın merkezinden seyahat ettikten sonra 18 Ocak 2020'de kardeşiyle temasta bulunduğunu ve bu kişinin 24 Ocak'ta solunum semptomlarının ve ateşinin olduğunu (39.6°C) belirtmişlerdir.

Ayakta ve yatarak tedavi gören hastalara uygulanan semptomatik tedavilerin bu hasta için yetersiz olduğunu vurgulayarak ve bu nedenle bu hastayı 3 Şubat'ta hastanelerine yatırdıklarını belirtmişlerdir. Toraks BT'de bilateral pulmoner opasiteyi "buzlu cam görünümü" olarak saptamışlardır.

Farengeal sürüntü örneği için SARS-CoV-2 testi rRT-PCR ile yapılmış ve sonuç negatif çıkmıştır. Ertesi gün, gaita numunesi için SARS-CoV-2 testi rRT-PCR ile yapılmış ve

Tablo 1.2 SARS-CoV-2 ile Enfekte Olan Hastanın Farklı Örneklerinde Viral RNA Tespitinin Zaman Çizelgesi [25].

Rektum	Onikiparmak bağırsağı	Karın	Yemek Borusu	İdrar	Serum	Gaita	Solunum	Örnek	
NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1.	Gün
NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	P	2.	
NT	NTS	NT	NT	N	N	N	P	3.	
NT	NT	NT	NT	N	N	N	P	5.	
NT	NT	NT	NT	N	N	N	P	7.	
NT	NT	NT	NT	N	N	P	P	9.	
P	P	P	P	N	N	P	P	10.	
NT	NT	NT	NT	NT	P	P	P	11.	
NT	NT	NT	NT	N	N	P	P	13.	
NT	NT	NT	NT	NT	N	P	P	14.	
NT	NT	NT	NT	P	N	P	P	16.	
NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	P	18.	
NT	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	20.	
NT	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	21.	
NT	NT	NT	NT	NT	N	P	P	22.	
NT	NT	NT	NT	NT	NT	P	P	24.	
NT	NT	NT	NT	NT	N	P	P	26.	

NT: Test Edilmedi P: Pozitif, N: Negatif

sonuç pozitif çıkmıştır. Başvurudan sonraki 7 gün boyunca, 2 adet farengeal sürüntü örneğinde ve 2 adet balgam örneğinde sonuçlar negatif bulunmuştur

Anti-enfektif ve anti-viral tedaviden sonra hastanın ateşini düşürerek, solunum semptomları giderilerek ve Toraks BT'de çıkan anormalliklerin iyileştiği görülerek, hastayı hastaneden taburcu etmişlerdir.

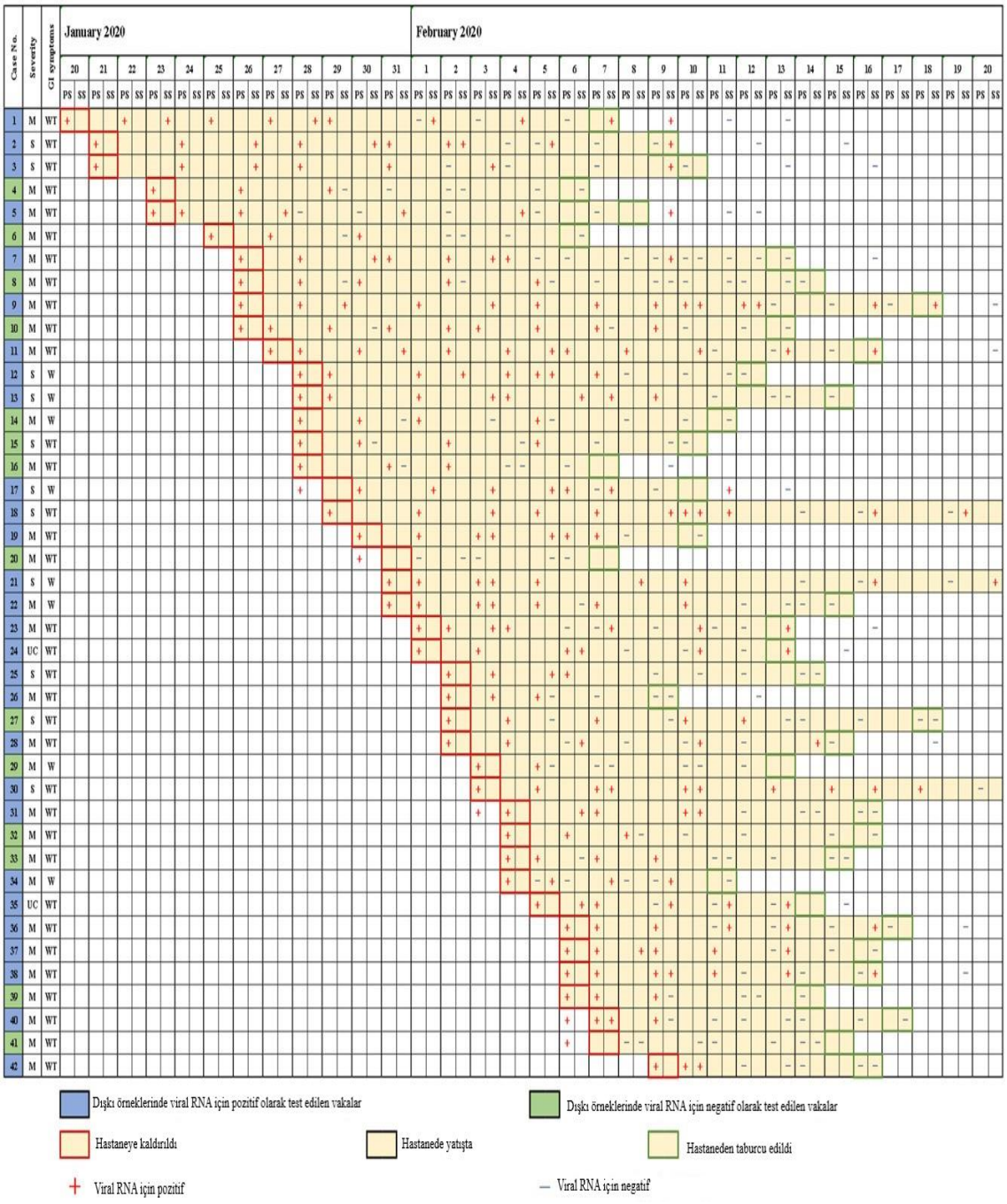
Bu vakanın, virüsün sindirim sisteminde çoğalabileceğini ve potansiyel olarak fekal-oral yolla taşınabileceğini gösterdiğini vurgulamışlardır [27].

W. Zhang vearkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, yerel bir hastanede Covid-19 hastaları ile çalışmışlardır. İki tür araştırma yapmışlardır. Birinci araştırmada 7'si ağır semptomlar gösteren 39 hastadan numune almışlardır. İkinci araştırmada ise, klinik bulgusu olmayan 139 hastadan numune almışlardır. Sadece viral RNA tespiti pozitif çıkan hastaları sonuçlarda göstermişlerdir ve hastalardan cinsiyet veya yaş tercihi olmadan numune almışlardır.

İlk araştırmada, oral sürüntü ve kanın yanı sıra, anal sürüntülerde de viral pozitif bulunup bulunmadığını test etmeyi amaçlamışlardır. Tedavi olmasına rağmen hala virüs taşıyan 15 hasta belirlemişlerdir. Bu hastaların 8'inin oral sürüntü numune sonuçları viral RNA açısından pozitif (%53.3), 4'ünün anal sürüntü numune sonuçları pozitif (%26.7), 6'sının kan numune sonuçları pozitif (%40) ve 3'ünün ise serum numune sonuçları pozitif (%20) çıkmıştır. İki hastada hem oral sürüntü hem de anal sürüntü numune sonuçları pozitif çıkmıştır fakat kan numune sonuçları pozitif çıkmamıştır.

Viral RNA'nın oral sürüntü örneklerinde bulunmasa bile, anal sürüntü ve kanda tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Daha sonra başka bir hasta grubunda viral RNA tespit etmek için hem oral hem de anal sürüntü numuneleri ile yapılan iki ardışık çalışma yapmışlardır. Bu araştırmadaki hastalar hastalar 16 kişidir ve 10 günlük tıbbi tedavi görmüşlerdir. 0. günde bu 16 hasta numuneler dan 8 hastada oral sürüntü numune sonuçlarını pozitif (%50) ve 4 hastada anal sürüntü numuneleri sonuçlarını pozitif (%25) bulmuşlardır. Beşinci günde sadece 4 (%25) hastada oral sürüntü numune sonuçlarını pozitif bulmuşlardır. Buna karşılık, 6 hastada anal sürüntü numuneleri sonuçlarını pozitif (%37.5) bulmuşlardır. 5. günde anal sürüntü numunelerinin sonuçlarının pozitif çıkma yüzdesinin (6/8, %75), oral sürüntü numunelerinin sonuçlarının pozitif çıkma yüzdesinden (4/8, %50) daha fazla olduğunu



20 Ocak - 20 Şubat 2020 tarihleri arasında kayıtlı 42 Covid-19 hastasının faringeal sürüntü ve gaita örneklerinde SARS-CoV-2 RNA için RT-PCR testi sonuçlarının sürüntü ve dışkı örneklerinde SARS-CoV-2 RNA için RT-PCR testi sonuçlarının süresi.;GI: Gastrointestinal Semptomlar; M: Hafif Vaka; PS: Faringeal Sürüntü Örneği; S: Ağır Vaka; SS: Gaita Örneği; UC: Komplike Olmayan Vaka; W: Gastrointestinal Semptomları Olan; WT: Gastrointestinal Semptomlar Olmayan

Şekil 1.8 COVID-19 hastalarının örneklerinde viral RNA için RT-PCR testi sonuçlarının zaman süreci [26]

görmüşlerdir. Bir diğer gözlem ise, 0. günde anal sürüntü numuneleri sonucu negatif olarak tespit edilen 6 hastada, 5. günde anal sürüntü numunelerinde bu virüsün yeniden ortaya çıkmasıdır. Bu veriler ışığında araştırmacılar, erken dönemde daha çok oral pozitif sayısı varken, daha sonraki dönemde anal pozitif sonuçlarda artışa doğru bir kayma olabileceğini düşünmektedir [28].

Bununla birlikte hastalıkla ilgili çeşitli çalışmalarda, enfektif aerosoller üreten Covid-19 hastalarının dışkı yoluyla bulaşabileceği belirtilmiştir. Epidemik bölgelerdeki endoskopik işlemlerin çapraz enfeksiyona neden olabileceği vurgulanmıştır. Aynı şekilde tüm cerrahi uygulamalarda uygun eğitim almış personel tarafından uygun aletler kullanılarak yapılması gerekliliği açıklanmıştır. Bunun yanında, SARS-CoV-2 virüsünün aerosol haline gelmesine neden olduğu düşünülen laparoskopik veya açık cerrahi işlemler ile de personele bulaşabileceği anlatılmıştır [29-33].

Y. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada, potansiyel fekal-oral bulaşma olasılığı araştırılmıştır. 258 gaita örneğini Çin'in dokuz ilinden toplamışlardır. RT-PCR kullanarak viral RNA tespit etmişlerdir.

SARS-CoV-2 nükleik asit pozitif hastaların ortalama yaşı 47 (1-86 yaş arası) ve SARS-CoV-2 nükleik asit negatif hastaların ortalama yaşı 41 (5-94 yaş arası) olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel olarak iki grup arasında fark bulunmamıştır. Tüm illerden alınmış olan gaita örneklerinde SARS-CoV-2 tespit edilmiştir. Pozitif orana göre düşükten yükseğe doğru sıralanan iller şunlardı: Jilin (%5.9, 1/17), Gansu (%18.5, 12/65), Hebei (%21.4, 9/42), Guizhou (%45.9/20), Shaanxi (%50, 10/20), Sichuan (%52.4, 11/21), Heilongjiang (%54.2, 13/24), Fujian (%55.6, 20/36) ve Chongqing (%61.5, 8/13)'dir.

Hastalığın başlamasından sonraki 2 hafta içinde nükleik asit içeriği, artmıştır. Klinik açısından, nükleik asit kritik hastaların gaitasında iki hafta içinde, şiddetli ve hafif hastaların gaitasında dört ila beş haftaya kadar saptanabileceği belirtilmiştir. Bu durumun gaitadaki canlı virüsün enfeksiyona yol açabileceği ve sağlık koşullarının iyi olmadığı bölgelerde hastalığındaha fazla yayılmasına neden olabileceği açıklamıştır [34].

S. Park ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada, asemptomatik veya hafif Covid-19 hastalarının gastrointestinal semptomlarını ve gaitalarına virüs bulaşmasını araştırmışlardır. 4 Nisan 2020'den 24 Nisan 2020'ye kadar Kore'de karantinaya alınan asemptomatik veya ateş ve pnömoni olmadan hafif seyreden Covid-19 ve uzun süreli

SARS-CoV-2 solunum yolu bulaşması olan 46 hastadan (medyan yaş, 26 yıl; %46 erkek) veri toplamışlardır.

Üst solunum örnekleri haftada iki kez olmak üzere, orofaringeal, nazofaringeal sürüntüler ve alt solunum örneklerini (balgam) olmak üzere toplanmıştır.

Covid-19 teşhisi konulması ve gaita örneği toplamanın başlaması arasındaki medyan aralık 37 gündür. 213 Gaita örneği 46 hastadan toplanmıştır. RT-PCR analiz yöntemini solunum ve gaita örneklerinde SARS-CoV-2'yi saptamak üzere kullanmışlardır.

46 Hastanın 16'sında (%35) Gastrointestinal belirtiler görülmüştür. En yaygın olanı ishal (%15), bunu dispepsi (%11), karın ağrısı (%11) ve mide bulantısı (%2) izlemiştir. Gastrointestinal semptomları olmayan 2 (%4) hastanın gaitasında virüs RNA saptanmıştır. Virüsün gaitaya bulaşması teşhisten sonraki 50. güne kadar devam etmiştir.

Kore'de karantinada bulunan Covid-19 hastalarından alınan gaita ve solunum örneklerinin analizinde, gastrointestinal sistemin, gastrointestinal semptomları olmayan asemptomatik veya hafif hastalığı olan hastalarda bile SARS-CoV-2'nin bulaşma yolu olabileceğini bulunmuştur. Bu hasta grubunda, virüsün gaitaya bulaşması solunum örneklerinin viral yükü,ile ilişkili olduğu görünmektedir [35].

Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Çin'in Wuxi şehrinde taburcu olan hastaları takip etmişleridir, 15 Mart 2020 tarihi itibariyle Covid-19 hastalığından iyileşen toplam 69 kişi hastaneden taburcu edildiğini bildirmişleridir.

Hastaneden taburcu olduktan sonra hastalara merkezi izole bir alanda en az 14 gün karantina protokolünü sürekli olarak uygulama talimatı verilmiştir ve daha önce tarif edilen bir yöntem izlenerek belirli günlerde nazofaringeal ve anal sürüntülerde RT-PCR testleri tekrarlanmıştır. Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından RT-PCR test kitleri (BioGerm) önerilmiştir.

Tüm RT-PCR testleri tek bir laboratuvar teknisyeni tarafından yapılmış olup, için benzer marka test kiti kullanılmıştır. Herbir test serisinde rutin olarak hem internal hem de negatif kontroller gerçekleştirilmiştir.

Dört Covid-19' hastası iyileştikten sonra 4-12 gün sonra, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için pozitif test edilmiştir ve taburcu olan bu dört hastadan üçünde nazofaringeal sürüntülerde RT-PCR testi sonucu pozitif elde edilmiştir.

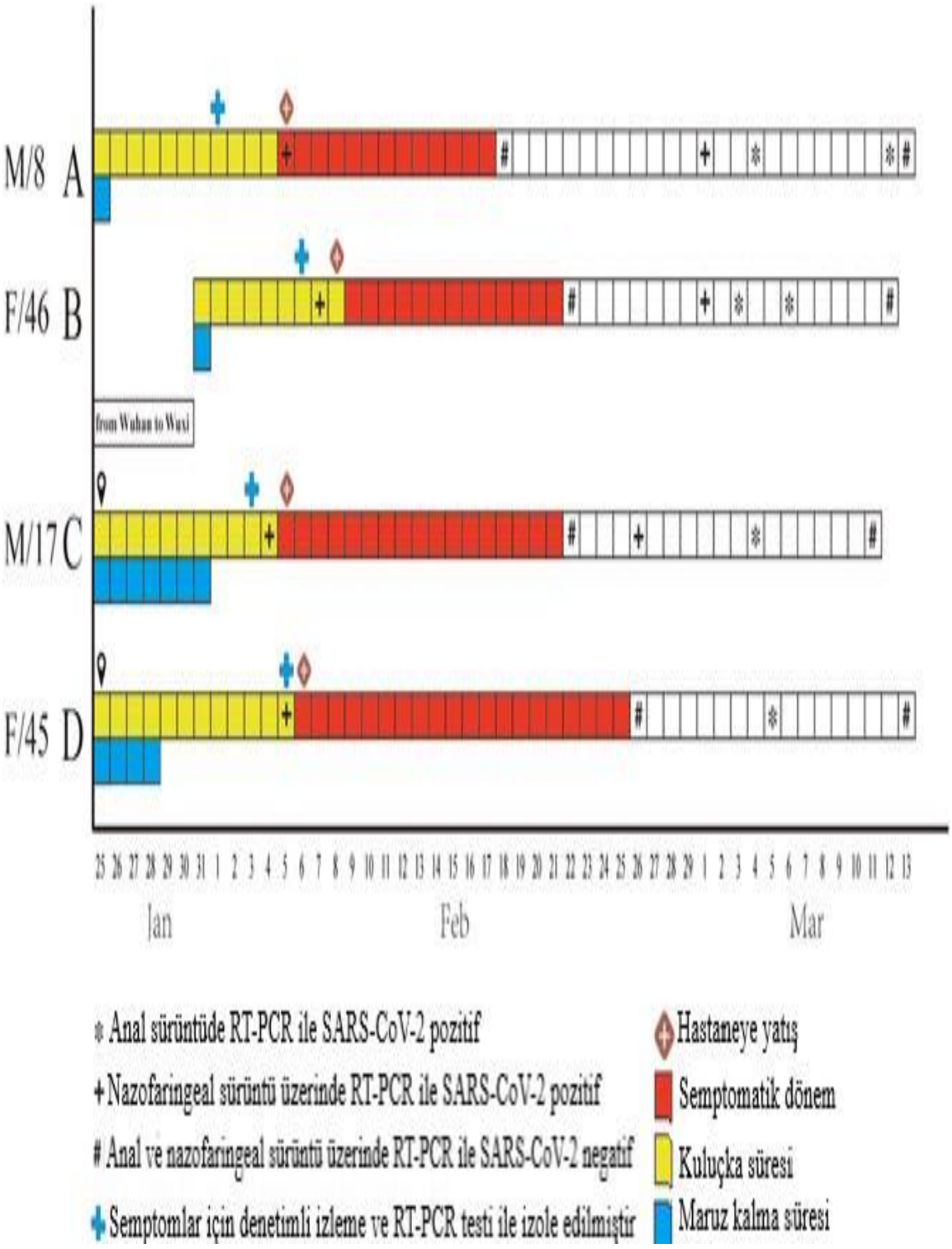
Ayrıca, 8 yaşında bir erkek çocuğunda anal sürüntüde yaklaşık 9 gün sonra SARS-CoV-2 virüsü pozitif olduğunu bulmuşlardır. Dört hastanın hepsine epidemiyolojik inceleme ile Covid-19 teşhisi konmuştur ve hastaların ikisinin erkek olduğunu ve yaş aralıklarının 8-46 arasında değiştiğini belirtmişlerdir (Şekil 1.9).

