

# SARS-CoV-2 PCR Pozitif Olgularda Viral Subgenomik RNA'ların ve Antijen Varlığının Değerlendirilmesi

## Evaluation of Viral Subgenomic RNAs and Antigen Presence in SARS-CoV-2 PCR Positive Cases

Kazım Batıhan BÜYÜKZENGİN<sup>1</sup> (ID), Alper AKÇALI<sup>2</sup> (ID), Sevil ALKAN<sup>3</sup> (ID), Gökhan AKDUR<sup>4</sup> (ID)

<sup>1</sup> Osmaniye Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Osmaniye.

<sup>1</sup> Osmaniye State Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Osmaniye, Türkiye.

<sup>2</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale.

<sup>2</sup> Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Çanakkale, Türkiye.

<sup>3</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale.

<sup>3</sup> Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Çanakkale, Türkiye.

<sup>4</sup> Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Çanakkale.

<sup>4</sup> Çanakkale Onsekiz Mart University Faculty of Medicine, Department of Emergency Medicine, Çanakkale, Türkiye.

\*Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2021-3637 proje kodu ile desteklenmiş olup Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlanmıştır.

**Makale Atfı:** Büyükgengin KB, Akçali A, Alkan S, Akdur G. SARS-CoV-2 PCR pozitif olgularda viral subgenomik RNA'ların ve antijen varlığının değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2024;58(3):309-320.

### ÖZ

Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)]'nin tanısında sıklıkla polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ve antijen testi (AgT) kullanılmaktadır. Virüs genomunu saptayan rutin PCR testleri virüsün bulaşıcı olup olmadığını belirleyemez. Ancak replikasyon döneminde üretilen subgenomik RNA (sgRNA) tespiti, aktif viral enfeksiyonu gösterebilir. Aktif virüs tespiti izolasyon süresinden tedaviye çeşitli sağlık ve ekonomik kazanımlar sunabilir. Antijen testleri de belli bir yük miktarından itibaren virüs saptayabildiğinden bulaşıcılık göstergesi olarak düşünülmektedir. Bu çalışmada, genomik RNA yerine iki farklı subgenomik RNA ve AgT kullanılarak bulaşıcılık açısından birbirleriyle ve klinik ile ilişkisini irdelemek amaçlanmıştır. Bulaşıcılık göstergesi olarak antijen testinin de subgenomik RNA ile birlikte değerlendirilmesi, bu testin önemini gösterebilecektir. SARS-CoV-2 PCR pozitif -80 °C'de saklanmış 109 nazo/orofarengeal sürüntü numunesi çalışmaya alınmıştır. Bu örnekler PCR pozitifliğini doğrulama amacıyla E gen PCR gerçekleştirilerek AgT, E ve N sgRNA [kantitatif gerçek zamanlı revers transkriptaz (RT-qPCR)] tespiti yapılmıştır. SARS-CoV-2 PCR pozitif 109 numunenin 83 (%76.14)'ünde antijen testi, 88 (%80.73)'ünde E gen sgRNA, 96 (%88.07)'sında N gen sgRNA, 97 (%89)'sinde en az bir sgRNA pozitifliği saptanmıştır. En az bir sgRNA tespit edilen örneklerin %77.3'ünde, negatif olanların %66.7'sinde AgT pozitif bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0.475$ ). E sgRNA ile AgT pozitifliği arasındaki fark anlamlı saptanmıştır ( $p=0.023$ ). E sgRNA pozitif örneklerin %98.9'unda, negatif örneklerin ise %42.9'unda N sgRNA pozitif bulunmuş olup bu fark istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur ( $p= 0.0001$ ). Döngü eşik değeri [cycle threshold (Ct)]  $\leq 25$  için AgT pozitifliği oranı %98.15 (53/54), Ct 25-30 için %57.14 (12/21), Ct  $\geq 30$  için %52.94 (18/34) bulunmuştur. E gRNA Ct değerinin  $\leq 25$  ve  $> 25$ ,  $\leq 29$  ve  $> 29$ ,  $< 30$  ve  $\geq 30$  olması durumunda antijen testi pozitifliğindeki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p= 0.0001$ ). Antijen testi pozitifliği, beklendiği gibi viral yük ve bulaşıcılık ile ilişkili görünmektedir. Bu çalışmada semptom süresinden en az 10 gün sonrasında da bulaşıcılık göstergesi sgRNA'ların ve AgT'nin saptanabildiği gösterilmiştir. Bu iki testin birlikte kullanılması, enfekte bireyleri daha yüksek bir doğrulukla saptayarak hastanede kalış ve izolasyon süresini kısaltabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2; COVID-19; PCR; subgenomik RNA; antijen testi.

## ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) and antigen test (AgT) are frequently used in the diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Routine PCR tests that detect the virus genome cannot determine whether the virus is infectious or not. However, detection of subgenomic RNA (sgRNA) produced during the replication period may indicate active viral infection. Active virus detection can offer various health and economic benefits from isolation time to treatment. Antigen tests are also considered as indicators of infectiousness since they can detect viruses above a certain load amount. The aim of this study was to use two different subgenomic RNAs and antigen test instead of genomic RNA to examine the relationship with each other and the clinic in terms of infectiousness. Evaluating the antigen test together with subgenomic RNA as an indicator of infectiousness may show the importance of this test. SARS-CoV-2 PCR positive 109 naso/oropharyngeal swab samples stored at  $-80$  °C were included in the study. In order to confirm the PCR positivity of these samples, E gene PCR was performed and AgT, and E and N sgRNA quantitative real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) detection was performed. Of the 109 SARS-CoV-2 PCR positive samples, 83 (76.14%) had antigen test positivity, 88 (80.73%) had E gene sgRNA, 96 (88.07%) had N gene sgRNA and 97 (89%) had at least one sgRNA positivity. The antigen test was found positive in 77.3% of the samples in which at least one sgRNA was detected and in 66.7% of the negative samples and this difference was not statistically significant ( $p= 0.475$ ). The difference between E sgRNA and AgT positivity was significant ( $p= 0.023$ ). N sgRNA was positive in 98.9% of E sgRNA positive samples and 42.9% of the negative samples and this difference was statistically significant ( $p= 0.0001$ ). The AgT positivity rate was found to be 98.15% (53/54) for cycle threshold (Ct) value  $\leq 25$ , 57.14% (12/21) for Ct 25-30, and 52.94% (18/34) for Ct  $\geq 30$ . The difference in antigen test positivity between E gRNA Ct value  $\leq 25$  and  $> 25$ ,  $\leq 29$  and  $> 29$ ,  $< 30$  and  $\geq 30$  was statistically significant ( $p= 0.0001$ ). Antigen test positivity appears to be associated with viral load and infectivity, as expected. In our study, it has been shown that sgRNAs and AgT which are indicators of infectiousness can be detected at least 10 days after the symptom period. Using these two tests together could detect infective individuals with higher accuracy and shorten the duration of hospital stay and isolation.

**Keywords:** SARS-CoV-2; COVID-19; PCR; subgenomic RNA; antigen test.

## GİRİŞ

Koronavirüsler insanlarda ve hayvanlarda soğuk algınlığından ağır solunum yetmezliği, şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV-2)], Orta Doğu solunum sendromu [Middle East respiratory syndrome (MERS)] gibi ciddi hastalıklara yol açabilen bir virüs ailesidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 31 Aralık 2019'da Çin'de sebebi bilinmeyen pnömoni vakaları bildirmiş, 7 Ocak 2020'de ise bunun yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) olduğu belirlenerek hastalığın adı COVID-19 olarak kabul edilmiştir<sup>1</sup>. Mevcut PCR yöntemleri sadece virüsün RNA'sının varlığını saptamakta olup virüs genomik RNA (gRNA)'sı bulaştırıcılık açısından fikir vermemektedir. Virüs replikasyonu sırasında sentezlenen subgenomik RNA (sgRNA) tespitinin,

virüsün enfeksiyon yapabilme kapasitesiyle bulunduğu dokudaki replikatif durumu ve bulaşıcılığı hakkında bilgi verebileceği düşünülmektedir<sup>2,3</sup>. Viral replikasyonu ve bulaşıcılığı belirlemede altın standart hücre kültürü gibi görülse de bunu rutinde çalışmak pratik ve uygulanabilir değildir<sup>2</sup>. Her koronaviral RNA, genomun akış aşağı kısmından gövde dizisine kaynaşmış yaklaşık 70 nükleotitik ortak 5' leader diziyi içerir. Viral sgRNA'lar, çeşitli yapısal ve fonksiyonel proteinlerin sentezinden sorumlu genom altı parçacıklardır ve virüs genomundan sürekli olmayan (aralıklı) transkripsiyon yoluyla sentezlenirler. Bu sayede grNA'daki leader diziyeye eklenerek ondan daha kısa, leader dizi ile yakınlaşmış, fonksiyonel sgRNA'lar elde edilmiş olur<sup>3</sup>. Leader dizi ile sentezlenecek olan virüs proteinini kodlayan RNA parçasının füzyonu ile sgRNA oluşturulması, sgRNA tespitiyle ilgili testlerin özgülüğünü sağlar. Primer pozisyonlarının seçiminde forward diziler sgRNA tespiti sürecinde leader dizi üzerinde özel olarak tasarlanırken, revers primerler ve prob lar genin kodlama bölgesinde tasarlanmaktadır. Genomik RNA'da leader diziden sonra E ve N gen bölgeleri dizisi arasındaki mesafe çok uzun olduğundan seçilen primerlerle qPCR testinde bu bölgenin çoğaltılması ve tespit edilmesi mümkün değildir. Ancak sgRNA, transkripsiyon düzenleyici dizi [transcription-regulatory sequence (TRS)] aracılı kalıp dönüşümü tarafından oluşturulan iç içe geçmiş yapıları nedeniyle çoğaltılabilir. Böylece özel primerler/prob setleri kullanılarak amplifikasyon sırasında yalnızca sgRNA tespitiyle aktif çoğalan virüslerin varlığı tespit edilebilir. Bu primer prob setleriyle grNA'nın varlığına rağmen E ve N bölgelerinin çoğaltılıp saptanmaları qPCR ile mümkün değildir<sup>4</sup>. Replikasyon ile çoğaltılan SARS-CoV-2 grNA'ları buldukları hücrede paketlenerek diğer hücreleri enfekte etmek üzere hücre dışına çıkarken, sadece viral replikasyon sürecinde ortaya çıkan ve üretildiği hücrede kalıp diğer hücrelere aktarılmayan viral sgRNA bu sebepten ötürü aktif replike olmakta olan virüsün konakta mevcut olduğunun belirtici olarak kullanılabilir.

