

Farklı Nükleik Asit Ekstraksiyon Yöntemlerinin SARS-CoV-2 Kantitatif Gerçek Zamanlı Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçlarına Etkisinin Karşılaştırmalı Analizi

Comparative Analysis of the Effect of Different Nucleic Acid Extraction Methods on SARS-CoV-2 Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Results

Taylan BOZOK¹(ID), Ali ÖZTÜRK²(ID)

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Türkiye.

² Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Niğde.

² Niğde Ömer Halisdemir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Niğde, Türkiye.

Makale Atfı: Bozok T, Öztürk A. Farklı nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin SARS-CoV-2 kantitatif gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına etkisinin karşılaştırmalı analizi. Mikrobiyol Bul 2023;57(4):597-607.

ÖZ

Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirus-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)], Koronavirüs hastalığı-2019 [Coronavirus disease-2019 (COVID-19)] hastalığının etkenidir. Virüsün hızlı ve doğru bir şekilde saptanması, bulaşı engellemek ve pandemi yönetimini etkili bir şekilde yapabilmek için hayati öneme sahiptir. Bu etkenin altın standart tanı yöntemi solunum yolu örneklerinden yapılan kantitatif gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qrRT-PCR)] testidir ve bu testin duyarlılığını etkileyen en önemli aşamalardan biri nükleik asit ekstraksiyon basamağıdır. Ancak reaktif temini ve saklama koşulları gibi kısıtlayıcı faktörler test kapasitesini sınırlamaktadır. Bu nedenle, testi hızlandırmak ve ön işlemleri en aza indirmek için yenilikçi ve maliyet etkin alternatiflere ihtiyaç vardır. Bu çalışmada SARS-CoV-2 qrRT-PCR testinde nükleik asit ekstraksiyon aşamasının verimliliğini artırmak için farklı yöntemlerin sonuçlara etkisinin ve uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Rutinde uygulanan viral nükleik asit ekstraksiyon tampon çözeltisine (vNAT) alternatif olarak; santrifüj işlemi eklenerek modifiye edilmiş vNAT yöntemi (MvNAT), R1-R2 kit ve ısı işlem (HT) yöntemi solunum yoluna ait 118 örneğe uygulanmıştır. Çalışmaya rutin sonuçlarda eşik döngü değeri (C_q) ≤ 35 (n = 10), >35 (n = 42), belirsiz (n = 56) olarak saptanan örnekler ve negatif kontroller (n = 10) dahil edilmiştir. Her bir yöntem için ekstraksiyon sonrası elde edilen RNA miktarları spektrofotometrik ölçüm cihazında ölçülerek kaydedilmiştir. Örneklerin tamamı RdRp bölgesini hedef alan SARS-CoV-2 qrRT-PCR kiti ile çalışılmıştır. Sonuçlar "unpaired" ve "paired" t-test kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiş, p değeri < 0.05 olan sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Negatif kontrol örnekleri hariç standart yöntem ile toplamda 108 örneğin %48.1 (Ortalama C_q değeri (C_q^{ort}) = 39.5 ± 6.9)'inde C_q değeri elde edilmişken bu çalışmada MvNAT yöntemi ile %11.1 (C_q^{ort} = 38.4 ± 5.2)'inde, R1-R2 kit ile %14.8 (C_q^{ort} = 35.9 ± 7.1)'inde ve HT yöntemi ile %25 (C_q^{ort} = 31.4 ± 6.3)'inde C_q elde edilmiştir. Tüm örneklerde

İletişim (Correspondence): Dr. Öğretim Üyesi Taylan Bozok, Mersin Üniversitesi Çiftlikköy Kampüsü, Mersin Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Yenişehir/Mersin.
Tel (Phone): 0324 241 0000, E-posta (E-mail): taylanbozok@hotmail.com

standart yöntemle göre hedef gen Cq değerlerindeki değişkenlik analiz edildiğinde, HT yöntemi ile anlamlı şekilde daha düşük Cq değerleri elde edildiği (n= 16; p= 0.007; paired t-test), MvNAT yöntemi ve R1-R2 kiti ile ise daha yüksek Cq değerleri saptandığı görülmüştür (n= 6; p= 0.025, n= 11; p= 0.004; paired t-test). Yöntemlerin duyarlılıkları; MvNAT: %31.6, R1-R2: %57.9, HT: %84.2, özgüllükleri ise her üç yöntem için de %100 olarak saptanmıştır. HT yöntemi hızlı ve kolay olması, reaktif bağımlı olmaması nedeniyle olumlu ekstraksiyon verimliliği göstermiştir. Bu yöntem ile, özellikle yüksek viral yüke sahip olan örneklerde standart yöntemle göre daha düşük Cq değerlerinin sağlandığı ancak Cq> 35 olan örneklerde yanlış negatif sonuç elde edilme potansiyeline de sahip olduğunun göz önünde bulundurulmasının gerektiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile SARS-CoV-2 qRT-PCR testinin ekstraksiyon aşamasının HT yöntemi gibi kit veya reaktif içermeyen farklı yöntemlerle de yapılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak testin standardizasyonunun yapılması ve yanlış negatiflik olasılıklarının değerlendirilmesi için daha fazla sayıda örneğin dahil edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2; COVID-19; qRT-PCR; RNA ekstraksiyonu; ısıtma işlemi.