Başlangıç semptomları olarak bu dört hasta, öksürük, ateş, veya her ikisi ile başvurmuşlardır. Tomografi-BT görüntülemesinde karışık buzlu cam opasifikasyonu, veya buzlu cam opasifikasyonu ve akciğer konsolidasyonu görülmüştür.

İyileşme sürecinin semptom başlangıcından itibaren 13-20 gün arasında değişmektekte olduğu belirtilmiştir. Covid-19 dört hastanın iyileşmelerinin ardından, bu hastaların anal sürüntülerinde RT-PCR sonuçlarının SARS-CoV-2 virüsü için pozitif olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, gaita örneklerinin elleri, yiyecekleri ve suyu kontamine edebileceğini ve ardından ağız, solunum mukozası ve konjonktivayı geçerek enfeksiyona neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, oral/nazofaringeal sürüntülerde viral testin tanı ve atılım kriterleri için mevcut yöntemlerin mükemmel olmadığı, orofaringeal/nazofaringeal örnek negatifken, gaitada canlı SARS-CoV-2 bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Bu doğrultuda bulaşma için dikkate alınması gereken sağlık koruması için, bu bilgilerin Covid-19'un dünya çapında hızlı yayılmasını yavaşlatabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, az sayıda hasta ile gerçekleştirilen bu çalışmada, bu hastalığın prognozunu kapsamlı olacak şekilde anlamak için daha büyük ölçekli bilimsel çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu önemle vurgulamışlardır [36].



Şekil 1.9 Ocak-Mart 2020 arasında Çin'in Jiangsu Eyaleti, Wuxi Şehrinde, şiddetli akut solunum sendromu SARS-CoV-2 enfeksiyonunun epidemiyolojik bağlantısı ve zaman çizelgesi. RT-PCR, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu [36]

Tulio ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada;. RT-PCR testi ile Ocak-Temmuz 2020 tarihleri arasında 121 AGE gaita örneği analizi gerçekleştirmişleridir. Akut gastroenterit (AGE) semptomları gösteren hastalardan alınan gaita örneklerinde SARS-CoV-2'i tespit etmişlerdir.

Bu numunelerin %27,5'inde sonuç pozitif bulunmuştur. Numuneler RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR ile yeniden test edilmiştir. Ct değerlerindeki küçük değişikliklerle SARS-CoV-2 RNA pozitifliği tüm numunelerde doğrulanmıştır. Pozitif örnekler mart ayında 2 adet, nisan ayında 1 adet ve haziran ayında 7 adet olmak üzere toplanmıştır.

Nisan-Temmuz 2020 (n = 29) arasında Brezilya'da Covid-19 vaka sayısının arttığı dönemde toplanan AGE gaita örneklerinin %27,5'inde SARS-CoV-2 RNA tespit edilmiştir.

Bu örnekler, Covid-19 semptomları hafif veya asemptomatik enfeksiyon geliştiren, çocuklardan veya genç yetişkinlerden alınmıştır.

Bulguları, özellikle çocuklar ve genç yetişkinler arasında, örneğin okul derslerine devam ederken, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken bir belirtisi olarak gastrointestinal semptomlara dikkatin artırılmasını belirtmişlerdir. Gaita numunelerinden virüs izolasyonu araştırmalarının fekal-oral bulaşma olasılıkları için teşvik edilmesi gerekliliğini vurgulamışlardır [37].

1.2 Tezin Amacı

SARS-CoV-2 virüsünün teşhis edilmesi hem ülkemiz hem de dünyadaki diğer tüm ülkelerde hastalığın yayılmasını engellemede en önemli kriterlerden biri olarak görülmektedir. Virüsün teşhis edilmesinde iki temel yöntem büyük önem arz etmektedir. Bunlar çeşitli immünolojik testler ve RT-PCR çalışmalarıdır. Burun ve ağızın arka kısmından alınan nazofarengeal sürüntü örnekleri ile yapılan kantitatif RT-PCR yöntemi Covid-19'un en ideal tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Çok hızlı bir biçimde yayılan bir virüse karşı zaman büyük bir önem kazanmaktadır. Covid-19'a neden olan virüsün enfekte bir kişi öksürdüğünde veya hapşırdığında esas olarak kişiden kişiye, doğrudan temas yoluyla ve üretilen solunum damlacıkları ile yayıldığı düşünülmektedir. Virüsün temel bulaşma yolunun hasta bireylerin solunum damlacıkları olduğu en yaygın görüş olsa da hasta bireylerin temas ettiği yüzeylerin hastalığın yayılmasında bir başka yol olarak değerlendirildiği görülmektedir.

Gaita numunelerindeki virüslerin ellere, yiyeceklere, suya vb. bulaşabileceği ve böylece virüsün solunum mukozası, ağız içi, konjonktiva vb. bölgelere yerleşerek enfeksiyon geliştirilmesi durumu için fekal-oral yol ile bulaşma ifadesi kullanılmaktadır. Fekal-oral yolla bulaşma, bu tez çalışmasının temel dayanak noktasını oluşturmuştur. Tedavi gören hastanın taburcu olduktan sonra ne kadar süre gaitasında virüsü taşıyabileceği araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasındaki amaç, tedavi gördükten sonra, 24 saatten daha dazla bir zaman sonunda alınan iki üst solunum yolu örneğinin PCR test analiz sonucu negatif çıkan 65 hastadan 7 günlük aralıklar 30 gün boyunca 4 adet gaita numunesi alınarak ve virüsün varlığı yeni geliştirilen tanı kiti kullanılarak RT-PCR yöntemi ile analiz edilmesidir.

1.3 Hipotez

SARS-COV2 virüsünün 11 Mart 2020 tarihinde ülkemizde resmi olarak görülmesinin ardından vaka sayısı hızla artmış ve günümüz tarihine kadar hastalık birçok kişiye bulaşmış ve çoğu kişinin ise yaşamını yitirmesine sebep olmuştur. Hastalık sürecinde sadece toplumun sağlığı değil aynı zamanda ekonomi, sosyal düzen, eğitim gibi bir toplumun temel taşlarını oluşturan birçok sistem olumsuz etkilenmiştir. Salgının önlenmesinde, oluşan toplum bilinci ve devletimiz tarafından alınan önleyici tedbirler hastalığın yayılmasını kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Özellikle tüm toplumumuzun, toplumsal yaşama dönmeye başladığı bu süreçte önleyici tedbirler daha fazla önem kazanmakta ve virüs hakkında önleyici tedbirlere dönüştürülebilecek bilgilere ihtiyaç duyulması kaçınılmaz görülmektedir.

Tez çalışmasının sonucunda, hakkında kısıtlı bilgiliye sahip olduğumuz virüs ile ilgili yeni bilgilerin literatüre kazandırılacağı şüphesizdir. Yapılan çalışmalarda, hastalığın üst solunum yollarındaki sürecine çoğu zaman odaklanıldığı görülmektedir. Fekal yolda nasıl bir süreç izlediği ile ilgili kısıtlı çalışmalar vardır ve yaptığımız çalışmanın hastalığın bu kısmının aydınlatılmasında katkısının olacağına inanıyoruz.

Elde edilecek veriler, fekal-oral yol bulaştırma riskine karşı kişisel hijyeni korumak, evlerde, tuvaletlerde, halka açık yerlerde ve ulaşım araçlarında sık sık ellerin yıkanması ve nesnelerin yüzeylerinin dezenfekte edilmesi gibi halkın sağlığını koruma ve bilinçlendirme çalışmalarında kullanılabilecektir.

Çalışmamızda, hasta taburcu olduktan sonra gaitasında virüsü ne kadar süre bulundurduğu belirlenecektir. Bu durum taburcu etme kriterleri arasına gaita

numunelerinin de negatif sonuç vermesi gibi bir kriterin eklenmesini sağlayabilir veya hasta taburcu olduktan sonra diğer bireylerin korunmasına karşın alınması gereken tedbirlerin revize edilmesini ve farkındalığın artmasını sağlayabilir.

Tez çalışmamız sadece sağlık alanında değil dolaylı olarak Ülkemiz ekonomisine de katkı sağlayacaktır. Her bir bireyin hastalığa yakalanması engellenerek, maliyetli tedaviler ve üretime engel olan iş kayıpları azaltılabilir.

Çalışmamızın sonuçlarının sağlayacağı yararlar sadece ülkemizin değil tüm dünyanın yararına gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılabileceğinden evrensel bir etkiye sahiptir.

2
KURUMSAL TEMELLER

2.1 Koronavirüsler

1930'ların başında koronavirüsler, evcilleştirilmiş tavukların akut solunum yolu enfeksiyonuna neden olduğu bilinen ve günümüzde kuş enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV) olarak bilinen bir virüsün bulunmasıyla keşfedilmiştir.

1960'larda ilk insan koronavirüsleri (HCoV) keşfedilmiştir. Birleşik Krallık, Salisbury yakınlarındaki Soğuk Algınlığı Birimi'nde insan gönüllülerle yapılan araştırmada, gönüllülerden alınan burun sürüntülerinin organ kültürlerine aşılandığı in-vitro deneyler, daha önce IBV için tarif edildiği gibi koronavirüslerin karakteristik morfolojisine sahip zarflı virüslerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu ajanlar için, negatif boyamadan sonra elektron mikroskobundaki karakteristik saçaklı görünümlerini yansıtan koronavirüs (Latince: korona, taç) terimi benimsenmiştir.

2003 yılında SARS'ın ortaya çıkmasına kadar, yalnızca iki tane HCoV; 229E ve OC43, insan patojenleri olarak kabul edilmiştir. Her ikisi de hafif ve önemsiz bir hastalık olarak ve soğuk algınlığının nedenleri olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle bu konuda araştırma yapılmamıştır.

SARS'a yeni bir koronavirüsün neden olduğunun anlaşılmasının ardından, solunum yolu hastalığı ile ilişkili iki yeni HCoV; NL63 ve HKU-1 daha bulunmuştur. Çeşitli türlerde çok sayıda başka hayvan koronavirüsünün keşfedilmesi, bu virüs grubuna yeniden oluşan ilgi sonucu gerçekleşmiştir [38].

2.1.1 Koronavirüslerin Özellikleri

Nidoviraller takımındaki üç RNA virüsü ailesinden biri Coronaviridae familyasıdır. Diğeri sırasıyla kuş ve böceklerin patojenlerini içeren Roniviridae ve Arteriviridae'dir.

Bu aile, Torovirinae ve Coronavirinae ve olmak üzere iki alt aileden oluşmaktadır. Toronovirinae, temel olarak sığırların, atların, kedilerin, domuzların ve keçilerin enterik enfeksiyonlarına neden olan virüsleri içermektedir.

Torovirinae alt ailesinin üyelerinin ekonomik önemi olmasına rağmen, insanlarda enfeksiyona neden olduğu henüz bilinmemektedir. Tüm koronavirüslerde 30 kb uzunluğa

kadar tek sarmallı bir RNA genomuna sahip ortak bir morfoloji görülmektedir. Coronavirinae alt ailesinin üyeleri ise dört cinse ayrılmaktadır;

1- Alfakoronavirus cinsi, insan virüsü HCoV-NL63'yı ve bir başka insan koronavirüsü olan HCoV-229E'yı ve birçok hayvan virüsünü içermektedir.

2- Betakoronavirus cinsi, üç insan virüsü HCoV-OC43, SARS-HCoV, HCoV-HKU1 SARS ile ilişkili koronavirüs, prototip fare hepatit virüsü MHV ve Orta Doğu spiratuvar sendromu MERS koronavirüsü ve bir dizi hayvan koronavirüslerini içermektedir.

3- Gamakoronavirus cinsi, kuş virüslerini ve balinaları içerir.

4- Deltakoronavirus cinsi ise, kuşlardan ve domuzdan izole edilen virüsleri içermektedir. 2005 yılından günümüze, yarasalardan düzinelerce yeni koronavirüs izole edilmiştir. İnsan solunum yolu koronavirüsleri, SARS koronavirüsü ve MERS koronavirüsünün her birinin orijinal olarak yarasa atalarından kalma virüslerden ortaya çıkmış olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır.

Bir dış grup olarak at torovirüsü Berne ile komşu birleştirme yöntemiyle, RdRp geninin nükleotit hizalamalarından üretilen köklü bir filogenetik ağaç Şekil 2.1' de gösterilmiştir.

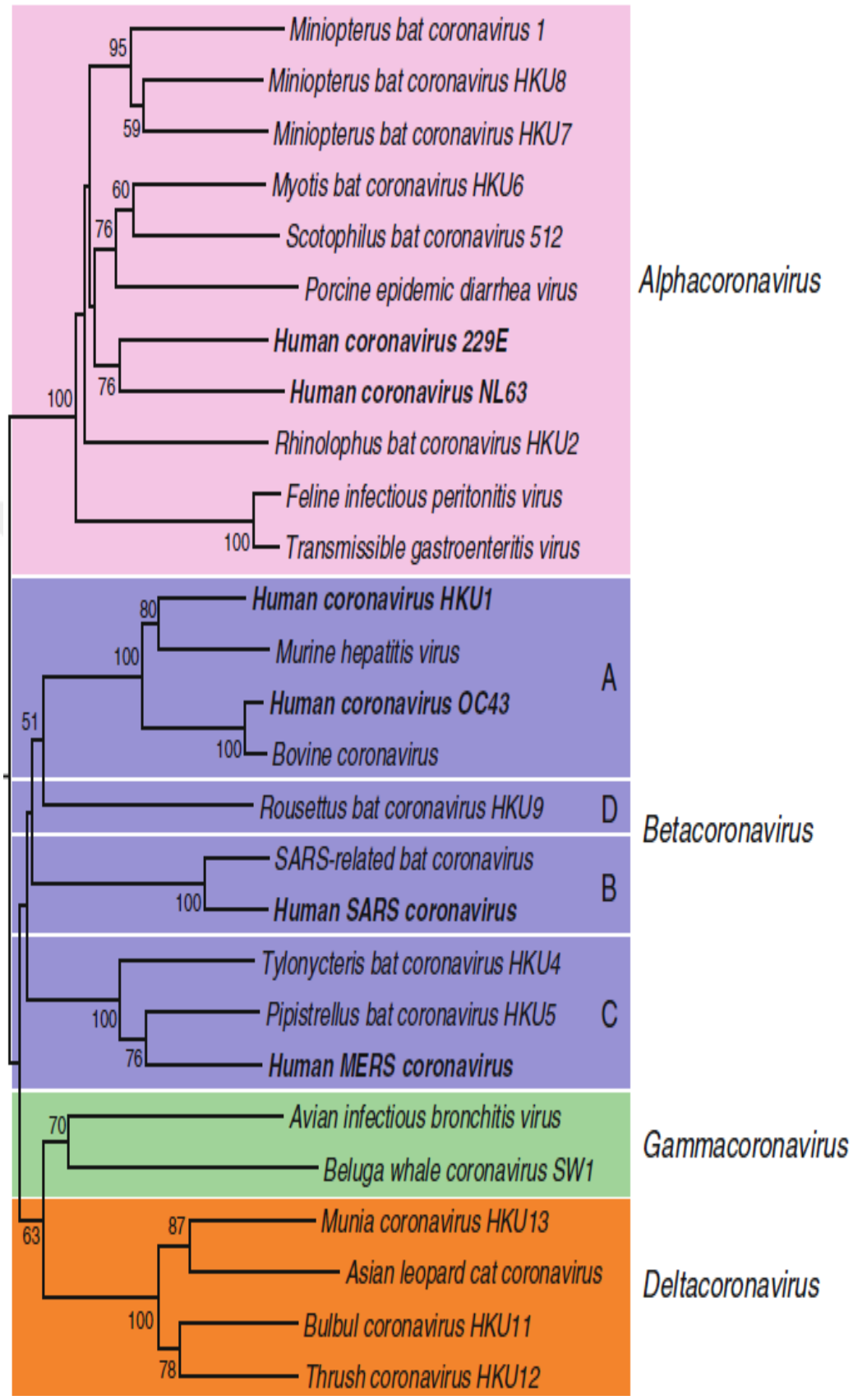
Dört koronavirüs türü Alfa - (pembe), Beta- (mavi), Gama- (yeşil) ve Delta-koronavirüs (turuncu) farklı renklerle gösterilmiştir. A'dan D'ye kadar farklı betakoronavirüs soyları belirtilmiştir. İnsan koronavirüsleri kalın harflerle belirtilmiştir. İnsan betakoronavirüs koronavirüsü 2c'yi içermektedir [38, 39].

2.1.2 Koronavirüslerin Genom ve Yapıları

Koronavirüs adı, bir güneş koronasına benzeyen 120-160 nm'lik küresel veya pleomorfik bir cisim üzerinde 20 nm'lik büyük taç yaprağı şeklindeki yüzey çıkıntıları "sivri uçlar" ile elektron mikroskobu altındaki görünümünden gelmektedir (Şekil 2.2). Betakoronavirüsler, glikoproteini olan 5-7 nm homodimerik hemaglutinin-esteraz (HE) ek bir yüzey sergilemektedir.