Subgenomik RNA tespitine dayalı bir PCR yöntemi kullanarak hem çeşitli sgRNA'ların tespitini kıyaslamak hem de bu sgRNA'ların pozitifliklerinde hastaların klinik durumlarını değerlendirmek mümkün olabilir. Subgenomik RNA tespitiyle karantina süresinden tedavi sürecine, hastanın olası klinik gidişine varan öngörüler vermek mümkün olabilir. Örneğin insan papilloma virüsü [human papilloma virus (HPV)] kaynaklı serviks prekanseröz lezyonları saptamada malign transformasyonla ilişkili onkoprotein olan E6 ve E7 mRNA'nın tespiti, rahim ağzı kanserinde yüksek riskli lezyonların histolojik sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur<sup>5</sup>. Kullandığımız sgRNA tespiti viral bulaşıcılığı ve aktif enfeksiyonu göstermede farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Antijen testi de viral bulaşıcılığı gösterebileceği için bunun iki farklı sgRNA ile birlikte değerlendirilmesi, antijen testinin önemi hakkında fikir verebilecektir. Bu çalışmada, PCR yöntemiyle grNA yerine iki farklı viral sgRNA ile tespit ederek hem bunları birbiriyle hem de antijen testiyle kıyaslamak ve bu tespitin klinik önemini irdelemek amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (ÇOMÜ) Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2020-04 karar numarasıyla 31.03.2021 tarihinde etik kurul onayı alınarak ve

ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2021-3637 proje koduyla desteklenerek gerçekleştirildi. Çalışmaya klinik tanı amacıyla vNAT® viral nükleik asit tamponu (Bioeksen, İstanbul, Türkiye) ile laboratuvara gönderilmiş ve SARS-CoV-2 gRNA pozitif saptanıp laboratuvarında -80 °C'de saklanmış 99 hastaya ait toplam 109 nazo/orofarengeal örnek dahil edildi. Çalışmaya alınan tüm örnekler için hastalardan yazılı aydınlatılmış onam alındı.

### Hasta Seçimi ve Araştırmanın Planlanması

SARS-CoV-2 PCR testi pozitif, 18 yaşından büyük, gerekli klinik bilgileri hastane sisteminde mevcut örnekler çalışmaya alındı. On sekiz yaşın altındaki hastalar, çalışma öncesi tekrar yapılan gRNA qPCR'da negatif sonucu olan, rutinde çalışılan ilk Ct değeri 35 ve üzeri olan qPCR pozitif, klinik verileri yetersiz olan ve onam vermeyen hasta örnekleri çalışmaya alınmadı.

Eksi 80 °C'de saklanan örnekler SARS-CoV-2 E gRNA PCR işlemi, DSÖ/Charité Protokolü'ne göre gerçekleştirildi<sup>3</sup>. Bu testin ardından antijen testi (Humasis COVID-19 antijen testi, Güney Kore) uygulandı. Çalışılacak örnekler viral nükleik asit kiti (High Pure Viral Nucleic Acid Isolation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ile ekstrakte edildi. Ardından E ve N sgRNA tespiti yapıldı. Bunun için gerekli master karışımı (Xpert OneStep Fast Probe, Grisp, Porto, Portekiz), forward ve revers primer ve problemlerle ısı döngü cihazındaki program uygun şekilde optimize edildi.

Hasta sonuçları, klinik ve radyolojik özellikleri de değerlendirilip T.C. Sağlık Bakanlığı Erişkin Hasta Tedavi Rehberi'ndeki gibi komplike olmayan, hafif/orta seyirli pnömoni- li, ağır pnömoni ve yoğun bakım ihtiyacı gerektiren hasta şeklinde kategorize edildi, semptom başlangıcından itibaren kaçınıcı günde sgRNA pozitif oldukları belirlendi<sup>1</sup>. Böylece hem yatan ve uzamış enfeksiyon belirtileri olan hastalarda hem de ayaktan başvuran hastalarda COVID-19 bulaşıcılığı açısından değerlendirme yapmak amaçlandı.

### qPCR Reaksiyonları

Forward diziler E ve N gen sgRNA için ortak olup leader spesifik primerin oligonükleotit dizisi 5'-CGA TCT CTT GTA GAT CTG TTC TC-3', E gen gRNA ve sgRNA için revers primer dizisi 5'-ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A-3', prob dizisi 5'-FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-BHQ-3', N gen sgRNA tespiti için revers primer dizisi 5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3', prob dizisi 5'-FAM- ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1 şeklinde belirlendi (Microsynth, İsviçre).

sgRNA tespiti için 10 µl reaksiyon hacmi hazırlandı: 2.8 µl nükleaz içermeyen su, primerler 400 nM olacak, problemler 200 nM olacak konsantrasyonlarda 2 µl sgRNA primer/prob çözeltisi, 0.2 µl Rtase karışımı ve 5 µl kalıp RNA. Daha sonra cDNA sentezi, 45 °C'de 20 dakika; başlangıç sıcaklığı 95 °C'de 2 dakika; gRNA ve sgRNA'lar için qPCR 95 °C'de 5 saniye ve 58 °C'de 30 saniye 40 döngü olacak şekilde gerçekleştirildi.

## İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 20.0 paket programı (SPSS Inc, Chicago, ABD) kullanıldı. Tanımlayıcı verilerin gösterilmesinde ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerler ve yüzdelikler kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede Ki-kare testi, dört gözlü tablolarda beklenen değerlerin beşin altında olduğu durumlarda Fisher's exact testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışma kapsamındaki hastalar 18-88 (medyan= 43) yaş aralığında ve yaş ortalaması  $45.41 \pm 16.29$  (ortalama  $\pm$  SS) olup numunelerin 53'ü erkek, 56'sı kadın hastadan alınmıştır. Yüz dokuz numunenin 79'u komplike olmamış, 15'i hafif pnömonili, üçü ağır pnömonili, üçü yoğun bakım ihtiyacı olan, dokuzu da asemptomatik hastaya ait olup yedisi COVID-19 servisi, biri yoğun bakım servisi, 101'i polikliniklerden gönderilmiştir. Çalışma kapsamında, semptomların varlığı açısından 0. gün (semptomların başladığı ilk gün) - 14. gün aralığında hasta örnekleri kullanılmıştır. SARS-CoV-2 PCR pozitif 109 numunenin 83 (%76.14)'ünde antijen testi pozitif, 88 (%80.73)'inde E gen sgRNA'sı pozitif, 96 (%88.07)'sında N gen sgRNA'sı pozitif, 97 (%89)'sinde en az bir sgRNA bulunmuştur (Tablo I). Numunelerin 12'sinde hem E hem N sgRNA negatif, dokuzunda sadece E sgRNA negatif, birinde sadece N sgRNA negatifliği saptanmıştır.

