KLIMUD REHBERLERİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için

PANDEMİ REHBERİ

1. Baskı, 2021 / ANKARA
KLİMUD-PAN.REH.10/21.Ver1.0

Bu Rehber Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLİMUD) tarafından hazırlatılmış olup Rehberin her türlü yayın, basım ve dağıtım hakkı KLİMUD'a aittir. KLİMUD'un yazılı izni olmadan Rehberin tümü ya da bir bölümü herhangi bir ortamda yayınlanamaz ve/veya çoğaltılamaz. Ancak kaynak gösterilerek kısa alıntılar yapılabilir. Rehber ilgili kişi ve kurum/kuruluş için hazırlanmış olup ücretsizdir ve para ile satılamaz.

Ekim 2021, Ankara

ISBN: 978-625-94077-0-8

KLİMUD Kaynak No: 16

1. Baskı

KLİMUD-PAN.REH.10/21.Ver1.0

Kapak fotoğrafı: Uzm Dr Yüce Ayhan tarafından hazırlanmıştır. Nazik desteği için teşekkürlerimizle...

REHBER KOORDİNASYON KURULU (RKK)

Efsun AKBAŞ (Başkan)
Duygu FINDIK
Aydan ÖZKÜTÜK
Serap SÜZÜK YILDIZ
Ayşın ZEYTİNOĞLU

PANDEMİ REHBERİ ÇALIŞMA GRUBU*

Başkan
Banu SANCAK

Yazıcı Üyeler
Candan ÇİÇEK
Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK
Selda ERENSOY
Berrin ESEN
Gül ERGÖR
Z. Ceren KARAHAN
A. Mert KUŞKUCU
Dilek Yeşim METİN
Kenan MİDİLLİ
Nevgün SEPİN ÖZEN

Okuyucu Üyeler
Selma GÖKAHMETOĞLU
Aydan ÖZKÜTÜK
Arzu SAYINER
Burçin ŞENER
Ayşın ZEYTİNOĞLU

(*) Soyadına göre alfabetik dizin

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Sunuş…

Sevgili okurlar, değerli meslektaşlarımız

2019 yılı sonunda ortaya çıkan COVID-19 pandemisi, yaşamın tüm alanlarında bir değişimi zorunlu kıldı. Tıbbi mikrobiyoloji uzmanlık alanı için yarattığı tüm sorunlar ve sıkıntılara karşın pandemi süreci hepimize benzersiz bir mesleki deneyim olanağı sundu.

Bu deneyimin gelecekte yaşanması mümkün olağandışı durumlara hazırlık açısından bir fırsat olarak değerlendirilmesi gerektiğine inandık. Bu amaçla KLİMUD Yönetim Kurulu olarak bir pandemi rehberi hazırlanması için çalışma başlattık. KLİMUD Rehber Koordinasyon Kurulu tarafından belirlenen iş takvimi ve planı doğrultusunda Banu SANCAK başkanlığında Rehber Çalışma Grubu oluşturuldu.

Yoğun iş yüklerine rağmen özverili bir çalışma yürüterek bu rehberin hazırlanmasında görev alan (soyadına göre alfabetik sırayla)

Candan ÇİÇEK, Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK, Selda ERENSOY, Gül ERGÖR, Berrin ESEN, Selma GÖKAHMETOĞLU, Z. Ceren KARAHAN, A. Mert KUŞKUCU, Dilek Yeşim METİN, Kenan MİDİLLİ, Nevgün SEPİN ÖZEN, Aydan ÖZKÜTÜK, Banu SANCAK, A. Arzu SAYINER, Burçin ŞENER ve Ayşın ZEYTİNOĞLU'na

minnettarlığımızı ifade etmek isteriz.

Rehberimizin ilk kısmında halk sağlığı uzmanlık alanı desteği de alınarak epidemiyolojik yaklaşım, laboratuvar ve afet yönetimine ilişkin temel ilkelere ağırlık verilirken ikinci kısmında COVID-19 özelinde, pandemide süreç yönetimine değinilmektedir.

Rehberin şekillenmesinde meslektaşlarımızın pandemi sürecindeki deneyimleri ve paylaşımları da yol gösterici olmuştur elbette. Derneğimizin gücünün temelini oluşturan kollektif emeğin bir ürünü olan bu Rehberin genel anlamda olağan dışı durumlara hazırlık konusunda tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları için önemli bir kaynak olacağına inanıyoruz. Umarız ki KLİMUD PANDEMİ REHBERİ, gelecek pandemilerin yönetimi açısından -iş yükümüz azalmasa bile- daha hızlı, daha verimli ve daha akılcı bir şekilde çalışma ortamına ulaşmamıza yardımcı olacaktır.

KLİMUD Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Selda Erensoy

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

İçindekiler

I. TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA PANDEMİYE HAZIRLIKLI OLMA: GENEL BİLGİLER 9

BÖLÜM 1 BULAŞICI HASTALIK EPİDEMİYOLOJİSİ 11

1.1 Salgınla ilgili terimler 11
1.2 COVID-19 Vaka Tanımı 13

BÖLÜM 2 TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARI VE PANDEMİ 15

2.1 Laboratuvar Ağı ve Özellikleri 16
2.2 Ulusal Laboratuvar Sistemi'nin Kapasitesinin Ölçülmesini Sağlayan Ana Unsurlar ve Göstergeler 18
2.3 Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları Özelinde Pandemi Yönetimi 22

BÖLÜM 3 TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA PANDEMİ ÖZELİNDE ACİL DURUM VE AFET YÖNETİMİ 25

3.1 Afetler 25
3.1.1 Doğal afetler 25
3.1.2 İnsan kaynaklı (beşeri) afetler 25

3.2 Afet Yönetimi 27
3.2.1 Bütünleşik afet yönetimi basamakları 27

3.3 Afetlerde Laboratuvar 29
3.3.1 Laboratuvarın afete hazırlanması 29

3.4 Acil Eylem Planları 34

II. COVID-19 PANDEMİSİ DENEYİMİ (TIBBİ MİKROBİYOLOJİ CEPHESİNDEN COVID-19 PANDEMİSİ DENEYİMİ) 39

BÖLÜM 4 COVID-19 EPİDEMİYOLOJİSİ 41

4.1 SARS-CoV-2 Varyantlarının COVID-19 epidemiyolojisine etkileri 42
4.2 Ara konak ve reseptör 44
4.3 R_0 ve bulaşma yolları 44
4.4 İnkübasyon periyodu ve klinik özellikler 45
4.5 COVID-19 ve mortalite 45

BÖLÜM 5 LABORATUVARDA BİYOGÜVENLİK / BİYORİSK DEĞERLENDİRME 49

5.1 Genel Kurallar 50
5.2 Sosyal Mesafe 52
5.3 Yüz Koruma 52
5.4 El Hijyeni 54
5.5 Çalışma Alanları ve Ekipman Dekontaminasyonu 55
5.6 Pandemide Genel Laboratuvar İşleyişi 56
5.7 Atık Yönetimi 57

BÖLÜM 6 COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: PREANALİTİK SÜREÇ 59

6.1 Örneklerin Alınması 59
6.1.1 Genel uyarılar 60
6.1.2 Örnek ne zaman alınmalıdır? 61
6.1.3 Hangi örnekler uygundur? 62
6.1.4 SARS-CoV-2 Ters Transkripsiyonlu PCR (RT-PCR) Testi için Örnek Almada Kullanılacak Ekipman 64
6.1.5 Örnek Alma 64

6.2 Örneklerin Taşınması 67
6.2.1 Hastane içinde örnek taşınması 67
6.2.2 Hastane dışından örneklerin taşınması 68

6.3 Örneklerin Laboratuvara Kabulü 69

6.4 Preanalitik Sürece ait Hata Kaynakları 70
6.4.1 Preanalitik hataların bildirimi ve iyileştirilmesine yönelik çalışmalar 70

BÖLÜM 7 COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: ANALİTİK SÜREÇ 73

7.1 SARS-CoV-2 RT-PCR Testi 73

7.2 RT-PCR İşlem Basamakları 75
7.2.1 Klinik örnekten nükleik asitlerin (DNA ve/veya RNA) elde edilmesi 75
7.2.2 RT-PCR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması 77
7.2.3 PCR cihazına yükleme ve amplifikasyon 79
7.2.4. Reaksiyon sonuçlarının analizi 79

7.3 SARS-CoV-2 RT-PCR Analizi Sonucunu Etkileyen Faktörler 86
7.3.1 Örnek türü ve viral yük 86
7.3.2 Taşıma ortamı ve şartları 87
7.3.3 Nükleik asit ekstraksiyon yöntemi: 87
7.3.4 Kullanılan tanı kitinin analitik performans parametreleri ve verifikasyon: 87
7.3.5 Ekstraksiyon ve amplifikasyon basamaklarında kullanılan malzemelerin uygunluğu: 87
7.3.6 İyi laboratuvar uygulamaları 88
7.3.7 Doğru amplifikasyon şartları ve analiz 88

7.4 RT-PCR'de Karşılaşılan Sorunlar ve Çözümleri 88
7.4.1 Yalancı pozitiflik 88
7.4.2. Yalancı negatiflik: 90
7.4.3 Sigmoidal Olmayan, Geç Başlayan, Alçak Amplifikasyon Eğrileri: 91
7.4.4 Özet 91

BÖLÜM 8 COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: POSTANALİTİK VE POST-POST ANALİTİK SÜREÇLER . 95

8.1 Postanalitik Süreç Yönetimi 95
8.1.1 Sonuçların yorumlanması 95
8.1.2 Sonuçların raporlanması 98
8.1.3 Numunelerin saklanması ve şahit numuneler 100
8.1.4. Gizlilik ve mahremiyet 100
8.1.5 Kayıt ve Arşiv 100

8.2 Post-Postanalitik Süreç Yönetimi 100
8.2.1 Sonuç bildirimi 100
8.2.2 Laboratuvar süreçlerinin izlenebilirliği ve hesap verebilirlik 101

BÖLÜM 9 SARS-CoV-2 ANTİJEN TESTLERİ 103

BÖLÜM 10 SARS-CoV-2 ANTİKOR TESTLERİ 107

BÖLÜM 11 PANDEMİDE VARYANT İZLEMİ VE GENOMİK SÜRVEYANS 111

I. TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA PANDEMİYE HAZIRLIKLI OLMA: GENEL BİLGİLER

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 1

BULAŞICI HASTALIK EPİDEMİYOLOJİSİ

Epidemiyoloji, hastalık ve sağlıkla ilgili durumların, dağılım özelliklerini ve risk faktörlerini inceleyen ve bu bilgilerin hastalıktan korunma için kullanılmasını sağlayan bilim dalıdır.

Tarihsel olarak öncelikle bulaşıcı hastalıkların özelliklerini inceleyen tanımlayıcı çalışmalar yapılmıştır. 1960'lardan sonra bulaşıcı hastalıklarla mücadelede kazanılan başarılar kronik hastalıklarla ilgili epidemiyolojik çalışmaların öne çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle ve salgınların incelenmesinde de yaygın olarak epidemiyolojiden yararlanıldığı için "epidemiyoloji" ifadesi yanlış bir kullanım olarak "salgın bilimi" olarak anılmıştır.

1.1 Salgınla ilgili terimler

Salgınla ilgili farklı terimler kullanılmaktadır

Endemi - Bir enfeksiyon etkeninin ya da hastalığın belirli bir coğrafyada ya da toplulukta sürekli görülmesi durumuna denir.

Epidemi - Bir enfeksiyon hastalığının belli bir bölgede beklenenden fazla görülmesidir.

Salgın (outbreak) - Kısa süreli, hızla yayılan sonra sönen salgınlara verilen isimdir, daha çok tek kaynaklı (su ve besinlerle) salgınlar için kullanılır.

Pandemi - Bir hastalığın, enfeksiyon etkeninin ya da sağlıkla ilgili bir sorunun birden fazla kıtada yayılım göstermesidir.

Sürveyans - Bir hastalıkla ilgili sürekli, düzenli veri toplanması, bu verilerin analiz edilerek tablo/grafik haline getirilmesi, bu bilgilerin sağlık hizmetinin planlanması ve değerlendirilmesinde kullanılması ile sonuçların toplumla ve veriyi toplayanlarla bir rapor aracılığı ile paylaşılması işlemlerinin bütünü olarak tanımlanır. Ülkemizde birçok hastalık için özellikle bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıklar için sürveyans programı vardır, ancak genellikle verilerin toplanması aşamasında kalınmaktadır. Bu verilerin zamanında analiz edilerek tablo/grafik haline getirilmesi ve yayınlanması eksik kalmaktadır. Özellikle bulaşıcı hastalıklarda yılda bir kez bu verilerin yayınlanması yeterli değildir. Gelişmiş ülkelerde bu yayınlar haftalık olarak yapılmaktadır (*örn.,* MMWR-CDC, Eurosurveillance-ECDC). Böylece bölgelerin karşılaştırılması ve zamanında müdahale kararlarının alınması mümkün olmaktadır.

Olgu (vaka) tanımı - Salgın döneminde hastaların klinik, laboratuvar ve bazı yer - zaman özelliklerinin de yer aldığı bir tanımdır. Olgu tanımı olası, kuvvetle olası ve kesin olmak üzere üç aşamalı olarak tanımlanır. Olası olgu tanımı olabildiğince geniş bir tanımdır ve olası olguların tamamını kapsaması amacıyla yapılır. Kesin olgu tanımı içinde laboratuvar yöntemi ile tanı konan hastalar vardır. Salgın süreci içinde bu vaka tanımlarında değişiklik yapılabilir. Yeni bilgiler eklendikçe ya da yeni risk faktörleri tanımlandıkça vaka tanımlarında da güncellemeler yapılmaktadır.

COVID-19 örneği incelenecek olursa 29 Haziran 2020'de güncellenen Sağlık Bakanlığı COVID-19 Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı Rehberinde olası vaka tanımına "koku ve tat duygusunda azalma" ifadesi eklenirken, yurt dışı ziyaret öyküsü yerine "hastalık açısından yüksek riskli bölgede bulunma" öyküsü konmuştur. Sağlık Bakanlığı tarafından 7.12.2020 de yayınlanmış olan "Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı rehberi"ndeki olgu tanımında 2021 Eylül ayı sonu itibariyle bir değişiklik yapılmamıştır.

Saha incelemesi/filyasyon - Kaynağın ve etkenin belirlenmesine yönelik çalışma yapılması ve/veya temaslılar dahil koruma ve kontrol önlemlerinin alınmasıdır. COVID-19 hastalarında "temaslı bulunması ve izlenmesi" yapılmaktadır. Hastanın evi ya da işyerine giderek kaynak arama işi "filyasyon" olarak adlandırılır ve sağlık sistemimizde bulaşıcı hastalık bildirim ve önleme faaliyetlerinde, , kullanılan bir yöntemdir. Bu pandemide de personelin tanıdık olduğu bir terminoloji olduğu için kullanılmaya devam edilmektedir. COVID-19 salgını damlacık yoluyla bulaşan bir virüs nedeniyle ortaya çıktığı için, kaynak hasta kişidir. Bu durumda bulaşmayı önlemek için en etkili yöntem, hastalarla temas eden bireylerin erken dönemde saptanıp, onların karantinaya alınmasıdır.

Toplumsal bağışıklık ("herd immunity") - Aşılanma ve/veya hastalığı geçirenlerin yüzdesi belirli bir seviyeye ulaşan bir toplumda, aşılanmamış bireylerin hastalıkla karşılaşma olasılıklarının azalmasıdır.

R_0 - Enfekte olmuş bir bireyle temas sonrasında duyarlı popülasyonda birincil vakanın **bulaştırıcılık süresi** içinde, hastalığı bulaştırabileceği **ortalama** sekonder vaka sayısıdır. Bir hastalık için toplumsal bağışıklık düzeyinin hesaplanmasında, aşağıdaki formülde bu sayı kullanılır.