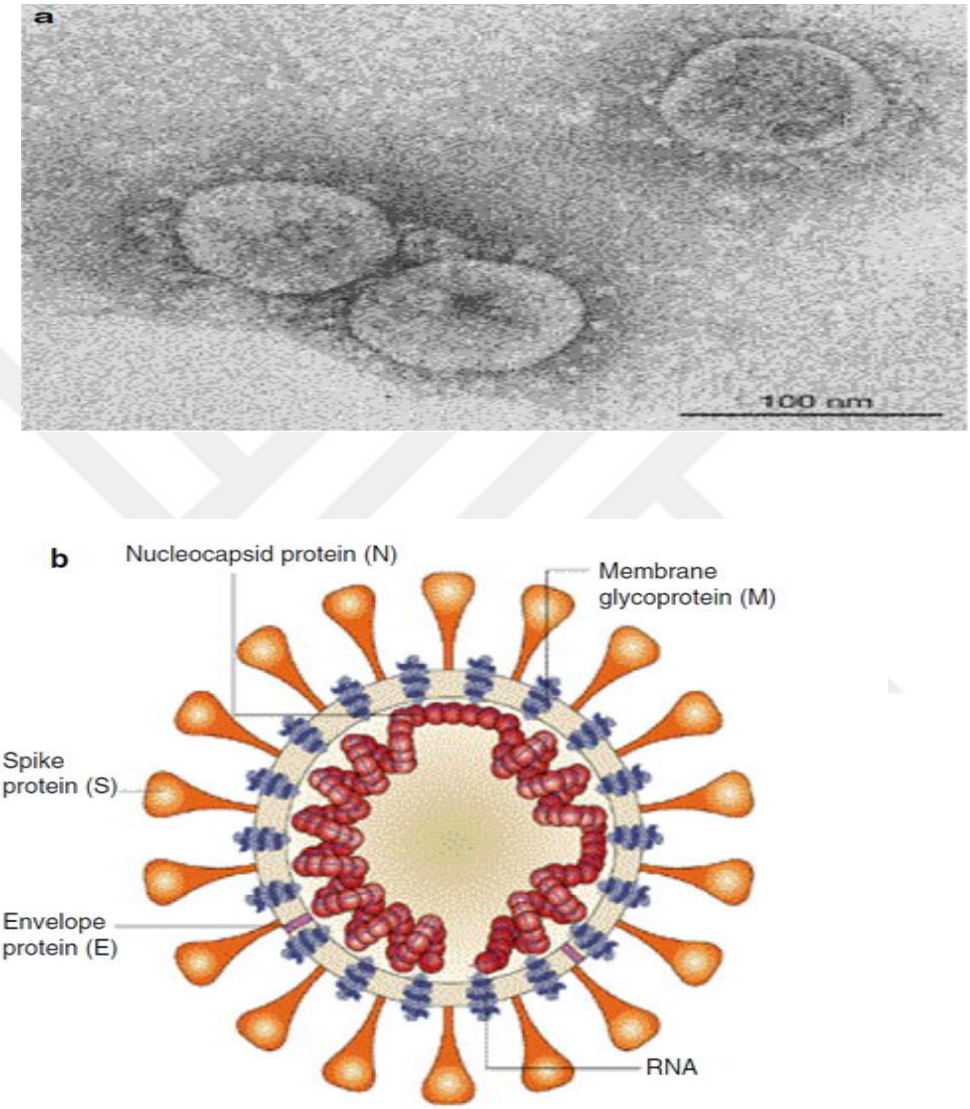
Ribobonükleoprotein, 10-20 nm çapında sarmal yapılar halinde ya da 1-2 nm çapında uzun bir şerit gibi görünmektedir.

Virionlar, lipit çözücülere, iyonik olmayan deterjanlara, ısıya, formaldehit, UV ışınlarına ve oksitleyici maddelere karşı hassastırlar [41].



Şekil 2.1 Coronavirinae'nin alt ailesinin üyeleri arasındaki filogenetik ilişkileri [38]

Dış grup olarak at torovirüsü Berne ile RdRp ve helikaz alanlarının amino asit dizisi hizalamalarından köklü bir komşu birleştirme ağacı üretilmiştir. Ağaç, Alpha-, Beta- ve Gammakoronavirus cinslerine ve öngörülen renk kodlu yeni bir cinse karşılık gelen dört ana monofiletik kümeyi ve ayrıca A'dan D'ye kadar farklı betakoronavirus soylarını göstermektedir.



(a) Vero hücrelerinde yetiştirilen şiddetli akut solunum sendromu ile ilişkili koronavirüsün (SARS ile ilişkili CoV) elektron mikrografı. (b)Büyük, sopa şeklindeki çıkıntılar (başak proteini), virüse adını veren taç benzeri bir korona oluşturur. Spike (S), membran (M) ve zarf (E) proteininden oluşan bir lipit çift tabakası, viral lineer pozitif sarmallı RNA ile ilişkili nükleokapsid (N) proteininden oluşan sarmal nükleokapsidi gizler. Konakçı hücrelerin hücre içi zarlarından lipit zarf türetilir [42].

Şekil 2.2 Koronavirüslerin morfolojisi (a), Koronavirüsün şematik gösterimi (b) [41, 42]

2.1.3 Koronavirüslerin Yaşam Döngüsü

Koronavirüsler şimdiye kadar açıklanan en büyük RNA genomlarını içermektedir. Tek sarmallı RNA molekülü 5' başlığa ve 3' poli(A) kuyruğa sahiptir.

Bir koronavirüsün yaşam döngüsü, isimsiz tacını oluşturan ve koronavirüslerde gözlenen ayırt edici spike (S) proteininin, bir reseptör ile S1 alanı aracılığı ile etkileşime girmesiyle başlamaktadır. Zar füzyonu ile S2 alanının aracılık etmesi ile giriş gerçekleşmektedir. Replikasyonun gerçekleştiği sitoplazmaya RNA genomu daha sonra salınmaktadır. Ana translasyon üreticisi, örtüşen açık okuma çerçeveleri ORF1a ve ORF1b'yi bir ribozomal çerçeve kaydırma mekanizması ile tek bir poliprotein üretmek için oluşturmaktadır (Şekil 2.3).

Negatif sarmallı RNA'yı sentezleyen viral replikasyon kompleksini birleştirmek için gerekli bileşenler, viral olarak kodlanmış proteinazlar tarafından bölünme ile oluşmaktadır.

Süreksiz bir transkripsiyon stratejisi, negatif sarmal sentezi sırasında iç içe geçmiş bir alt genomik negatif anlamlı RNA seti üretmektedir. Bu süreçte, çevrilmiş her genin yukarısında bulunan transkripsiyon düzenleyici dizi TRS, lider dizinin 3' ucunda bulunmaktadır ve oldukça büyük öneme sahiptir.

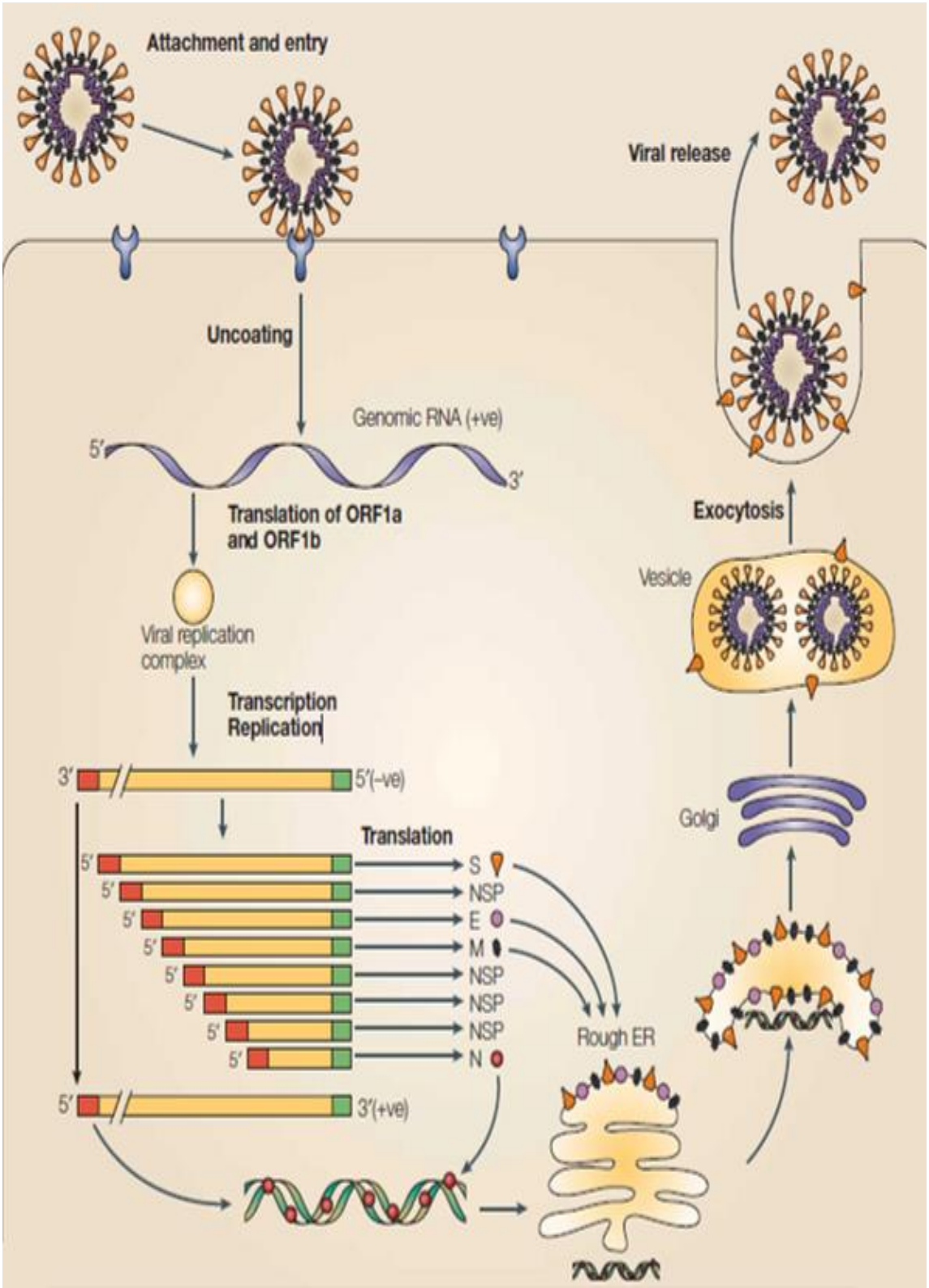
Oluşan subgenomik eksi şeritlerin 3' uçlarının antisens lider dizisine kaynaştığı varsayılmaktadır. Pozitif anlamda mRNA'ların sentezi için bir şablon görevini kesintili olarak sentezlenen eksi zincirler görmektedir.

Bir diğer alternatif hipotez, pozitif sarmal sentezi sırasında süreksiz transkripsiyon tarafından mRNA moleküllerinin üretildiğini öne sürmektedir. Bu koşullarda sadece 5' ORF oluşmaktadır. Genomik RNA ve Nükleokapsit (N) proteini sitoplazmada birleşerek sarmal nükleokapsidi oluşturmaktadır.

Bu çekirdek yapının zarfı, golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum (ER) arasındaki hücre içi zarlardan alınmaktadır. Lipit çift tabakasında yer alacak olan zarf E, zar M ve S proteinlerinin tümü, ER yoluyla, nükleokapsidin olası oluşumunu tetiklemek için M proteini ile etkileşime girdiği bölüme taşınmaktadırlar.

Şeker parçaları virüsün golgi aparatı yoluyla taşınması sırasında modifiye edilmektedir ve tümünde olmasa bile bazı koronavirüslerde S proteini, S1 ve S2 alanlarına bölünmektedir. Virionlara dahil olmayan herhangi bir S proteini, hücre yüzeyine taşınmaktadır.

Virüs, konakçı hücreden viryon içeren veziküllerin plazma zarı ile füzyonu ile salınmaktadır. Her mRNA'nın ortak lider dizisi 5' ucundaki kırmızı işaret ile gösterilmiştir (Şekil 2.3)[42].



Şekil 2.3 Koronavirüslerin yaşam döngüsü [42]

2.1.4 İnsan Koronovirüs Enfeksiyonları

Solunum yolu koronavirüs enfeksiyonları 2003'ten önce, insan koronavirüslerine olan ilgi, esas olarak nispeten hafif üst solunum yolu enfeksiyonlarında rol oynamasından kaynaklanmıştır. 1960'larda üst solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan viral suşlar HCoV-229E ve HCoV-OC43 izole edilmiştir.

Hong Kong'da HKU ve Hollanda'da HCoV-NL63 olmak üzere yeni insan koronavirüsleri izole edilmiştir. Konak hücre reseptörü aminopeptidaz N, HCoV-229E için, ACE2 ise HCoV-NL63 için hücre reseptörleridir.

İnsan beyin dokularında insan koronavirüsleri için bir araştırmayı insan koronavirüslerinin çoklu sklerozdaki olası rolüne olan ilgi başlatmıştır. Bir araştırmada kontrollerin beyinlerinin %14'ünde ve MS hastalarının beyinlerinin %36'sında HCoV-OC43 dizileri bulunmuştur [39].

2.1.5 Klinik Bulgular

Covid-19 hastalığının klinik özellikleri, SARS ve MERS'in klinik özelikleri ile benzerlik göstermektedir. Hastaların çoğu ateş, kuru öksürük, nefes darlığı ve göğüs BT taramalarında ikili buzlu cam opasiteleri ile başvurmaktadır [43-48]. Hatta bazı Covid-19 hastaları, başlangıçta SARS ve MERS'te hiç meydana gelmeyen belirgin bir solunum semptomu göstermemektedirler [48-50].

SARS-CoV-2 virüsünün enfeksiyondan sonraki ilk günlerde çok yavaş çoğalabileceğini ve enfeksiyondan sonraki ilk dört gün boyunca tespit seviyelerinin altında kalabileceği matematiksel modeller ile ortaya konmuştur [50].

Son araştırmalar Covid-19'un ara sıra ishal gibi enterik enfeksiyon semptomları olarak ortaya çıktığını, MERS veya SARS hastalarının yaklaşık %20-25'inde ishal olduğunu ortaya koymuştur [47].

Covid -19 hastalığının özellikle 60 yaş üstü hastalarda, genellikle altta yatan en az bir hastalığın eşlik etmesiyle ortaya çıktığı belirlenmiştir. Örneğin, diyabet, kardiyovasküler bozukluklar, hipertansiyon ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı vb. Covid-19 hastalığının %80'den fazlası ise hafif veya orta şiddette zatürre olarak görüldüğü bulunmuştur [48].

2.1.6 Örnek Toplama

Covid-19 vakalarının çoğunun tespiti için uygun örneğin toplanması, hastalığın yayılımı enfekte açısından oldukça önemlidir. Nazofaringeal sürüntü genellikle toplanmaktadır,

ancak bazı durumlarda hastalık bu örnekleme ile saptanmayabilir. Alternatif olarak bronkoalveolar lavaj BAL, balgam, gibi alt solunum yolu örnekleri alınabilmektedir [51-55].

Laboratuvar test yöntemleri ne kadar doğru ve hızlı olursa olsun SARS-CoV-2 gibi viral pnömonilerin tanısı hastadan doğru zamanda doğru örneğin alınmasından geçmektedir.

Wang ve ark., Covid-19 salgını sırasında Çin'de orofaringeal (OP) sürüntü örneklerinin (n= 398) nazofaringeal (NP) çubuklardan (n= 8) çok daha sık kullanıldığını bildirmiştir. Ancak SARS-CoV-2 RNA, OP sürüntü örneklerinin yalnızca %32'sinde tespit edilmiştir. Bu oran, NP çubuklarından (%63) önemli ölçüde daha düşüktür [56].

Sürüntü örnekleri evrensel veya viral taşıma besiyerine yerleştirilmelidir. Nazofaringeal aspiratlar da HCoV'lerin saptanması için uygun örneklerdir. SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2'nin en hassas tespiti için hem üst hem de alt solunum örneklerinin; balgam, BAL'ın toplanması ve test edilmesi önerilmektedir [57].

Bir çalışmada diyabet, solunum yollarında uzun süreli MERS-CoV RNA dökülmesi ile ilişkilendirilmiştir [58].

Çin'den yapılan bir başka çalışmada da virüsün solunum yolu örnekleri ile birlikte gaita ve kanda tespit edilebildiğine dair çok ilginç sonuçlar bulunmuştur (Tablo 2.1) [59].

Japonya'dan yayınlanan bir vaka raporunda araştırmacılar, klinik şüphe yüksek olduğunda boğaz sürüntülerindeki negatif PCR testinin COVID-19 enfeksiyonunu dışlamak için yeterli olmadığını belgelediler; ancak tanı için alt solunum yolu örneği BAL tercih edilmelidir [60].

Tablo 2.1 qRT-PCR Numune Testinin Sonuçları Ve SARS-CoV-2 İle Enfekte Hastaların Klinik Sonuçları [59]

Anal Süründü	**İdrar**	**Kan**	**Orofaringeal sürüntü**		**Semptom başlangıcından numune toplamaya kadar geçen**	
ND	ND	ND	ND		15	**1. Hasta**
ND	ND	ND	4.56E + 02		17	**2. Hasta**
ND	ND	ND	2.41E + 04	**qRT- PCR,**	8	**3. Hasta**
ND	ND	8.04E + 00	1.14E + 04	**kopya/mL**	3	**4. Hasta**
ND	ND	ND	ND		10	**5. Hasta**
ND	ND	ND	6.11E + 03		8	**6. Hasta**
ND	3.22E + 02	ND	6.77E + 04		7	**7. Hasta**
4.47E + 02	ND	9.11E + 01	9.83E + 03		3	**8. Hasta**
5.42E + 04	ND	ND	2.29E + 04		3	**9. Hasta**
2(%22)	1(%11)	2(%22)	7(%78)			**(%)Toplam Sayı**

ND: Mevcut değil (hastalar hastaneden taburcu edilmemiştir)

2.2 RT-PCR Analizleri

2.2.1 Nükleik Asit Miktar Tayini Testi

Akut solunum yolu enfeksiyonunda, nükleik asit testi analizinde solunum salgılarından neden olan virüsleri tespit etmek için RT-PCR rutin olarak kullanılmaktadır. RT-PCR, koronavirüsü izlemek, tespit etmek ve incelemek için en iyi ve doğru laboratuvar yöntemlerinden biridir. RT-PCR, hedef genetik materyalin varlığını tespit edebildiğimiz spesifik bir yöntemdir. Günümüzde, genetik hedefi saptamak için çeşitli spesifik floresan boyalar belirteç olarak kullanılmaktadır; daha önce radyoaktif izotoplar işaretleyici olarak kullanılmıştır.

RT-PCR'de sonucun yorumlanması, örneğin Ct değerlerine dayanır; sonuçlar 40'tan düşük bir değer ise klinik olarak PCR pozitif olarak rapor edilmektedir. Sonuçlar RT-PCR'de çoğu zaman %100 spesifiktir. Fakat hatalı olarak negatif sonuçlar da oluşabilmektedir. Bu durum uygun olmayan örnekleme zamanlamasından veya örnekleme hatasından kaynaklanabilmektedir [61].

Covid-19'un teşhisi için en yaygın kullanılan ve güvenilir testler, boğaz sürüntüsü, nazofaringeal sürüntüler, veya balgam dahil olmak üzere diğer üst solunum yolu örnekleri kullanılarak yapılan RT-PCR testleridir.

Farklı üreticiler tarafından çeşitli RNA gen hedefleri kullanılmaktadır ve çoğu spike S, test zarf, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz RdRp, nükleokapsid N ve ORF1 genlerinden bir ya da daha fazlasını hedeflemektedir.

Testlerin tek tek genlere karşı duyarlılıkları, muhtemelen ters primerdeki bir uyumsuzluk nedeniyle biraz daha düşük bir duyarlılığa sahip olan RdRp- SARSr (Charité) primer probu dışında, karşılaştırma çalışmalarına göre karşılaştırılabilmektedir [62].

Semptomatik Covid-19 enfeksiyonu olan çoğu kişide, döngü eşiği Ct, ile ölçülen nazofaringeal sürüntüdeki viral RNA, semptomların 1. gününde saptanabilir hale gelir ve semptomların başlamasından sonra, ilk haftasında zirveye ulaşır.

Ct, daha yüksek viral RNA yüklerini temsil eden daha düşük Ct değerleri, bir flüoresan sinyali üretmek için gereken replikasyon döngülerinin sayısıdır. 40'tan düşük bir Ct değeri klinik olarak PCR pozitif olarak rapor edilmektedir.

Bununla birlikte, hastaneye kaldırılan hafif vakaların Ct değerleri, ağır hastalardan elde edilen Ct değerlerine göre daha yüksektir. PCR pozitifliği, çoğu hafif vakanın negatif sonuç vereceği hastalık başladıktan itibaren 3 haftayı aşabilmektedir [63].