E sgRNA pozitif örneklerin %98.9'unda, negatif örneklerin ise %42.9'unda N sgRNA pozitif bulunmuştur (Tablo II). Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p = 0.0001$ ).

E sgRNA pozitif örneklerin %80.7'sinde, negatif olanların %57.1'inde antijen testi pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p = 0.023$ ). N sgRNA ve en az bir sgRNA pozitifliği ile antijen testinin pozitif olma durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ( $p = 0.295$ ;  $p = 0.475$ ) (Tablo III).

**Tablo I.** SARS-CoV-2 Pcr Pozitif Örneklerde Araştırılan Yöntemlerin Pozitiflik Sayı ve Yüzdeleri (n= 109)

Yöntem	Pozitif Örnek Sayısı	Yüzde n (%)
Antijen testi	83	%76.14
N sgRNA	96	%88.07
E sgRNA	88	%80.73

**Tablo II.** SARS-CoV-2 E ve N sgRNA Pozitifliğinin Birbirine İlişkisini Gösteren Sayısal Değerler

	N sgRNA pozitif n (%)	N sgRNA negatif n (%)	Toplam n (%)
E sgRNA pozitif	87 (%98.9)	1 (%1.1)	88 (%100.0)
E sgRNA negatif	9 (%42.9)	12 (%57.1)	21 (%100.0)
Toplam	96 (%88.1)	13 (%11.9)	109 (%100.0)
p*	<b>0.0001</b>		

**Tablo III.** SARS-CoV-2 E ve N sgRNA Pozitifliğinin Birbiriyle İlişisini Gösteren Sayısal Değerler

sgRNA varlığı (E veya N)	Antijen Testi		
	Pozitif	Negatif	Toplam
Var	75 (%77.3)	22 (%22.7)	97 (%100.0)
Yok	8 (%66.7)	4 (%33.3)	12 (%100.0)
Toplam	83 (%76.1)	26 (%23.9)	109 (%100.0)
<b>p*</b>	<b>0.475</b>		

p\*: Ki-kare testi (Fisher's exact test).

Ct değerleri ile diğer testlerin pozitifliği kıyaslandığında E gRNA Ct değeri  $\leq 25$  ve  $> 25$  için en az bir sgRNA pozitifliğiyle antijen testi pozitifliği ile arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p= 1.0$ ;  $p= 0.112$ ). E gRNA Ct değeri  $\leq 25$  ve  $> 25$  için E sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p= 1.0$ ;  $p= 0.303$ ). E gRNA Ct değeri  $\leq 25$  ve  $> 25$  için N sgRNA ile antijen testi pozitifliği arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p= 1.0$ ;  $p= 0.484$ ).

Asemptomatik dokuz hastanın beşinde her iki sgRNA da pozitif, bu beş hastanın sadece birinde antijen testi pozitif bulunmuştur. Bu dokuz hastanın sadece ikisinde antijen testi pozitif, üçünde de her üç test de negatif bulunmuştur. Semptomatik 100 hasta örneğinin 81'inde antijen testi, 83'ünde E sgRNA, 91'inde N sgRNA pozitif olup en az bir sgRNA'nın pozitif olduğu 92 numune tespit edilmiştir. Semptomatik hasta örneklerinin ortalama semptom süresi  $2.99 \pm 2.83$  gündür. Komplike olmamış 79 hastanın 67 (%84.81)'sinde antijen testi, 69 (%87.34)'unda E sgRNA, 74 (%93.67)'ünde N sgRNA, 75 (%94.94)'inde en az bir sgRNA pozitif bulunmuştur. Ağır pnömonili üç hastanın antijen testi pozitif, ikisinde N sgRNA pozitif, birinde E sgRNA pozitif tespit edilmiştir.

Hafif pnömonili 15 hasta örneğinin yedisinde (%46.67) sgRNA'lar ve antijen testi pozitif, 11 (%73.34)'inde en az bir sgRNA pozitif, dördünde sgRNA'lar negatifken antijen testleri pozitif, birinde sadece N sgRNA pozitif, üçünde sgRNA'lar pozitifken antijen testleri negatif bulunmuştur. Yoğun bakım ihtiyacı olan üç hasta örneğinin ikisinde sgRNA'lar ve antijen testi pozitif, birinde sadece N sgRNA pozitif tespit edilmiştir.

Antijen testi pozitif tespit edilen 83 hasta örneğinin E gRNA ortalama Ct değeri  $24.80 \pm 5.09$ ; bunların 71'i (%85.54) E sgRNA pozitif olup ortalama Ct değeri  $30.32 \pm 3.36$ ; 75'i (%90.36) N sgRNA pozitif olup ortalama Ct değeri  $29.33 \pm 3.72$  bulunmuştur.

Antijen testi negatif tespit edilen 26 hasta örneğinin E gRNA ortalama Ct değeri  $32.05 \pm 4.24$ , E sgRNA ortalama Ct değeri  $34.28 \pm 3.62$ , N sgRNA ortalama Ct değeri  $33.89 \pm 4.27$  bulunmuştur. Bu 26 örneğin 17 (%65.38)'sinde E sgRNA pozitif, 21 (%80.77)'inde N sgRNA pozitif saptanmıştır. Antijen testi negatif 26 örneğin 22 (%84.61)'sinde en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır.