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the causative agent of Coronavirus diseases-2019 (COVID-19) disease. Rapid and accurate detection of the virus is vital to prevent transmission and effectively manage the pandemic. The gold standard diagnostic method for this agent is the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) test conducted on respiratory tract samples and one of the most critical steps affecting the sensitivity of this test is the nucleic acid extraction stage. However, restrictive factors such as reagent supply and storage conditions limit the testing capacity. Therefore, innovative and cost-effective alternatives are needed to speed up testing and minimize pre-processing steps. The aim of this study was to evaluate the impact and applicability of different methods to enhance the efficiency of the nucleic acid extraction stage in the SARS-CoV-2 qRT-PCR test. As an alternative to the routinely used viral nucleic acid extraction buffer (vNAT), the modified vNAT method (MvNAT), which includes centrifugation, the R1-R2 kit and the heat treatment (HT) method, was applied to 118 respiratory tract samples. Samples determined with threshold cycle values of (Cq) of ≤ 35 (n= 10), > 35 (n= 42), indeterminate (n= 56) in routine results and negative controls (n= 10) were included in the study. The RNA quantities obtained after extraction for each method were measured and recorded using a spectrophotometric measurement device. All samples were processed using the SARS-CoV-2 qRT-PCR kit targeting the RdRp region. The results were statistically analyzed using unpaired and paired t-tests and results with a p-value of < 0.05 were considered statistically significant. Excluding negative control samples, while the standard method yielded a Cq value of 48.1% (mean Cq value (Cq^{mean})= 39.5 ± 6.9) for a total of 108 samples, the MvNAT method produced a Cq value of 11.1% (Cq^{mean} = 38.4 ± 5.2), the R1-R2 kit yielded 14.8% (Cq^{mean} = 35.9 ± 7.1) and HT method resulted in 25% (Cq^{mean} = 31.4 ± 6.3). When the variability in target gene Cq values was analyzed in all samples compared to the standard method, the HT method significantly provided lower Cq values (n= 16; p= 0.007; paired t-test) while the MvNAT method and R1-R2 kit yielded higher Cq values (n= 6; p= 0.025, n= 11; p= 0.004; paired t-test). Sensitivity rates were MvNAT= 31.6%, R1-R2= 57.9%, HT= 84.2%, with 100% specificity for all three methods. The HT method demonstrated a positive extraction efficiency because it is fast, easy and not dependent on reagents. Although this method provided lower Cq values than the standard method, especially in samples with a high viral load, it should be considered that it also has the potential to yield false-negative results in samples with Cq> 35. With this study, it was concluded that the extraction phase of the SARS-CoV-2 qRT-PCR test can be carried out using various methods that do not require kits or reagents, such as the HT method. However, it is believed that multicenter studies involving a larger number of samples are necessary to standardize the test and assess the possibility of false negatives.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; qRT-PCR; RNA extraction; heat treatment.

GİRİŞ

İlk olarak Çin'in Wuhan, Hubei kentinde 2019 yılı sonunda tanımlanan ve şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2

(SARS-CoV-2)'ye bağlı gelişen Koronavirüs hastalığı-2019 [Coronavirus disease-2019 (COVID-19)] kısa sürede pandemiye dönüşmüş ve bütün dünyayı ciddi şekilde etkilemiştir¹. Etkenin hızlı ve kolay tespiti, SARS-CoV-2 pandemisinde olduğu gibi etken ile mücadelede hastaları izole etmek ve bulaşı önleyebilmek için çok önemlidir^{2,3}. Hızlı ve güvenilir tanısal testlerin hızla geliştirilmesine yönelik çabalar olmasına rağmen, solunum örneklerinden kantitatif gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qrRT-PCR)] tabanlı testler, SARS-CoV-2'yi tespit etmek için halen altın standart olarak kabul edilmektedir^{4,5}. Bununla birlikte, nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılacak reaktiflerin temini ve saklama koşulları gibi test kapasitesini artırmada engel olarak karşımıza çıkan birçok etmen mevcuttur⁶. Bu nedenle ön işlemleri hızlandırmaya ve azaltmaya yönelik, maliyet etkin alternatif yöntemler geliştirmek, önümüzdeki süreçte de devam etmesi olası salgınlara karşı mücadelede kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada, hızlandırılmış ticari viral nükleik asit ekstraksiyon tampon çözeltileri ve konvansiyonel bir ekstraksiyon yöntemi olan ısıtma yöntemi kullanılarak SARS-CoV-2 qrRT-PCR test sonuçlarının nasıl etkilenebileceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 25.06.2020 ve Karar No: 2020/18).