Toplumsal Bağışıklık

$$p = 1 - 1/R_0$$

p - toplumsal bağışıklık için gerekli oranı göstermektedir. *Örneğin;* COVID-19 salgını için **R_0**'ın ortalama 3 civarında olduğu salgının başlangıç döneminde Çin'de yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Buna göre toplumsal bağışıklık düzeyi P = %67 olarak hesaplanmıştır. Yani toplumun %60-70 i aşılama ile ya da hastalığı geçirerek bağışık duruma gelirse, hastalığın yeni salgınlar yapmayacağı öngörülmektedir.

1.2 COVID-19 Vaka Tanımı

Sağlık Bakanlığı tarafından 7.12.2020 de yayınlanmış olan "Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı Rehberi"ndeki COVID-19 vaka tanımı

Olası Vaka

A: » Ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az biri VE » Klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması VE » Semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde kendisi veya yakın temaslısının hastalık açısından yüksek riskli bölgede bulunma öyküsü **VEYA**

B: » Ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az biri VE » Semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde doğrulanmış COVID-19 vakası ile yakın temas eden **VEYA**

C: » Ateş ve ağır akut solunum yolu enfeksiyonu belirti ve bulgularından en az biri (öksürük ve solunum sıkıntısı), **VE**

Hastanede yatış gerekliliği varlığı (SARI)* VE Klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması *SARI (Severe Acute Respiratory Infections-Ağır Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları)◊ son 14 gün içinde gelişen akut solunum yolu enfeksiyonu olan bir hastada, ateş, öksürük ve dispne, takipne, hipoksemi, hipotansiyon, akciğer görüntülemesinde yaygın radyolojik bulgu ve bilinç değişikliği nedeniyle hastaneye yatış gerekliliği **VEYA**

D: » Ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az ikisinin bir arada olması ve bu durumun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması.

Kesin Vaka

» Olası vaka tanımına uyan olgulardan moleküler yöntemlerle SARS-CoV-2 saptanan olgular

Kaynaklar

1. Principles of Epidemiology in Public Health Practice, CDC, May 2012.
2. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Temaslı Takibi, Salgın Yönetimi, Evde Hasta İzlemi Ve Filyasyon, Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 21 Eylül 2021.
3. COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı, Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 7 Aralık 2020.
4. https://www.cebm.net/covid-19/when-will-it-be-over-an-introduction-to-viral-reproduction-numbers-r0-and-re/ Accessed: 17.04.2020.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 2

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARI VE PANDEMİ

Pandeminin toplum düzeyindeki etkisi, virüsün özelliklerinin yanı sıra topluma ait faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Virüsün bulaşma yolu, virülansı, dünyadaki yaygınlığı toplumda bu virüse karşı varsa mevcut bağışıklık düzeyi, toplumun sosyokültürel davranış şekli, ülkedeki sağlık hizmetleri sunumunun nitelik ve nicelik olarak durumu pandemi seyrini etkileyen önemli unsurlardır. Her pandemi farklı olmakla birlikte, pandemilerin bazı ortak özellikleri mevcuttur.

- Pandemilerde genellikle birden fazla dalga beklenir.
- Pandemi sırasında çeşitli varyantlar/mutantlar ortaya çıkabilir.
- Pandemi sağlık sistemlerine beklenmedik, ani ve öngörülmesi zor bir yük getirebilir.

İnfluenza virüsü, 16. yüzyıldan beri 10-50 yıllık periyotlarla olmak üzere, şiddeti ve etkisi farklı pandemilere neden olmuştur. İnfluenza A (H1N1) pdm09 virüs alt tipinin ortaya çıkmasından sonra Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Haziran 2009'da 21. yüzyılın ilk influenza pandemisini ilan etmiştir. Pandemiye yol açabilecek olası bir başka influenza virüsü nedeniyle DSÖ, "Pandemik İnfluenza Planları"nın hazırlanmasına yönelik bir dizi rehber yayınlamıştır. Periyodik olarak bu rehberler güncellenmektedir. 1999 yılında ilk rehberin yayınlanmasını takiben, 2005 ve 2009'da olmak üzere iki revizyon yapılmıştır. 2013 yılında ise risk temelli bir değerlendirme yapılması öngörülmüş ve üye ülkelerin ulusal risk değerlendirmelerine göre esnek ulusal planlar yapmaları önerilmiştir. Burada, ulusal afet yönetimi otoriteleri ile birlikte, acil yanıt ve acil durum yönetimi planlamasının yapılması gerektiği belirtilmiştir. Bunu takiben ülkelerin ulusal pandemi planlarını güncellemeleri için gerekli olan tüm aşamaları açıklayan bir belge de kullanıma sokulmuştur. DSÖ 2018 yılında ülkelerin pandemi durumunda mevcut yanıt kapasitesinde ve bunun geliştirilmesinde kullanabilecekleri kontrol listelerini içeren kapsamlı bir belge hazırlamış ve bunu üye ülkelerin kullanımına sunmuştur. Bu belge içeriği daha sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak ele alınacaktır.

DSÖ, influenza pandemisi için bu planlamaları yaparken eş zamanlı olarak Uluslararası Sağlık Tüzüğünü [International Health Regulation (UST-IHR)] de güncellemiştir. Uluslararası Sağlık Tüzüğü 1969 yılında yayımlanmış, ülkemizde de 1972 yılında yürürlüğe girmiştir. 2005 yılında yapılan önemli bir revizyonun ardından 58. Dünya Sağlık Asamblesinde kabul edilerek 15 Haziran 2007'de yeniden yürürlüğe girmiştir. Yeni tüzükte amaç ve kapsam; "*Uluslararası halk sağlığı açısından ortaya çıkacak risk ile orantılı ve sınırlı olarak, hastalıkların uluslararası yayılmasını önlemek, bu hastalıklara karşı korunmak, yayılmalarını kontrol etmek ve halk sağlığı açısından gerekli yanıtı vermek*" şeklinde tanımlanmıştır. UST gerekliliklerine göre, tüm üye devletlerin minimum düzeyde halk sağlığı çekirdek kapasitelerini geliştirmiş olmaları gerekmektedir.

Bu kapasite tanımı içinde UST tarafından belirlenen durum ve olayların zamanında saptanması, değerlendirilmesi, bildiriminin yapılması ve gerekli müdahalelerin gerçekleştirilmesi yer almaktadır. DSÖ, ülkelerin UST ile uyum kapasitelerinin değerlendirilmesine ilişkin yerinde ziyaretler, anketler, çeşitli eğitimler, toplantılar ve uzaktan simülasyon egzersizleri yürüterek çekirdek kapasitenin geliştirilmesine destek olmaktadır.

Pandemi, uluslararası halk sağlığı tehdidi oluşturan bir durumdur. Olası bir pandemi durumunda, mevcut "Pandemik İnfluenza Planı", bir prototip olarak kullanılabilir. Uluslararası mevzuatta bağlayıcılığı olan UST ve ilgili ek belgelerinin de yol gösterici olması beklenmektedir.

Ulusal ve uluslararası halk sağlığı tehdidi oluşturan beklenmedik ve olağanüstü tüm koşullarda ve özellikle bir pandemi durumunda konunun taraflarına önemli sorumluluklar düşmektedir. Pandemi özelinde etkenin tanımlanması, vakaların kontrolü, takibi, tedavisi, aşılama ve kontrol önlemleri, sağlık sisteminin sürdürülebilirliğinin sağlanması gibi pek çok konu bir arada ve eşgüdüm içinde yürütülmelidir. Bu durum bir ülkenin kurumlarının normal koşullarda ne kadar işlevsel olduğu ve birbirleriyle eşgüdüm içinde çalıştığı ile doğrudan ilişkilidir. Güçlü bir mevzuat alt yapısının yanı sıra olağan ve olağandışı durumlar için alt düzenlemeler yapılarak kurumlar arası iş birliği mekanizmaları tanımlanmış, kurum ve kişilerin görev tanımları yapılmış olmalıdır.

2.1 Laboratuvar Ağı ve Özellikleri

Bir ülkede bir enfeksiyon hastalığının tanı kapasitesinden bahsedildiğinde; devlet, üniversite, özel, halk sağlığı laboratuvarları ve hayvan sağlığı ile ilgili çalışan tüm laboratuvarların tanı kapasitesinden bahsedilmektedir. **"Ulusal Laboratuvar"** kapasitesinin verimli ve etkin olabilmesi, bu laboratuvarların birbiri ile olan iletişimi ile yakından ilişkilidir. Bu konu pandemi durumunda daha da önem kazanmaktadır. Laboratuvar ağlarının geliştirilmesi ülkenin halk sağlığı sistemini güçlendirir ve ulusal laboratuvar yanıt ağının (national laboratory response network) gelişmesinde kritik öneme sahiptir. İyi bir halk sağlığı laboratuvarının ana görevi acil bir şekilde halk sağlığı tehdidine yanıt oluşturmak, diğer kurumlara destek olmak ve laboratuvara dayalı sürveyansın gereklerini veri analizi de dâhil olmak üzere yerine getirmektir. Bu fonksiyonlar ancak **Halk Sağlığı Laboratuvarları ve mikrobiyolojik tanı laboratuvarların birlikte bulunacakları bir "laboratuvar ağı"** ile gerçekleştirilebilir.

Ulusal düzeyde ülkemizde mevzuat ile tanımlanmış bir "Ulusal Laboratuvar Ağı" olmamakla birlikte, 2012 yılına kadar Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) ismi ile var olan ve uluslararası kuruluşlar tarafından da ulusal referans laboratuvar (ulusal halk sağlığı enstitüsü) olarak tanınan ve kabul edilen kurumun bölge yapılanması operasyonel bir ağ yapısı olarak tanımlanabilirdi. Bu yapının getirdiği hafıza ve deneyim ile özellikle influenza, influenza benzeri hastalık ("influenza like illness"/ILI) başta olmak üzere bazı hastalıklar için özel sürveyans ağları oluşturulmuş ve son yıllarda bu ağların sayısı giderek artmıştır. 2012 yılında, RSHMB kuruluş kanununun iptali ile ve Sağlık Bakanlığının yeniden yapılanması çerçevesinde Bölge Hıfzıssıhha Laboratuvarlarının da organizasyon şeması değişmiştir. Ancak önceki hafıza ve deneyimlerle bu iletişim ve ağ yapısı sürdürülmektedir. Bu ağlarda ülkedeki diğer laboratuvarlar yer almamaktadır. Her ne kadar 30 Mayıs 2007 tarih ve 26537 sayılı Resmi gazetede yer alan ve 22.01.2020 tarihinde güncellenen "Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliği"nde madde 14'te *"tanı ve referans laboratuvarları başlığı altında", "Bakanlık, bildirime esas bulaşıcı hastalıkların tanısı, sürveyansı ve kontrolü kapsamında mikrobiyolojik tanı ve referans laboratuvarlarının çalışma usul ve esaslarını belirler"* şeklinde bir madde olsa da, henüz böyle bir düzenleme hayata geçememiştir. Bu durum ülkemizdeki laboratuvara dayalı sürveyans sisteminin zayıf kalmasına, bir başka deyişle sürveyansın laboratuvar ayağının yetersiz olmasına neden olmaktadır. Ülkemizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının sisteme entegre, etkin ve verimli kullanımları için mevzuat ile tanımlanmış bir laboratuvar ağı sisteminin bulunması gerekmektedir. Bu sistem içinde yer alan laboratuvarların görev ve sorumlulukları ile birbirleri arasındaki her türlü iletişim ve eşgüdüm tanımlanmalıdır.

Laboratuvar ağ yapıları ulusal düzeyde genellikle üç basamaklı, uluslararası referans laboratuvarlarının da sisteme katılmasıyla dört basamaklı olarak tanımlanmaktadır. Düşük kapasiteli, göreceli olarak düşük nüfuslu yerlerde bulunan, az sayıda eğitimli personeli olan ve daha basit testleri yapabilen laboratuvarlar **"birinci (yerel) basamak"**; orta ölçekli kapasitesi olan, orta ölçekli bir nüfusa hitap eden, eğitilmiş personeli ve eğitici personeli bulunan ve orta düzey zorlukta testleri çalışan laboratuvarlar **"orta (bölgesel) düzey"** laboratuvarlar; yüksek kapasitesi olan, kalabalık nüfusa hitap eden, hem eğitimli personel sayısı hem de eğitici personel sayısı yüksek, özel hasta gruplarında özel testler yapabilen laboratuvarlar da **"üçüncü (merkez/referans) düzey**" laboratuvarlar olarak kurgulanmaktadır. "Ulusal Referans Laboratuvarları" üçüncü basamak laboratuvarlar arasından seçilebilir. Bazen de bu laboratuvarlar, etkene özel referans laboratuvarları ya da ülkenin halk sağlığı önceliklerini çalışan "Ulusal Halk Sağlığı Enstitüleri" içinde yer alan ulusal referans laboratuvarlar şeklinde yapılandırılabilir.

Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC), hastalık kontrol programları kapsamında 17 hastalığı özel hastalık ağları ile izlemektedir. Bu kapsamda ECDC üye ülkelerde halk sağlığı laboratuvarlarının da dahil olduğu ulusal ya da bölgesel ağlara; laboratuvarların özel etkenler için tanımlama, tiplendirme ve sürveyansı ile antimikrobiyal direncinin izlenmesi konularında kapasitelerinin güçlendirilmesi için destek olmaktadır. Böylece AB, bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde yer alan enfeksiyonların ve bunların etkenlerinin, epidemiyolojik sürveyansını ve Avrupa'daki yayılımının izlenmesini sağlamaktadır. Benzer şekilde ülkemizde bu ağlarla uyumlu ulusal ağların ya da etkene özgü ağların kurulması, verilerimizin diğer ülkelerle karşılaştırılabilir olmasını sağlamak için ilk adımdır.

Ulusal laboratuvar ağı, bildirimi zorunlu tüm etkenler için tasarlanabileceği gibi etkene özgü olarak da tasarlanabilir. Nitekim ülkemizde; kızamık, influenza, ILI SARI ("severe acute respiratory illness"), Kırım Kongo kanamalı ateşi (KKKA) gibi farklı etkenlere özgü olan "laboratuvar ağları" bulunmaktadır. Bu ağlarda önceki RSHMB bölge laboratuvarları ve sonradan eklenen bazı halk sağlığı laboratuvarları bulunmaktadır. Ancak bunların hem sayı olarak artırılması hem de işlevsel olarak geliştirilmeleri gerekmektedir.

Laboratuvar ağının özellikleri aşağıda sunulmaktadır:

- Laboratuvar ağı, yönetici bir laboratuvar ve üye laboratuvarlardan oluşmalıdır.
- Bunların görev ve sorumluluklarının yanı sıra birbirlerine karşı sorumlulukları da belirlenmeli; birbirleri ile arasındaki ilişkiler de düzenlenmelidir.
- Laboratuvar ağı iyi bir yazılımla desteklenmeli ve laboratuvar sonuçlarının analizini yapan bir yapı/birim mutlaka bulunmalıdır.
- Yönetici laboratuvar, üye laboratuvarları; eğitim, etken doğrulama ve ileri testler konusunda desteklemeli; geri bildirim ve koordinasyon yine yönetici laboratuvar tarafından yürütülmelidir.
- Ağın sürdürülebilir olması için alt yapı ve kaynak gereksinimleri önceden belirlenmelidir. Kalite yönetim sistemi için kaynak ayrılmalıdır.
- Laboratuvar ağı değişen koşullara yanıt verme kapasitesine sahip olmalı, sorun giderici ve gelişime açık olmalıdır.

Tüm bu unsurlar değerlendirildiğinde ülkemizde yürütülen hastalık sürveyans ağlarının geliştirilmesi gereken birçok yönünün olduğu düşünülebilir. Bu durumun iyileştirilmesi için öncelikle güçlü ve zayıf yönlerimizin belirlenmesi gereklidir.

Laboratuvar ağları yapılandırılırken uluslararası bildirimi zorunlu hastalıklar içinde yer alan ve o ülke için önemli olan etken ya da hastalıklar öncelikli olarak göz önünde bulundurulmalıdır. Ülkemizde bu şekilde kurgulanmış olan laboratuvar ağlarının yürütülmesi sırasında edinilen deneyimler, var olan ve yeni kurulacak olan laboratuvar ağlarının uluslararası kuruluşların belirlediği gereksinimleri karşılayacak düzeye getirilmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.