Bununla birlikte, "pozitif" bir PCR sonucu mutlaka canlı virüsün varlığını göstermemekle birlikte yalnızca viral RNA'nın tespitini yansıttmaktadır. PCR test sonucu ile canlı ve cansız virüs ayırımı yapılmamaktadır. Ayrıca PCR testi virüsün farklı dokulardaki replikasyon seviyesini yansıtmaz.

Nazofaringeal sürüntü dışındaki örneklerde PCR pozitifliğinin zaman çizelgesi farklıdır. PCR pozitifliği balgamda daha yavaş azalmaktadır. Nazofaringeal sürüntü negatif olduktan sonra da balgamda PCR pozitif olabilmektedir [64].

Wölfel ve ark. tarafından yapılan çalışmada, enfekte olmuş 96 hastanın 55'inde (%57) gaitada PCR pozitifliği gözlemlenmiştir ve nazofaringeal sürüntünün ötesinde gaitada medyan 4 ila 11 gün pozitif kalmıştır, ancak klinik açıdan kritik bir durum görülmemiştir. Balgam ve gaitada PCR'nin testi sonucu benzer bulunmuştur. [63].

2.2.2 Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kararlı durum mRNA düzeylerinin RT-PCR ile miktarının belirlenmesi muazzam bir potansiyele sahiptir; ancak, aynı zamanda önemli problemleri de beraberinde getirmektedir.

RT-PCR tekniğinin olumlu yönü, bu tekniğin çok hassas olması ve çok küçük miktarlardaki RNA'dan (tek bir hücrenin içerdiği düzeyde) gen ifadesinin analizine izin vermesidir. Bu durum, birçok farklı gen ve/veya çok sayıda numune üzerinde deneyde gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknik araştırmacıya, northern blot, dot blot, hibridizasyon koruma deneyleri ve in-situ hibridizasyon gibi daha geleneksel tekniklerere göre, esneklik ölçüsü sağlamaktadır [65].

İlk olarak PCR tekniği Kary Mullis [66] tarafından bulunmuştur. PCR reaksiyonlarındaki gelişmelerle birlikte, kantitatif ve hassas bir PCR tekniği olan qPCR kantitatif gerçek zamanlı polimeraz reaksiyonu tekniğini ortaya çıkarılmıştır. Bu teknikte şablon olarak cDNA kullanılmaktadır.

cDNA, ters transkriptaz reaksiyonlarından sentezlenen RNA moleküllerinden tamamlayıcı bir DNA'dır. qPCR reaksiyonları sırasında, bir prob ya da boya, amplifikasyon sırasında

bir flüoresan raportör görevi görerek, amplifiye edilmiş çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) bağlanmaktadır.

Bu nedenle, floresan sinyalinin artması, reaksiyonlarda sentezlenen PCR ürünlerinin sayısı ile doğru orantılıdır [67].

qPCR, düşük ekspresyon seviyelerinde bile hedef genleri tespit etme ve kesin olarak ölçme verimliliği nedeniyle, gen ekspresyonundaki modülasyonları analiz etmek için en etkili yöntem olarak bilinmektedir [68].

qPCR'nin reaksiyonları, çok sayıda numunede mRNA ekspresyon seviyelerini ölçmemizi sağlamaktadır.

Bununla birlikte, başarılı bir qPCR testi, cDNA numuneleri arasında spesifik olmayan varyasyonlardan uzak uygun bir normalizasyon yaklaşımı gerektirmektedir. Bu nedenle, RNA ekstraksiyonunda veya kontaminasyonda olası hatalardan kaçınmak için belirleyici bir özellik olarak referans genlere bağlı hedef genlerle qPCR kullanılmaktadır.

1- Spesifiklik ve etkinlik açısından doğru bir primer tasarımı;
2- Karbonhidratlar, proteinler ve fenoller gibi kontaminantlardan arınmış saflaştırılmış bir mRNA
3- Analiz edilen deneysel koşul için kararlı olması gereken titiz bir referans gen seçimi

Özetle, tutarlı sonuçlar elde etmek ve qPCR analizlerinde veri yorumlamada hataları elimine etmek olmak için yukarıdaki 3 madde dahil birkaç önlem dikkate alınmalıdır [69].

2.2.3 RNA’nın Kalitesi

Kalitesi yüksek RNA, qPCR için önemli bir gerekliliktir. DNA genomik, protein, karbohidrat fazlalığı ve ayrıca fenolik bileşikler gibi esas olarak transkriptaz ters ve DNA polimeraz enzimlerini inhibe ederek PCR reaksiyonlarına müdahale edebilecek birkaç olası safsızlık varlığı bilinmektedir [69].

RNA, 260 nm'de spektrofotometrede ölçülebilmektedir ve sırasıyla 280 ve 230'da absorbans okumaları, proteinleri ve karbonhidratları saptamak için kullanılmaktadır.

Sambrook ve arkadaşlarına göre, RNA saflığını doğrulamak için, 1.8 ile 2.0 arasındaki A260/280 oranı değerleri, proteinlerle düşük kontaminasyonu gösterirken, A260/230 > 2,0 oranı, karbonhidratlarla çok düşük kontaminasyonu göstermektedir [70].

qPCR reaksiyonlarına başlamadan önce, genomik DNA'yı uzaklaştıran ek bir saflaştırma adımı gerçekleştirilmelidir.

Gen kodlama bölgesinin ekzon-ekzon sınırında tasarlanmış spesifik primerler kullanılması ya da RNaz içermeyen DNaz enzimlerinin doğrudan RNA numunelerinde kullanılması önlenebilmektedir [67].

2.2.4 Primer Tasarımı ve Prob Önemi

Uygun probların benimsenmesi ve spesifik primerlerin tasarlanması, qPCR analizlerinde spesifiklik, amplifikasyon etkinliği ve floresans için çok önemli gerekliliklerdir.

Primer, safsızlık genomik DNA'nın amplifikasyonunu önlemek için, özellikle hedef cDNA sekansını amplifiye ederek, genik sekansın bağlantı ekzon-ekzonunda tasarlanmalıdır [71].

Primer etkinliği, ideal primer konsantrasyonunu tanımlayan ve/veya reaksiyon etkinliğini değerlendiren seri dilüsyonlar veya standart eğriler kullanılarak analiz edilebilmektedir.

Bu durumda, o konsantrasyon için bir Cq değerine karşı, reaksiyon performansı ve y-kesme noktası, standart eğride kullanılan her bir konsantrasyonun log'sı, eğim ve korelasyon katsayısı gibi diğer reaksiyon parametreleri hariç tutularak çizilmektedir. Literatürde, araştırmalarda aşağıda yer alan formül kullanmıştır.

$$\text{Primer etkinliği} = 10^{(-1/\text{eğim})} - 1 \qquad (1.1)$$

Eğim değeri, ilk seyreltmenin Cq değerinin son seyreltmenin Cq değerinden çıkarılması, seyreltme sayısına bölünmesiyle hesaplanmaktadır (Şekil 2.4).

Bu nedenle, %100 qPCR verimliliğinde toplam PCR ürünlerinin her döngüden sonra ikiye katlanacağı düşünüldüğünde, standart eğri eğimi -3.33 olmalıdır ($100 = \%100 = 10^{(-1/-3.33)} - 1$). Kabul edilebilir bir eğim - vakaların büyük çoğunluğunda 3.33 döngü civarındadır.- 3.9 ile -3.0 (%80–110 verimlilik) arasındaki bir eğim genellikle uygun kabul edilmektedir [72, 73].

2.2.5 qPCR'de DNA Bağlayıcı Boyalara Karşı Hidroliz Probları

PCR ürününe dahil edilen flüoresan belirteçlerin kullanılmasıyla birlikte qPCR'de DNA miktarı ölçülmektedir. Reaksiyonun üstel fazında oluşan PCR ürün molekülleri amplikonların sayısı ile floresan sinyalindeki artış doğru orantılıdır.

Floresan raportörler, probları ve amplifikasyon sırasında ürüne dahil edilen çift sarmallı DNA (dsDNA) bağlayıcı boyalarını içermektedir [74].

SYBR Yeşili; flüorasan bir boya türü olup, çift sarmallı DNA'ya bağlanan ve uyarılma üzerine ışık yaymaktadır. PCR reaksiyonu ilerledikçe ve PCR ürünü oluştukça, orijinal numunede bulunan DNA miktarıyla orantılı olarak floresan seviyeleri artmaktadır [72, 74, 75].

Bu boyanın kullanılmasıyla birlikte prob kullanımı ortadan kalkmaktadır ve bu boya DNA sekansının amplifikasyonunu izlemek için kullanılmaktadır. Bu durum amplifikasyon maliyetini düşürerek uygulamada büyük bir avantaj sağlamaktadır.

SYBR Yeşili boya yalnızca hedef DNA'ya değil, aynı zamanda qPCR sırasında oluşan tüm dsDNA'ya bağlandmaktadır. Bu boyanın kullanımı basittir ve spesifiklikten oldukça uzaktır (Şekil 2.4a)[76].

TaqMan® gibi problar, DNA bağlayıcı boyalara ek olarak, belirli DNA dizilerine bağlanmak üzere tasarlanmış olan problardır.

TaqMan® probları hedef DNA'nın bazı bölgelerini tamamlayan bir oligonükleotid dizisinden oluşmaktadır. Bu problar 3' ve 5' uçlarında sırasıyla bir söndürücü ve bir raportör florofor boya ile kompleks haline getirilmektedir.

Bu prob amplifikasyon adımı sırasında, tamamlayıcı hedef DNA'sı ile ilişkilendirilmekte ve Taq DNA polimeraz 5'-3' eksonükleaz aktivitesi (Şekil 2.4b) tarafından bölünmektedir. Bu bölünme sonucunda, raportör boyayı serbest bırakmakta ve böylelikle her döngüde artan bir flüoresan sinyali üretilmektedir [74].

SYBR yeşili gibi DNA bağlayıcı boyalara göre TaqMan® probu, daha yüksek spesifiklik sağlamaktadır. Aynı reaksiyon tüpünde bu problar iki farklı sekansın amplifikasyonuna izin vermektedir. TaqMan® probu, PCR testi sonrasında belirgin ve ayırt edilebilir raportör boyalarla da etiketlenebilmektedir.

Bu sistemin ana dezavantajı, her bir hedef sekans için spesifik probların sentezlenmesi gerekliliğidir ve bu da testin maliyetini arttırmaktadır [77].

qPCR testinde büyük ölçüde kullanılan bir başka prob türü moleküler işaret probudur. Çözelti içinde serbest olduğunda, moleküler işaret probları, bir söndürücü ve bir raportör boyadan oluşan bir saç tokası yapısını oluşturmaktadır [78].

Raportör flüoresan boya ve söndürücü birbirine yaklaştığı zamanki yapıda hiçbir flüoresans algılanmaktadır (Şekil 2.4c). Moleküler işaret, tavlama adımı sırasında,

flüoresan emisyonu ile raportör ve söndürücü boyaların ayrılmasına yol açan konformasyonel değişiklikler oluşturan bir hedef sekansa hibritlenmektedir [78, 79].

Hibridizasyon probunun doğru tasarlanması moleküler işaret ile ilişkili ana dezavantaj kabul edilmektedir. Gövde tavlama gücünün moleküler işaret için optimum tasarımı oldukça önemlidir [80].

Bir diğer prob olan akrepler, 3’ ucunda bir söndürücü tave 5’ ucunda bir raportör florofor şıyan problardır. 20 ila 25 nt’lik tek sarmallı bir oligonükleotid probundan oluşmaktadırlar. Üç boyutlu konformasyonları incelendiğinde, yapıları içine bir PCR primerinin eklendiği kök ve halka yapısına benzemektedir (Şekil 2.4d).

Bu yapı, bloker görevi görerek, DNA ile etkileşimi sırasında, DNA polimeraz aktivitesini önlemektedir [74, 81]. Söndürücü ve habercinin birbirine yakın olması, haberci tarafından yayılan flüoresanın sürekli olarak baskılanmasına neden olmaktadır.

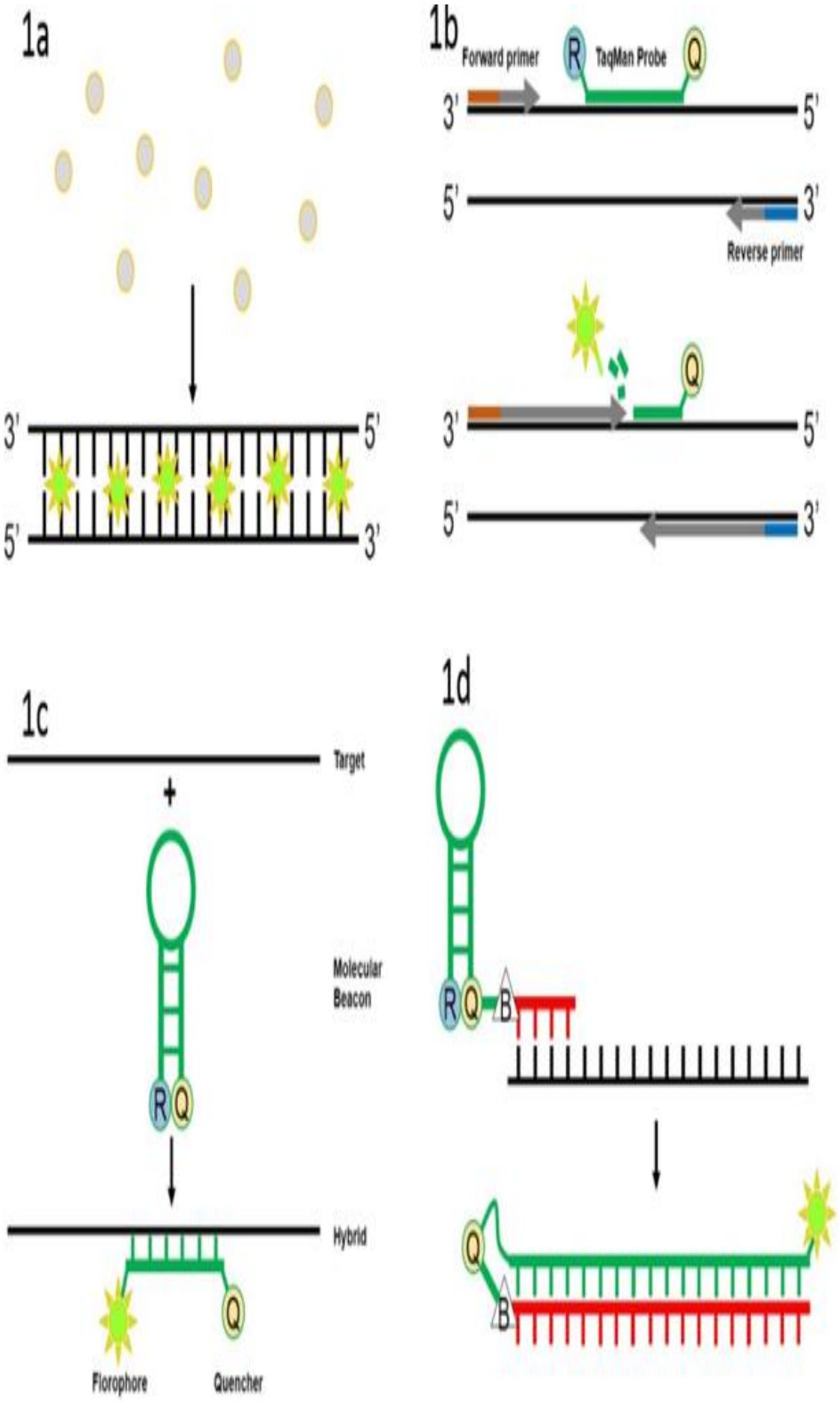
TaqDNA polimeraz PCR primerini PCR başlangıcında uzatmakta ve hedef sekansın tamamlayıcı sarmalını sentezlemektedir [82]. Bir sonraki döngü sırasında, kök ve ilmek yapısı açılır ve probun ilmek bölgesi, yeni sentezlenen hedef sekansa molekül içi olarak hibritlenmektedir.

qPCR cihazından gelen ışıkla raportör uyarılmaktadır [74]. Flüoresans emisyonu raportör boyanın söndürücü boyaya yakın olmaması nedeniyle gerçekleşebilmektedir. Floresan sinyalindeki önemli artış ise, hedef DNA miktarı ile doğru orantı olarak qPCR cihazı tarafından tespit edilmektedir [80, 83-84].

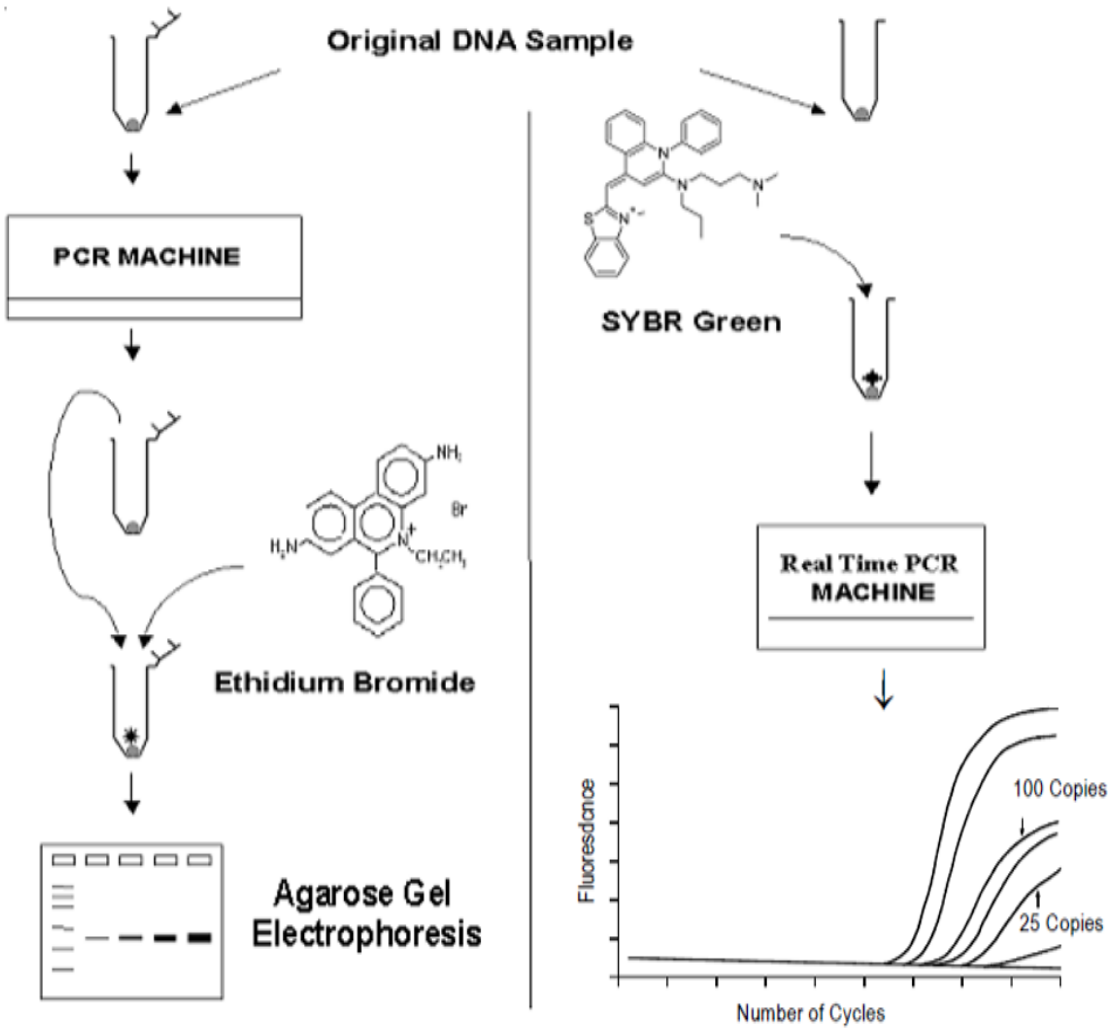
Şablon, polimeraz, primerler vb. içeren reaksiyon karışımı, RT-PCR reaksiyonunda SYBR Yeşili ile karıştırılmaktadır. Oluşan döngü sayısı arttıkça, floresans miktarı ve çift sarmallı DNA miktarı da artmaktadır. PCR ve RT-PCR teknikleri arasındaki farklar Şekil 2.6’da gösterilmiştir.