Semptom süresi 10 gün olan altı hasta ve 14 gün olan bir hasta bu çalışmada yer almıştır. Semptomları 10 gündür olan SARS-CoV-2 PCR pozitif altı hastanın ikisinde

E sgRNA, dördünde N sgRNA, üçünde antijen testi pozitifliği saptanmıştır. Bu altı örnekte her üç testin de pozitif ve negatif olduğu birer hasta yer almıştır. Semptom süresi en uzun süreli (14 gün) olan komplike olmamış hastada sgRNA'lar negatif, antijen testi ise pozitif tespit edilmiştir. Komplike olmamış hasta sınıflamasında yer alan bu hastada yaygın kas ağrısı, terleme, ses kısıklığı mevcutken bu tabloya son üç gündür öksürük ve baş ağrısı eklenmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada SARS-CoV-2 PCR pozitif 109 numunenin 83 (%76.14)'ünde antijen testi, 88 (%80.73)'inde E gen sgRNA, 96 (%88.07)'sında N gen sgRNA, 97 (%89)'sında en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır. SARS-CoV-2 E gen PCR pozitif 109 örneğin 54 (%49.54)'ünde Ct  $\leq$  25 olup, bunların 53 (%98.15)'ünde antijen testi pozitif, 75'inde Ct  $<$  30 olup 65 (%86.67)'inde antijen testi pozitif, 55'inde Ct  $>$  25 olup 30 (%54.55)'unda antijen testi pozitif bulunmuştur.

Tuyji Tok ve arkadaşları<sup>6</sup>, SARS-COV-2 pozitif solunum yolu örneklerinde, 12 farklı ticari kitle yaptıkları AgT duyarlılıklarını %40.4-97.5 (ort= %54.8) gibi geniş bir aralıkta saptamıştır. Erman Daloğlu ve arkadaşları<sup>7</sup>, SARS-CoV-2 PCR yöntemine göre N protein saptayan bir AgT ile duyarlılığı %70 bulmuşlardır. Ülkemizdeki bahsi geçen çalışmalar ile bu çalışmadaki pozitif saptama oranı uyumlu görülmektedir. Yapılan literatür taramasında ülkemizde sgRNA ile ilgili bir çalışma saptanamamıştır.

Korenkov ve arkadaşları<sup>8</sup>, AgT'nin SARS-CoV-2 ile enfekte ve muhtemelen bulaştırıcı bireyleri tespit etmede kullanımını değerlendirmek için 2028 nazo/orofarengeal sürüntü örneğinde qPCR ve virüs kültürünü birlikte çalışmışlardır. Numunelerin 210'unda qPCR pozitif, 92 (%4.54)'sında AgT pozitif bulunurken, duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %42.86 ve %99.89 saptanmıştır. Belirlenen Ct değerleri;  $<$  20 (n= 14),  $<$  25 (n= 57) ve  $<$  30 (n= 88) için antijen testini sırasıyla %100, %98.25 ve %88.64 duyarlılıkta saptamışlardır. Bu çalışmada SARS-CoV-2 PCR pozitif hastalarda AgT pozitifliği %76.14, Ct  $\leq$  25 için %98.15 (n= 54), Ct  $<$  30 için %86.67 (n= 75) bulunmuş olup sonuçlar benzerdir. Genel duyarlılığın düşük olmasına rağmen AgT, SARS-CoV-2 bulaştırması muhtemel yüksek RNA yüklerine sahip bireylerin tespitinde değerli görünmektedir.

Scheiblaue ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>9</sup> Ct  $\leq$  25 değeri için %75'lik duyarlılık sınırı, değerlendirilen 122 AgT'nin 96'sında sağlanmıştır. Kullandığımız Humasis COVID-19 antijen testinin duyarlılığı Ct  $\leq$  25, Ct  $>$  25-30 arası, Ct  $\geq$  30, Ct 17-36 arası için sırasıyla %88.2, %21.7, %0, %40 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda SARS-CoV-2 E gen pozitif 109 örneğin 54'ünde Ct  $\leq$  25, bunların 53 (%98.15)'ünde AgT pozitif, 55'inde Ct  $>$  25 olup bunların 30 (%54.55)'unda AgT pozitif bulunmuş olmakla beraber yüksek viral yük ile AgT pozitifliği arasındaki ilişkiyle uyumlu görünmektedir. Humasis antijen testi dahil 105 AgT'de Ct  $\geq$  30 eşik değerinde hiç pozitiflik saptanmamışken, çalışmadaki 109 örneğin 18'inde bu değer saptanmıştır. Mevcut durum seçilen hasta grubuna bağlı viral yük farklılıkları, değerlendirmedeki subjektivite ve transport koşulları gibi durumlarla açıklanabilir.

Bu çalışmadaki Humasis antijen testi kitinde hem N hem de S proteinine özgü monoklonal antikörlerin olması, antijen testindeki tespit oranının yüksekliğini (%76.14), E ve N sgRNA tespit oranına yaklaşan yüksekliğini açıklayabilir. Ancak antijen testi negatif 26 örneğin 22 (%84.61)'sinde en az bir sgRNA pozitif saptanması dikkat çekicidir. Negatif sonuçlu AgT sonuçlarının sgRNA'lar ile yüksek oranda tespit edilebilmesi, sgRNA'ların belirteç olarak kullanılabilmesindeki önemi gösterebilir.