2.2 Ulusal Laboratuvar Sistemi'nin Kapasitesinin Ölçülmesini Sağlayan Ana Unsurlar ve Göstergeler

Olağan işleyiş içinde ulusal laboratuvar ağının olması, pandemi gibi olağanüstü durumlarda daha da büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde insan gücü ve kaynaklar daha etkin ve verimli kullanılabilir. Pandemilerde ulusal laboratuvar ağının işlevlerini ve sağlayacağı yararları anlamak için, uluslararası rehberler ve UST gereklilikleri göz önünde bulundurulmalıdır. DSÖ, ülkelerin UST'sinin gerekliliklerini yerine getirecek **"Çekirdek Kapasite"**lerinin izlenebilmesi ve geliştirilmesi için çeşitli değerlendirme araçları geliştirmiştir. UST'nin kabul edilmesinin ardından DSÖ, 2010-2016 yılları arasında üye ülkelere, çekirdek kapasitelerin değerlendirilmesi için kontrol listesi ve ilgili göstergeleri içeren anketler uygulamıştır.

2018 yılında yayınlanan ve ülkelerin kapasitelerini belirleyen değerlendirme aracında **dört ana çekirdek kapasite** belirlenmiştir. İkinci versiyon olarak güncellenen bu değerlendirme aracında 19 teknik alanda 49 gösterge izlenebilmektedir.

Değerlendirme aracında yer alan çekirdek kapasiteler şöyledir:

Önleme: Bu bölümde salgınların ve UST kapsamında yer alan tüm olay ve durumların önlenmesi ve azaltılması için gerekli kapasite toplam yedi alt başlık altında değerlendirilmiştir. Bu alanlar içinde klinik mikrobiyolojiyi doğrudan ilgilendiren konular "biyogüvenlik, biyoemniyet" ve "immünizasyon" başlıklarıdır.

Saptama: Bu bölümde halk sağlığını tehdit eden durumların erken saptanması değerlendirilmekte ve dört bölümden oluşmaktadır. Bunlar "ulusal laboratuvar ağı sistemi", sürveyans, raporlama ve insan kaynaklarıdır.

Yanıt: Bu bölümde acil hazırlık planları, halk sağlığı güvenliği ve otoritelerle işbirliği, tıbbi önlemler, personel görevlendirmeleri ve risk iletişimi kapasitesi değerlendirilir.

UST açısından oluşan zarar ve giriş kapıları: Bu bölümde özellikle giriş kapıları, kimyasal ve radyolojik tehditlere hazırlık değerlendirilmektedir.

Değerlendirme aracında her bir gösterge ülkelerin kapasitesine göre 1-5 arasında skorlanmıştır.

Skor 1 - Kapasite yok

Skor 2 - Sınırlı kapasite; gelişmekte olan bir kapasite var.

Skor 3 - Gelişmiş kapasite; kapasite var ancak sürdürülebilir değil.

Skor 4 - Gösterilebilir kapasite; birkaç yıldır sürdürülebilen ve ölçülebilen bir kapasite var.

Skor 5 - Sürdürülebilir kapasite; tüm özellikler işlevsel ve sürdürülebilir, diğer ülkelere de bir veya birden fazla uygulama için destek olabilir.

Değerlendirme aracında Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarlarını doğrudan ilgilendiren alt başlıklar incelendiğinde; Bölüm 1'de yer alan **biyogüvenlik ve biyoemniyet** düzenlemeleri aşağıdaki kriterler kullanılarak değerlendirilir. Değerlendirme tüm ülke çapında, tüm sektörlerdeki araştırma, tanı ve biyoteknoloji laboratuvarlarını içermelidir.

1. Devlet tarafından oluşturulmuş insan ve hayvan sağlığını içeren çok sektörlü ulusal biyogüvenlik ve biyoemniyet sistemlerinin tanımlanmış olması; bu sistemlerin izlenebilir olması

2. Ulusal biyorisk (biyogüvenlik ve biyoemniyet) yönetimi mevzuatının oluşturulması
3. Biyorisk yönetimi eğitimlerinin yapılıyor olması ve bu yaklaşımın her düzeyde benimsenmesi
4. Laboratuvarların ruhsatlandırılması ve patojenlere yönelik kontrol önlemlerini düzenleyen mevzuatın olması
5. Biyolojik etkenlerin laboratuvarlarda güvenli bir şekilde saklanması, kullanılması, taşınması ve uzaklaştırılmasını içeren bir ulusal programın olması
6. Biyolojik etkenlerin güvenli taşınmasına ilişkin düzenleme olması

Değerlendirme araçları kullanıldığında ülkemizin bazı göstergeler için 2 bazı göstergeler için 3 düzeyinde olduğu söylenebilir.

Saptama alt başlığında özellikle mikrobiyoloji laboratuvarlarını doğrudan ilgilendiren **"Ulusal Laboratuvar Sistemi"** başlığı daha kapsamlı ele alınacaktır.

Ulusal laboratuvar sisteminin değerlendirilmesinde amaç; tüm ilgili sektörlerin, özellikle insan ve hayvan sağlığını temsil edenlerin yer aldığı etkin, modern yöntemlerin kullanıldığı, hasta başı ve laboratuvara dayalı sürveyansın yapıldığı bir ulusal laboratuvar sisteminin varlığının ve yeterliliğinin değerlendirilmesidir.

Ulusal laboratuvar ağı şu şekilde tanımlanmaktadır:

- Güvenli ve doğru bir şekilde, ülkede bilinen ve bilinmeyen epidemik hastalıklara neden olan etkenleri ve bunların tüm özelliklerini tanımlamalı,
- Güvenli, emniyetli, maliyet etkin ve uygun tanı test ve araçlarını yaygın bir şekilde kullanabilmeli,
- Etkenlerin hızlı ve kesin tanısı için gerekli olan modern tanı araçlarını (moleküler yöntemler vb) maliyet etkin bir şekilde kullanabilmeli,
- Testleri çalışan ve/veya bu test sonuçlarını kullanan klinik laboratuvarlar ve halk sağlığı laboratuvarları eşgüdüm ve işbirliği içinde olmalı

Değerlendirme aracında yer alan "Ulusal Laboratuvar Sistemi"nin kapasitesinin ölçülmesini sağlayan ana unsurlar aşağıda sunulmaktadır.

1. On çekirdek (esas) laboratuvar testinden (*) en az beşini uygun şekilde yapması; ileri tanı testlerini yaptırmak amacıyla, yerel/bölge laboratuvarlarının en az %80'ninin, akredite laboratuvarlara güvenli ve uygun şekilde örnek gönderilmesinin gerçekleştirmesi,

   (*)10 çekirdek test: UST tarafından bildirimi zorunlu hastalıklar listesinde ve DSÖ'nün düşük gelirli ülkelerdeki ilk 10 ölüm nedenleri arasında yer alan hastalıklar için gerekli altı tanı testi (1-influenza PCR, 2-poliovirus virüs kültürü, 3-HIV serolojik tanısı, 4-Mycobacterium tuberculosis mikroskopisi, 5-Plasmodium spp, hızlı tanısı, 6-Salmonella enteritidis serotip typhi'nin kültürü) ile ulusal düzeyde en önemli halk sağlığı problemi olan hastalıklar arasından seçilecek dört tanı testi

2. Ulusal laboratuvar sisteminde yer alan laboratuvarlar için "ulusal laboratuvar kalite standartları" ve laboratuvarların ruhsatlandırılmasına ilişkin düzenlemelerin olması
3. İleri tanı testlerinin, ulusal laboratuvarlarda ve gerektiğinde uluslararası bölgesel referans laboratuvarlarında yapılabilmesi için gerekli anlaşmaları sağlama yeteneği
4. İnsan sağlığı ve hayvansal gıda üretiminde öncelikli olan patojenler için antimikrobiyal direnç testlerini yapabilmesi

Bu ana unsurlar, **dört gösterge ile** değerlendirilmektedir. Bu göstergeler ve göstergelerin skorlanmaları için kullanılan özellikler aşağıda özetlenmiştir.

Gösterge 1: Öncelikli hastalıkların saptanması için laboratuvar testlerinin yapılması

a. Hızlı, doğru ve maliyet etkin yöntemlerin tanıda kullanılması
b. Ülkelerin kendi halk sağlığı problemlerine göre öncelikli hastalık listelerini oluşturmaları (bakınız * madde 1; 10 çekirdek test).

Gösterge 2: Doğrulama ve örnek gönderilmesi

a. Doğrulama için örnek gönderilmesine ilişkin standart uygulama prosedürlerinin olması
b. Doğrulama için örnek gönderebilecek laboratuvar oranı
c. Bu iş için bir bütçenin ayrılması

Gösterge 3: Etkin ulusal tanı ağı

a. Veterinerlik laboratuvarları tanı ağının olması
b. Laboratuvarlarda kalite güvence sisteminin bulunması
c. Hızlı hasta başı testlerinin kullanılma durumu
d. Klasik ve ileri tanı yöntemlerinin kullanılma durumu ve yaygınlığı

Gösterge 4: Laboratuvar kalite sistemi

a. Laboratuvarlarda kalite standartlarının olması
b. Kalite standartlarının uygulanmasının izlenmesi
c. Tüm laboratuvarların ruhsatlandırılması ve kalite standartlarına uyumu ile ilişkili düzenleme olması
d. Ulusal kalite standartlarına uyumun zorunlu olması
e. Uluslararası kalite standartlarına uyulması

Yukarıda da değinildiği gibi, UST'de tanımlanan çekirdek kapasitenin kullanılma olasılığı en yüksek olan halk sağlığı tehdidi influenza pandemisidir. Bu nedenle DSÖ, "Pandemik Influenza Plan"larını revize etmiştir. 2018 yılında pandemik influenzanın risk yönetimi için yanıt kapasitesinin oluşturulmasında kullanılacak bir kontrol listesinin yer aldığı bir belge yayınlamıştır. Bu belge UST ile eşgüdümde hazırlanmıştır. Belgede UST değerlendirme aracındaki göstergeler kullanılmış ve influenza pandemisi durumuna yanıt kapasitesi için uyarlanmıştır.

Bu belgede yer alan başlıklar:

1. Giriş
2. Acil duruma hazırlıklı olma
3. Sürveyans, araştırma ve değerlendirme
4. Sağlık hizmetleri ve klinik yönetim
5. Toplum içinde hastalığı önleme
6. Zorunlu hizmetler ve iyileşmenin sağlanması

Kontrol listesinde öncelik düzeyi ve uygulanabilirliği göz önüne alınarak yer alan aktiviteler, **ana gereklilikler ("Essentials")"-** ve **-olması istenilenler ("Desirables")** şeklinde iki ana başlıkta değerlendirilmektedir. Ülkelerin kendi durumlarına ve kaynaklarına göre hangi aktivitenin ana gereklilik olduğuna karar vermesi gerekmektedir. Aşağıda, dokümanda yer alan ve özellikle tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları için önemli olan alt başlıklar özetlenmiştir.

Söz konusu dokümanın üçüncü bölümünde yer alan **Sürveyans** başlığı incelendiğinde; UST gereklilikleri doğrultusunda yeni bir influenza alt tipi ile enfekte bir insan vakasının DSÖ'ye acilen bildirilmesi gerekmektedir. Bu bölümde **"laboratuvarlar"** alt başlığında özellikle influenza hızlı tanısı ve doğrulanması için laboratuvarların kapasitesi değerlendirilmektedir.

A. Ana gereklilikler

- Laboratuvarlar için uygun biyogüvenlik protokollerinin olması
- Ülkede en az bir laboratuvarın tanı, tiplendirme, alt tiplendirme kapasitesinin olması
- Klinik örneklerin laboratuvara uygun koşullarda taşınmasının sağlanması
- Laboratuvar verilerinin toplanması, yönetimi ve saklanması
- DSÖ işbirliği merkezleri ile iletişim halinde olunması
- Eğitilmiş personel, pandemi sırasında gerekli olabilecek her türlü ekipman ve malzeme ihtiyacının tanımlanması
- Pandemi öncesinde, alarm düzeyinde ve pandemi döneminde test stratejilerinin çerçevesinin belirlenmesi; test yapılmama koşullarının belirlenmesi
- Pandemi döneminde ortaya çıkabilecek test ihtiyacının artmasına ve klinik örneklerin laboratuvarlar arası taşınması sistemine yönelik acil planların geliştirilmesi
- İnfluenza dışındaki laboratuvar testlerine ilişkin planlamaların yapılması
- Laboratuvar çalışanlarının influenza aşılanmalarının sağlanması
- Klinik örneklerin ve virüs içeren diğer materyallerin ulusal ve uluslararası taşıma kurallarına uygun bir şekilde taşınmasının sağlanması
- Pandemi yönetimi, ulusal sağlık otoritesi ve laboratuvar ağları arasındaki uygun iletişim işlerliğinin sağlanması

B. Olması istenilenler

- Tüm halk sağlığı laboratuvarlarının influenza testlerini yapabilmesi için ulusal ve uluslararası kalite standartlarında olup olmadığının değerlendirilmesi
- Ulusal influenza merkezinin oluşturulması ve global influenza sürveyans sistemine dahil olması
- Ulusal düzeyde pandemik influenza virüsünü çalışabilecek, uygun biyogüvenlik koşullarına sahip laboratuvarların alt yapı çalışmalarının sağlanması
- Spesifik viral araştırmaların yapılabilmesi için gereken laboratuvar kapasitesinin oluşturulması (antijenik yapıların tanımlanması ve moleküler epidemiyolojisi vb)
- Antiviral ilaç direncinin izlenebilmesi için gereken laboratuvar kapasitesinin oluşturulması
- Doğrulanmış pandemik influenza klinik örneklerinin uluslararası paylaşımı (viral izolat, RNA ve sekans verileri ve diğer laboratuvar verileri) için bir politikanın oluşturulması, örnek gönderilmesi anlaşmalarının yapılması
- Daha sonra yapılacak pandemik influenza araştırmalarında kullanılmak üzere olası ve kesin olgulara ait klinik örneklerin saklanması

Yedinci bölümde yer alan "**Araştırma ve Geliştirme"** faaliyetleri de önemli bir unsuru içermektedir. Gerekçede; "*Kanıta dayalı yanıtın geliştirilmesinde Ar-Ge kritik bir öneme sahiptir. Bir pandemi, virüsün kendisi ve halk sağlığı üzerine etkileri ile ilgili bilgimizi arttıracak pek çok araştırma ve veri toplamaya olanak sağlayacak bir duruma neden olacaktır. Bu bilgi etkili bir aşı ve tedavi geliştirilmesi için kullanılabilecek ve pandemi kontrol stratejilerinin en üst düzeyde etkili olabilmesini sağlayacak kanıtları artıracaktır*" denilmektedir. Bu başlıkta ana unsurlar aşağıdaki gereklilikler olarak tanımlanmaktadır.

- Doğrulanmış pandemik influenza klinik örneklerinin uluslararası paylaşımı (viral izolat, RNA ve sekans verileri ve diğer laboratuvar verileri) için bir politikanın oluşturulması, örnek gönderilmesi anlaşmalarının yapılması
- Pandeminin epidemiyolojik ve virolojik özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için araştırma protokollerinin geliştirilmesi ve bunların değerlendirilmesi

2.3 Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları Özelinde Pandemi Yönetimi

Dünya Sağlık Örgütü pandemik influenza planı doğrultusunda, ülkemizde de "Pandemik İnfluenza Ulusal Hazırlık Plan"ları hazırlanmakta ve güncellenmektedir. Bu rehber 2019 yılında güncellenerek yürürlüğe girmiştir. Rehberin amacı; pandemi öncesinde, pandemi sırasında ve pandemi sonrasında ülke çapında yapılacak çalışmaların etkinliğini artırmak amacıyla ulusal koordinasyonu, kamu ve özel kuruluşlar arasındaki iş birliğini, kuruluşların rollerini, sorumluluklarını ve yapılması gereken çalışmaları belirlemek ve pandemi faaliyet planlarının hazırlanmasında sağlık hizmeti sunan kurum ve kuruluşlara yol göstermektir. Bu kapsamda tüm evrelerde ve sağlık hizmetinin tüm basamaklarında hangi hazırlıkların yapılması gerektiği anlatılmaktadır.