Klinik Örneklerin Toplanması

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 7 Nisan-31 Mayıs 2020 tarihleri arasında gelen, viral transport besiyerine (VTM) alınmış oro-nazofarengeal sürüntü (ONS) ve alt solunum yolu (ASY) örnekleri arasından rutinde çalışılan SARS-CoV-2 qrRT-PCR sonucu eşik döngü değeri (Cq) ≤ 35 olan 10 örnek (grup I), > 35 olan 42 örnek (grup II) ve Cq oluşturmayan 56 belirsiz örnek (grup III) çalışmaya dahil edildi. Özgüllüğün değerlendirilmesi açısından klinik ve radyolojik olarak COVID-19 düşünülmeyen ve SARS-CoV-2 qrRT-PCR testi negatif olan 10 hastaya ait örnek de eklenerek toplamda 118 örnek çalışmaya dahil edildi.

Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Laboratuvarımızda rutinde uygulanan viral nükleik asit ekstraksiyon tampon çözeltisi (vNAT) (Bio-Speedy, Türkiye) yöntemi, standart yöntem olarak kabul edildi. Bu çalışmada, vNAT yöntemine alternatif olarak klinik örneklerden viral RNA elde edilmesi için üç farklı yöntem kullanıldı. İki yöntemde ticari viral nükleik asit izolasyon kiti [santrifüj işlemi eklenerek modifiye edilmiş vNAT yöntemi (MvNAT)] ve viral nükleik asit ekstraksiyon kiti (R1-R2) (Bio-Speedy, Türkiye) kullanılırken üçüncü yöntemde ısı işlem [heat treatment (HT)] yöntemi uygulandı. Rutinde çalışılmış örneklerin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan nükleik asit ekstraktları ve bu çalışmada uygulanan yöntemler ile ekstraksiyon sonrası elde edilen ekstraktlardaki RNA miktarları spektrofotometrik ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek kayıt altına alındı. Tüm ekstrakte edilmiş örnekler PCR işlemine kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi.

Ekstraksiyon Protokolleri

1. vNAT ve Modifiye vNAT

vNAT yöntemi laboratuvarımızda örneklerin ekstraksiyonunda rutin uygulamada kullanılmaktadır. Bu çalışmada vNAT yöntemi üretici firmanın talimatlarına ek olarak santrifüj işlemi eklenerek modifiye edildi (MvNAT). Rutinde kullanılan vNAT yöntemi için; VTM ile gelen ONS veya ASY örnekleri en yüksek hızda 15 saniye vortekslenildi, ardından vNAT tampon çözeltisinden 100 µl temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 1:1 oranda olacak şekilde VTM ile gelen örnekten 100 µl eklendi. Tüpler 15 saniye boyunca en yüksek hızda vortekslenerek beş dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. MvNAT yöntemi uygulanırken bunlara ek olarak inkübasyon sonrası örnekler üç dakika boyunca 10000 xg'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatanın 50 µl'si temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak qRT-PCR reaksiyonunda kullanımına kadar -20 °C'de saklandı.

2. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (R1-R2)

R1 tampon çözeltisinden 100 µl temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 100 µl ONS ya da ASY örneği eklendi, karışım en yüksek hızda 15 saniye vortekslenerek beş dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve üç dakika 10000 xg'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatanın 25 µl'si temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı, süpernatanın içeren tüpe 25 µl R2 tampon çözeltisi eklenerek pipetaj ile karıştırıldı, bu 50 µl'lik karışım qRT-PCR reaksiyonunda kullanımına kadar -20 °C'de saklandı.

3. Isıl İşlem Yöntemi

Klinik örneklerden 100 µl vida kapaklı mikrosantrifüj tüpüne aktararak 95 °C'de 10 dakika süre ile ısı bloğunda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örnekler qRT-PCR reaksiyonunda kullanımına kadar -20 °C'de saklandı.

Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Eldesi ve Amplifikasyonu

Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi amacıyla COVID-19 qRT-PCR tespit kiti-versiyon 2 (Bio-Speedy, Türkiye) kullanıldı. qRT-PCR, "CFX96 touch real-time PCR (Bio-Rad)" cihazı kullanılarak 20 µl nihai hacimde gerçekleştirildi. Her bir örnek için numaralandırılmış 0.2 ml'lik PCR tüplerine 15 µl PCR reaksiyon karışımı dağıtıldı. Ekstrakte örneklerden 5 µl eklendikten sonra spin santrifüj yapılarak real-time PCR cihazına yerleştirildi. Çalışmada hedef gen (RdRp) bölgesinin amplifikasyon karışımının hazırlanması; 10 µl PrimeScript karışımı (DNA polimeraz, dNTP karışımı, reaksiyon tampon çözeltisi, revers transkripsiyon ve ribonükleaz inhibitör), 5 µl Oligo karışımı SARS-CoV-2 tespiti (RdRp geni-FAM), internal kontrol (RNase P geni-HEX), 5 µl RNA ekstrakte örnek şeklinde gerçekleştirildi. Çalışmada RdRp gen bölgesinin amplifikasyonu; 45 °C'de 15 dk (cDNA oluşumu), 95 °C'de üç dk ön denatürasyon ve 50 döngü 95 °C beş sn denatürasyon, 55 °C 35 sn primer birleşmesi, FAM-HEX okuma şeklinde gerçekleştirildi. Her PCR çalışmasında üretici firma tarafından temin edilen ikişer adet negatif ve pozitif kontrol kullanıldı.

Kantitatif Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda FAM/HEX kanalları için 'threshold' seviyesi 200 RFU (relative fluorescence units) olarak ayarlandı. FAM/HEX kanallarından elde edilen amplifikasyon eğrilerinin şekli ve cihaz tarafından belirlenen Cq değerleri negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılarak incelendi. Sigmoidal eğri gözlemlenmeyen örneğin sonucu negatif olarak kabul edildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS 20.0 paket programı (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı ve yapılan analizlerde unpaired ve paired t-test kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