Viral kültür ve sgRNA ile tespit edilen replikatif virüsün, hafif hastalığı olan hastalarda semptomların başlamasından sekiz veya dokuz gün sonra bulunmadığı gösterilmiştir<sup>10,11</sup>. Fakat şiddetli hastalığı olan hastalarda viral saçılma daha uzun süre gözlenebilir<sup>12,13</sup>. Van Kampen ve arkadaşları<sup>14</sup>, semptomların başlamasından 22 gün sonrasına kadar E sgRNA saptayarak SARS-CoV-2 sgRNA'larının tespitinin geniş bir aralıkta olduğu ve sonuç olarak aktif virüs replikasyonu/transkripsiyon veya aktif/persistan enfeksiyon için iyi bir gösterge olmadığını ifade etmiştir. Bu çalışmada, semptom başlangıcından 10 gün sonra gelen hafif seyirli ve komplike olmamış hasta örneklerinde sgRNA ve antijen testi pozitifliği saptanmıştır. Semptom süresi en uzun süreli (14 gün) olan hastada sgRNA'lar negatif, antijen testi ise pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu durum alt saptama limitinin altında viral RNA varlığının olması ile açıklanabilir. Wölfel ve arkadaşlarının<sup>11</sup> beşinci günden sonra SARS-CoV-2 sgRNA'larını saptayamamasının aksine Alexandersen ve arkadaşları<sup>15</sup>, ilk tespitten sonraki yeni nesil dizileme [next generation sequencing (NGS)] ile 17. günde ve PCR ile 11. günde saptayarak geç/aktif enfeksiyondan sonra bile bulunabileceğini göstermişlerdir. Alexandersen ve arkadaşları tüm sgRNA'ların tespitinde PCR ve NGS kullanmış, diğer iki çalışmada sadece E sgRNA PCR kullanılmıştır. Bu çalışmada COVID-19 pozitif hastayla temasından itibaren 15. günde sgRNA pozitifliği olan asemptomatik bir hasta mevcuttur.

Kim ve arkadaşları<sup>16</sup>, N ve S genlerinin gRNA ve sgRNA'sının duyarlılıklarını %100; ancak sgRNA'nın (N %65 ve S %68) özgülüğünü, gRNA'ninkinden daha yüksek bulmuşlardır (N, %23 ve S, %17). Ortalama sgRNA tespit süresini  $13.75 \pm 11.22$  gün olarak saptamışlardır. Rodríguez-Grande ve arkadaşları<sup>17</sup> uzun süreli viral SARS-CoV-2 saçılımını değerlendirmiş, COVID-19 persistan vakaların 12/60 (%20)'ünde E sgRNA'yı, semptomların başlamasından 28 ile 79 gün sonra tespit etmiş ve uzun süreli SARS-CoV-2 PCR pozitif persistan vakalarda da bulaşıcılığın söz konusu olabileceğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada en uzun semptom süresi 14 gün olan tek hasta olup sgRNA'ları negatiftir. Semptom süresi 10 gün olan altı hasta örneğinin dördünde en az bir sgRNA pozitif, ikisinde her iki sgRNA pozitif, ikisinde N sgRNA pozitif, ikisinde her iki sgRNA negatif bulunmuş olup sadece E sgRNA pozitifliği olan örnek saptanmamıştır. Liotti ve arkadaşları<sup>18</sup> iyileşmiş 176 COVID-19'lu hastadan nazo/orofarengeal sürüntü örneklerini yeniden RT-PCR ile araştırmış, 32 (%18.2)'sinde gRNA pozitif, bunların da sadece birinde (kronik hastalıkları bulunan) (%3.1) sgRNA pozitif saptamışlardır. Bu çalışmada semptomatik belirtilerinin üçüncü gününde hastaneye başvurup pozitif SARS-CoV-2 PCR sonucu olan bir hastada sgRNA'lar ve AgT pozitif, iyileştikten 12 gün sonra tekrar verdiği örnekte gRNA, E ve N sgRNA



pozitif, AgT negatif saptanmıştır. Bu durum antijen testi pozitifliğinin yüksek viral yük ile ilişkili olabilmesinden kaynaklanabilir. Uzun süreli semptomatik vakalarda viral sgRNA'ların da pozitif olabileceği gösterilmiş olup bulaşıcılık açısından bu durumun ayrıca irdelenmesi gerekmektedir.

Osborn ve arkadaşları<sup>19</sup> SARS-CoV-2 pozitif 75 pediyatrik yatan hastadan aldıkları 95 örneğin 27 (%28.4)'sinde E sgRNA pozitif saptamıştır. Hastaların 52 (%54.7)'si asemptomatik olup semptomatik hastalardaki sgRNA pozitiflik oranı %66.7'dir. Pozitif sgRNA sonucunu hastalığın şiddeti, semptomları, servise yatış ve bağışıklık ile ilişkili saptayıp tedavi ve izolasyona alınmada karar değişikliği sağlayabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada semptomatik 100 hasta örneğinin 81'inde antijen testi, 83'ünde E sgRNA, 91'inde N sgRNA pozitif olup en az bir sgRNA'nın pozitif olduğu 92 numune tespit edilmiştir.

Immergluck ve arkadaşları<sup>20</sup> COVID-19 hastalarında N sgRNA'yı N antijen tespitiyle kıyaslamış ve uyumlu bulmuştur ancak antijen testi negatif kişilerden alınan 16 örneğin 13 (%82.1)'ünde sgRNA saptamıştır. N sgRNA'sını, AgT pozitif hastalardan alınan tüm numunelerde (28/28) tespit etmişlerdir. Çalışmada 100 semptomatik hasta örneğinin 81'inde antijen testi pozitifken, 91'inde N sgRNA pozitifliği tespit edilmiştir. Antijen testi negatif tespit edilen 26 hasta örneğinin 21 (%80.77)'inde N sgRNA tespit edilmiştir. Bu 26 örneğin 17 (%65.38)'sinde E sgRNA pozitif, 22 (%84.61)'sinde en az bir sgRNA pozitif saptanmıştır. AgT negatif örneklerdeki N sgRNA tespit oranları çalışmamızdaki oranlara benzer bulunmuştur.