Bu rehberde mikrobiyoloji laboratuvarlarının işleyişine yönelik detaylı bilgiye yer verilememiştir. Uluslararası rehberlerde olduğu gibi **laboratuvarların, pandemi planlarında yer alan stratejik hedeflerin hepsinde etkin rolü** olmalıdır. Bu stratejik hedefler arasında **etkenin insandan insana bulaşmasının sınırlandırılması, hastaların erken tanısı ve izolasyonu, hayvan kaynakları ve bulaş yollarının saptanması, etken tanısı, tiplendirilmesi ve tanı tedavi süreçlerinin geliştirilmesi için araştırma ve geliştirme faaliyetlerinde bulunulması yer almaktadır.** Yine ulusal planda, pandemi sürecinde oluşturulması düşünülen birimlerde tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları temsiliyeti sınırlı tutulmuştur. Tüm birimlerin görevleri detaylı bir şekilde anlatılırken, laboratuvarların çalışma sistemleri, birbirleri ile iletişimleri, lojistik desteği nereden ve nasıl sağlayacakları ayrıntılı bir şekilde belirtilmemiştir. Bakanlık operasyon merkezinde yer alan sürveyans biriminin görevleri arasında sendromik ve laboratuvar sürveyans hizmetlerinin yürütülmesi, koordinasyonu ve uluslararası referans laboratuvarlarıyla iletişimi belirtilmiştir. Ancak bu hizmetlerde laboratuvarların görev ve sorumlukları detaylı bir şekilde yer almamıştır. İl düzeyinde ise İl Sağlık Müdürlüğünün tanı, tedavi ve laboratuvar kapasitesinin devamlılığı için personel ve malzeme desteğinin sağlanması görevleri arasında yer alırken, ildeki operasyon merkezinde laboratuvarları temsilen Halk Sağlığı Laboratuvar temsilcisi bulunmakta, ilde bulunan üniversite ya da devlet/eğitim araştırma hastaneleri (EAH) laboratuvar temsilcileri bu yapı içinde yer almamaktadır.

Söz konusu planda laboratuvarların işleyişi ile ilgili konulara yer verilememesi; olağan koşullarda işleyen ve mevzuat ile tanımlanmış bir ulusal laboratuvar sistemimizin olmamasına bağlı olabilir. Bir başka bakış açısıyla "de facto"(10) (*de facto*= ECDC tarafından ulusal resmi bir mevzuatı olmamakla birlikte ülkede kabul edilmiş, tarihsel geçmişi olan enstitüler ve referans laborauvarlar) ulusal referans laboratuvarlarımız tarafından yürütülen sürveyans ağlarımız olmakla birlikte bu ağların genişletilmesi veya yenilerinin eklenmesine ilişkin bir düzenleme bulunmamaktadır. Ulusal planlar sağlık sisteminde yer alan tanımlanmış sistemler üzerinden geliştirildiğinden ve ülkemizde mevzuat ile tanımlanmış bir laboratuvar ağ yapısı bulunmadığından bu planda laboratuvarlar için geniş bir bölüm ayrılamadığı düşünülmektedir.

Pandemiler disiplinler arası sürdürülmesi gereken süreçlerdir. Tüm sağlık sisteminde bulunan kapasitenin bilinmesi ve güncel tutulması pandemi hazırlığı için çok önemlidir.

Mikrobiyoloji laboratuvarları özelinde aşağıda yer alan maddeler pandemi yönetimi için çok önemlidir:

- Laboratuvar kapasitesinin nasıl kullanılacağının tanımlanması,
- İnsan gücü ve teknik alt yapının pandeminin gerekleri doğrultusunda artırılması,
- Eğitimli personel istihdamı,
- Verilerin toplanması ve saklanması,
- Bildirim ve analizi için pratik ve kolay kullanılabilir yazılımların hayata geçirilmesi,
- Ülkedeki tüm kit ve sarf malzeme tedarikçileri ile işbirliği içinde sahadaki ihtiyaçların hızlı bir şekilde giderilmesi.

Pandemi öncesinde ulusal düzeyde bu hazırlık ve koordinasyon sürdürülürken, yerel merkezlerde her laboratuvar olağanüstü durumlar için bir eylem planı hazırlamış olmalıdır. Pandemi sırasında da ulusal ve yerel merkezler kurumun her türlü olanaklarını kullanarak, eşgüdüm içinde resmi otoritelere gerekli desteği sağlamalıdır.

Ülkemizde iyi donanımlı bir tıbbi mikrobiyoloji alt yapısı bulunmakla birlikte bu kapasitenin çok etkin kullanılamadığı söylenebilir. Özellikle tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının idari ve teknik kapasitelerinin halk sağlığının korunmasına yönelik kullanılmasında belirli bir strateji bulunmamaktadır ya da uygulayıcılar görev ve sorumluluklarını yeterince bilmemektedirler. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının bulaşıcı hastalıkların sürveyans sistemine entegrasyonu ile ilgili özel bir mevzuat olmaması, kurumların bu alanda görev ve sorumlulukları ile ilgili farkındalık düzeylerini düşük tutmaktadır. Gerek mevzuat eksikliği gerekse işleyişte de tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının sistemin dışında sadece sonuç veren tanı laboratuvarları olarak konumlandırılması bulaşıcı hastalıkların sürveyansı ve olağanüstü halk sağlığı acilleri için tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının mevcut kapasitesinin de kullanılamamasına neden olmaktadır. Yeni enfeksiyon hastalıkları tehditlerinin devam edeceğinden hareketle güçlü yönler tanımlanarak yol alınmalıdır. Bu güçlü yönler arasında; iyi işleyen sürveyans ağlarındaki deneyimler, referans laboratuvarların deneyimleri, deneyimli tıbbi mikrobiyoloji uzmanlarının bulunması, bu alanda emek veren tüm üniversiteler, eğitim ve araştırma hastaneleri, eğitimli ve deneyimli teknik personel, güçlü sivil toplum örgütleri yer almaktadır. Ulusal laboratuvar sistemini güçlendirmek için karar vericilerle birlikte uluslararası rehberlerde tanımlandığı şekilde pandemi planlarını iyileştirmek ve güncellemek, atılması gerekli en önemli adımlardan birisi olacaktır.

Kaynaklar

1. Pandemik influenza Ulusal Hazırlık Planı, T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, 2019.
2. Pandemic Influenza Risk Management: A WHO guide to inform and harmonize national and international pandemic preparedness and response. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Essential steps for developing or updating a national pandemic influenza preparedness plan. Geneva: World Health Organization; 2018.Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
4. A checklist for pandemic influenza risk and impact management: building capacity for pandemic response. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence:CC BY-NC-SA 3.0 IGO)
5. Uluslararası Sağlık Tüzüğü. 25/4/1973 tarih ve 14517 sayılı Resmi Gazete
6. Joint External Evaluation Tool: International Health Regulations (2005), Second Edition. Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO).
7. Kirk CJ, Shult PA. Developing aboratory networks: A practical guide and application. Public Health Rep. 2010 May-Jun;125 Suppl 2: 102-9. doi: 10.1177/00333549101250S213. PMID: 20518451; PMCID: PMC2846809.)
8. Parekh, Bharat & Fonjungo, Peter & Kalou, Mireille & Rottinghaus, Erin & Puren, Adrian & Alexander, Heather & Cox, Mackenzie & Nkengasong, John. (2018). Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. Clinical Microbiology Reviews. 32. 10.1128/CMR.00064-18.
9. https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-work/disease-and-laboratory-networks. Erişim tarihi: 30.03.2021
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC; 2010. ISBN 978-92-9193-211-5. doi 10.2900/29017

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 3

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUVARLARINDA PANDEMİ ÖZELİNDE ACİL DURUM VE AFET YÖNETİMİ

3.1 Afetler

Afetler, etkilenen toplum veya çevrenin, dışarıdan yardım almasını gerektirecek büyüklükte fiziksel, sosyal, ekonomik hasar, ekolojik yıkım, insan/hayvan ölümü, hastalık, sakatlık ve sağlık hizmetlerinin bozulmasına yol açan, normal yaşamı ve insan faaliyetlerini tamamen durdurarak veya kesintiye uğratarak toplulukları olumsuz etkileyen doğal, teknolojik veya insan kaynaklı olaylardır.

Oluş sebebine göre afetler iki ana başlık altında toplanır:

3.1.1 Doğal afetler

Doğal afetler: Doğanın kendi davranışlarından kaynaklanırlar; fakat doğanın davranışlarını etkileyen insan unsuru da bu tür afetlerin tetikleyicisi olabilir. *Meteorolojik afetler* (sel, su taşkınları, tsunami, siklonlar, fırtına ve kasırgalar, hortum, tipi ve kar fırtınası, çığ düşmesi, dolu fırtınası, kuraklık, vb.), *topografik afetler* (depremler, volkanik patlamalar, toprak kaymaları ve heyelanlar, gök taşı düşmesi, vb.), *çevresel afetler* (küresel ısınma, ozon tabakası delinmesine bağlı UVB radyasyonu, güneş patlamaları, yangınlar, çevre kirliliği, ormansızlaşma, çölleşme, vb.) bu grup altında sınıflandırılabilir.

3.1.2 İnsan kaynaklı (beşeri) afetler

İnsan kaynaklı (beşeri) afetler İnsanın doğayla olumsuz etkileşimi sonucunda ortaya çıkan, doğa kaynaklı olmayan afetlerdir. Eğitimsizlik, bilgisizlik, dikkatsizlik, yeterli önlemlerin alınmaması gibi sebeplerden ötürü kaza veya kasıt sonucu ortaya çıkarlar. *Teknoloji kaynaklı afetler* (taşımacılık ve ulaşım kazaları, yangınlar, vb.), *endüstriyel afetler* (biyolojik, kimyasal, radyoaktif saçılmalar, hava/toprak/su kirliliği, asit yağmuru, vb.), *savaşlar ve silahlı saldırılar* (savaş, iç savaş, terörizm, çatışmalar, vb.), *salgın hastalıklar* (salgınlar, biyoterörizm) beşeri afetlerdendir.

İçinde bulunduğumuz COVID-19 pandemisi de insan kaynaklı afetlerdendir.

Afetin boyutu üzerine etkili faktörler üç başlık altında toplanır:

1. Konağa ait faktörler (yaş, komorbiditeler, bağışıklanma durumu, duygusal kararlılığı, vb.)
2. Çevresel faktörler (fiziksel, kimyasal, biyolojik, sosyal, psikolojik faktörler, vb.)
3. Afete ait özellikler (öngörülebilirliği, kontrol edilebilirliği, ortaya çıkış hızı, erken uyarı için kullanılabilecek zaman, afetin gerçekleşme/etkileme süresi, etkisinin boyutu ve yoğunluğu, vb.)

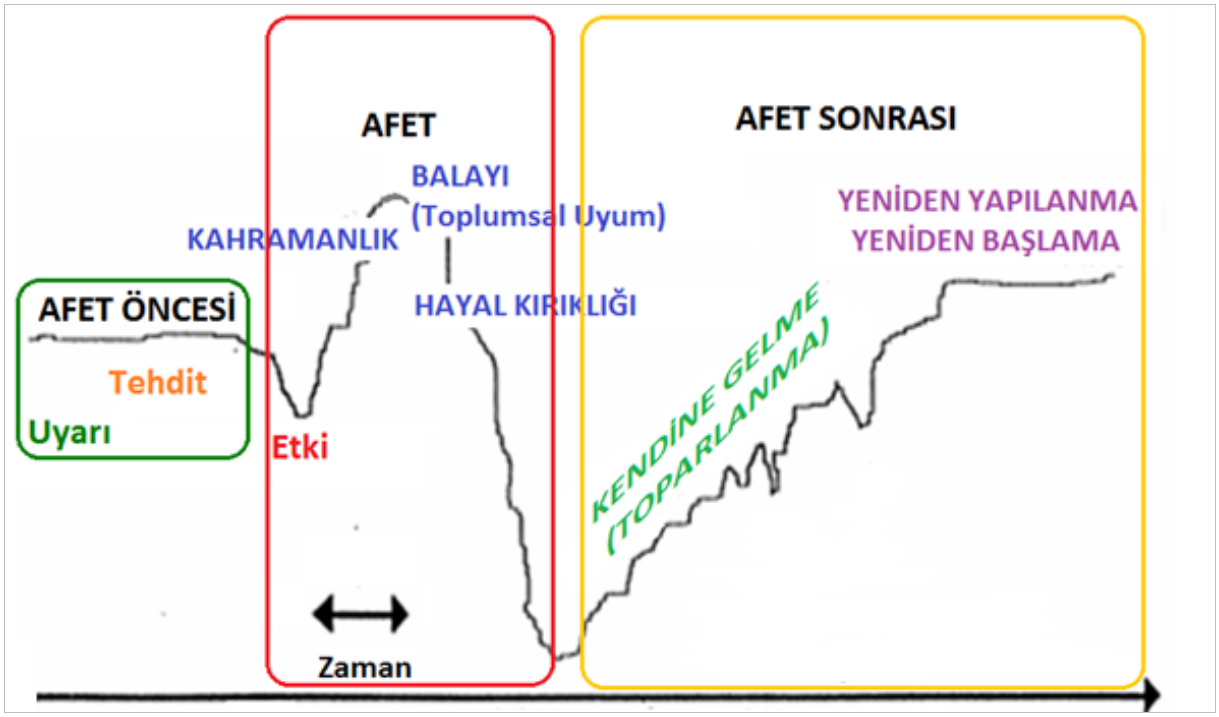
Afetin üç evresi vardır (Şekil 3.1):

- Afet öncesi dönem
- Afet dönemi
- Afet sonrası dönem

Afet öncesi dönem; afete hazırlık dönemidir. Bu dönem ne kadar başarılı gerçekleştirilirse, afete müdahale ve sonraki iyileşme dönemleri de o kadar başarıyla tamamlanır. Afetin gerçekleşmesi ile yüksek motivasyon ve kapasite kullanımı ile yerine getirilen işler, süreç uzadıkça yerini kanıksamaya, yılgınlığa ve tükenmeye bırakır.

Afet sonrası bireysel ve toplumsal iyileşme süreci;

- Başarılı iyileşme programlarının hazırlanmasına,
- Sağlık yönetiminde doğru müdahalelerin gerçekleştirilmesine,
- Sağlık-psikolojik-sosyal-ekonomik destek sunumuna,
- Hastanelerin (ve sağlık personelinin) ulaşılabilir ve etkin olmasına,
- Çevre sağlığını koruyucu tedbirlerin alınmasına
- Tehlikeyi algılama ve müdahale etme becerisinin geliştirilmesine bağlı olarak değişkenlik gösterir.



Şekil-3.1 Afetin evreleri

3.2 Afet Yönetimi

Afetlerin önlenmesi ve zararlarının azaltılması, afet sonucunu doğuran olaylara zamanında, hızlı ve etkili olarak müdahale edilmesi ve afetten etkilenen topluluklar için daha güvenli ve gelişmiş, yeni bir yaşam çevresi oluşturulabilmesi amacıyla yapılması gereken topyekûn mücadele **afet yönetimi** olarak adlandırılmaktadır. Afet yönetimi, ilgili kurum ve kuruluşların kaynakların kullanımını; afet öncesi (risk analizi, zarar azaltılması/ortadan kaldırılması, afete hazırlık), afet sırası (afete müdahale) ve afet sonrasında (iyileştirme) ortak amaç doğrultusunda uygun planlaması ile gerçekleştirilir.

Bütünleşik (entegre) afet yönetimi, afetlerle baş edebilen bir toplum oluşturmak için tüm tehlikeleri dikkate alan, afet yönetim basamakları olan zarar azaltma, hazırlık, müdahale ve iyileştirme aşamalarında yapılması gereken çalışmaları ve alınması gereken önlemleri ortaya koyan, toplumun tüm güç ve kaynaklarının kullanımı ile gerçekleştirebilen bir yönetim sürecidir.