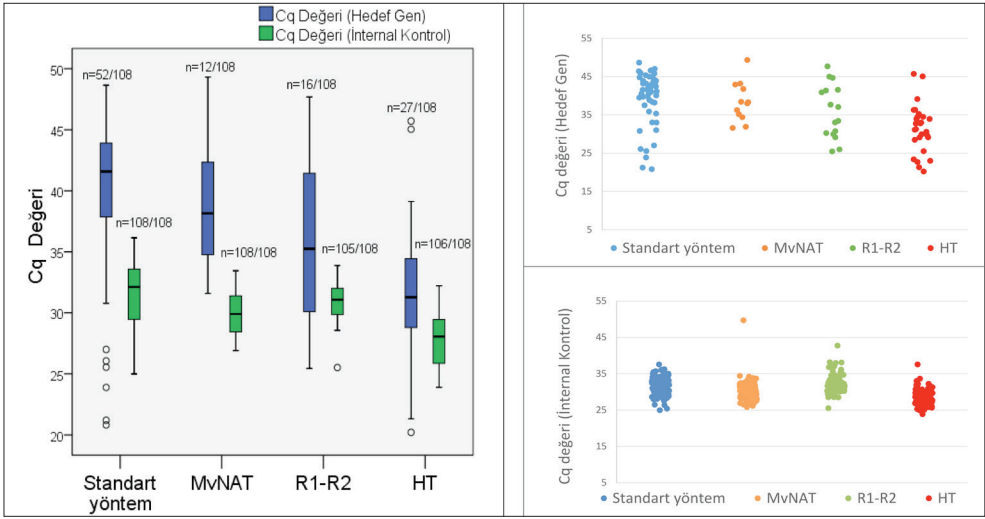
BULGULAR

Hedef gen analiz sonuçları incelendiğinde toplamda 108 örneğin (grup I + II + III) standart yöntem ile %48.1 [ortalama Cq değeri (Cq^{ort})= 39.5 ± 6.9]’inde Cq değeri elde edilmiş iken bu çalışmada MvNAT yöntemi ile %11.1 (Cq^{ort} = 38.4 ± 5.2)’inde, R1-R2 kit ile %14.8 (Cq^{ort} = 35.9 ± 7.1)’inde ve HT ile %25 (Cq^{ort} = 31.4 ± 6.3)’inde Cq değeri elde edilmiştir. Grup I örneklerinde MvNAT ile sadece %50’inde, R1-R2 ile %90’ında ve HT ile %100’ünde Cq değeri elde edilmiştir. HT yöntemi uygulanan örneklerin ortalama Cq değerinin standart yöneme kıyasla anlamlı şekilde daha düşük olduğu analiz edilmiştir (272-25.5; $p = 0.016$; paired t-test). Aynı zamanda uygulanan diğer iki yöneme göre HT yöntemiyle anlamlı şekilde daha düşük Cq değerleri elde edilmiştir (MvNAT; $p = 0.001$, R1-R2; $p = 0.02$; unpaired t-test). Grup II örneklerde ($n = 42$) HT yöntemiyle altı örnekte Cq değeri elde edilirken, R1-R2 ile iki, MvNAT ile yalnız bir örnekte Cq değeri saptanmıştır. Bu grupta HT yöntemiyle elde edilen Cq^{ort} standart yöneme göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.0005$; unpaired t-test). Grup III ($n = 56$)’te ise belirsiz sonuç elde edilen örneklerin HT ile %19.6 (11/56)’sında Cq saptanmıştır. Yine bu örneklerde MvNAT ve R1-R2 yöntemleriyle sırasıyla %10.7 (6/56)’sında ve %8.9 (5/56)’unda Cq değeri elde edilmiştir. Tüm gruplar için standart yöneme kıyasla hedef gen Cq değerlerinde değişkenliğe bakıldığında HT yöntemiyle anlamlı şekilde daha düşük Cq değerleri elde edilirken ($n = 16$; $p = 0.007$; paired t-test), MvNAT yöntemi ve R1-R2 kitiyle anlamlı şekilde daha yüksek Cq değerleri saptanmıştır ($n = 6$; $p = 0.025$, $n = 11$; $p = 0.004$; paired t-test). Standart yöntem ile pozitif değerlendirme sınırı olarak $Cq < 40$ değeri kabul edildiğinde, yöntemlerin duyarlılıkları MvNAT, %31.6; R1-R2, %57.9; HT, %84.2 olarak, özgülükler ise her üç yöntem için de %100 olarak bulunmuştur⁷. Internal kontrol (IC) Cq değerleri standart yöntem ile karşılaştırıldığında HT ve MvNAT yöntemi ile anlamlı şekilde daha düşük Cq bulunurken ($p < 0.0005$; paired t-test), R1-R2 kiti ile yapılan ekstraksiyon sonucunda IC Cq değerleri daha yüksek saptanmıştır ($p = 0.001$; paired t-test). MvNAT yöntemi ve R1-R2 kit ile yapılan ekstraksiyonlarda elde edilen RNA miktarları standart yöneme göre daha düşük tespit edilirken, HT yöntemi ile elde edilen RNA miktarları Cq değerleri ile uyumlu olarak diğer yöntemlere göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.0005$; paired t-test). Ekstraksiyon yöntemlerine göre örnek grupları

nın ortalama Cq ve nükleik asit değerlerine ait ayrıntılı bilgi Tablo I ve Şekil 1’de verilmiştir. Şekil 2’de ise, üç farklı yöntemle klinik örneklerden elde edilen ekstraktlar ile çalışılan SARS-CoV-2 qRT-PCR grafiği sunulmuştur.

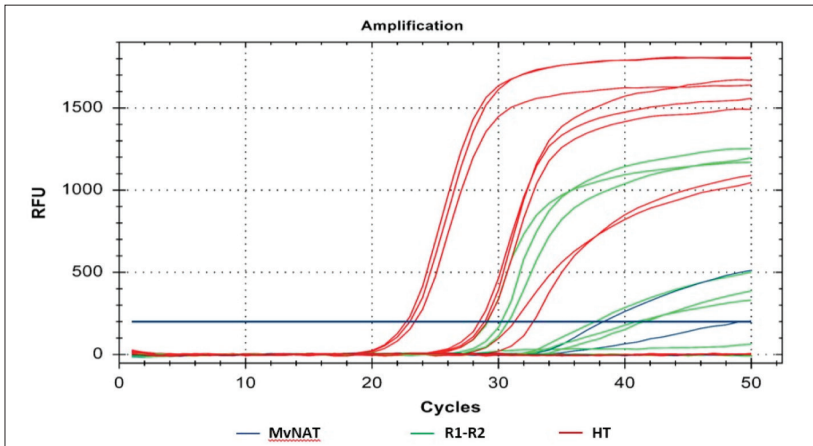
Tablo I. Ekstraksiyon Yöntemlerine Göre Örnek Gruplarının Ortalama Cq ve Nükleik Asit Değerleri					
Ekstraksiyon Yöntemi	Cq Değeri ³⁵ (Grup I; n= 10)	Cq Değeri ^{> 35} (Grup II; n= 42)	Belirsiz (Grup III; n= 56)	Toplam (n= 108)	p*
Standart yöntem	27.2 (± 4.6) (10/10)	42.4 (± 3.0) (42/42)		39.5 (± 6.9) (52/108)	
MvNAT	37.3 (± 7.3) (5/10)	34.4 (1/42)	40.1 (± 2.9) (6/56)	38.4 (± 5.2) (12/108)	0.168 ^a
R1-R2 kit	31.6 (± 5.2) (9/10)	37.0 (± 5.6) (2/42)	43.2 (± 4.1) (5/56)	35.9 (± 7.1) (16/108)	0.002 ^a
HT	25.5 (± 3.9) (10/10)	33.7 (± 5.8) (6/42)	35.6 (± 4.0) (11/56)	31.4 (± 6.3) (27/108)	< 0.0005 ^a
Standart yöntem	28.7 (± 2.3) (10/10)	32.4 (± 2.1) (42/42)	31.3 (± 2.5) (56/56)	31.5 (± 2.5) (108/108)	
MvNAT	29.9 (± 1.5) (10/10)	30.5 (± 2.0) (42/42)	30.4 (± 3.2) (56/56)	30.4 (± 2.7) (108/108)	< 0.0005 ^b
R1-R2 kit	30.8 (± 2.1) (10/10)	32.5 (± 2.2) (41/42)	32.1 (± 2.7) (54/56)	32.1 (± 2.5) (105/108)	0.001 ^b
HT	27.6 (± 1.9) (10/10)	29.2 (± 1.8) (42/42)	28.5 (± 2.4) (54/56)	28.7 (± 2.2) (106/108)	< 0.0005 ^b
Standart yöntem	658.2 (± 59.3)	569.4 (± 65.8)	588.6 (± 78.4)	587.6 (± 71.7)	
MvNAT	603.4 (± 76.1)	551.3 (± 68.1)	546.5 (± 62.3)	553.6 (± 65.8)	< 0.0005 ^b
R1-R2 kit	256.5 (± 36.7)	238.8 (± 25.2)	227.6 (± 15.9)	234.6 (± 21.4)	< 0.0005 ^b
HT	876.9 (± 114.5)	782.0 (± 86.3)	734.5 (± 88.6)	766.2 (± 90.1)	< 0.0005 ^b