De Angelis ve arkadaşları<sup>21</sup> aktif virüs varlığını 102 örnekte E sgRNA ile tespit ederek bunu üç farklı antijen testiyle kıyaslamışlardır. E sgRNA pozitif 63 örnekte AgT pozitifliği üç testte 48 (%76.2), 56 (%88.9), 63 (%100); E sgRNA negatifliğinde ise 39 örnekte AgT negatifliğini 37 (%94.9), 29 (%74.4), 7 (%17.9) bulmuşlardır. Bu çalışmada sadece E sgRNA kullanılmış olup hastaların %19.6'sı COVID-19 semptomları ile uyumsuzdur. Çalışmamızda E sgRNA pozitif örneklerin %80.7'sinde, negatif olanların %57.1'inde antijen testi pozitif olarak bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ancak N sgRNA için anlamlı fark bulunmamıştır. N ve E sgRNA için diğer AgT'ler ile daha fazla kıyaslamalı çalışmaya ihtiyaç vardır. Dikkat çeken bir durum da AgT'ler arasındaki yüksek değişken saptama oranıdır. Değerlendiricinin yorumu, bu testlerdeki belirgin farklılığın sebebi olabilir.

Bullard ve arkadaşları<sup>22</sup> SARS-CoV-2 RT-PCR pozitif 90 örneğin 26 (%28.9)'sında viral kültürde üremeyi göstermişlerdir. RT-PCR Ct değeri > 24 ve sekiz günden uzun semptomatik hastalarda bulaşıcılık olasılığını düşük bulmuşlardır. Aktif replikasyonu sgRNA ile değerlendirilen çalışmamızda SARS-CoV-2 pozitif 109 numunenin 97 (%89)'sinde en az bir sgRNA pozitifliği mevcuttur. Bu durum viral kültürde replikatif virüslerin tespitini sınırlandıran düşük viral yük ile açıklanabilir. Hasta grubu net olarak belirtilmese de semptom başlangıcından 21 güne kadar olan SARS-CoV-2 PCR pozitif hastaların bir kısmında uzamış saçılma bağlı virüs yükündeki düşüklükten dolayı hücre kültüründe görece az bir

tespit oranı saptanmış olabilir. Çalışmamızda semptom başlangıcından 14 güne kadar olan süreç, replikatif virüs tespiti açısından daha yüksek saptama değerini açıklayabilir.

Corrêa ve arkadaşları<sup>23</sup> SARS-CoV-2 qPCR pozitif ancak AgT negatif hasta örneklerinde bulaşıcı virüsün bulunma ihtimalini daha düşük bulmuşlar, dolayısıyla daha düşük bir bulaşıcı potansiyele sahip olabileceklerini viral kültür ve N sgRNA ile göstermişlerdir. Çalışmamızda AgT negatif 26 hastanın 21 (%80.77)'inde N sgRNA, 17 (%65.38)'sinde E sgRNA pozitif olarak tespit edilmiştir, bu açıdan AgT'nin yalancı negatif sonuç verebileceği durumlarda sgRNA'nın önemli ölçüde bulaşıcı virüsü saptayabileceği düşünülmüştür. Çeşitli AgT'lerin pozitif sonuç saptama aralıkları arasında önemli farklılıklar olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Scutari ve arkadaşları viral bulaşıcılığı değerlendirdikleri çalışmalarında<sup>24</sup> SARS-CoV-2 PCR pozitif 51 hasta örneğinden 14 (%27.5)'ünü kültür pozitif, E ve N sgRNA tespit sayılarını da sırasıyla 20 (%39.2) ve 19 (%37.3), özgüllüklerini %84 ve %86, duyarlılıklarını %100 bulmuşlardır. Hastalığın şiddetine göre kategorizasyonu ile ilgili verilerin kısıtlı olduğu bu çalışmada sgRNA'ların tespit oranındaki düşüklük, başlangıçta asemptomatik hasta oranının yüksekliğiyle açıklanabilir. Asemptomatik hasta sayısının dokuz (%8.25) olduğu çalışmamızda toplam 109 hastanın 88 (%80.73)'ünde E sgRNA, 96 (%88.07)'sında N sgRNA bulunmuştur.

Çalışmamızda çeşitli kısıtlamalar mevcuttur. Bulaşıcılığı ve yalancı sgRNA negatifliğini değerlendirmede ek bir yöntem kullanılmamıştır. Sadece tek bir antijen testi kullanılmış olup bu testlerdeki duyarlılık farkının fazla olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Birçok çalışmada sgRNA'ların direkt olarak bulaşıcılık göstergesi olarak kabul edilip bunun üzerinden çıkarım yapılmaya çalışılsa da tek başına sgRNA ile bulaşıcılığı değerlendirmek kesin bir sonuç vermeyebilir. Klinik ve epidemiyolojik takiplerin de eklendiği çalışmalar ile bulaşıcılığı değerlendirmede sgRNA ve antijen testlerinin kullanımı değerlendirilmelidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TTU-2021-3637. İstatistiksel analizler için verdiği katkıdan dolayı Prof. Dr. Coşkun BAKAR'a teşekkür ederiz.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 31.03.2021 ve Karar No: 2020-04).