3.2.1 Bütünleşik afet yönetimi basamakları

3.2.1.1 Zarar azaltma ve hazırlık

Zarar azaltma; afet tehlikesi ve riskinin belirlenmesiyle bunlardan kaçınılması, etkilerinin önlenmesi veya en aza indirilmesi ve kayıpların tazmini için alınan tedbirleri içerir. Zarar azaltma; etkili eğitim, organizasyon ve yönetimle, uygun yöntemlerle olayın ortaya çıkma olasılığını azaltarak afeti engellemeyi amaçlayabileceği gibi, olayın yaratacağı etkilerin boyutunu azaltarak, olaya maruz kalanların zarar görmesini önlemeyi ya da en aza indirmeyi de amaçlayabilir. Bu aşamada yapılması gereken faaliyetler:

- Tahmin ve erken uyarı sistemlerinin geliştirilmesi
- Risk analizlerinin yapılması
- Standart uygulama prosedürlerinin geliştirilmesi
- İletişim ve müdahale mekanizmalarının oluşturulması
- Afete müdahale aşamasında gerekecek temel kaynakların temini
- Temel kaynakların saklanması ve sevk edilebilir ya da sevke hazır hale getirilmesi
- Eğitim programlarının düzenlenmesi ve tatbikatların yapılması
- Bilgi ve haberlerin basınla paylaşılması ve duyurulmasının sağlanması
- Müdahale hazırlıklarının yapılması ve yönetiminin sağlanması

Pandemiye müdahale açısından bakıldığında yapılması gerekenler aşağıda belirtilmiştir.

- Müdahale edecek sağlık personeli işgücünün arttırılması, ekiplerin oluşturulması ve iş bölümünün yapılması
- Hasta ve temaslıların değerlendirilmesi ve triaj standartlarının belirlenmesi
- Sağlık birimleri için gerekli stokların oluşturulması (tanı kitleri, ilaç, kişisel koruyucu donanım, vb.) tüm hastanelerin (üniversite, kamu ve özel hastaneler dâhil) acil durum plan ya da krokilerinin hazırlanması
- Hasta kabul, takip ve laboratuvar tanı kapasitelerinin belirlenmesi
- Uygun tanı - tedavi prosedürlerinin belirlenmesi ve tanı-tedavi algoritmalarının geliştirilmesi
- Tıbbi bakım birimi olarak görev yapabilecek bakım merkezlerinin belirlenmesi
- Birimler arası yapısal ve işlevsel bütünlüğün sağlanması, iletişim yollarının tanımlanması

Görev alacak ekiplerin işlerini yapabilmeleri için gereklilikler:

- Pandemi durumunda gerekecek ilk ve acil müdahalelerin belirlenmesi
- Bu müdahaleleri gerçekleştirebilmek için gerekecek temel ihtiyaçların tanımlanması
- Stoklarının oluşturulması ve koordinasyonlarının sağlanması

3.2.1.2 Müdahale

Afet sırasında insanların can/mal güvenliğini sağlamak, temel ihtiyaçları belirlemek ve daha fazla hasarın ortaya çıkmasını ya da yayılmasını önlemek üzere tasarlanmış eylemlerin tümünü kapsar. Müdahale süresi ne kadar başarıyla ve hızla tamamlanırsa iyileşme evresine geçiş o kadar çabuk olur. Müdahale çalışmalarına afetin hemen ardından başlanmalıdır. Tüm afetlerde bulaşıcı hastalıkların ortaya çıkma riski artar. Alt yapının bozulması, suların kontaminasyonu, kalabalık yaşam, kötü beslenme, vb. faktörler bu riski doğuran ve arttıran unsurlardır. Sadece enfeksiyon etkeni ile temasın ve enfeksiyon riskinin önlenmesi/azaltılması değil, toplum ve sağlık çalışanlarının akıl sağlığının korunması, biyolojik atıkların yok edilmesi, kurumsal ve kurumlar arası iletişim stratejilerinin belirlenmesi, iletişimin sağlanması için gerekli planlamanın yapılması ve koordinasyonun sağlanması gereklidir.

3.2.1.3 İyileşme ve yeniden yapılanma:

Afete müdahale ile başlayan ve devamlılık gösteren, hayatın normale dönmesini sağlayan çalışmaların yapıldığı, rehabilitasyon programlarının yer aldığı safhadır. Tüm insani ve fiziksel bileşenlerin tekrar yapılandırılarak, afet öncesi durumlarına (hatta daha iyiye) getirilmesi için gerekli tüm adımları kapsayan uzun bir süreçtir. Afetten etkilenen veya zarar gören tüm insan aktivitelerinin afetten önceki düzeyden daha ileri bir düzeyde karşılanabilmesi, bu safhada yapılacak faaliyetlerin ana hedefidir. İyileşme ve yeniden yapılanma süreci, afetin sona ermesinden sonra, afet etkilerinin en aza indirilmesi, kayıpların tazmini, afetin tekrarlaması durumunda da oluşabilecek zararın en aza indirilmesi için alınan tedbirleri kapsar.

Afet yönetiminin genel prensipleri

1. Devletin tüm resmi kurumlarının sorumluluğudur.
2. Hazırda bulunan kaynaklar kullanılmalıdır.
3. Organizasyonlar, kendi çekirdek görevlerinin bir uzantısı olarak görev yapmalıdır.
4. Her birey kendi güvenliğinden sorumludur.
5. Planlama sadece büyük boyutta olaylar için yapılmalı, olaylarla afetlerin arasındaki farkı ortaya koymalıdır
6. Fiziksel çevre ve toplumun yapısı gibi özellikleri dikkate almalıdır.
7. Düzenlemeler resmi olmayan kurum/kuruluşların da yer almasını sağlamalı ve rolünü tanımlamalıdır.

3.3 Afetlerde Laboratuvar

Tüm afetlerde tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları üç temel görevi üstlenir.

1. Yüksek mortalite/morbiditeye sahip bulaşıcı hastalıkların laboratuvar tanısının konması,
2. Afetten etkilenenlerin ve toplumun diğer kesiminin tıbbi bakımı için gerekli temel laboratuvar testlerinin uygulanması
3. Zamanında ve güvenli kan ve kan ürünlerinin sağlanması

Pandemide Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarının temel görevi, enfeksiyon etkeninin zamanında ve güvenilir şekilde tanımlanmasına yönelik testlerin uygulanması ve raporlanmasını sağlamaktır. Laboratuvar, tüm temel sağlık/laboratuvar hizmetlerinin kesintisiz sunulmasına yönelik olarak istenen ve en azından acil/hayati öneme sahip olan testleri de yapabilmeli, artan örnek yükünü kaldırabilmeli, çalışanları için güvenli ve rahat bir ortam sağlayabilmelidir.

Laboratuvarlar ve kan bankalarının etkin işleyişinin sağlanması için gereklilikler:

1. Laboratuvarın/kan merkezinin hasar görme riskinin en aza indirilmesi
2. Hastane acil durum eylem planı ve/veya ulusal acil durum eylem planına laboratuvar eylem planlarının entegrasyonunun sağlanması
3. Afetin olduğu dönemde toplumda sık görülen hastalıkların hızlı tanısına yönelik testlerin devamlılığının sağlanması
4. Laboratuvar hizmetlerinin en acil ve önemli testlerle sınırlandırılması
5. Acil ihtiyaca cevap verebilecek sağlıklı kan stoğunun bulundurulması

Afetlerde tanı laboratuvarlarının maliyet etkin yöntemler kullanarak gerçekleştirmesi gereken faaliyetler:

- Klinik anlamı olan durumlar için laboratuvar tanısı koyabilmeli
- Tedaviyi yönlendirmeye ve tedaviye yanıtın izlenmesine yönelik gerekli testleri (antimikrobiyal duyarlılık testleri, hızlı tanı testleri, vb.) uygulayabilmeli
- Taramaları gerçekleştirmeli
- Epidemiyolojik veri sağlayarak sağlık yönetimi ve planlamasına katkı sunabilmeli

Bu nedenle afet döneminde laboratuvar testlerinin istenmesine ilişkin katı endikasyon kuralları olmalıdır.

3.3.1 Laboratuvarın afete hazırlanması

Laboratuvarlar ve kan bankaları, kendilerine ait afet eylem planları hazırlamalı, bunları ulusal afet programı ve sağlık sektörünün genel afet planları içerisine yerleştirmelidir. Bir başka ifade ile bu planlar genel ya da ulusal afet planları eşgüdümünde olmalı ve uygulanmalıdır. Laboratuvarların afet öncesinde acil eylem planlarını bu planlar doğrultusunda hazırlayabilmesi için, sağlık otoritesinin ulusal düzeyde laboratuvar iş akışlarını belirlemiş ve kurumsal düzenlemeleri gerçekleştirmiş olması kritik öneme sahiptir.

Afet eylem planları hazırlanırken aşağıdaki hususlar göz önünde bulundurulmalıdır.

- Doğal, teknolojik, sosyal veya biyolojik faktörlere bağlı olarak ülkenin veya belli bir bölgenin, hangi afetler açısından risk altında olduğunun tanımlanması ve önceki deneyimlere dayanarak olası sağlık ve temel ihtiyaç senaryolarının oluşturulması

- Ülkenin veya belli bir bölgenin epidemiyolojik profilinin çıkartılması ve afet durumunda hangi faktörler açısından duyarlı bir topluma sahip olunduğunun değerlendirilmesi
- Servislerin fiziksel ve organizasyonel kapasitesinin belirlenmesi
- Su ve elektrik kaynağı, iletişim ve taşıma gibi servislerin hizmet vermesini sağlayacak temel destek servislerinin etkilenme potansiyelinin belirlenmesi
- Organizasyonel ve kurumsal yanıt kapasitesinin değerlendirilmesi, kilit öneme sahip personelin görevlerinin belirlenmesi
- Laboratuvarlar arası ve laboratuvarlarla diğer kuruluşlar (sağlık bakanlığı, halk sağlığı genel müdürlüğü, diğer sivil ve askeri hastaneler, ilgili diğer bakanlıklar, üniversiteler, sosyal güvenlik kurumları, gümrükler, havaalanları, vb.) arası koordinasyonu sağlayacak mekanizmaların tanımlanması
- Afet eylem planının tüm laboratuvar çalışanları tarafından bilinir ve uygulanabilir olmasının sağlanması
- Planların işlerliğinin değerlendirilmesi için periyodik tatbikatlar yapılması
- Afet hazırlık ve müdahale aktiviteleri için bütçe oluşturulması

Afet gerçekleşmesi durumunda, hasarın azaltılması için öncelikle laboratuvarların duyarlılık ve etkilenebilirlik analizlerinin yapılarak sistemin özgül risklere sahip kritik noktalarının belirlenmesi gerekir. Bu analizlere dayanarak sorumlu otoriteler, yapısal ve fonksiyonel unsurlar için önerilen değişiklikler ve düzenlemelerden sağlanacak yararın olası finansal ve sosyal kayba karşı dengesinin değerlendirildiği bir maliyet etkinlik analizi oluşturmalıdır. Bu analiz yapılırken şu hususlar dikkate alınmalıdır.

- **Laboratuvarın bulunduğu binanın unsurları:** Yapısal unsurları (bacalar, kolonlar, kirişler, yük taşıyan duvarlar, vb.), yapısal olmayan unsurları (dış duvarlar, pencereler, tavanlar, vb. mimari yapılar), kritik sistemler (su, elektrik ve iletişim) ve laboratuvar donanımı (destek malzemeler, cihazlar, teknik donanım, mobilya vb)
- **Laboratuvarın fonksiyonel unsurları:** Alan kullanımı, farklı kritik bölgelere ulaşım veya birimler arası bağlantılar vb. iç mimari özellikler; binaya giriş yolları vb. dış mimari özellikler ve yönlendirmeler, acil çıkış kapıları, yangın söndürücülerin varlığı ile personel eğitimleri ve personelin afete hazırlıklı olmasının sağlanması gibi idari ve organizasyonel unsurlar değerlendirilmelidir.

Afetin ilk günlerinde laboratuvarlar kendi temel ihtiyaçlarını karşılayacak kapasiteye sahip olmalıdır. Ancak tanımlanan afet bir pandemi ise, zaman ilerledikçe, bireylerin sadece pandemi etkeni ile değil, diğer çeşitli ve ciddi enfeksiyon etkenleri ile enfekte olma olasılıkları da artar. Dolayısı ile laboratuvarların farklı enfeksiyon etkenlerini tanımlayacak şekilde hizmetlerini genişletmesi gerekebilir.

Bu nedenle laboratuvarın aşağıdaki bilgilere sahip olması gerekir.

- Laboratuvarın hizmet verdiği bölgenin nüfusunu ve bu nüfusun özelliklerini (yaş-cinsiyet dağılımı, sık görülen hastalıklar, vb.)
- Sık karşılaşılan enfeksiyon etkenlerini, o bölgenin geçmişinde ortaya çıkmış salgınları
- Bölgedeki vektörleri ve dağılımları
- Bölge halkının etken(ler)den korunma durumu(aşılamalar, aktif bağışıklık, vb.)

Bu süreçte her etkenin laboratuvarda tanımlanması mümkün değilse, hasta örneklerinin uygun şekilde saklanması ve nakli için güvenli yolların belirlenmesi gereklidir. Laboratuvarlar bu dönemde aşırı çalışma ve tehlikeli patojenlere maruz kalma riski altında kalacaktır.

Unutulmamalıdır ki; laboratuvar, temel ihtiyaçların ne kadar üzerinde hizmet vermeye başlarsa laboratuvarın ihtiyaç ve harcamaları o kadar artar; birimin etkin çalışması ve yeterli personel temini o kadar güçleşir!

Laboratuvarın afet durumunda aşağıdaki başlıklar açısından nasıl bir yol izleyeceğini belirlemesi ve bunları gerekli tüm hastane/laboratuvar çalışanları ile paylaşması uygundur.

- Hangi testlerin yapılmaya devam edeceği
- Kullanılan tanı testleri için yöntemin analitik performans parametreleri
- Farklı testlerin sonuçlanma süreleri
- Hangi örneklerle çalışılacağı
- Çalışanların hangi temel bilgilere ihtiyacı olacağı
- Laboratuvar çıktısı üzerine etkili olabilecek pre-analitik/analitik ve post-analitik hata kaynakları,
- Örnekler başka bir laboratuvara gönderilecekse aşağıdaki durumların belirlenmesi
  - Hangi testler için örneklerin gönderileceği
  - Örneklerin hangi koşullarda, ne kadar süre saklanacağı
  - Örneklerin gönderilme koşulları

Laboratuvar personelinin temel becerilerinin geliştirilmesi ve bunların belli aralıklarla pekiştirilmesi için afet öncesinde laboratuvar içi eğitim programları düzenlenmelidir. Dış kalite kontrol programları da eğitimin bir parçasıdır ve laboratuvar sonuçlarının objektif olarak değerlendirilmesini sağlar.

Laboratuvarlar afette; salgının tanımlanması, salgın etkeninin ve özelliklerinin belirlenmesi, kaynağının saptanması, bulaşma yollarının ortaya konması ve izlenmesi gibi epidemiyolojik verileri sağlamakla da yükümlüdür. Bunun için laboratuvarın, testleri gerçekleştirecek eğitimli personel ve malzemeye ihtiyacı vardır. Bu ihtiyacın tanımlanmasında aşağıdaki unsurların dikkate alınması gerekmektedir.

- Laboratuvarlarda kalite kontrolünün nasıl sağlanacağı
- Örneklerin hangi durumda hangi laboratuvara gönderileceği
- Örneklerin saklanma ve taşınma koşulları
- Test sonuçlarının raporlanması ve bildirimi
- Özel eğitimli personel gereksiniminin olup olmadığının belirlenmesi ve varsa bu eğitimin ne şekilde gerçekleştirileceğinin tanımlanması

Laboratuvar düzenlemeleri ulusal afet/pandemi planları ile eşgüdümde olmalıdır. Uluslararası Sağlık Tüzüğü (UST) ile uyumlu belgeler ve/veya o afet/pandemi için hazırlanmış tüm hazırlık belgeleri bu amaçla kullanılabilir.