SD: Standart sapma, Cq: Döngü eşiği, MvNAT: Modifiye vNAT, HT: ısı işlem.
 *İstatistiksel analizler standart yöntem ile karşılaştırma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Standart yöntem için Grup III’ün hedef gen (FAM) Cq değerleri olmadığı için bu satırdaki analizlere Grup III dahil edilmemiştir.
^aUnpaired t-test ile analiz edilmiştir.
^bPaired t-test ile analiz edilmiştir.



Şekil 1. Ekstraksiyon yöntemlerine göre örneklerin Cq (hedef gen/FAM-internal kontrol/HEX) değerlerinin dağılım grafiği.

Cq: Döngü eşiği, MvNAT: Modifiye vNAT, HT: Isıl işlem.



Şekil 2. Her üç yöntemle de elde edilen ekstraktlar ile çalışılmış bir grup örneğin SARS-CoV-2 qRT-PCR amplifikasyon eğrileri.

RFU: Relative fluorescence units, MvNAT: Modifiye vNAT, HT: Isıl işlem.

TARTIŞMA

COVID-19 pandemisinin etkileri devam ederken, olası varyantlara bağlı ya da yeni etkenlerle oluşabilecek salgın tehditlerine karşı mücadelede tanı basamağının çok önemli bir yer oluşturduğu görülmektedir. Günümüzde, COVID-19 tanısı için duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek yöntem qRT-PCR tekniği olarak kabul edilmektedir^{8,9}. Ancak bu tekniğin duyarlılığını etkileyecek pre-analitik ve analitik evreler bulunmaktadır. RNA eks-

traksiyon aşaması yöntemin en önemli basamaklarından biridir. Dolayısıyla ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için uygun yöntem seçimi yapılmalıdır. Piyasada valide edilmiş birçok manuel nükleik asit ekstraksiyon kiti mevcut olmakla birlikte rutinde kullanımı daha uygun ve standardizasyonu daha iyi olan otomatik nükleik asit ekstraksiyon sistemleri de vardır. Ancak pandemi döneminde tecrübe ettiğimiz bir durum olarak; öngörülemeden sarf ihtiyacı ve sonucunda oluşan arz problemi, laboratuvarların elindeki sistemleri kullanamaz hale getirmiştir. Aynı zamanda maliyet ve süre etkinliği yönünden bu yöntemlerin kullanımı büyük problemlere yol açabilmektedir.

Bu çalışmada daha önce de birçok çalışmada kullanılmış ısı işlem ile pandemi döneminde geliştirilen hızlı ekstraksiyon kit ve tampon çözeltilerinin qRT-PCR sonuçları üzerindeki etkinliği karşılaştırılmıştır¹⁰⁻¹². Elde edilen sonuçlara göre HT yönteminin kolay ve hızlı oluşu, reaktif gerektirmemesi ve ucuz altyapısı SARS-CoV-2 virüsü için ekstraksiyon verimliliği açısından olumlu sonuçlar doğurmuştur. Rutinde kullanılan vNAT yöntemi ile kıyasladığımızda standart yöntemle $Cq \leq 35$ saptanan örneklerin tamamında HT yöntemiyle de Cq değeri elde edilmiştir. Aynı zamanda bu Cq değerleri standart yöntemle kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu grup örnekler için HT yönteminin duyarlılığının %100 olduğunu söyleyebiliriz. Ancak HT yöntemi ile standart yöntemle $Cq > 35$ elde edilen örneklerin ($n=42$) sadece altısında Cq değerinin saptanması yalancı negatiflik durumunu akla getirmektedir. Bu da yöntemin duyarlılığının sorgulanmasına neden olmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken bir durum da $Cq > 40$ saptanan örneklerin yanlış pozitiflik olabileceği gerçeğidir^{7,13}. Bu örneklerin daha konsantre nükleik asit elde edilmesini sağlayan valide yöntemler ile tekrarlanması doğruluk payını arttırabilir.