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**KAYNAKLAR**

1. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) rehberi. Bilim Kurulu Çalışması, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2020, Ankara.
2. Manzulli V, Scioscia G, Giganti G, Capobianchi MR, Lacedonia D, Pace L, et al. Real time PCR and culture-based virus isolation test in clinically recovered patients: Is the subject still infectious for SARS-CoV2? *J Clin Med* 2021; 10(2): 309. <https://doi.org/10.3390/jcm10020309>
3. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
4. Ge X, Zhou H, Shen F, Yang G, Zhang Y, Zhang X, et al. SARS-CoV-2 subgenomic RNA: formation process and rapid molecular diagnostic methods. *Clin Chem Lab Med* 2023; 62(6): 1019-28. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0846>
5. Zhang SK, Guo Z, Wang P, Kang LN, Jia MM, Wu ZN, et al. The Potential Benefits of HPV E6/E7 mRNA Test in Cervical Cancer Screening in China. *Front Oncol* 2020; 10: 533253. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.533253>
6. Tuyji Tok Y, Dinç HÖ, Akçın R, Daşdemir FO, Eryiğit ÖY, Demirci M ve ark. SARS-CoV-2 hızlı antijen testlerinin COVID-19 hastalarındaki tanısal performanslarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(2): 251-62. <https://doi.org/10.5578/mb.20229805>
7. Erman Daloğlu A, Er H, Sepin Özen N, Çekin Y. Solunum yolu örneklerinde SARS-CoV-2 tespiti için hızlı antijen tespit kitinin polimeraz zincir reaksiyonu ile birlikte değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(2): 263-73. <https://doi.org/10.5578/mb.20229806>
8. Korenkov M, Poopalasingam N, Madler M, Vanshylla K, Eggeling R, Wirtz M, et al. Evaluation of a rapid antigen test to detect SARS-CoV-2 infection and identify potentially infectious individuals. *J Clin Microbiol* 2021; 59(9): e0089621. <https://doi.org/10.1128/JCM.00896-21>
9. Scheiblaue H, Filomena A, Nitsche A, Puyskens A, Corman VM, Drosten C, et al. Comparative sensitivity evaluation for 122 CE-marked rapid diagnostic tests for SARS-CoV-2 antigen, Germany, September 2020 to April 2021. *Euro Surveill* 2021; 26(44): 2100441. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.44.2100441>
10. Perera RAPM, Tso E, Tsang OTY, Tsang DNC, Fung K, Leung YWY, et al. SARS-CoV-2 virus culture and subgenomic RNA for respiratory specimens from patients with mild coronavirus disease. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(11): 2701-4. <https://doi.org/10.3201/eid2611.203219>
11. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020; 581(7809): 465-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
12. Huang JT, Ran RX, Lv ZH, Feng LN, Ran CY, Tong YQ, et al. Chronological changes of viral shedding in adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* 2020; 71(16): 2158-66. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa631>
13. Han J, Shi LX, Xie Y, Zhang YJ, Huang SP, Li JG, et al. Analysis of factors affecting the prognosis of COVID-19 patients and viral shedding duration. *Epidemiol Infect* 2020; 148: e125. <https://doi.org/10.1017/S0950268820001399>
14. Van Kampen JJA, van de Vijver DAMC, Fraaij PLA, Haagmans BL, Lamers MM, Okba N, et al. Duration and key determinants of infectious virus shedding in hospitalized patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Nat Commun* 2021; 12(1): 267. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20568-4>
15. Alexandersen S, Chamings A, Bhatta TR. SARS-CoV-2 genomic and subgenomic RNAs in diagnostic samples are not an indicator of active replication. *Nat Commun* 2020; 11(1): 6059. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19883-7>
16. Kim JY, Bae JY, Bae S, Cha HH, Kwon JS, Suh MH, et al. Diagnostic usefulness of subgenomic RNA detection of viable SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Clin Microbiol Infect* 2022; 28(1): 101-6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.08.009>

17. Rodríguez-Grande C, Adán-Jiménez J, Catalán P, Alcalá L, Estévez A, Muñoz P, et al. Inference of active viral replication in cases with sustained positive reverse transcription-PCR results for SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2021; 59(2): e02277-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02277-20>
18. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Posteraro B, Landi F, Sanguinetti M, et al. Assessment of SARS-CoV-2 RNA test results among patients who recovered from COVID-19 with prior negative results. *JAMA Intern Med* 2021; 181(5): 702-4. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.7570>
19. Osborn LJ, Chen PY, Flores-Vazquez J, Mestas J, Salas E, Glucoft, et al. Clinical utility of SARS-CoV-2 subgenomic RT-PCR in a pediatric quaternary care setting. *J Clin Virol* 2023; 164: 105494. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105494>
20. Immergluck K, Gonzalez MD, Frediani JK, Levy JM, Figueroa J, Wood A, et al. correlation of SARS-CoV-2 subgenomic RNA with antigen detection in nasal midturbinate swab specimens. *Emerg Infect Dis* 2021; 27(11): 2887-91. <https://doi.org/10.3201/eid2711.211135>
21. De Angelis G, Menchinelli G, Liotti FM, Marchetti S, Salustri A, Vella A, et al. SARS-CoV-2 antigen test results to infer active or non-active virus replication status in COVID-19 patients. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(6): 1338. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061338>
22. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020; 71(10): 2663-6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>
23. Corrêa IA, Faffe DS, Galliez RM, Gonçalves CCA, Maia RA, da Silva GP, et al. A SARS-CoV-2 negative antigen rapid diagnostic in RT-qPCR positive samples correlates with a low likelihood of infectious viruses in the Nasopharynx. *Front Microbiol* 2022; 13: 912138. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.912138>
24. Scutari R, Renica S, Cento V, Nava A, Sammartino JC, Ferrari A, et al. Quantitative SARS-CoV-2 subgenomic RNA as a surrogate marker for viral infectivity: Comparison between culture isolation and direct sgRNA quantification. *PLoS One* 2023; 18(9): e0291120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0291120>