Laboratuvarlar kendi **öz denetiml**erini yaparak afet durumunda hangi testleri ne şekilde yapabileceğine, hangilerini dış merkezlerde yaptırabileceğine karar vermeli, bunun için yerinde detaylı değerlendirme yapmalıdır!

Laboratuvarın temel hizmetlerini sürdürebilmesi ve salgında aktif rol oynayabilmesi için gerekliliklar:

1. **İyi tasarlanmış ve iyi tefriş edilmiş olması, binada uygun ve güvenli bir konumda bulunması gereklidir.**
   a. Pencereler sağlam, sıkı kapalı olmalıdır. Pencerelerde sineklik bulunmalıdır.
   b. Duvarlar yağlı boya veya silinebilir/kolay temizlenebilir malzemeden olmalıdır.
   c. Tezgâhlar sağlam, sabit ve ergonomik (yerden yaklaşık 90 cm yükseklikte) olmalı, kimyasallara ve aleve dirençli olmalı, mümkün olduğunca ek yeri bulundurmamalıdır.
   d. Laboratuvar malzemesinin yerleşimi laboratuvarda etkin çalışmaya uygun ve ergonomik olmalıdır.
2. **Temiz ve atık su, elektrik, telefon, havalandırma, vb. alt yapı olanakları sağlam ve güvenilir olmalıdır.**
   a. Yeterli sayıda ve atığın cinsine uygun atık bidonu/kabı olmalıdır.
   b. Su arıtma sistemi bulunmalıdır.
   c. Alt yapının tamamen bozulması durumunda laboratuvarın atık sisteminin tamamen kapatılması gerekebileceğinden mümkünse ayrılmalıdır.
   d. Elektrik kaynağı, belirlenen testler için gerekli olan cihazları çalıştırmaya yetecek güçte olmalıdır. Yedek jeneratör bulunmalıdır.
   e. Pil bankası ve dolum cihazları bulunması önemlidir. Mümkünse laboratuvar, yedek/ tükenmeyen enerji kaynakları (güneş enerjisi, vb.) ile desteklenmelidir. Gerektiği takdirde kliniklere güç veren birimden laboratuvara güç aktarımı yapılabilmelidir.
   f. Laboratuvarda sıcaklık kontrolü sağlanabilmelidir (>30°C sıcaklıklarda veya yüksek nem altında kişisel koruyucu donanımın kullanılması zordur, birçok test bu sıcaklıkta hatalı sonuç verir, cihazlar hata bildirimi yapar). Bununla birlikte, mikroorganizmaların yayılmasına neden olabileceğinden soğutma amaçlı vantilatör kullanımından kaçınılmalıdır. Kapıların veya pencerelerin tek taraflı açılarak (laboratuvar iş akışı yönünde akım yaratacak şekilde) laboratuvarın havalandırılması tercih edilmelidir, laboratuvardan dışarı hava çıkmamalıdır.
3. **Atık yönetimi ve çevre kontrolü uygun şekilde sağlanmalıdır.**
   a. Sıvı mikrobiyolojik materyal atılmadan önce ısı veya kimyasallarla muamele edilmelidir.
   b. Enfeksiyöz katı malzemeler yakılmalıdır.
   c. Atık kutuları temin edilmeli ve dolunca yakılmalıdır.
   d. Vektör kontrolü sağlanmalıdır (böcek ve kemirgenler laboratuvarın içine girememelidir). Vektörler laboratuvarda iş yapılmasını engeller, kontaminasyona neden olur, etkenlerin laboratuvar dışına taşınmasında aracı olarak görev yapar.
4. **Belirlenen testleri yapacak kapasitede ve sayıda personel olmalıdır.**
   a. Mümkün olduğunca eğitimli laboratuvar personeli çalıştırılmalıdır.
   b. Mümkün olduğunca laboratuvarın kendi personelini çalıştırması tercih edilmelidir.
   c. Bakteriyoloji, viroloji, seroloji, mikoloji, parazitoloji, hematoloji testleri için eğitimli personel bulunmalıdır.
   d. Laboratuvar sorumlusu deneyimli, bilgili, personel ve stok yönetimi konusunda donanımlı olmalıdır.
   e. Laboratuvarda afet/pandemi koşullarına uygun çalışma düzeni sağlandıktan sonra güncel eğitimlerle personel sayısı arttırılmalıdır.

5. **Yapılacak testlerin ve laboratuvar işlemlerinin tamamı için standart işlem prosedürleri olmalıdır. Bunlar en azından aşağıdaki bilgileri içermelidir.**
   a. Testin adı,
   b. Uygulanacak yöntemin basamakları
   c. Yöntem riskleri ve biyogüvenlik önlemleri
   d. İç ve dış kalite değerlendirme protokolleri
   e. Stok kontrol protokolleri (kritik stok miktarı)
6. **Sonuçların doğruluğu için iç ve dış kalite kontrol programları olmalıdır.**
7. **Yapılacak testler ve maruz kalınabilecek etkenler için güvenlik politikası olmalıdır.**
   a. Biyogüvenlik rehberi oluşturulmalıdır.
   b. Yeterli KKD, ilk yardım, göz yıkama istasyonu, duş, yangın söndürücüler bulunmalıdır.
8. **Yapılacak testler için uygun donanıma, yeterli kimyasal ve sarf malzemeye sahip olmalıdır.**
   a. Laboratuvar donanımı, yapılacak testler için uygun olmalı, kullanımı, kurulması, çalıştırılması, idamesi, temizlenmesi kolay olmalıdır.
   b. Yüksek riskli bölgelerdeki laboratuvarlarda donanım duvara veya tezgâha sabitlenmelidir.
   c. Buzdolapları ve dondurucular mümkün olduğunca kapağı üstten açılır tipte olmalıdır, temiz ve kirli dolapları ayrılmalıdır.
9. **Teknik ve lojistik desteği olmalıdır.**
10. **Ulaşım imkânları iyi olmalı ve dış bağlantıları olmalıdır.**

Afetin gerçekleşmesinin hemen ardından ulusal sağlık otoritesi tarafından belirlenen kurum, kuruluş ve ilgili laboratuvarlar tarafından UST ve ulusal afet planları doğrultusunda yapılması gerekenler şunlardır.

1. Laboratuvar ağı oluşturulması ve işlerliğinin sağlanması (gerektiğinde hasarın tanımlanması, giderilmesi ve laboratuvarın yeniden işler hale getirilmesi)
   a. Yerel laboratuvarların temel işlevlerinin kazandırılması
   b. Laboratuvar sarf ve kimyasallarının zamanında temini ve taşınması için girişimlerde bulunulması
   c. Örneklerin yeterli ve etkin toplanmasının sağlanması
   d. Erken ve güvenilir tanı sistemlerinin oluşturulması
   e. Bilginin aktarılması/paylaşılması için güvenli ve işlerliği olan iletişim kanallarının oluşturulması ve kullanılmasının sağlanması
   f. Hastalıkların kaynağı, nedeni ve bulaş yollarının belirlenmesi ve değişikliklerin izlenmesi
   g. Teknik personelin bilgisinin güncellenmesi
   h. Verilerin kaydedilmesi
2. Filyasyon ekiplerinde eğitimli laboratuvar personelinin görevlendirilmesi
3. Saha çalışmalarında görev alacak laboratuvar ekiplerinin belirlenmesi
4. Aktivitelerin koordinasyonu

Kaynakların etkin kullanımı merkezi otoritenin önemli bir görevidir. Hızlı tanı testlerinin kullanılması, yerel düzeyde erken tanı için alternatif bir yol olsa da ilk vakaların mutlaka doğrulanması gerekir. Bunun için, hazırlık evresinde tanımlanan yollarla klinik örneklerin ulusal referans laboratuvarına gönderilmesi gereklidir.

Afetin gerçekleşmesinin hemen ardından her ilde İl Sağlık Müdürlüğü düzeyinde pandemi koordinasyon için gerekli kurullar oluşturulabilir. Pandemi koordinasyon kurulunun görevleri:

1. Belirli aralıklarda yapılan toplantılarla ilin genel durumu hakkında gerekli önlemleri alır.
2. Ulusal otorite tarafından tanı, tedavi ve temaslı takip protokollerini içeren vaka yönetim algoritması açısından güncellenen rehberlerin yerel düzeyde yetkilendirilmiş laboratuvarlara ve bu laboratuvarların bulunduğu kurumlara veri akışını sağlar.
3. Yetkilendirilmiş laboratuvarların lojistik, mal ve hizmet teminleri ve personel desteklerine yardımcı olur.
4. Yetkilendirilmiş laboratuvarda çalışacak personele gerekli eğitimlerin sağlanmasını koordine eder.
5. İldeki verilerin düzenli şekilde HSGM ve Sağlık Bakanlığına iletilmesinden sorumludur.
6. Yöneticilerin farklı yaklaşımlarını önlemek için gerekli bilgilendirmelerin ilgili kurumlara zamanında yapılmasını planlar.

Pandemi koordinasyon kurullarında; hızlı tanı, doğrulama, uygun mal ve hizmet alımı ile ildeki insan kaynaklarının doğru yönetimi için tıbbi mikrobiyoloji uzmanının bulunması önemlidir. Ancak bulunmuyorsa bu kurulla iletişim sağlanması, ildeki gelişmelerin izlenmesi ve gerekirse çalışmalara katkıda bulunulması gerekir!

Pandemi sonrası dönem; sürveyans ve hastalık kontrol çalışmalarının ağırlık kazandığı evredir. Salgının karakteristikleri incelenir (dolaşan serotipler/genotipler, direnç profilleri, virülans faktörleri, kaynaklar, vektörler, risk faktörleri vb), eğilim analizi yapılır. Sürveyans kapsamındaki diğer etkenler de bu dönemde ihmal edilmemelidir. Tüm operasyonel evre değerlendirilir ve ilerisi için dersler çıkartılır. Bu dönem, sonraki olası pandemiler için hazırlık dönemi ile devam eder.

3.4 Acil Eylem Planları

Acil durum ve afetlerde laboratuvarın hızlı tepki vermesini sağlayan plan ve programlara "acil durum hazırlık planı", "acil durum müdahale planı" veya "afet eylem planı" gibi isimler verilir. Acil eylem planının ana hedefi, acil durum/afet ortaya çıktığında laboratuvar hizmetlerinin kesintiye uğraması veya durmasını engellemektir. Bu nedenle iyi bir planlama ve hazırlık gerektirir. Acil eylem planı, sağlık kurumunun acil eylem stratejisinin bir unsuru olarak kurgulanmalıdır.

Acil eylem planı mutlaka yazılı olmalıdır. Acil müdahale gerektiren durumla karşılaşan personelin müdahale için ihtiyaç duyacağı tüm bilgiyi içermeli, çalışanların doğru yargılama ve sağduyulu davranmasını sağlayacak bir rehber olarak tasarlanmalıdır. Planda kullanılan ifade net ve anlaşılır, tasarlanan plan gerçekçi ve kolay uygulanabilir olmalıdır. Hazırlanması esnasında mümkün olduğunca çok personelin ve kilit sorumluların süreçte rol alması sağlanmalı, tüm personel tarafından plan ve planın uygulanmasındaki bireysel sorumluluklar biliniyor olmalıdır. Acil eylem planı hazırlanırken bölgeye özgü olası tüm afet senaryoları (deprem, toprak kayması, tsunami, kasırga, hortum, terörizm, salgın vb.) tanımlanmalıdır. Tüm çalışanlar, hastalar, ziyaretçiler, özel ihtiyacı olan bireyler için güvenlik ihtiyaçları karşılanmış olmalıdır. Acil müdahale unsurlarının yerleşim/ulaşım alanlarını (yangın söndürücüler, alarm sistemi, acil çıkışları vb.), iletişim bilgilerini (polis, itfaiye, vb) içermelidir. Acil durumda personelin alternatif rol ve sorumlulukları da yazılmalıdır (şoför, ilk-yardım görevlisi vb.) Psikolojik destek unsuru da planda dikkate alınmalıdır.

Acil eylem planı, programın kapsamı ve hedeflerini içeren açıklayıcı bilgiler, her bir acil durum için sorumlu(lar)ın listesi ve görev paylaşımı, hem iç hem dış kaynaklı afetlere müdahale sağlayabilecek çoklu senaryolara cevap oluşturabilecek şekilde hazırlanmış eylem planını içermelidir. Acil eylem planı hazırlanması için örnek yazım rehberi ekte verilmiştir.

Dış kaynaklı acil durumlar ve afetlerde (deprem, terörizm, salgın vb.) hasta sayısında artma, personel sayısında azalma beklenir. Hasta bakım merkezlerinin yeri değişebilir. Sarf ve ihtiyaç malzemelerinde yetersizlik yaşanabilir. Dekontaminasyon prosedürlerinin arttırılması ve halk sağlığı otoritelerinin bilgilendirilmesi gerekir. İç kaynaklı acil durumlarda (kesintiler, personel yetersizliği, grevler, bilgisayar çökmesi, vb.) ise, destek servislerinde aksama, veri kaybı, manuel işlemlerde artış, diğer laboratuvarlardan destek alınamaması gibi istenmeyen sonuçların ortaya çıkması beklenir.

Acil eylem planı hazırlanırken aşağıdaki adımlar izlenebilir.

1. Laboratuvarı etkileyebilecek olası afetleri ve laboratuvarın buna nasıl tepki vereceğini tanımlayın:
   - Bilgilendirilecek sorumluları belirleyin
   - Bilinmesi gereken telefon numaraları/çağrı kodlarını uygun yere asın
   - Kritik görevleri ve bu görevlerin sorumlularını belirleyin
   - Kritik alanları ve donanımları belirleyin
   - Güvenlik önlemlerini açıklayın
   - Tahliye planı oluşturun
2. Hasta bakımı için verilecek hizmetin boyutunu tanımlayın:
   - Tüm rutin testleri listeleyin
   - Önceliklerinizi belirleyin
   - Acil durumlarda uygulanacak minimum test menünüzü hazırlayın
3. İletişim planı oluşturun:
   - Kritik sağlık bakım personelini belirleyin
   - Kritik laboratuvar personelini belirleyin
   - Kritik ihtiyaçları belirleyin
4. Alternatif işlemleri/çözümleri belirleyin:
   - İşlerin yürütülebileceği alternatif alanları belirleyin
   - Servis işlerini gerçekleştirecek alternatif laboratuvar alanı belirleyin
   - Alternatif personel ve mesai planları hazırlayın

Acil eylem planı hazırlanması esnasında cevaplanması gereken kritik sorular şunlardır.

1. Testleri çalışmak için yeterli cihaz var mı? Kritik cihazlar neler? Bunlar jeneratöre bağlı mı? İşlerliği sürdürülebilir mi?
2. Testlerin çalışılması için yeterli miktarda sarf malzemesi var mı? Sarf malzeme zinciri, temin edilecek alternatif kaynaklar nelerdir?
3. Testleri yapacak personel sayısı yeterli mi? Bu kişilerin laboratuvara ulaşımı nasıl sağlanabilir? Yedekleri kimlerdir?
4. Test çeşitliliği acil durumda ihtiyaçları karşılar mı?
5. Laboratuvar iş göremez hale gelir veya kapanırsa testler nasıl çalışılabilir?
6. Veri akışını/bilgi güvenliğini sağlamak adına ne gibi önlemler alınabilir?

Hazırlanan acil eylem planı mutlaka tüm çalışanlarca biliniyor olmalı ve işlerliği tatbikatlarla ortaya konmalıdır. Tatbikatlarda belirlenen aksaklıklar kaydedilmeli, bunları ortadan kaldıracak şekilde plan revize edilmelidir. Yapılan her revizyon mutlaka planda belirtilmelidir.

Acil eylem planının başarısı;

- Olaylara ve olay esnasında yapılacaklara özgü detaylı akış şemalarının varlığına,
- Devam edecek yeterli ve etkin laboratuvar hizmetlerinin tanımlanmasına,
- Acil Servis ve Yoğun Bakım Ünitelerinin varlığına ve kullanılabilir olmasına,
- Etkin ve güncel iletişim ağının işlevsel olarak varlığına,
- Alternatif sağlık hizmeti sunucularının tanımlanmasına,
- Tatbikatların yapılmış olmasına bağlıdır.