Cihazın yazılımı, DNA şablonu miktarını ölçmek için, döngü sayısının floresans yoğunluğunun lazer okumasına karşı grafiğini çizmektedir. Bu grafik 'Amplifikasyon Eğrisi' olarak bilinmektedir (Şekil 2.7). Amplifikasyonun saptanma aralığına bağlı olarak bir eşik belirlenmektedir.

Floresanın eşik değerini geçtiği döngüye "Döngü eşiği" veya "Ct" olarak ifade edilmektedir. Floresans bu eşiği geçer geçmez, yazılım amplifikasyonun meydana geldiğinden emin olmaktadır.

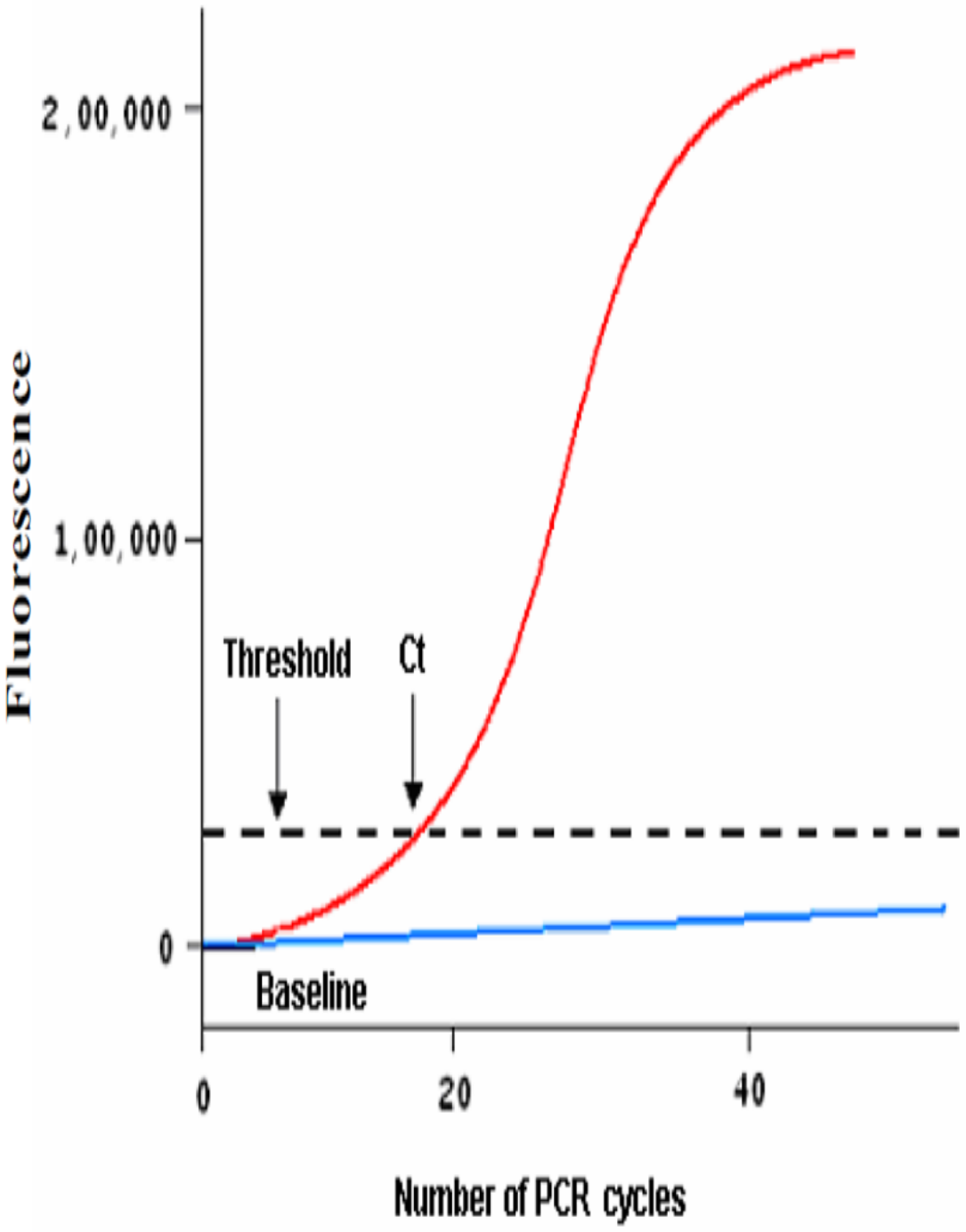


Şekil 2.4 Real time PCR testinde kullanılan Problar ve Boyalar; a) SYBR Yeşili; b) TaqMan; c) Moleküler İşaret; d) Akrepler [69]



Şekil 2.5 Geleneksel ve Gerçek Zamanlı PCR Arasındaki Farklar [75]

Ct değerinin analizi önemli yorumlara izin verebilmektedir. Örneğin, başlangıçta serum 10 viral genoma sahipse, örneğin 30 döngüde Ct'ye ulaşacaktır. Ancak 100 viral genom varsa, o zaman daha az sayıda örneğin 10.döngüde döngüde Ct'ye ulaşacaktır. Böylece, Ct değeri ne kadar yüksek olursa, serum numunesindeki viral genom o kadar düşük olmaktadır [75].



Şekil 2.6 PCR grafiği. Baseline (Mavi): Amplifikasyon eğrisi yok, (Kırmızı): Amplifikasyon eğrisi [75]

3
DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

Bu tez çalışmasında, gaita numuneleri yeni geliştirilen tanı kiti kullanılarak RT-PCR analizi ile virüsün varlığı tayin edilmiştir. Deneyler sırasında kullanılan cihazlar ve kitler sırasıyla aşağıda yer alan tablolarda gösterilmiştir (Tablo 3.1 ve Tablo 3.2).

Tablo 3.1 Deney Çalışmalarında Kullanılmış Olan Cihazlar

Cihaz	**Marka**	**Kullanım Amacı**
Termal Blok	Biosan	İzolasyon Aşaması
Santrifüj	VWR® Micro Star 12 VWR®, Microcentrifuge	İzolasyon Aşaması
Vorteks	VWR® Vortex	İzolasyon Aşaması
Mini Vorteks	Peqlab	RT-PCR Hazırlık Aşaması
PCR Cihazı	QIAGEN Rotor Gene	RT-PCR Aşaması

Tablo 3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kitler

Kit Adı	**Kullanım Amacı**
CVXTM Viral RNA Ekstraksiyon kiti (Canwax Biotech, İspanya)	Gaita örneklerinden viral RNA ekstraksiyonu
KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 RT-PCR Tanı Kiti	N geni üzerinde N1, N2 gen bölgelerinin taraması

CVXTM Viral RNA Ekstraksiyon kiti içeriği aşağıda Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3 CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kiti İçeriği

	AN0105	**AN0105-XL**
Minispin Kolonlar	100	500
Toplama Tüpleri (2 mL)	200	1000
Taşıyıcı RNA	1 vial	1 vial
BLQ Tamponu	60 mL	300 mL
WB1 Tamponu [a,b]	33 mL	165 mL
WB2 Tamponu [b]	20 mL	100 mL
RNAaz içermeyen su	10 mL	50 mL

a: Kaotropik tuzlar içerir. Güvenlik talimatlarına uyulmalıdır.

b: İlk kullanımdan önce belirtilen hacimde Etanol (% 96 -% 100) ekleyin (hacim için şişe etiketine bakın). Etanol eklendiğinde, şişe bu adımın tamamlandığını göstermek amacıyla işaretlenmelidir.

RT-PCR çalışma süresi yaklaşık 90 dakika olan "KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 RT PCR Tanı Kitin, çalışmasından önce RNA izolasyon aşaması zorunludur. Bu kitin teknik özellikleri ve kitin içeriği aşağıda yer alan tablolarda sunulmaktadır (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5). Bu kitin master mixTablo 3.6'da, kit içeriği ve miktarları ise Tablo 3.7'de görülmektedir.

Tablo 3.4 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Realtime PCR Tanı Kiti Teknik Özellikleri

Tanımlama Yöntemi	
Bakılan Gen Bölgeleri ve Işıma Boyaları	N1 (FAM), N2 (FAM), RP (HEX)
Test Tüp Sayısı ve İçeriği	N1, N2, RP
Reaksiyon Hacmi	20 µl
Test Sayısı	100 Reaksiyon /300 Reaksiyon
Reaksiyon Süresi	Yaklaşık 90 dakika

Tablo 3.5 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Real Time PCR Tanı Kit İçeriği

Bileşen	**İçerik**	**100 Reaksiyon**	**200 Reaksiyon**
1	PCR Master Mix	1500 µL	1500 µL x 3 tüp
2	Pozitif Kontrol	150 µL	450 µL
3	Negatif Kontrol	150 µL	450 µL

İzole RNA örneklerinde RT-PCR analiz sonuçları pozitif ve negatif olmak üzere kayıt altına alınmıştır.

Tablo 3.6 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Real Time PCR Tanı Kiti Mix İçeriği

PCR Master Mix		
N1 Gen Bölgesi (FAM)	N2 Gen Bölgesi (FAM)	RP (İç Kontrol) (HEX)

Tablo 3.7 KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 Realtime-PCR Tanı Kiti İçeriği ve Miktarları

Bileşen	**Miktar (µL)**
PCR Master Mix	15
RNA İzolatı/PC/NTC	5
TOPLAM	20

3.2 Hastaların Belirlenmesi ve Gaita Numunelerinin Toplanması

Çalışmayı gerçekleştirirken seçilen Covid-19 hastaları, hastanenin pandemi bölümüne farklı şikayetler ile başvurarak RT-PCR testi sonucu SARS-CoV-2 virüsü pozitif bulunan ve Covid-19 hastalığının tedavisi sonrasında 24 saatten daha uzun bir süreçte alınan iki üst solunum yolu örneği RT-PCR testi sonucu SARS-CoV-2 virüsü negatif tespit edilen ve hastaneden taburcu olmuş 19-73 yaş aralığındaki 65 kişidir.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik araştırmalar etik kurulundan onay alınarak başlatılan (Karar No: 2020-11) bu çalışma, yine bu hastanede enfeksiyon hastalıkları anabilim dalı polikliniğine başvuran ve;

- Covid-19 tedavisi gördükten ve iki üst solunum yolu örneğinin art arda negatif sonuç vermesinden sonra taburcu olan 65 gönüllü hastadan gaita numuneleri alınarak gerçekleştirilmiştir.
- Hastaların yaşları 19-73 arasında değişmektedir.
- Çalışmaya dâhil edilen her hasta ve her sağlıklı bireyden gönüllü olur formu doldurularak onay alınmıştır.

Gaita numune sonucu negatif görülen hastalar ile çalışmaya devam edilmemiştir. 1. Gaita numunesi pozitif çıkan hasta sayısı 8'bulunmuştur ve bu hastalar ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu hastalardan 7 gün ara ile 30 gün boyunca dört adet gaita numunesi alınmaya devam edilmiştir.

3.2.1 Toplanan Gaita Numunelerinin RNA İzolasyonunu Yapılması

Viral RNA izolasyonu için ilk olarak 2 mL bidestile su bir santrifüj tüpüne alınmış ve ardından tüpe 0.5 g gaita örneği eklenmiştir. Numune, çalkalayıcı kullanılarak homojen olarak karıştırılmıştır ve 3,000 g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant ayrılmış ve viral RNA izolasyonu için kullanılmıştır.

Viral RNA, üreticinin talimatlarına göre CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon kiti (Canwax Biotech, İspanya) kullanılarak gaita örneğinin süpernatantlarından izole edilmiştir. Ekstrakte edilen RNA'lar RT-qPCR analizine kadar -80 ° C'de tutulmuştur.

3.2.1.1 CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kiti Kullanım Öncesi Yapılması Gereken İşlemler

Liyofilize taşıyıcı RNA flakonunu, 600 µL (Kat. No. AN0105, 100 reaksiyon için) veya 3.000 µL (Kat. No. AN0105XL için, 500 reaksiyon) RNaz içermeyen su kullanarak yeniden süspanse edilmiştir ve iyice karıştırılmıştır. (Taşıyıcı RNA, Viral RNA'nın silika membrana bağlanmasını artırmaktadır ve viral RNA bozunma riskini azaltmaktadır. Taşıyıcı RNA, 4 °C'de saklanırsa, BLQ Tamponunda 4 haftalık sınırlı bir raf ömrüne sahiptir.)

Taşıyıcı RNA içeren BLQ tamponu hazırlanmış ve taşıyıcı RNA'nın eklendiğini belirtmek için şişe etiketi işaretlenmiştir. Kullanılmayan BLQ tamponunu 4 °C'de 4 haftaya kadar saklanmıştır. Taşıyıcı RNA'nın BLQ tamponuna eklenme tarihini kayıt edilmiştir.

Şişe etiketinde belirtilen miktardaki etanol (% 96-% 100) WB1 tamponuna ve WB2 tamponuna eklenmiştir ve bu adımın yapıldığını belirtmek için şişe işaretlenmiştir.

Viral RNA izolasyonu için Proteinaz K tedavisi genellikle gerekli olmasa da viskoz numunelerden (örn. balgam numuneleri) izolasyon için tavsiye edilmektedir. 25µL Proteinaz K (20 mg / mL stok solüsyon) eklenmiştir ve 5 saniye kuvvetlice vortekslenerek karıştırılmıştır. 70 ° C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. (Proteinaz K kite dahil değildir)

Alternatif olarak, numune çok viskozsa ve izole edilmiş RNA'nın başka reaksiyonu yoksa, yeni bir RNA izolasyonu için daha seyreltilmiş bir numune kullanılabilir, örneğin 1/2 ila 1/10 başlangıç numunesi kullanılabilir.

Lizis karışımına **CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kit Protokolüne Göre Uygulanan Adımlar**

CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kit Protokolü basamakları aşağıdaki maddelerde ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

1- 560 µL BLQ Tamponu (Taşıyıcı RNA içerir) 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Taşıyıcı RNA, Viral RNA'nın silika membrana bağlanmasını güçlendirmekte ve Viral RNA bozulma riskini azaltmaktadır.

2- 140 µL numune eklenmiştir ve 5 saniye boyunca vortekslenerek karıştırılmıştır. Nazofarengeal Swab (NP) /Orofarengeal Swab (OP): Swab, nükleik asit virüs stabilizasyonu için uygun bir taşıma besiyerinde verilirse, 140 µL'yi doğrudan bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılırmaktadır.

   Taşıma besiyeri olmayan bir swab alınırsa, swabı PBS içeren mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir. Daha sonra swab kuvvetlice sallanır, tüpün duvarına bastırılır ve swab çıkarılır. Viral RNA ekstraksiyonu için sıvının 140 µL'lik bir kısmını kullanılır.

3- Karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

4- Numuneye 560 µL etanol (% 96-100) eklenmiştir ve 5 saniye vortekslenerek karıştırılmıştır.

5- Minispin kolonu, 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiştir ve parçalanmış numuneden 700 µL aktarılmıştır. 1 dakika boyunca en az 10.000xg'de santrifüjlenmiştir.

   Nükleik asit saflaştırmasında başalılı olmak için, Minispin kolonuna yüklemeden önce viskoz olmayan, homojen ve berrak bir numune elde etmek önemlidir.

6- Tüm örnek minispin kolonuna aktarılıncaya kadar adım 5 tekrarlanmıştır.

7- Yeni bir toplama tüpüne minispin kolonu yerleştirilmiştir. Üzerine 500 µL WB1 tamponu eklenmiştir. 1 dakika boyunca en az 10.000xg'de (veya maksimum hızda) santrifüjlenmiştir.

8- Minispin kolonu aynı toplama tüpüne yerleştirilmiştir ve 500 µL WB2 tampon eklenmiştir. 1 dakika boyunca 10.000xg'de (veya maksimum hızda) santrifüjlenmiştir.

9- Minispin kolonu aynı toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 500 µL WB2 tampon eklenmiştir. 1 dakika boyunca 10.000xg'de (veya maksimum hızda) santrifüjlenmiştir.

10- Minispin kolonunu kurutmak için 3 dakika daha tam hızda santrifüjlenmiştir, kolon 180º döndürülmüş ve minispin kolonunu kurutmak için ek 3 dakika boyunca tam hızda santrifüjleme tekrarlanmıştır.

Bu adım, sonraki enzimatik reaksiyonları inhibe etmek için kalan sıvıyı önleyecektir.

11- Minispin kolonu yeni, etiketli 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 50 µL RNaz içermeyen su doğrudan membrana pipetlenmiştir. Kapak kapatılmış ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.

12- Ayrıştırmak için tam hızda 1 dakika santrifüjlenmiştir. Elüat, viral RNA içerir. Ekstraksiyondan sonra elüsyon tüpü buza yerleştirildi. Uzun süreli saklamak için nükleik asitler –80 ° C'ye yerleştirilmiştir.

Son ürün viral RNA ve taşıyıcı RNA içermektedir. Bu nedenle, kit ile izole edilen nükleik asitleri fotometrik veya florometrik yöntemlerle ölçmek mümkün değildir.

3.2.2 İzole edilen RNA Örneklerinde RT-PCR Analizi ile SARS-CoV-2 Virüsünün Belirlenmesi

RT-PCR analizi aşamasında, SARS-CoV-2 virüsünün tanılanmasında kullanılan gen bölgesinin varyasyon içermeyen olmasına dikkat edilmiştir. Gaita örneklerinden izole edilen RNA'larda, SARS-CoV-2 RNA'ları, N1 ve N2 genlerini (Krosgen Biotechnology, İstanbul, Türkiye) hedefleyen ticari bir RT-PCR test kiti olan "KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 RT-PCR Tanı Kiti" kullanılarak tespit edilmiştir. Tüm deneyler, üreticinin talimatları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Kit prosedürüne göre, numunedeki pozitifliği saptamak için Ct değeri Ct <40 olmalıdır. RT-PCR çalışmaları seçilen kitin

çalışma protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. İzole RNA örneklerinde RT-PCR analiz sonuçları pozitif ve negatif olmak üzere kayıt altına alınmıştır.