Rutinde kullanılan vNAT tampon çözeltisi ön işlem gerektirmeden yalnız vorteksleme ile örnekleri PCR işlemine hazır hale getirmektedir. Bunun yanı sıra standart yöntemin Cq^{ort} değeri ısı işleme kıyasla daha yüksek olsa da duyarlılığının daha iyi olması ile diğer yöntemlere nazaran üstün durmaktadır. Isıl işlemde, örnekte bulunabilecek PCR inhibisyonuna neden olan maddeleri etkisiz hale getirecek ortamın olmaması duyarlılığını düşürecek önemli faktörlerden biridir^{14,15}. Nitekim bu çalışmada HT yöntemiyle ekstrakte edilmiş iki örneğin PCR testinde IC'leri negatif olarak bulunmuştur. Aynı zamanda vNAT tampon çözeltisi içerisine alınan örnekte bulunan patojenler tampon çözeltinin bir özelliği olarak kısa bir sürede inaktive hale getirilmektedir. Bu özellik laboratuvar çalışanlarının biyogüvenliği açısından olumlu bir durum oluşturmaktadır.

Chu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada¹¹, çalışmamıza benzer bir yöntem denenmiş olup farklı olarak proteinaz K ilaveli ısı işlem yöntemi de kullanılmış ve daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmiştir. Smyrlaki ve arkadaşları tarafından ekstraksiyonsuz olarak anılan ısı ile inaktivasyon işleminden sonra direkt örnekten PCR işlemi gerçekleştirilen çalışmada¹⁶, hem farklı transport ortamları ve lizis solüsyonlarının hem de farklı sıcaklıklarda inaktivasyonların SARS-CoV-2 RT-PCR sonuçlarına etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PCR öncesi ısı ile inaktivasyonun optimal 95-98 °C'de ve 5-15 dk süre ile yapılmasının sonuçlara olumlu katkı sağlayacağı belirtilmiştir. Guan ve arkadaşları¹⁷, Che-

lex reçinesi kullanarak basitleştirilmiş ve yeni bir hazırlama yöntemi kullanarak ısı işlem ile RNA ekstraksiyonunu değerlendirmişler ve yalnızca ısı uygulamasına kıyasla hassasiyetin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Böylece genel teşhis için iş akışını kısalttığını ve ayrıca ilk olarak numune ısıtma adımının eklenmesinin SARS-CoV-2'nin bulaşıcılığını yok ederek iş güvenliğini arttırdığını belirtmişlerdir. HT yönteminin ek maliyet ve işlem gerektirmeden kullanımını sağlayacak kombinasyonlar geliştirilerek duyarlılığı ve özgül-lüğü daha da artırılabilir. Bunu VTM'de yapılacak modifikasyonlar ile de gerçekleştirmek mümkün olabilir. Ayrıca SARS-CoV-2 PCR'nin direkt klinik örnekten çalışılmasına elverişli hale getirebilecek yöntemler geliştirilebilir¹⁸. Ancak bu durumun avantaj ve dezavantajlarının daha iyi ortaya konulabilmesi için çok sayıda klinik örneğin dahil edildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

R1-R2 kitinin ön işlemler açısından daha uzun sürmesi, zahmetli olması ve elde edilen sonuçlar açısından değerlendirildiğinde verimliliğinin diğer yöntemlere göre düşük saptanması; bu kitin pandemi döneminde rutin kullanımını olumsuz etkilemiştir. Yine standart yöntem ile elde edilen sonuçların iyileştirilmesi amacıyla yöntem eklenen sant-rifüj basamağı ile oluşturulan MvNAT yöntemi hedef bölge amplifikasyonu sonuçlarının iyileştirilmesini sağlamamıştır. Ancak IC sonuçlarının toplamdaki Cq^{ort} değerinin standart yöntemle kıyasla anlamlı bir şekilde düşük olması dikkat çekicidir (Tablo I). Buradaki çelişkili durumun; standart yöntemle çalışıldıktan sonra diğer yöntemlerde kullanılan dek beketme ve saklama koşullarında düşük viral yüke sahip örneklerdeki muhtemel nükleik asit kayıplarından kaynaklandığı düşünülebilir¹⁴.

IC sonuçlarının ve elde edilen nükleik asit miktarlarının HT yöntemi uygulanan klinik örneklerde daha iyi olması, bu yöntemin nükleik asit eldesinde diğer yöntemlere göre oldukça iyi olduğunu göstermektedir. Ancak inhibitör madde içerebilmesi ve kullanılan VTM'nin standardizasyonu gibi sorunlar nedeniyle SARS-CoV-2 qRT-PCR işlemine uygunluğu açısından değerlendirmek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Bir başka önemli noktayı qRT-PCR için seçilen hedef gen ve IC gen bölgesinin özellikleri oluşturmaktadır. Isıtma işlemi sırasında oluşabilecek RNA parçalanmalarına karşı HT metodunda stabilitesi yüksek bölgelerin seçimi önem arz etmektedir¹⁶.