Kaynaklar

1. Akdağ, S. E., Mali Yapı ve Denetim Boyutlarıyla Afet Yönetimi, Sayıştay Başkanlığı, Ankara, 2002.
2. Özcan AŞ. Afet ve acil durum yönetimi. Mahiyeti, ilgili kurumları ve kapsamı. İdarecinin sesi 2011; Mart-Nisan: 11-16
3. http://afetyonetimi.kizilay.org.tr/tr/default.html
4. http://www.ahder.org/definiciones/afet-yonetimi-nedir
5. http://www.ahder.org/definiciones/butunlesik-afet-yonetimi-nedir
6. Risk reduction and emergency preparedness, WHO six-year strategy for the health sector and community capacity development, ISBN 978 92 4 159589 6 © World Health Organization, 2007.
7. Communicable diseases following natural disasters: Risk assessment and priority interventions, World Health Organization, 2006.
8. Disaster Prevention and Preparedness, Lecture Notes For Health Science Students, Jimma University in collaboration with the Ethiopia Public Health Training Initiative, The Carter Center, the Ethiopia Ministry of Health, and the Ethiopia Ministry of Education, 2006. Funded under USAID Cooperative Agreement No. 663-A-00-00-0358-00.
9. Wallace R, Maxcy-Rosenau-Last-Public Health & Preventive Medicine, Fifteenth edition, United States of America, The McGraw-Hill Companies, Inc.;2008.
10. Park K, Park's Textbook of Preventive and Social Medicine,22nd Edition, Jabalpur,India, Bhanot Publications,2013.
11. Global Diseaster Preparedness Center.Position Paper on Crowd Management at Places of Mass Gatherings. Erişim Bağlantısı: https://preparecenter.org/resource/position-paper-crowd-management-places-mass-gatherings/ (son erişim tarihi:29.09.2021)
12. The Disaster Management Act, 2005, NO. 53 of 2005, 23rd December, 2005, enacted by Parliament in the Fifty-sixth Year of the Republic of India.
13. Emergency Triage Assessment and Treatment (ETAT), Manual for Participants, © World Health Organization, 2005.
14. Emergency Surgical Care in Disaster Situations, WHO manual *Surgical Care at the District Hospital (SCDH), a part of the WHO Integrated Management on Emergency and Essential Surgical Care* (IMEESC) tool kit.
15. The Global Platform for Disaster Reduction, The official agenda for the 4th Session from Tuesday 21 to Thursday 23 May 2013,assessed on 05/012/2013.
16. National Policy on Disaster Management(NPDM) ,NDMA publication online assessed on 07/12/2013.
17. Public Health Risk Assessment and Interventions, Typhoon Haiyan,16 November 2013.
18. National Disaster Management Guidelines, Preparation of State Disaster Management Plans, July 2007, NDMA, GOI.
19. Disaster management and risk reduction: strategy and coordination; plan 2010-2011,International Federation of Red cross and Red Crescent Societies, 2009.
20. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. Selection of basic laboratory equipment for laboratories with limited resources, 2000. https://apps.who.int/iris/handle/10665/119641.
21. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. (2017). Health laboratory facilities in emergency and disaster situations, 2. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean. https://apps.who.int/iris/handle/10665/327297.

22. World Health Organization. Guidelines for the collection of clinical specimens during field investigation of outbreaks. World Health Organization, 2000. https://apps.who.int/iris/handle/10665/66348.

23. World Health Organization. (2003). Manual of basic techniques for a health laboratory, 2nd ed. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/42295

24. Connolly, Máire A & World Health Organization. (2005). Communicable disease control in emergencies: a field manual. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/96340 World Health Organization, Flooding and communicable diseases fact sheet: Risk assessment and preventive measures, 2005, www.who.int/hac/techguidance/ems/flood

25. Laboratory Safety Manual, Emergency Preparedness and Response, University of Washington, Environmental Health and Safety, Seattle, WA, October 2016.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

II. COVID-19 PANDEMİSİ DENEYİMİ

(TIBBİ MİKROBİYOLOJİ CEPHESİNDEN COVID-19 PANDEMİSİ DENEYİMİ)

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 4

COVID-19 EPİDEMİYOLOJİSİ

Yirmibirinci yüzyılda koronavirüsler üçüncü kez ağır alt solunum yolu enfeksiyonuna neden olan yeni bir tiple, bu kez Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmıştır ve kısa zamanda tüm dünyayı etkileyen yüzyılın salgınına dönüşmüştür.

Koronavirüsler, birçok farklı hayvanı enfekte edebilen konak yelpazesi çok geniş olan RNA virüsleridir ve insanlarda solunum yolu enfeksiyonlarına neden olurlar. Patojenitesi yüksek zoonotik kökenli iki koronavirüsten, "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus" (SARS-CoV) 2002'de ve "Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus" (MERS-CoV) 2012'de salgınlarla ortaya çıkmış ve insanlarda ölümcül solunum yolu hastalığına neden olmuştur. Aralık 2019'da ortaya çıkan ve viral pnömoni salgınına neden olan yeni koronavirus, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICVT) tarafından 11 Şubat 2020 tarihinde SARS-CoV-2 olarak adlandırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 (**Co**rona **Vi**rus **D**isease) olarak tanımlanan bu yeni enfeksiyon, oldukça bulaşıcı olduğundan tüm dünyaya hızla yayılmış hem enfekte olmuş insan sayısı hem de salgın alanları açısından SARS ve MERS'in oluşturduğu etkiyi ezici bir şekilde geçmiştir.

Devam eden COVID-19 salgını, küresel halk sağlığı için olağanüstü bir tehdit oluşturmaktadır. Eylül 2021 sonlarına gelindiğinde, salgın son hızıyla tüm dünyada devam etmektedir. Tüm dünyada 228 milyon doğrulanmış vaka ve enfeksiyon nedeniyle 4,6 milyon ölüm bildirilmiştir. Ülkemizde de dalgalarla seyreden vaka sayılarında artışlar görülmektedir; Nisan 2021 sonunda Avrupa'da en yüksek yeni olgu sayısı Türkiye'den bildirilmiştir. Eylül 2021 sonlarına gelindiğinde, 7 milyonun üzerinde doğrulanmış olgu ve 60 binin üzerinde ölüm gerçekleşmiştir.

Pek çok ülke salgını kontrol etmek için çeşitli yöntemler uygulamaktadır. Aralık 2020 tarihinden itibaren riskli gruplar başta olmak üzere birçok ülkede etkene karşı aşılama başlamıştır. Nisan 2021 sonuna kadar dünyada yaklaşık 900 milyon kişi çeşitli tiplerdeki SARS-CoV-2 aşısı ile aşılanmışlardır. Aşılama sayısı giderek artmakla birlikte, toplumlar ve ülkeler arasındaki aşılama oranları arasında büyük farklılıklar görülmesi aşıya ulaşmada olanaklarındaki eşitsizlikler nedeniyle kaygı vericidir. Ülkemizde Eylül 2021 sonuna gelindiğinde 43 milyonun üzerinde kişiye 2 doz, 10 milyonun üzerinde kişiye 3 doz aşı yapıldığı bildirilmiştir.

Salgın, DSÖ'nün Batı Pasifik bölgesinde bulunan Çin'de başlamış ancak kısa bir süre sonra Avrupa'daki ülkeler ve Amerika Birleşik Devletleri'nde çok yüksek olgu sayılarına ulaşılmıştır. Salgın başlangıcından itibaren geçen 20 ayda en fazla olgu ve ölüm sayıları DSÖ'nün Amerika ve Avrupa bölgelerinden bildirilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 1. DSÖ Bölgelerine Göre Olgu ve Ölüm Sayıları (19 Eylül 2021)

DSÖ bölgesi	Son haftadaki yeni olgular	Son haftadaki yeni olgu sayısında değişiklik	Doğrulanmış olgu sayısı (%)	Son haftadaki yeni ölüm sayısı	Son haftadaki yeni ölüm sayısında değişiklik	Toplam ölüm sayısı (%)
Amerika	1.384.267	-%7	87.874.973 (39)	24.489	-%2	2.170.188 (46)
Avrupa	1.090.667	-%4	68.290.457 (30)	14.477	%1	1.311.390 (28)
Güney Doğu Asya	383.053	-%16	42.498.922 (19)	6.540	-%27	668.468 (14)
Doğu Akdeniz	250.781	-%22	15.449.977 (7)	5.074	-%20	282.711 (6)
Batı Pasifik	461.979	-%11	7. 914.374 (3)	6.852	%7	107.712 (2)
Afrika	98.485	%4	5. 911.505 (3)	2.407	-%21	142.417 (3)
Toplam	**3 .671.232**	**-%9**	**227.940.972** (100)	**59.839**	**-%7**	**4.682.899** (100)

2021 Eylül ayının üçüncü hafta verilerine göre DSÖ bölgelerindeki gelişmeler:

Küresel olarak, COVID-19 yeni vaka ve ölüm sayılarında önceki haftaya göre düşüş olduğu görülmektedir. Afrika ve Avrupa bölgelerinde önceki haftaya yakın sayılar bildirilirken, diğer bölgelerde haftalık vaka insidanslarında düşüşler bildirilmiştir. En yüksek haftalık 100 000 kişide vaka ve ölüm insidans hızları Amerika (100 000 kişide 135,5 yeni vaka, 2,4 ölüm) ve Avrupa (100 000 kişide 116,9 yeni vaka, 1,6 ölüm) bölgelerinde bildirilmektedir. Türkiye'den bildirilen haftalık yeni vaka sayısı (183 962; %16 artış), Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan ve Birleşik Krallık'tan sonra dördüncü sıradadır.

Güneydoğu Asya bölgesinde yeni olgu ve yeni ölüm sayılarında 2021 Mart–Nisan döneminde görülen çok keskin artışın ana nedeni, Hindistan'dan bildirilen çok sayıda yeni olguya (%52 artış) ve yeni ölüme (%93 artış) bağlıdır. Hindistan'dan tüm dünyaya yayıldığı düşünülen ve baskın hale gelen delta varyantı göz önüne alındığında, epidemiyolojik verilerin izleminin önemi ortaya çıkmaktadır.

4.1 SARS-CoV-2 Varyantlarının COVID-19 epidemiyolojisine etkileri

Varyant virüsler: Genomlarının nükleik asit dizilerinde oluşan mutasyonlarla amino asitlerinde değişiklik olan, ilk tanımlanan virüse göre biyolojik ve fonksiyonel özelliklerinde farklılıklara yol açabilen mutasyonların bulunduğu virüslerdir.

Çoğalma hızını veya konak hücreleri enfekte etme yeteneğini arttıran, koruyucu immün yanıttan kaçma veya tedavide kullanılan ilaçların etkisini azaltma gibi virüse avantajlar sağlayan ya da hastalığın seyrini ağırlaştıran etkileri olan mutasyonlara sahip varyant virüsler salgınla mücadelede tehlike oluşturur.

Virüsün toplumda kişiden kişiye bulaşması, antiviral tedaviler, immün plazma uygulanması, vb. gibi nedenlerle virüste yeni mutasyonlar ortaya çıkabilir ve bu durum potansiyel olarak daha yüksek ölüm oranlarına veya tedaviye dirençli virülan kökenlerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle, demografik ve klinik hasta bilgilerinin yanı sıra köken bilgilerinin sistematik olarak izlenmesi COVID-19 ile etkili bir şekilde mücadele etmek için vazgeçilmezdir.

SARS-CoV-2'nin konak hücreye bağlanmasını kolaylaştırarak bulaşıcılığını arttırdığı D614G mutasyonunu taşıyan ve Nisan 2020'de yayılmaya başladığı tanımlanan virüs dolaşımda baskın hale gelmiştir. Başka mutasyonların eklenmesi ve yeni varyantların dikkat çekmesi ile endişe oluşturan ve dikkat edilmesi gereken SARS-CoV-2 varyant sayısı artmaktadır. SARS-CoV-2 yüzeyindeki "S" proteinlerini; özellikle hücreye bağlanma kısmını (RBD) kodlayan mutasyonlar enfektivite, çoğalma ve antikorların nötralizasyonundan kaçma avantajlarıyla seçilerek öne çıkmaktadır

Wuhan'da salgının başlangıcında tanımlanan referans virüs dizisine (hCoV-19/ Wuhan/ WIV04/2019) göre binlerce mutasyon birikmiştir. Başlangıçta İngiltere varyantı olarak tanımlanan B.1.1.7 ile birlikte B.1.351 (Güney Afrika) ve P.1 (Brezilya) varyantlarının bulaşma hızlarının artması ve mevcut epidemiyolojik durumda değişikliklere yol açmaları nedeniyle risk oluşturdukları kabul edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) B1.617.2 (Hindistan) varyantını da 11 Mayıs 2021'de endişe oluşturan varyantlar arasına almıştır.

Ortaya çıkan varyantların küresel halk sağlığına etkileri incelenmekte, alınması gerekli önlemler değerlendirilmektedir. SARS-CoV-2 varyantlarını takip etmeye yönelik genomik sıralama ve tam genom dizileri, Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) gibi halka açık platformlarla paylaşılmaktadır. Mutasyonların sürveyansı GISAID, Nextstrain, Avrupa Birliği COVID-19 açık veritabanı, NCBI SARS-CoV-2 kaynağı, Çin Biyoinformasyon Merkezi gibi farklı veritabanları ve biyoinformatik platformlarında hızla izlenmektedir. GISAID, Nextstrain, Pango gibi veritabanlarının bilimsel temele dayalı farklı isimlendirme sistemleri olduğundan, DSÖ SARS-CoV-2 varyantlarının tanımlanmasını toplum tarafından da daha anlaşılır olması için Yunan harflerine dayalı ortak bir isimlendirme sistemi oluşturmuştur. Bu isimlendirme sistemine örnek olarak, başlangıçta öne çıkan varyanların isimleri Tablo 4.2'de gösterilmektedir.

Tablo 4.2 Bazı SARS-CoV-2 varyantları ve tanımlanmasında kullanılan DSÖ adlandırması

V. ismi (Pango)	**Alfa** (B.1.1.7)	**Beta** (B.1.351)	**Gamma** (P.1)	**Delta** (B.1.617.2)
Diğer isimleri (GISAID, Nextstrain)	GR/501Y.V1, 20I (V1)	GH/501Y.V2, 20H (V2)	GR/501Y.V3, 20J (V3)	G/478K.V1, 21A
İlk saptama	İngiltere	Güney Afrika	Brezilya	Hindistan

DSÖ, ulusal makamlar, kurumlar ve araştırmacılarla iş birliği içinde, SARS-CoV-2'nin dikkate alınması gereken/ilgilenilmeye değer varyantları "variants of interest" (VOI) ile endişe uyandıran varyantlarını "variants of concern" (VOC) izlemektedir. VOI'ler orijinal virüse göre yapısal değişiklikler gösteren, toplumda kümeler şeklinde bulaşan, DSÖ'nün incelemeye ve takip etmeye önem verdiği varyantlardır. VOC'lar ise bulaşıcılığı artmış veya daha ağır klinikle seyreden ya da kullanılan aşılardan etkilenmeyerek COVID-19 epidemiyolojisini etkileyebilecek yeni kökenlerdir.

SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkış, yayılım ve etkilerinin belirlenmesinin dinamizmi içinde tanımlamaları da hızla güncellenmektedir. Ülkeler ve kuruluşlar (DSÖ, A.B.D. Hastalık Kontrol Merkezi (CDC), Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC), İngiltere HSK) arasında varyantların sınıflandırılmalarında bölge özelliklerine ve değerlendirmelerine göre değişiklikler görülebilmektedir. Artmış bulaşıcılık özelliği ile Alfa varyantı dünyada olduğu gibi ülkemizde de baskın iken bulaşıcılığı daha yüksek Delta varyantının ortaya çıkışı ile alfa inişe geçmiş, 2021 Ağustos-Eylül aylarında Delta baskın olmuştur. Bu dönemde ECDC Alfa varyantının derecesini düşürerek VOC grubundan çıkarmıştır. GISAID veri tabanına 15 Haziran – 15 Eylül 2021 tarihleri arasında yüklenen dizilerin %90'ını Delta varyantı oluşturmaktadır.