3.2.2.1 Gerçek Zamanlı PCR Kit Protokolüne Göre Uygulanan Parametreler

KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 RT-PCR Tanı Kiti ile, USA-CDC ve WHO tarafından belirlenmiş N geni üzerinde N1, N2 gen bölgelerinin taraması yapılmakta olup, KrosQuant SARS-COV-2 (2019 nCOV) V2 RT-PCR Tanı Kiti, balgam, üst solunum yolu; orofarengeal, nazofarengeal ve BAL örneklerinden SARS-CoV-2 tespiti analizini yapmaktadır.

Tanı kitinde insanda mRNA düzeyinde bulunan RNAaz P(RP) mRNA'sı iç kontrol olarak seçilmiştir. Kit FAM ve HEX dalga boylarında ışıma almaktadır ve tek tüp ile multipleks olarak çalışmaktadır. Kit içinde bunların yanında, negatif kontrol ve pozitif kontrol bulunmaktadır. Bu kitin RT-PCR çalışma süresi yaklaşık 90 dakika'dır. Öncelikli olarak RNA izolasyon aşaması çalışmadan önce yapılmalıdır.

Pozitif Kontrol RP gen bölgesini içermemekte, N1 ve N2 gen bölgelerini içermektedir.

3.2.2.2 RT-PCR Deneylerinin Hazırlanması

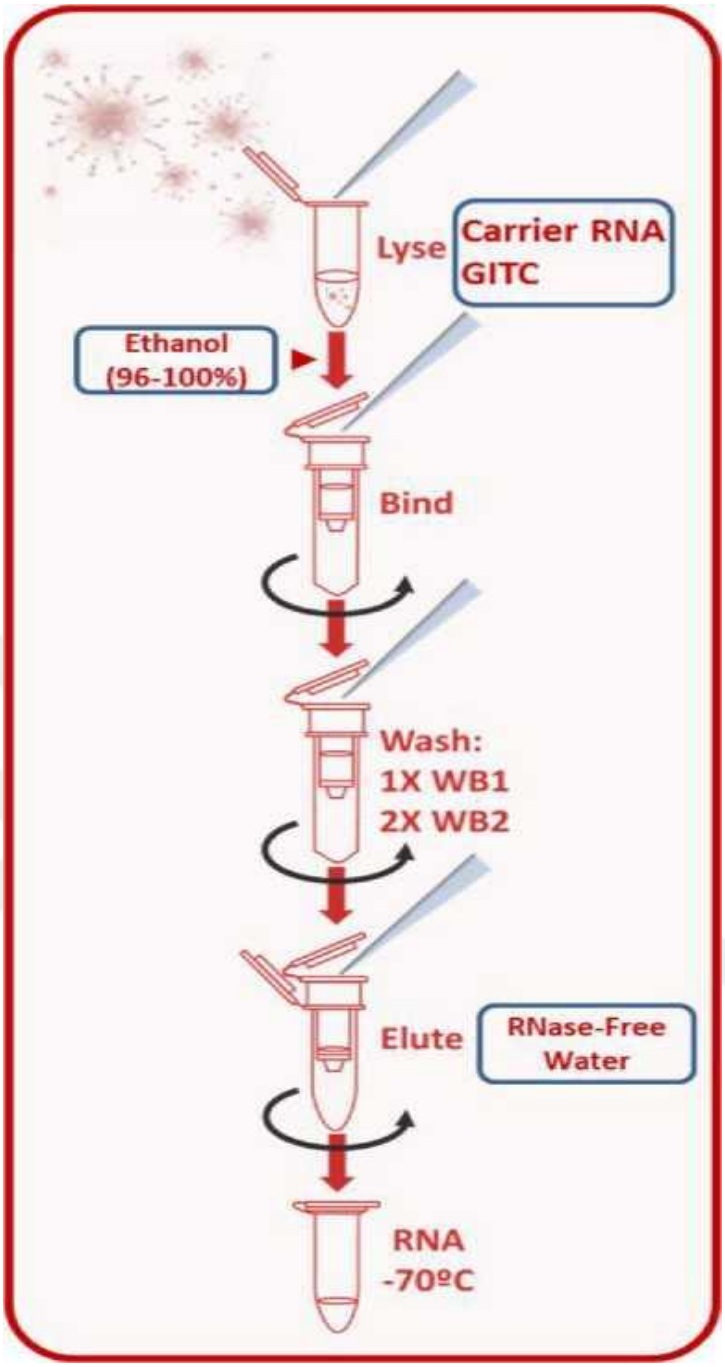
3.2.2.3 Gerekli Malzemeler ve Cihazlar

- RT-PCR cihazı
- Tek kullanımlık eldiven
- Viral RNA İzolasyonu
- Derin Dondurucu
- Pipet (10-100 µL ve 0.5-10 µL)
- PCR tüpleri, PCR plate'leri veya Stripler
- Soğuk Rack
- Steril pipet ucu
- Vorteks, Santrifüj

3.2.2.4 Malzemelerin Çözünmesi

-20°C'de bekletilen malzemeler buz üzerinde tutularak çözünmesi sağlanmıştır.

Pipetaj yapılarak sıvı hale gelen malzemeler karıştırılmıştır.



Şekil 3.1 CVX^{TM} Viral RNA Ekstraksiyon Kit Protokolü İş Akışı [CVX™ Viral RNA Extraction Kit]

3.2.2.5 Reaksiyonların Hazırlanması

Örnekler için bir tek reaksiyon hazırlanmıştır. Pozitif Kontrol (PC) ve Negatif Kontrol (NTC) için farklı bir reaksiyon hazırlanmıştır.

1- Kit içinden çıkan mix1, mix2, mix3, pozitif kontrol ve negatif kontrol -20°C'de saklanmıştır ve çalışılacağı zaman buz üzerinde tutularak çözünmesi sağlanmıştır.

2- Pipetaj yapılarak sıvı hale gelen malzemeler karıştırılmıştır.
3- Her bir örnek için 3 ayrı 0.2mL'lik PCR tüpü hazırlanmıştır. NTC ve PC için ayrı bir reaksiyon hazırlanmıştır.
4- Her bir mixden 15µL alınarak o mix için ayrılmış 0.2mL'lik PCR tüpüne konulmuştur.
5- 5µL RNA izolatı her bir tüpe eklenmiştir.
6- Hazırlanan karışım ilk olarak vorteks ardından spin santrifüje tabi tutulmuştur.
7- RT- PCR cihazında aşağıdaki protokol yazılmıştır.
8- Örnekler RT-PCR cihazına mix1, mix2 ve mix3 şeklinde sıralı olarak konulmuştur.
9- RT- PCR cihazına tüp yerleştirme sırası cihaz yazılımına doğru bir şekilde yazılarak cihaz çalıştırılmıştır.

RT- PCR cihaz çalışma prototokolü Tablo 3.8'de sunulmuştur.

Tablo 3.8 RT- PCR Cihaz Çalışma Protokolü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Florasan Işıma
1	45	600	
1	95	120	
45	95	10	
	55	30	FAM, HEX

3.2.2.6 Sonuçların Yorumlanması

Sonuçlar yorumlanırken aşağıdaki Tablo 3.8'dEn yararlanılmıştır. Her bir parametrenin pozitif olarak yorumlanması için Ct < 40 olması gerekmektedir. Ct değerinin "0" çıkması durumunda parametre negatif olarak kabul edilmiştir. Her çalışmanın, kit içerisinden çıkan pozitif ve negatif kontrol ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan pozitif kontrol için FAM ışımasının 28 < Ct < 32 arasında çıkması beklenmiştir. RT-PCR cihazı sonuç değerlendirmesi kriterleri Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

Tablo 3.9 RT-PCR Cihaz Sonuç Değerlendirme Kriterleri

(FAM) N1-N2 Gen Bölgesi	(HEX) RP	SONUÇ
+	-	SARS-CoV-2 Pozitif Örnek
+	+	SARS-CoV-2 Pozitif Örnek
-	+	SARS-CoV-2 Negatif Örnek
-	-	Geçersiz sonuçtur. Örnek izolasyonundan itibaren tekrar çalışılmalıdır.

Tablo 3.10 Pozitif ve Negatif Kontrollerine Ait Beklenen Sonuç Tablosu

N1-N2 Gen Bölgesi (FAM)	RP (HEX)	SONUÇ
+	-	SARS-CoV-2 Pozitif Kontrol
-	-	SARS-CoV-2 Negatif Kontrol

3.2.2.7 İstatiksel Analizler

İstatistiksel analiz için NCSS (Kaysville, Utah, ABD) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri boyunca elde edilen veriler incelenirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemler örneğin. standart sapma, ortalama, frekans, medyan, oran, minimum, maksimum kullanılmıştır. Nicel verilerin normal dağılımın uygunluğu Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk testleri ve grafiksel değerlendirmeler ile test edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen iki grup verinin karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Pearson Ki-Kare testi ile gerçekleştirilmiştir. Wilcoxon Signed Ranks testi ise, normal dağılım göstermeyen parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Çalışmaya Katılan Hastaların Demografik ve Temel Özellikleri

4.1.1 Hasta Karakteristikleri

Tez çalışmamızda tedavi gördükten sonra taburcu olan hastaların gaitalarında SARS-CoV-2 virüsünün ne kadar süreyle kaldığını belirlemeyi amaçlıyoruz. 65 hastadan alınan 1. gaita örneğinin 8'inde SARS-CoV-2 pozitif, 57'sinde negatif bulunmuştur. Çalışma, gaita örneğinde SARS-CoV-2 pozitif sonuçlar alınan 8 hasta ile devam etmiştir. Tez çalışması, Nisan-Ekim 2020 tarihleri arasında %43.1 (n=28) kadın, %56.9 (n=37) erkek olmak üzere toplam 65 hasta ile gerçekleştirilmiştir. Hastaların yaşları 19 ile 73 arasında değişmekte olup, ortalama 52.34± 10.90 yıldır. Hastaların %12.3'ünün (n=8) dışkı sonucu SARS-CoV-2 pozitif bulunmuştur. Pnömoni düzeyi %72.3 (n=47) hafif iken, %27.7 (n=18) orta düzeyde belirlenmiştir. Olguların %38.5'inde (n=25); %18.5'inde (n=12) diyabet, %30.8'inde (n=20) hipertansiyon, %10.8'inde (n=7) astım, %3.1'inde (n=2) kroner arter hastalığı, %1.5'inde (n=1) ülseratif kolit, %3.1'inde (n=2) akut böbrek yetmezliği ve %1.5'inde (n=1) lenfoma gibi ek hastalık görülmüştür. Tüm olgu özellikleri aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Tanımlayıcı Özelliklere Göre Gaita Sonuçlarının Değerlendirilmesi

		Gaita sonuç		
		Negatif (n=57)	Pozitif (n=8)	
		n (%)	n (%)	p
Yaş (yıl)	Min-Mak (Medyan)	19-73 (55)	33-68 (52)	[a]0.696
	Ort±Ss	52.47±11.06	51,38±10,29	
Cinsiyet	Kadın	23 (40.4)	5 (62.5)	[b]0.275

Tablo 4.1 Tanımlayıcı Özelliklere Göre Gaita Sonuçlarının Değerlendirilmesi [Devamı]

	Erkek	34 (59.6)	3 (37.5)	
Pnömoni düzeyi	Hafif	41 (71.9)	6 (75.0)	[b]1.000
	Orta	16 (28.1)	2 (25.0)	
Ek hastalık	Yok	37 (64.9)	3 (37.5)	[b]0.243
	Var	20 (35.1)	5 (62.5)	
•Görülen ek hastalıklar	Diyabet	9 (15.8)	3 (37.5)	[b]0.158
	Hipertansiyon	15 (26.3)	5 (62.5)	[b]0.095
	Astım	5 (8.8)	2 (25.0)	[b]0.203
	Kronor arter hastalığı	1 (1.8)	1 (12.5)	[b]0.233
	Ülseratif kolit	1 (1.8)	0 (0)	[b]1.000
	Akut böbrek yetmezliği	2 (3.5)	0 (0)	[b]1.000
	Lenfoma	1 (1.8)	0 (0)	[b]1.000

[a]*Mann Whitney U Test* [b]*Pearson Ki-kare Test*

4.1.2 Olguların Tanımlayıcı Özelliklere Göre Gaita Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İki grup demografik olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). Olguların pnömoni düzeylerine ve ek hastalık varlığına göre gaita sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05). Olgularda diyabet, hipertansiyon, astım, kronor arter hastalığı, ülseratif kolit, akut böbrek yetmezliği ve lenfoma görülme durumuna göre de gaita sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

4.1.3 Laboratuvar Bulgularının Değerlendirilmesi

Beyaz kan hücresi (WBC), kreatin kinaz (CK), lenfosit ve % lenfosit (LYM, %LYM), nötrofil ve % nötrofil (NEU, %NEU), Hemoglobin (HGB), plak (PLT), C-reaktif protein (CRP), prokalsitonin, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), D-dimer, ferritin, protrombin zamanı (INR), kreatinin ve kan üre nitrojen düzeyleri belirlenmiştir. Hastaların biyokimyasal parametreleri ve karşılaştırılmaları, hastaların yatış ve taburculuk sırasındaki biyokimyasal parametrelerinin grup içi ve grup sonuçları karşılaştırılmıştır, değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).**Tablo 4.2** Hastaların Biyokimyasal Parametreleri Ve Karşılaştırılmaları

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
WBC (10^9/L)		N	57	8	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	2.5-13.2 (5,6)	3.1-8 (6.1)	***0.846***
		Ort±Ss	6.10±2.34	3.61±1.92	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	2.2-13.4 (6,6)7	3.9-11.5 (7.8)	***0.357***
		Ort±Ss	6.94±2.21	7.88±2.53	
		[c]p	***0.007****	***0.028****	
CK	**İlk ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	11-1818 (105.5)	70-166 (120)	***0.812***
		Ort±Ss	199.80±292.67	112.40±40.94	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	14.9-200 (49.5)	24-71 (28)	***0.342***
		Ort±Ss	54.13±35.05	39.80±20.98	
		[c]p	***0.001****	***0.043****	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [Devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
LYM (10^9/L)		*N*	*55*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.5-3.4 (1.3)	0.5-2.2 (1.2)	***0.498***
		Ort±Ss	1.39±0.55	1.23±0.68	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.8-4.4 (1.9)	0.9-2.9 (2)	0.904
		Ort±Ss	2.04±0.75	1.99±0.70	
		[c]p	***0.001*****	***0.028****	
		N	*55*	*6*	
LYM (%)	**İlk ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	7.9-66.6 (22.3)	12.1-28.2 (21.9)	***0.438***
		Ort±Ss	24.92±10.72	20.97±6.94	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	16.2-57.6 (28.2)	12.7-43.9 (24.7)	***0.521***
		Ort±Ss	27,50±9.88	26.85±10.94	
		[c]p	***0.002*****	***0.0753****	
NEU (10^9/L)		*N*	*55*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.9-10.6 (3.7)	2.3-5.9 (3.5)	***0.790***
		Ort±Ss	4.14±2.15	3.71±1.43	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	1-10 (4.1)	1.4-8 (4.9)	***0.217***
		Ort±Ss	4.15±1.78	4.91±2.14	
		[c]p	***0.651*****	***0.173****	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [Devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
NEU (%)		*N*	*55*	*6*	
	İlk ölçüm	*Min-Max(Medyan)*	21.8-88.3 (64.5)	12.1-28.2 (21.9)	***0.913***
		Ort±Ss	63.53±15.11	20.97±6.94	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	176-76.7 (58.6)	35.8-73.7 (63.6)	***0.438***
		Ort±Ss	56.96±11.81	59.88±13.57	
		[c]p	***0.006*****	***0.0917****	
HGB (g/L)		*N*	*55*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	8.8-16.2 (13.2)	10.4-14.9 (12.3)	***0.309***
		Ort±Ss	13.00±1.79	12.30±1.74	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	8.8-16.1 (12,9)	11-13.6 (11.6)	***0.171***
		Ort±Ss	12,74±1,71	11,93±0,99	
		[c]p	***0.082*****	***0.0527****	
		n	*53*	*6*	
PLT (10^9/L)	**İlk ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	18-660 (201)	12.1-28.2 (21.9)	***0.697***
		Ort±Ss	221.79±105.81	20.97±6.94	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	93-606 (282)	211-471 (304)	***0.812***
		Ort±Ss	286.00±124.93	319.33±896.3	
		[c]p	***0.001*****	***0.028****	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [Devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
CRP (mg/L)		*n*	*54*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	2.2-302.7(54.1)	11-107.8 (51.8)	***0.941***
		Ort±Ss	69.61±69.18	56.47±47.67	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.9-49.7 (8.2)	0-28.4 (12.3)	***0.980***
		Ort±Ss	12.79±12.01	11.96±10.34	
		[c]p	***0.001*****	***0.075****	
Procalcitonin (µg/L)		*n*	*55*	*6*	
	İlk ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.01-14.1(0.06)	0.04-0.2 (0.06)	***0.739***
		Ort±Ss	0.35±1.95	0.08±0.06	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.01-1.4 (0.03)	0.02-0.16 (0.03)	***0.774***
		Ort±Ss	0.07±0.19	0.05±0.05	
		[c]p	***0.001*****	***0.0248****	
		n	*54*	*6*	
AST (U/L)	**İlk Ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	14-151 (37)	19-124 (37)	***0.882***
		Ort±Ss	43.67±25.97	55.67±43.34	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	14-188 (35)	16-31 (24,9)	***0.049***
		Ort±Ss	38.29±26.80	23.47±5.57	
		[c]p	***0.020*****	***0.028****	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [Devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
ALT (U/L)		*n*	*55*	*6*	
	İlk ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	7-218 (31)	19-125 (71.5)	***0.136***
		Ort±Ss	40.89±35.10	65.17±40.06	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	10-196 (53)	20-68 (35.1)	***0.364***
		Ort±Ss	48.01±42.27	40.53±18.33	
		[c]p	***0.001*****	***0.0116****	
LDH (U/L)		*n*	*48*	*5*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	145-667 (299)	151-600 (253)	***0.761***
		Ort±Ss	314.60±124.59	326.80±184.03	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	127-494 (228.5)	163-296 (186)	***0.181***
		Ort±Ss	242.06±69.45	11.96±10.34	
		[c]p	***0.001*****	***0.080****	
		n	*50*	*5*	
D-dimer	**İlk ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	0.01-3.9 (0.26)	0.2-0.8 (0.2)	***0.714***
		Ort±Ss	0.51±0.79	0.37±0.25	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.01-4.3 (0.3)	0.2-1.4 (0.3)	***0.183***
		Ort±Ss	0.28±0.85	0.65±0.52	
		[c]p	***0.337***	***0.225***	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [Devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	***[c]p***
Ferritin (µg/L)		*n*	*53*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	30.3-1471 (253.4)	46-820.4 (211)	***0.707***
		Ort±Ss	330.36±303.96	288.95±274.21	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	11.6-885.7 (216.9)	.7,4-354.7 (87.2)	***0.160***
		Ort±Ss	242.69±191.53	130.67±113.70	
		[c]p	***0.008*****	***0.249***	
INR		*n*	*43*	3•	
	İlk ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.9-4.2 (1)	1-1.1 (1)	**-**
		Ort±Ss	1.16±0.54	1.04±0.06	
	Son ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.9-1.8 (1)	0.9-1 (1)	**-**
		Ort±Ss	1.05±0.16	0.99±0.05	
		[c]p	***0.349***	**-**	
		n	*54*	*6*	
Kreatinin (µmol/L)	**İlk Ölçüm**	*Min-Max (Medyan)*	0.5-1.6 (0.8)	0.6-1.3 (0.8)	***0.758***
		Ort±Ss	0.88±0.24	0.86±02.5	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	0.4-1.3 (0.8)	0.5-1.1 (0,.)	***0.375***
		Ort±Ss	0.81±0.20	0.74±0.23	
		[c]p	***0.006*****	***0.116***	

Tablo 4.2 Hastaların Biyokimyasal Parametreleri ve Karşılaştırılmaları [devamı]

			Gaita sonuç		
			Negatif	**Pozitif**	**[c]p**
Fibrinojen		*n*	*45*	*3•*	
	İlk ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	254-658 (445)	275-582 (408)	**-**
		Ort±Ss	446.44±105.14	421.67±153,.6	
	Son ölçüm	*Min-Max(Medyan)*	232-684 (427)	340-416 (358)	**-**
		Ort±Ss	423.85±106.69	371.33±39.72	
		[c]p	***0.159***	**-**	
Üre (mmol/L)		*n*	*55*	*6*	
	İlk Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	13-53 (28.5)	18-51 (29.5)	***0.846***
		Ort±Ss	31.31±10.22	30.33±12.40	
	Son Ölçüm	*Min-Max (Medyan)*	14-51 (25.1)	16.9-47.4 (25.5)	***0,725***
		Ort±Ss	27.48±9.15	29.60±11.40	
		[c]p	***0.015****	***0.600***	

*[a]Mann Whitney U Test [c]Wilcoxon Signed Ranks Test *p<0.05**p<0.01*

•Gruplardaki kişi sayısı az olmasından dolayı istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır

Gaita sonuçlarına göre olguların ilk ve son WBC, CK; LYM, LYM (%), NEU, NEU (%), HGB, PLT, CRP, Prokalsitonin, ALT, LDH, D-dimer, Ferritin , Kreatinin, Üre ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0.05).