Pandeminin getirdiği iş yoğunluğu, personel yetersizliği, altyapı ve malzeme eksikliklerinden dolayı bu çalışmaya klasik ekstraksiyon yöntemlerinin dahil edilememiş olması karşılaştırmalı değerlendirmeler açısından bir kısıtlılık oluşturmuştur.

COVID-19 salgınında olduğu gibi dünyayı çok hızlı bir şekilde etkisi altına alan pandemilerde hızlı ve güvenilir tanı testlerinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha görülmüştür. Dünyanın herhangi bir yerinde oluşabilecek bir salgına hızlı bir şekilde adapte olabilecek sistemler kurmak oldukça zor olabilmektedir. Bunun yerine güvenilirliği kanıtlanmış hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirmek daha uygun olacaktır. Bu çalışmada COVID-19 tanısında kullanılan solunum yolu örneklerinde çalışılan SARS-CoV-2 qRT-PCR testinin ön aşaması olan ekstraksiyon aşamasının ısı işlem gibi kit veya reaktif içermeyen

farklı yöntemlerle de yapılabileceği sonucuna varılmıştır. Ancak standardizasyon ve yanlış negatiflikler açısından daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Rektörlüğü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Sayı: 2020/18, Tarih: 25.06.2020).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al; China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382(8): 727-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
2. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA* 2020; 323(11): 1061-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
3. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol* 2020; 58(6): e00512-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
4. Zhang Z, Bi Q, Fang S, Wei L, Wang X, He J, et al. Insight into the practical performance of RT-PCR testing for SARS-CoV-2 using serological data: A cohort study. *Lancet Microbe* 2021; 2(2): e79-e87. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30200-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30200-7)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim guidance for antigen testing for SARS-CoV-2. Accessed from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>
6. Babiker A, Myers CW, Hill CE, Guarner J. SARS-CoV-2 testing: Trials and tribulations. *Am J Clin Pathol* 2020; 153 (6): 706-8. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa052>
7. Wozniak A, Cerda A, Ibarra-Henriquez C, Sebastian V, Armijo G, Lamig L, et al. A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Sci Rep* 2020; 10(1): 16608. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73616-w>
8. Wang C, Liu Z, Chen Z, Huang X, Xu M, He T, et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *J Med Virol* 2020; 92(6): 667-74. <https://doi.org/10.1002/jmv.25762>
9. Mercer TR, Salit M. Testing at scale during the COVID-19 pandemic. *Nat Rev Genet* 2021; 22(7): 415-26. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00360-w>
10. Rames E, Roiko A, Stratton H, Macdonald J. DNA heat treatment for improving qPCR analysis of human adenovirus in wastewater. *Food Environ Virol* 2017; 9(3): 354-7. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9294-4>
11. Chu AWH, Chan WM, Ip JD, Yip CCY, Chan JFW, Yuen KY, et al. Evaluation of simple nucleic acid extraction methods for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and saliva specimens during global shortage of extraction kits. *J Clin Virol* 2020; 129: 104519. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104519>
12. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2-escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. *Euro Surveill* 2020; 25(14): 2000398. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398>
13. Kriegova E, Fillerova R, Raska M, Manakova J, Dihel M, Janca O, et al. Excellent option for mass testing during the SARS-CoV-2 pandemic: Painless self-collection and direct RT-qPCR. *Virol J* 2021; 18(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01567-3>
14. Lübke N, Senff T, Scherger S, Hauka S, André M, Adams O, et al. Extraction-free SARS-CoV-2 detection by rapid RT-qPCR universal for all primary respiratory materials. *J Clin Virol* 2020; 130: 104579. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104579>

15. Hasan MR, Mirza F, Al-Hail H, Sundararaju S, Xaba T, Iqbal M, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA by direct RT-qPCR on nasopharyngeal specimens without extraction of viral RNA. *PLoS One* 2020; 15(7): e0236564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236564>
16. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, de Sousa NR, Papanicolaou N, Vondracek M, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. *Nat Commun* 2020; 11(1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18611-5>
17. Guan B, Frank KM, Maldonado JO, Beach M, Pelayo E, Warner BM, et al. Sensitive extraction-free SARS-CoV-2 RNA virus detection using a novel RNA preparation method. *medRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.01.29.21250790>
18. Wei S, Kohl E, Djandji A, Morgan S, Whittier S, Mansukhani M, et al. Direct diagnostic testing of SARS-CoV-2 without the need for prior RNA extraction. *Sci Rep* 2021; 11(1): 2402. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81487-y>