Gaita sonuçlarına göre olguların ilk AST ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermezken (p>0.05); Gaita sonucu pozitif olanların son AST ölçümlerinin, sonucu negatif olanlardan düşük olması anlamlı bulunmuştur (p=0.049; p<0.05).

Gaita sonucu negatif olanların ilk ölçüme göre son WBC ölçümlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.007; p<0.01), CK (p=0.001; p<0.01), LYM (p=0.001; p<0.01), LYM (%) (p=0.002; p<0.01) olarak anlamlı bulunmuştur. NEU ölçümlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05), NEU (%) ölçümlerindeki düşüş istatistiksel olarak (p=0.002; p<0.01), HGB ölçümlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05), PLT (p=0.001; p<0.01), Prokalsitonin (p=0.001; p<0.01), AST (p=0.020; p<0.05), ALT (p=0.001; p<0.01), LDH (p=0.001; p<0.01) olarak

anlamlıdır. D-dimer ölçümlerindeki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$), INR ölçümlerindeki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ferritin ($p=0.008$; $p<0.01$), Kreatinin ($p=0.006$; $p<0.01$). olarak anlamlı bulunmuştur..Üre ölçümlerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.015$; $p<0.05$).

Gaita sonucu pozitif olanların ilk ölçüme göre son WBC ölçümlerindeki artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.028$; $p<0.05$), CK ($p=0.043$; $p<0.05$).

LYM ($p=0.028$; $p<0.05$) olarak anlamlı, LYM (%) ölçümlerindeki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). NEU ($p>0.05$), NEU (%) ($p>0.05$), HGB ölçümlerindeki değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$),

PLT ($p=0.028$; $p<0.05$)olarak anlamlı, CRP, Üre, Kreatinin, Fibrinojen, ALT, LDH, D-dimer, Ferritin ve Prokalsitonin ölçümlerindeki değişim ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). AST ölçümlerindeki düşüş de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.028$; $p<0.05$).

Gaita sonuçlarına göre olguların ilk ve son INR ölçümleri gruplardaki kişi sayılarının az olmasından dolayı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Gaita sonuçlarına göre olguların ilk ve son Fibrinojen ölçümleri gruplardaki kişi sayılarının az olmasından dolayı istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Gaita pozitif ve negatif grupların hastanede yatış ve taburculuk durumlarının tüm biyokimyasal parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($p>0.05$) gözlenmemiştir ($p>0.05$).Gaita negatif grupların grup içi karşılaştırmalarında WBC, LYM, %LYM, PLT ve ALT değerleri istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken, CK, %NEU, CRP, prokalsitonin, AST, DH, ferritin ve kreatinin değerleri önemli düşüş göstermiştir. Gaita pozitif grupta, WBC, LYM ve PLT istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken sadece CK anlamlı olarak azalmıştır.

Hastaların iyileşmesine paralel olarak laboratuvar bulgularındaki iyileşme göz önüne alındığında, hastalığın prognozunda büyük önem taşıyan lenfopenideki iyileşme hem gaita pozitif hem de gaita negatif gruplarda istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca, inflamatuar sürecin önemli göstergeleri olan CRP ve ferritin düzeylerindeki iyileşme, gaita negatif grupta istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu gelişme gaita pozitif grupta istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durumun PCR pozitif veya negatif gaita ile değil, hastalığın klinik şiddeti ve kalış süresi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Gaita negatif ve pozitif gruplar karşılaştırıldığında, yatış ve taburculuk laboratuvar bulguları açısından anlamlı fark bulunmamıştır.

4.1.4 Dışkı Örneklerinde Viral RNA Süresinin Değerlendirilmesi

Çalışmada; 65 hastadan alınan 1. gaita örneklerinin sonuçları 8 kişide pozitif, 57 kişide negatif çıkmıştır. Çalışmaya gaita örneğinde pozitif olan 8 hasta ile devam edilmiştir. Gaitaı örnekleri pozitif olan sekiz hasta değerlendirildiğinde, örneklemeye göre COVID-19 tanısından en az on dört gün sonra başlanan SARS-CoV-2 varlığı 3 haftaya kadar devam ettiği tespit edilmiştir. İlk gaita örneklerinde SARS-CoV-2 sonuçları, tüm hastalarda pozitif çıkmıştır. 2. gaita örneğine bakıldığında hastaların % 62.5'inin hala SARS-CoV-2 pozitifliği olduğu görülmektedir. Üçüncü haftada sadece bir hastanın gaita pozitifliği devam ederken, dördüncü haftada tüm hastaların gaita sonuçları negatif bulunmuştur (Tablo 4.3)

Tablo 4.3 Gaita Örnekleri SARS-CoV-2 Sonuçları İçin Pozitif Olan Hastalar

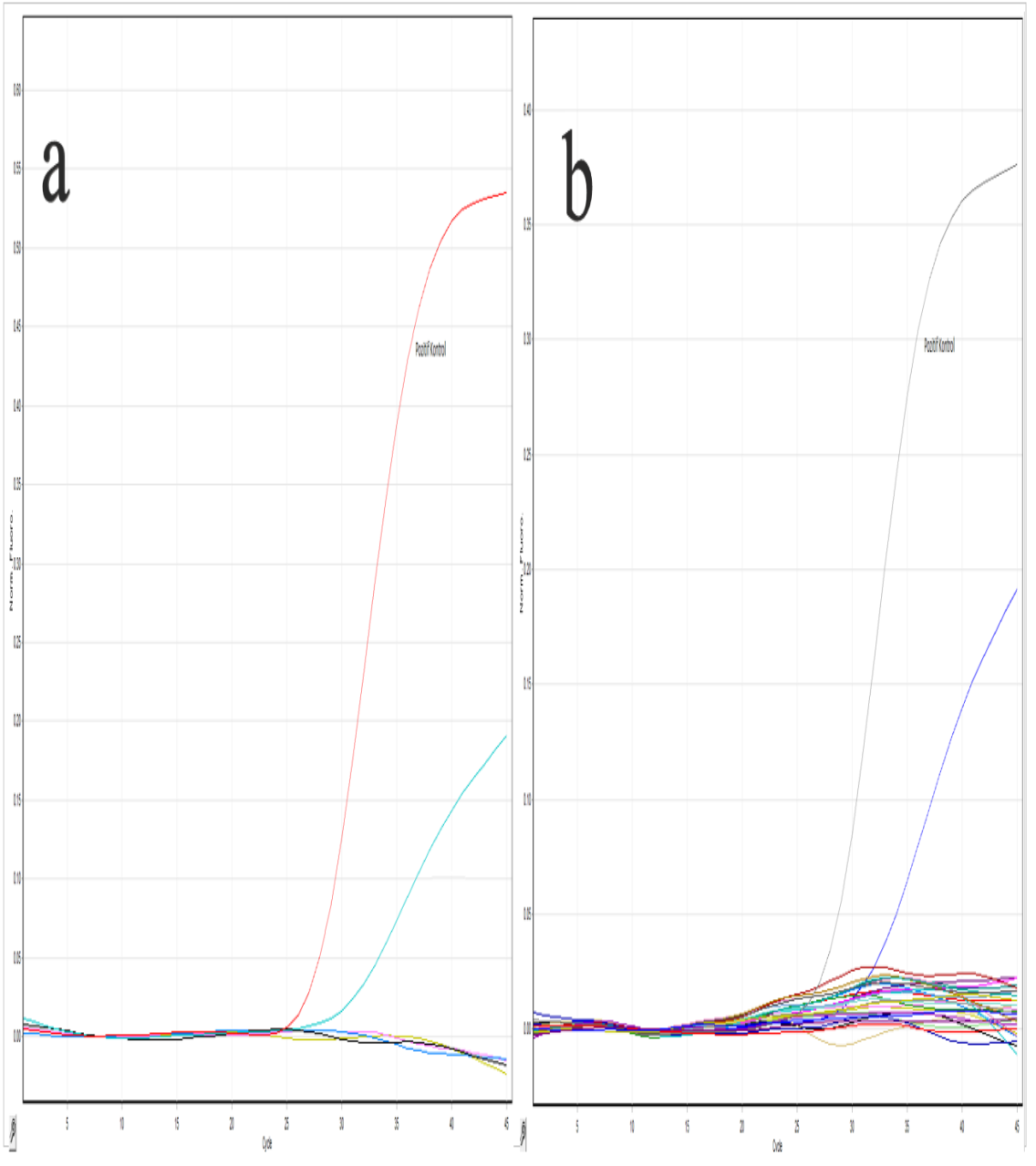
Hasta	**Yaş**	**Cinsiyet**	**Klinik Sınıflandırma**	**COVID-19 Tanı Tarihi**	**COVID-19 Tanısından Negatif Solunum Sonucuna Kadar Geçen Süre**	**COVID-19 Tanısından İlk Gaita Numunesi Alınmasına Kadar Geçen Süre**	**Gaita Numune Sonuçları**			
							1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
H1	49	E	UY	06.08.2020	9	24	+	+	-	-
H2	55	E	AĞIR	25.05.2020	10	27	+	-	-	-
H3	58	K	UY	26.08.2020	5	23	+	-	-	-

Tablo 4.3 Gaita Örnekleri SARS-CoV-2 Sonuçları İçin Sozitif Olan Hastalar [Devamı]

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Klinik Sınıflandırma	COVID-19 Tanı Tarihi	COVID-19 Tanısından Negatif Solunum Sonucuna Kadar Geçen Süre	COVID-19 Tanısından İlk Gaita Numunesi Alınmasına Kadar Geçen Süre	Gaita Numune Sonuçları			
							1. Hafta	2. Hafta	3. Hafta	4. Hafta
H4	45	E	UY	16.09.2020	6	15	+	+	+	-
H5	33	K	UY	14.09.2020	8	16	+	+	-	-
H6	48	K	UY	26.09.2020	7	15	+	+	-	-
H7	68	K	UY	28.09.2020	3	14	+	+	-	-
H8	55	K	UY	08.10.2020	11	15	+	-	-	-

4.1.5 Gerçek-Zamanlı PCR Sonuçları

RT-PCR, nükleik asit artmasıyla eş zamanlı olarak yükselme gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle, kısa zamanda kantitatif olarak sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. RT-PCR yöntemi ile analiz edilen bazı gaita numunelerine ait PCR grafikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1)



Şekil 4.1 Gaita numuneleri için örnek bazı PCR Grafikleri

4.2 Tartışma

SARS-CoV-2 virüsü bu virüse enfekte bir kişi öksürdüğünde ya da hapşırdığında üretilen solunum damlacıkları yoluyla esas olarak kişiden kişiye, doğrudan temas yoluyla

bulaşmaktadır [5, 89]. Çeşitli çalışmalar, hastalığın farklı evrelerinde gaita örneklerinde pozitifliğin bulunabileceğini göstermiştir ve bu çalışmalar, solunum örnekleri negatifleşen hastalarda gaita pozitifliğinin devam ettiğini göstermiştir [12, 14, 90]. En yaygın görüş virüsün ana bulaşma yolunun enfekte bireylerin solunum damlacıkları olduğu yönünde olsa da, hastalığın başka bir yayılma yolu olarak kabul edilen enfekte bireylerle temas yoluyla kontamine olmuş yüzeylerden de hastalığın bulaşabileceği gözlenmektedir. SARS-CoV-2'in aerosollerde 3 saat, bakır yüzeylerde 4 saat süre ile, kartonda 24 saat süre ile, plastik ve paslanmaz çelik yüzeylerde 72 saatten fazla yaşayabildiği gösterilmiştir [91]. Virüsün başka bir bulaşma yolu ise fekal-oral bulaşma yoludur. Bu tarihe kadar fekal-oral yolla bulaşan klinik vakaya rastlanmamıştır. SARS-CoV-2 ile aynı virüs ailesinden olan SARS-CoV ve MERS-CoV'un Suudi Arabistan'da birçok ölüme neden olması, SARS-CoV-2'nin bu yolla bulaşma ihtimalini düşündürmektedir [12].

Fekal-oral yolla bulaşma olasılığını artırabilecek faktörler göz önünde bulundurulmalı ve gaita ile çalışırken daha sıkı önlemler alınmalıdır. Bununla birlikte hastalık, enfektif aerosoller üreten COVID-19 hastalarının gaitası yoluyla bulaşabileceği düşünülmektedir. Epidemik bölgelerdeki endoskopik işlemler de çapraz enfeksiyona neden olabileceği belirlenmiştir. Aynı şekilde tüm cerrahi uygulamalar da uygun eğitim almış personel tarafından uygun aletler kullanılarak yapılmalıdır. Ayrıca SARS-CoV-2 virüsünün aerosol haline gelmesine neden olduğu düşünülen laparoskopik veya açık cerrahi işlemler personele bulaşabilileceği öngörülmektedir [29-33].

Yong Zhang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, hastalığın başlamasıyla birlikte takibe başlanan kritik ve hafif hastalarda 2 hafta, şiddetli ve orta şiddette en fazla 4-5 haftaya kadar gaita pozitifliği saptanmıştır [34]. Benzer şekilde hastanede yatan 45 hasta ile yapılan bir diğer çalışmada hastaların vücut sıvılarında SARS-CoV-2 RNA'nın bulunma süresi araştırılmıştır. Hastalardan 4 hafta boyunca üç günde bir vücut sıvıları alınmıştır. Çalışma sonucunda hastalığın başlangıcından ilk negatif gaita örneği sonucuna kadar geçen sürenin hafif hastalarda 24.5 gün, şiddetli semptomları olan hastalarda ise 32.5 gün olduğu belirtilmiştir [92]. Bir meta-analiz çalışması, 443 hastanın 282'sinin (%64), üst solunum testi negatif olduktan sonra ortalama 12.5 günden maksimum 33 güne kadar gaita pozitif kaldığını göstermiştir [93]. Benzer sonuçlara ulaşan başka bir meta-analiz çalışmasında, 4243 hastanın %48,1'inde hastalığın başlangıcından 33 güne kadar dışkı pozitifliği olduğu bulunmuştur [21]. Çalışmamızın sonuçları yukarıda belirtilen

çalışmalarla uyumludur. Ancak bu çalışmaların bir kısmı tedavisi devam eden hastalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Gaita pozitifliği döneminde bu hastalar bulaşma riskinin çok daha az olduğu hastane koşullarındaydı. Çalışmamız tedavi sonrası taburcu olup normal hayatlarına dönen bireylerden hastalığın bulaşma olasılığının anlaşılması açısından oldukça önemlidir.

Gaitada SARS-CoV-2 RNA'sının saptanması, virüsün gaita yoluyla yayılabileceği anlamına gelmemektedir. Virüsün başka bir bulaşma yolu olarak fekal-oral bulaşma yolu kabul edilmektedir [20, 91]. Bu durum fekal-oral bulaşma olasılığını öne çıkarmaktadır. Sonuçlarımız COVID-19 tedavisi gören ve taburcu edilen hastaların gaita örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'nın uzun süreli kalıcılığını göstermektedir.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Çin'in Wuhan şehrinde, 2019 yılının sonunda şiddetli akut solunum yolu hastalığı ile ortaya çıkan ve dünya çapındaki ülkelerde insanların ölümlerine neden olan koronavirüsün bir yeni türü olan SARS-CoV-2 virüsü bulunmuştur. Covid-19 hastalığı bu virüs ile ortaya çıkmakta ve bir kişiden diğer kişiye solunum yoluyla damlacıklar halinde ve kişilerin doğrudan temas etmesiyle yayıldığı düşünülmekte olan bir hastalıktır.

Covid-19 hastalığının fekal-oral yayılma yolu ise, bu virüsün başka bir bulaşma yolu olduğu belirtilmektedir.

Literatürde gerçekleştirilen çeşitli araştırmalara bakıldığında, Covid-19 hastalarının üst solunum yolu örnekleri ile RT-PCR testi yapıldığında bu testin sonuçları SARS-CoV-2 negatif sonuç verirken, aynı hastalara ait gaita numulerinin RT-PCR analiz test sonuçlarının pozitif olması, Covid-19 hastalığının yayılmasının araştırmacılara sadece solunum yolu ile olmadığını, fekal-oral yayılma yolu ile de bulaşma riskinin olabileceğini düşündürmüştür.

Covid-19 hastalığını geçirmiş bireylerin gaita numunelerinde canlı virüslerin olduğunu literatürde yer alan araştırmalar göstermiştir ve bu durumun hastalığı bulaştırmada çok önemli bir yol olabileceği bu araştırmalarda belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında ise, taburcu olan hastaların fekal örneklerinde SARS-CoV-2 virüsünün kalabileceği süre tespit edilmiş ve buna bağlı olarak bulaşma riskinin devam ettiği zaman aralığı belirlenmiştir.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesinin pandemi birimine çeşitli şikayetler ile başvurarak, RT-PCR testi sonucu pozitif çıkan ve tedavi sonrasında 24 saatten daha uzun bir zamanda alınan iki üst solunum yolu örneği negatif sonuç veren hastalar ile çalışmalar yürütülmüştür.

Tez araştırması hastaneden iyileşerek taburcu olmuş 19-73 yaş aralığındaki 65 kişi ile gerçekleştirilmiştir. İyileşerek hastaneden ayrılmış olan kişilerden alınan gaita örnekleri RT-PCR testi sonuçlarına bakıldığında, 65 hastadan alınan birinci gaita örneklerinin sonuçları 8 kişide SARS-CoV-2 virüsü pozitif, 57 kişide negatif bulunmuştur. Tez çalışmasına gaita örneğinde pozitif olan 8 hasta ile devam edilmiştir. Gaita örnekleri

pozitif olan sekiz hasta değerlendirildiğinde, örneklemeye göre Covid-19 hastalığında SARS-CoV-2 virüsü varlığının 3 haftaya kadar devam ettiği tespit edilmiştir. İlk gaita örneklerinde SARS-CoV-2 virüsü sonuçları, tüm hastalarda pozitif çıkmıştır. İkinci gaita örneğine bakıldığında hastaların % 62.5'inin hala SARS-CoV-2 virüsünün pozitifliği olduğu görülmektedir. Üçüncü haftada sadece bir hastanın gaita pozitifliği devam ederken, dördüncü haftada tüm hastaların gaita sonuçları negatif bulunmuştur.

Sonuçlarımız Covid-19 tedavisi gören ve taburcu edilen hastaların gaita örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'nın uzun süreli kalıcılığını göstermektedir. Özellikle negatif bir üst solunum testi ile taburcu olma kriterlerini karşılayan hastalarda, diğer bireylere olası bir fekal-oral bulaşma yoluyla SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı korunmak için önemli bir tıbbi tavsiye olarak kabul edilebilir. Bireylerin kişisel korunmalarına rağmen farkındalığı ve alınması gereken önlemleri de artırabilir.

Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, Covid-19 hastalığını geçiren ve üst solunum yolları RT-PCR sonuçları negatif bulunan bireylerin gaita numunelerinde bu virüsün canlı kalma süresinin belirlenmesi, Covid-19 hastalığının bulaşmasının önlenmesinde ve gerekli tedbirlerin alınmasında çok önemlidir. Sonuçlarımız Covid-19 tedavisi gören ve taburcu edilen hastaların gaita örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'nın uzun süreli kalıcılığını göstermektedir. Özellikle negatif bir üst solunum testi ile taburcu olma kriterlerini karşılayan hastalarda, diğer bireylere olası bir fekal-oral bulaşma yoluyla SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı korunmak için önemli bir tıbbi tavsiye olarak kabul edilebilir. Bireylerin kişisel korunmalarına rağmen farkındalığı ve alınması gereken önlemleri de artırabilir.

Son olarak doktora çalışmamız değerlendirildiğinde, Covid-19 tedavisi gören ve taburcu edilen hastaların gaita örneklerinde SARS-CoV-2 virüsünün uzun süreli kalıcılığını göstermektedir. Covid-19 hastalığının fekal-oral yol ile bulaşmanın engellenmesine ve gerekli tedbirlerin alınmasında çok önemli olup, gerçekleştirilen bu tez çalışması ile dünya literatürüne ve ülkemize önemli bir katkı sağlanmıştır.

KAYNAKÇA

[1] World Health Organization. (n.d.). Coronavirus disease (covid-19). World Health Organization. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019

[2] Richman, D. D., Whitley, R. J., & Hayden, F. G. (Eds.). (2020). Clinical virology. John Wiley & Sons.

[3] Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. Coronaviruses: methods and protocols, 1-23.

[4] Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W., ... & Wu, G. (2020). A novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases—Wuhan, China 2019− 2020. China CDC weekly, 2(4), 61-62.

[5] Sohrabi, C., Alsafi, Z., O'neill, N., Khan, M., Kerwan, A., Al-Jabir, A., ... & Agha, R. (2020). World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). International journal of surgery, 76, 71-76.

[6] Su, L., Ma, X., Yu, H., Zhang, Z., Bian, P., Han, Y., ... & Gai, Z. (2020). The different clinical characteristics of corona virus disease cases between children and their families in China–the character of children with COVID-19. Emerging microbes & infections, 9(1), 707-713.

[7] Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The lancet, 395(10224), 565-574.

[8] Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Krüger, N., Müller, M., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. BioRxiv, 2020-01.

[9] Aktoz, M., Altay, H., Aslanger, E., Atalar, E., Atar, İ., Aytekin, V., ... & Yıldızeli35, B. (2020). Türk Kardiyoloji Derneği uzlaşı raporu: COVID-19 pandemisi ve kardiyovasküler hastalıklar konusunda bilinmesi gerekenler. Turk Kardiyol Dern Ars, 48(1), 1-87.

[10] Şeker, M., Özer, A., Tosun, Z., Korkut, C., & Doğrul, M. (2020). Covid-19 pandemi değerlendirme raporu. Türkiye Bilimler Akademisi.

[11] Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., ... & Munster, V. J. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. New England journal of medicine, 382(16), 1564-1567.

[12] Wu, Y., Guo, C., Tang, L., Hong, Z., Zhou, J., Dong, X., ... & Huang, X. (2020). Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. The lancet Gastroenterology & hepatology, 5(5), 434-435.

[13] Ianiro, G., Mullish, B. H., Kelly, C. R., Sokol, H., Kassam, Z., Ng, S., ... & Cammarota, G. Donor screening for faecal microbiota transplantation in the COVID-19 outbreak era: suggestions for urgent updates from an international expert panel.

[14] Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. Jama, 323(18), 1843-1844.

[15] Zhang, T., Cui, X., Zhao, X., Wang, J., Zheng, J., Zheng, G., ... & Xu, Y. (2020). Detectable SARS-CoV-2 viral RNA in feces of three children during recovery period of COVID-19 pneumonia. Journal of medical virology, 92(7), 909-914.

[16] Xu, Y., Li, X., Zhu, B., Liang, H., Fang, C., Gong, Y., ... & Gong, S. (2020). Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. Nature medicine, 26(4), 502-505.

[17] Zhang, Y., Chen, C., Zhu, S., Shu, C., Wang, D., Song, J., ... & Xu, W. (2020). Isolation of 2019-nCoV from a stool specimen of a laboratory-confirmed case of the coronavirus disease 2019 (COVID-19). China CDC Weekly, 2(8), 123-124.

[18] Chan, K. H., Peiris, J. M., Lam, S. Y., Poon, L. L. M., Yuen, K. Y., & Seto, W. H. (2011). The effects of temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus. Advances in virology, 2011.

[19] Van Doremalen, N., Bushmaker, T., & Munster, V. J. (2013). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. Eurosurveillance, 18(38), 20590.

[20] Yeo, C., Kaushal, S., & Yeo, D. (2020). Enteric involvement of coronaviruses: is faecal–oral transmission of SARS-CoV-2 possible? The lancet Gastroenterology & hepatology, 5(4), 335-337.

[21] Cheung, K. S., Hung, I. F., Chan, P. P., Lung, K. C., Tso, E., Liu, R., ... & Leung, W. K. (2020). Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 infection and virus load in fecal samples from a Hong Kong cohort: systematic review and meta-analysis. Gastroenterology, 159(1), 81-95.

[22] Tian, Y., Rong, L., Nian, W., & He, Y. (2020). gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. Alimentary pharmacology & therapeutics, 51(9), 843-851.

[23] Zhang, J., Wang, S., & Xue, Y. (2020). Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus–infected pneumonia. Journal of medical virology, 92(6), 680-682.

[24] Ling, Y., Xu, S. B., Lin, Y. X., Tian, D., Zhu, Z. Q., Dai, F. H., ... & Lu, H. Z. (2020). Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. Chinese medical journal, 133(09), 1039-1043.

[25] Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X., & Shan, H. (2020). Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. Gastroenterology, 158(6), 1831-1833.

[26] Chen, Y., Chen, L., Deng, Q., Zhang, G., Wu, K., Ni, L., ... & Cheng, Z. (2020). The presence of SARS-CoV-2 RNA in the feces of COVID-19 patients. Journal of medical virology, 92(7), 833-840.

[27] Chen, L., Lou, J., Bai, Y., & Wang, M. (2020). COVID-19 disease with positive fecal and negative pharyngeal and sputum viral tests. Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG, 115(5), 790.

[28] Zhang, W., Du, R. H., Li, B., Zheng, X. S., Yang, X. L., Hu, B., ... & Zhou, P. (2020). Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerging microbes & infections, 9(1), 386-389.

[29] Cuicchi, D., Lazzarotto, T., & Poggioli, G. (2021). Fecal-oral transmission of SARS-CoV-2: review of laboratory-confirmed virus in gastrointestinal system. International Journal of Colorectal Disease, 36, 437-444.

[30] Coccolini, F., Perrone, G., Chiarugi, M., Di Marzo, F., Ansaloni, L., Scandroglio, I., ... & Catena, F. (2020). Surgery in COVID-19 patients: operational directives. World Journal of Emergency Surgery, 15, 1-7.

[31] Flemming, S., Hankir, M., Hering, I., Meybohm, P., Krone, M., Weissbrich, B., ... & Wiegering, A. (2020). Abdominal fluid samples (negative for SARS-CoV-2) from a critically unwell patient with respiratory COVID-19. Journal of British Surgery, 107(8), e259-e260.

[32] Coccolini, F., Tartaglia, D., Puglisi, A., Giordano, C., Pistello, M., Lodato, M., & Chiarugi, M. (2020). SARS-CoV-2 is present in peritoneal fluid in COVID-19 patients. Annals of surgery, 272(3), e240.

[33] Safari, S., Keyvani, H., Alamdari, N. M., Dehghanian, A., Hashemi, M. R., Honar, B. N., & Aminian, A. (2020). Abdominal surgery in patients with COVID-19: detection of SARS-CoV-2 in abdominal and adipose tissues. Annals of Surgery, 272(3), e253.

[34] Zhang, Y., Chen, C., Song, Y., Zhu, S., Wang, D., Zhang, H., ... & Xu, W. (2020). Excretion of SARS-CoV-2 through faecal specimens. Emerging microbes & infections, 9(1), 2501-2508.

[35] Park, S. K., Lee, C. W., Park, D. I., Woo, H. Y., Cheong, H. S., Shin, H. C., ... & Joo, E. J. (2021). Detection of SARS-CoV-2 in fecal samples from patients with asymptomatic and mild COVID-19 in Korea. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 19(7), 1387-1394.

[36] Liu, J., Xiao, Y., Shen, Y., Shi, C., Chen, Y., Shi, P., ... & Lu, B. (2020). Detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR in anal from patients who have recovered from coronavirus disease 2019. Journal of Medical Virology, 92(10), 1769.

[37] Fumian, T. M., Malta, F. C., Dos Santos, D. R., Pauvolid-Corrêa, A., Fialho, A. M., Leite, J. P., & Miagostovich, M. P. (2021). SARS-CoV-2 RNA detection in stool samples from acute gastroenteritis cases, Brazil. Journal of Medical Virology, 93(4), 2543-2547.

[38] Peiris, J. S. M. (2016). Coronaviruses. Clinical virology, 1243-1265.

[39] Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Coronaviruses. Fenner and white's medical virology, 437.

[40] de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., ... & Lefkowitz, E. J. (2011). Family coronaviridae.

[41] Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H. D., & Rappuoli, R. (2003). SARS—beginning to understand a new virus. Nature Reviews Microbiology, 1(3), 209-218.

[42] Sun, C. B., Wang, Y. Y., Liu, G. H., & Liu, Z. (2020). Role of the eye in transmitting human coronavirus: what we know and what we do not know. Frontiers in public health, 8, 155.

[43] Swerdlow, D. L., & Finelli, L. (2020). Preparation for possible sustained transmission of 2019 novel coronavirus: lessons from previous epidemics. Jama, 323(12), 1129-1130.

[44] Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., ... & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature, 579(7798), 265-269.

[45] Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., ... & Peng, Z. (2020). Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. jama, 323(11), 1061-1069.

[46] Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., ... & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. The lancet, 395(10223), 507-513.

[47] Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., ... & Zhong, N. S. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. New England journal of medicine, 382(18), 1708-1720.

[48] Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The lancet, 395(10223), 497-506.

[49] Hernandez-Vargas, E. A., & Velasco-Hernandez, J. X. (2020). In-host modelling of covid-19 kinetics in humans. medrxiv, 20044487.

[50] Mathuria, J. P., & Yadav, R. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2-A review of current methods. Journal of infection and public health, 13(7), 901-905.

[51] Loeffelholz, M. J., & Tang, Y. W. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections–the state of the art. Emerging microbes & infections, 9(1), 747-756.

[52] Gaunt, E. R., Hardie, A., Claas, E. C., Simmonds, P., & Templeton, K. E. (2010). Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. Journal of clinical microbiology, 48(8), 2940-2947.

[53] Charlton, C. L., Babady, E., Ginocchio, C. C., Hatchette, T. F., Jerris, R. C., Li, Y., ... & Drews, S. J. (2018). Practical guidance for clinical microbiology laboratories: viruses causing acute respiratory tract infections. Clinical microbiology reviews, 32(1), e00042-18.

[54] Falsey, A. R., Formica, M. A., & Walsh, E. E. (2012). Simple method for combining sputum and nasal samples for virus detection by reverse transcriptase PCR. Journal of clinical microbiology, 50(8), 2835.

[55] Wang, W., Xu, Y., Gao, R., Lu, R., Han, K., Wu, G., & Tan, W. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. Jama, 323(18), 1843-1844.

[56] Cheng, P. K., Wong, D. A., Tong, L. K., Ip, S. M., Lo, A. C., Lau, C. S., ... & Lim, W. W. (2004). Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. The Lancet, 363(9422), 1699-1700.

[57] Al-Abdely, H. M., Midgley, C. M., Alkhamis, A. M., Abedi, G. R., Lu, X., Binder, A. M., ... & Gerber, S. I. (2019). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection dynamics and antibody responses among clinically diverse patients, Saudi Arabia. Emerging infectious diseases, 25(4), 753.

[58] Peng, L., Liu, J., Xu, W., Luo, Q., Chen, D., Lei, Z., ... & Gao, Z. (2020). SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. Journal of medical virology, 92(9), 1676-1680.

[59] Hase, R., Kurita, T., Muranaka, E., Sasazawa, H., Mito, H., & Yano, Y. (2020). A case of imported COVID-19 diagnosed by PCR-positive lower respiratory specimen but with PCR-negative throat swabs. Infectious Diseases, 52(6), 423-426.

[60] Sethuraman, N., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. Jama, 323(22), 2249-2251.

[61] Nalla, A. K., Casto, A. M., Huang, M. L. W., Perchetti, G. A., Sampoleo, R., Shrestha, L., ... & Greninger, A. L. (2020). Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer-probe sets and one assay kit. Journal of clinical microbiology, 58(6), e00557-20.

[62] Zheng, S., Fan, J., Yu, F., Feng, B., Lou, B., Zou, Q., ... & Liang, T. (2020). Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. bmj, 369.

[63] Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., ... & Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature, 581(7809), 465-469.

[64] Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques, 26(1), 112-125.

[65] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230(4732), 1350-1354.

[66] Rocha, A. J., de Souza Miranda, R., Sousa, A. J. S., & da Silva, A. L. C. (2016). Guidelines for successful quantitative gene expression in real-time qPCR assays. Polymerase chain reaction for biomedical applications, 1-13.

[67] Holland, M. J. (2002). Transcript abundance in yeast varies over six orders of magnitude. Journal of Biological Chemistry, 277(17), 14363-14366.

[68] Rocha, A. J., Monteiro-Júnior, J. E., Freire, J. E., Sousa, A. J., & Fonteles, C. S. (2015). Real time PCR: the use of reference genes and essential rules required to obtain normalisation data reliable to quantitative gene expression. Journal of Molecular Biology Research, 5(1), 45.

[69] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Sprin Harbor Laboratory Press, New York.

[70] Rocha, A. J., Maranhão, P. A., Silva, R. O., Pohl, S., & Fonteles, C. S. (2016). Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in Jatropha curcas L during development and under stress conditions using Real Time Quantitative PCR. Brazilian Archives of Biology and Technology, 59.

[71] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods, 25(4), 402-408.

[72] Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology letters, 26, 509-515.

[73] Bustin, S. A. (2002). INVITED REVIEW Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology, 29, 23-39.

[74] Pabla, S. S., & Pabla, S. S. (2008). Real-Time Polymerase Chain Reaction. Resonance: Journal of Science Education, 13(4).

[75] Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques, 37(1), 112-119.

[76] de la Cruz, S., López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., & García, T. (2013). TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (Bertholletia excelsa) in food products. Food control, 33(1), 105-113.

[77] Tyagi, S., & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nature biotechnology, 14(3), 303-308.

[78] VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Biotechniques, 44(5), 619-626.

[79] Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, 39(1), 75-85.

[80] Ng, C. T., Gilchrist, C. A., Lane, A., Roy, S., Haque, R., & Houpt, E. R. (2005). Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of Giardia lamblia on fecal samples. Journal of clinical microbiology, 43(3), 1256-1260.

[81] Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S. P., Brown, T., & Little, S. (1999). Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature biotechnology, 17(8), 804-807.

[82] Holland, M. J. (2002). Transcript abundance in yeast varies over six orders of magnitude. Journal of Biological Chemistry, 277(17), 14363-14366.

[83] Kumar, K., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (Setaria italica L.) subjected to abiotic stress conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 115, 13-22.

[84] Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., & Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. Nucleic acids research, 31(20), e122-e122.

[85] Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome research, 6(10), 986-994.

[86] Von Ahsen, N., Schutz, E., Armstrong, V. W., & Oellerich, M. (1999). Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. Clinical Chemistry, 45(5), 694-696.

[87] Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of molecular endocrinology, 25(2), 169-193.

[88] Russell, C. D., Millar, J. E., & Baillie, J. K. (2020). Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. The lancet, 395(10223), 473-475.

[89] Jin, X., Lian, J. S., Hu, J. H., Gao, J., Zheng, L., Zhang, Y. M., ... & Yang, Y. (2020). Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. Gut, 69(6), 1002-1009.

[90] Van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., ... & Munster, V. J. (2020). Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. New England journal of medicine, 382(16), 1564-1567.

[91] Sun, J., Xiao, J., Sun, R., Tang, X., Liang, C., Lin, H., ... & Ke, C. (2020). Prolonged persistence of SARS-CoV-2 RNA in body fluids. Emerging infectious diseases, 26(8), 1834.

[92] van Doorn, A. S., Meijer, B., Frampton, C. M., Barclay, M. L., & de Boer, N. K. (2020). Systematic review with meta-analysis: SARS-CoV-2 stool testing and the potential for faecal-oral transmission. Alimentary pharmacology & therapeutics, 52(8), 1276-1288.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Koparan, A., Karakuş E. (2021). Investigation of SARS-CoV-2 Release in Fecal Specimens of Discharged Covid-19 Patients. Dünya Pandemi Araştırmaları Kongresi, Ankara. 1 Mayıs 2021.

Makaleler

1. Koparan A., Dede S., Işıksaçan N., Yeşilbağ Z., ve Karakuş E. Investigation of SARS-CoV-2 Release in Faecal Specimens of Discharged COVID-19 Patients, Turkish Journal of Biochemistry, vol:48 (2023), iss:4.

Projeler

1. Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Emine KARAKUŞ, Proje Koordinatörü Kurum: Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje Kodu:2020-3972, Proje Adı: Taburcu Olan COVID-19 Hastalarının Fekal Örneklerinde Yeni Geliştirilen Gerçek Zamanlı Zıt Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Tanı Kiti İle SARS-CoV-2 Salınımının Araştırılması, Projedeki Unvan: Araştırmacı, Başlama Tarihi: 16.06.2020.