Ayrıca, izlem altında incelemede tutulan varyantlar ("Variants Under Monitoring") VUM olarak isimlendirilmiştir.

4.2 Ara konak ve reseptör

Virüsün konakçı hücreler tarafından eksprese edilen bir reseptöre bağlanması, viral enfeksiyonun ilk adımıdır ve bunu hücre zarı ile füzyon izler. Akciğer epitel hücrelerinin virüsün birincil hedefi olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, SARS-CoV'nin insandan insana bulaşmasının, virüs "spike" (diken/başak) proteininin reseptör bağlanma bölgesi (Receptor Binding Domain: RBD) ile anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörü ve transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) reseptörü, tanımlanan hücresel reseptör arasındaki bağlanma sonucu meydana geldiği bildirilmiştir. SARS-CoV-2'nin spike RBD'sinin dizisi SARS-CoV'unkine benzer bulunmuştur.

Yapılan araştırmalarda, SARS-CoV-2 "spike" proteininin ACE2'ye bağlanma kapasitesinin SARS-CoV'den çok daha güçlü olduğu bulunmuştur. Bu durum SARS- CoV-2'nin insana adapte olmasında birden fazla ara konak olduğunu düşündürmektedir. Koronavirüs "spike" proteininin RBD ile ACE2 anahtar amino asitleri arasındaki etkileşim, pangolinler ve yılanlar dışında kaplumbağaların da (Chrysemys picta bellii, Chelonia mydas ve Pelodiscus sinensis) virüsü insanlara bulaştırabilecek potansiyel ara konaklar olabileceğini göstermiştir. Ancak, henüz ara konak çalışmaları bir kesinlik kazanmamıştır.

4.3 R_0 ve bulaşma yolları

Pandeminin ciddiyetini ve boyutunu belirlemek, toplumu korumak ve hastalığın yayılmasına engel olmak için COVID-19'un R_0 (reproduction number) değeri çeşitli yayınlarda hesaplanmakta ve DSÖ tarafından tahmin edilmektedir. SARS-CoV-2'nin tüm dünyaya yayılmasıyla birlikte kişiden kişiye bulaşma gözlemlerine dayanılarak, temel R_0 ortalamasının 2,24 (%95 GA 1,96-2,55) ile 3.58 (%95 GA, 2.89-4,39) arasında olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan sistematik bir meta-analizde, genel R_0'ın 3,32 (%95 CI, 2,81 ila 3,82) olduğu bulunmuştur. DSÖ tarafından, R_0 değeri 1,4 ila 2,5 olarak bildirilmiştir. Farklı coğrafi bölgelerde, o bölgede yaşayanların yaş ortalaması, genel önlemlere uyma ve çevre faktörleri gibi çeşitli değişkenlerin etkilerine göre R_0 oranlarında değişiklikler görülebilir. Salgın kontrolü sırasında karar vermede matematiksel modeller önemli bir rol oynar. Tahmini R_0 değeri bulaşıcı hastalık epidemiyolojisinde önemlidir. Çünkü salgının sonlanabilmesi için R_0'ın 1'in altına düşmesi gereklidir. *Örneğin,* R_0 = 2.5 ise toplumun %60'ı, 3.2 ise toplumun %68.7'si bağışık duruma geçmeden salgın durdurulamaz.

İlk olgularda canlı hayvan pazarında bulunan kişilere hayvandan insana bulaşma olasılığını gösteren bildirimler yapılmasına karşın, SARS-CoV-2'nin insandan insana, enfekte olmuş bir kişiden öksürme veya hapşırma ile yayılan damlacıkların solunması yoluyla veya enfekte yüzeylere direkt temas ederek ellerin ağız, burun veya göze temas etmesiyle bulaştığı gösterilmiştir. Özellikle havalandırmanın yetersiz olduğu kapalı mekanlarda 1m'den yakın mesafelerde virüs kişiden kişiye kolaylıkla bulaşmaktadır (DSÖ'nün 3C kuralı; Crowded places-Close contact-Confined spaces). Aerosoller, 1m'den de uzağa gidebilmekte ve enfeksiyonun bulaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Semptomları olsun ya da olmasın, enfekte kişiler bulaşıcı olabilir ve virüs onlardan diğer insanlara bulaşabilir. Laboratuvar verileri, enfekte kişilerin semptomları başlamadan 2 gün önce ve enfeksiyonun erken dönemlerinde en bulaşıcı olduklarını göstermektedir. Enfeksiyonu ağır geçiren kişiler daha uzun süre bulaşıcı olabilir. Yapılan araştırmalarda, hastanede gerçekleşen bulaşmaların %41 oranında olduğu bildirilmiştir. Sağlık çalışanları normal topluma göre daha fazla risk altındadır.

4.4 İnkübasyon periyodu ve klinik özellikler

COVID-19'un inkübasyon süresi 5,2 gün (%95 GA, 4.1-12.5 gün) olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalarda asemptomatik kişilerden de bulaşma söz konusu olduğunda 2.1 gün ile 12,5 gün arasında kişiden kişiye bulaşabileceği bildirilmiştir.

Bir sistematik derlemede, COVID-19 tanısı PCR testi ile doğrulanmış, klinik bulgu, laboratuvar ve radyolojik incelemeleri içeren 38 çalışmadaki 1.124 pediatrik olgu (<18 y) değerlendirilmiştir. Olguların %14.2'si asemptomatik, %36.3'ü hafif, %46'sı orta, %2,1'i şiddetli ve %1.2'si kritik olarak sınıflandırılmıştır. Semptomlu olgularda en sık ateş ve öksürük gözlenmiş, bu semptomları nazal konjesyon, ishal, bulantı ve kusma izlemiştir. Çalışmalarda sadece 145 hastaya pnömoni tanısı konmuştur. Çocuk yaş grubunda yetişkinlere göre COVID-19 kliniği asemptomatik veya oldukça hafif seyretmektedir. Tüm çalışmalarda sadece bir ölüm bildirilmiştir.

COVID-19'un erişkinlerdeki klinik özelliklerini sistematik olarak derleyen bir makalede, 3.062 hastayı içeren toplam 38 çalışma sonuçları analiz edilmiştir. Enfekte hastaların yüksek oranda erkek olduğu (%56.9), solunum yetmezliği veya akut solunum sıkıntısının %19.5 ve ölüm oranının %5.5 olduğu bildirilmiştir. En sık görülen bulgular; ateş (%80.4), öksürük (%63.1), yorgunluk (%46) ve balgam çıkarma (%41.8) şeklinde rapor edilmiştir. Diğer yaygın semptomlar arasında kas ağrısı (%33), iştahsızlık (%38.8), göğüste sıkışma (%35.7), nefes darlığı (%35.5) bildirilmiştir. Daha az görülen semptomlar ise mide bulantısı ve kusma (%10.2), ishal (%12.9), baş ağrısı (%15.4), boğaz ağrısı (%13.1), titreme (%10.9) ve karın ağrısı (%4.4)'dır. Asemptomatik hasta oranı %11.9'dur. Hastaların çoğunda normal lökosit sayısı (%69.7), lenfopeni (%56.5), yüksek C-reaktif protein seviyeleri (%73.6), sedimantasyon yükselmesi (%65.6) ve oksijen indeksinde azalma (%63.6) gözlenmiştir. Hastaların sadece %25,8'inde tek bir akciğeri tutan lezyonlar diğerlerinde ise (%75.7) iki taraflı akciğerleri tutan buzlu cam görünümünde lezyonlar gözlenmiştir (21). Çin'de geniş hasta grubu ile yapılan diğer bir çalışmada, olguların %87'sinin 30 ila 79 yaşları arasında olduğu, enfeksiyonu %81'inin hafif (pnömoni olmayan veya hafif pnömoni), %14'ünün ciddi (dispne, solunum frekansı ≥30/dak, kan oksijen satürasyonu ≤%93, 24 ila 48 saat içinde gelişen %50'den fazla akciğer infilitrasyonu) ve %5'inin kritik düzeyde (solunum yetmezliği, septik şok ve/veya çoklu organ disfonksiyonu veya yetmezliği) olduğu saptanmıştır.

COVID-19 hastalarında yukarıda belirtilen bulgular sık olarak görülmekle birlikte, salgının tüm dünyaya yayılması ile şiddetli enfeksiyonu olan hastalarda akut serebrovasküler hastalıklar, iskelet kası hasarı ve bilinç bozukluğu gibi nörolojik belirtiler de gelişebildiği gösterilmiştir. Ayrıca bazı hastaların faringodini, boğaz ağrısı, burunda tıkanıklık, rinore, tat ve koku almada değişiklikler gibi üst solunum yolu semptomları ile başvurduğu görülmüştür. Daha sonra bu özellikle başvuran hastalar belirgin bir şekilde artış göstermiştir. Bu bulguların patogenezi hala daha netleşmemekle birlikte, birçok kesitsel çalışmada COVID-19 hastalarında koku ve tat alma disfonksiyonunun kadın cinsiyeti baskınlığı ile %33.9-68 arasında değiştiği gösterilmiştir.

COVID-19 enfeksiyonunda hastanın yaşı, hastalık şiddeti ve mortalite için risk faktörlerinden biridir. Bildirilen olgularda, 60 yaşından büyük COVID-19 hastalarında daha yüksek oranlarda solunum yetmezliği geliştiği ve daha uzun süreli tedaviye ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (24). COVID-19'un klinik bulguları yaş, cinsiyet, diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, kronik akciğer hastalıkları ve kanser gibi altta yatan komorbiditelere bağlı olarak farklı seyredebilir ve prognoz olumsuz yönde etkilenebilir.

4.5 COVID-19 ve mortalite

COVID-19 semptomlarının başlangıcından ölüme kadar geçen sürenin, ortanca 14 gün olmak üzere 6 ila 41 gün arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu süre hastanın yaşına ve bağışıklık sisteminin durumuna göre değişmektedir. Yetmiş (11,5 gün [aralık 6-19]) yaşın üstündeki hastalarda bu süre daha kısa bulunmuştur. Çin'de ilk ay enfekte olan ve ölen kişilerin ortalama yaşı 75 (48-89

yaş) olarak belirlenmiştir. Daha sonra yapılan geniş olgu sayılı bir çalışmada (doğrulanmış 44.672 olguda), toplam olgu ölüm oranı %2.3 bulunmuştur. Dokuz yaş ve altındaki gruplarda ölüm görülmemiş, 70-79 yaş arasında ölüm oranı %8, 80 yaş üstünde ise %14.8 oranında gerçekleşmiştir. Ölümlerin %50'si kritik durumda olan hastalarda görülmüştür. Olgu ölüm hızı, önceden komorbiditesi (kardiyovasküler hastalık %10.5, diyabet %7.3, kronik solunum yolu hastalığı %6.3, hipertansiyon %6, kanser %5.6) olan kişilerde artmıştır.

Kaynaklar

1. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. Respirology. 2018; 23: 130–37.
2. WHO Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports, https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports. (Erişim, Eylül 2021)
3. T.C. Sağlık Bakanlığı, Yeni koronavirüs Hastalığı (COVID-19), https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/tr/.(Erişim, Eylül 2021)
4. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update on COVID-19. (Erişim, Eylül 2021)
5. Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. Bull World Health Organ 2020;98:495–504
6. Rothan HA, Byrareddy Sn. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. Journal of Autoimmu- nity. 2020;109(102433):1-4.
7. Wan Y, Shang J, graham R, Baric RS, li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade- long structural studies of SARS. J Virol. 2020; 94(7):1-9.
8. Liu Z, Xiao X, Wei X, Li J, Yang J, Tan H, Zhu J, Zhang Q, Wu J, Liu L. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. J Med Virol. 2020;1–7.
9. Liu P, Chen W, Chen JP. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). Viruses. 2019; 24;11(11): 979:1-15. doi: 10.3390/v11110979.
10. Zhang T, Wu Q, Zhang Z. Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated With the COVID-19 Outbreak. Curr Biol. 2020; 6;30(7):1346-1351.e2. doi: 10.1016/j.cub.2020.03.022. Epub 2020 Mar 19.
11. Liu P, Jiang JZ, Wan XF, Hua Y, Li L, Zhou J, et al. Are Pangolins the Intermediate Host of the 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2)? PLoS Pathog. 2020; 14;16(5):e1008421. doi: 10.1371/journal.ppat.1008421.eCollection 2020 May.
12. Zhao S, lin SQ, Ran J, Musa SS, Yang g, Wang W, et al. Preliminary estimation of the basic reproduction number of novel coronavirus (2019-nCoV) in China, from 2019 to 2020: a data-driven analysis in the early phase of the outbreak. Int J Infect Dis. 2020;92:214-7.
13. Wu JT, leung K, leung gM. nowcasting and forecasting the potential domestic and inter- national spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. lancet. 2020;395:689-97.
14. Alimohamadi Y, Taghdir M, Sepandi M. Estimate of the Basic Reproduction Number for COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. J Prev Med Public Health2020;53:151-157. https://doi.org/10.3961/jpmph.20.076.
15. Rothan HA, Byrareddy Sn. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. Journal of Autoimmunity. 2020;109(102433):1-4.
16. 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.
17. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted. (Erişim, 2 Mayıs 2021).
18. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. Int J Antimicrobial Agents. 2020; 55(105924):1-9, https://doi.org/10.1016/j.ijan- timicag.2020.105924.
19. Li Q, guan X, Wu P, Wang W, zhou l, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. The New Eng J Med. 2020;382(13):1199-207.
20. Souza TH' Nadal JA, Nogueira RJN, Pereira RM, Brandđo MB. Clinical manifestations of children with COVID-19: A systematic review. Pediatric Pulmonology. 2020;1–8.

21. Zhu J, Ji P, Pang J, Zhong Z, li H, He C, Zhang J, Zhao C. Clinical characteristics of 3062 COVID-19 patients: A meta-analysis. J Med Virol. 2020 Oct;92(10):1902-1914. doi: 10.1002/jmv.25884. Epub 2020 Jun 24.

22. Wu Z, Mcgoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 Cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020;323(13):1239-42.

23. Meng X, Deng Y, Dai Z, Meng Z. COVID-19 and anosmia: A review based on up-to-date knowledge. Am J Otolaryngol. 2020 Sep-Oct;41(5):102581. doi: 10.1016/j.amjoto.2020.102581. Epub 2020 Jun 2.

24. Liu Y, Mao B, Liang S, et all. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. Eur Respir J. 2020 May 27;55(5):2001112. doi: 10.1183/13993003.01112-2020.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 5

LABORATUVARDA BİYOGÜVENLİK / BİYORİSK DEĞERLENDİRME

Laboratuvar güvenliğinde temel yapıtaşları dört ana başlık altında toplanır:

1. Liderlik

- Risk değerlendirmesi, lider olan laboratuvar yöneticisinin sorumluluğundadır. Laboratuvar yöneticisi, çok odaklı işlerin büyük resmini görebilmelidir. Laboratuvarın tüm paydaşları dâhil edilmelidir.
- Laboratuvar yöneticisi, örnek alınmasından atık malzemelerin yönetilmesine kadar tüm işlem basamaklarında olası riskleri öngörebilmeli ve değerlendirebilmelidir.
- Tüm risklerin azaltılması ve laboratuvar çalışanlarının korunması, en önemli önceliktir.
- Laboratuvar yöneticisi, arzu edilen biyogüvenlik uygulamalarının sağlanmasında, maliyet etkin (laboratuvar gelir kaynakları ile uyumlu) bütçeyi oluşturmaya yönelik maliyet analizlerini yapabilmelidir.

2. Standart uygulama prosedürleri (SUP)

- Hatalı uygulamaların önüne geçmek ve ilgili bölüm personelince benimsenmesini sağlamak için SUP'lar hazırlanırken çalışanlar da sürece dâhil edilmelidir.
- Hazırlanan SUP'ların uygulanabilir olması ve yazıldığı şekliyle uygulandığına dair değerlendirmelerin yapılması gerekmektedir.
- SUP'larda kullanılan ifadeler açık ve net olmalı; fotoğraf, şema, akış diyagramları gibi görsel malzeme ile desteklenmelidir.

3. Kişisel koruyucu ekipman (KKE) ve diğer malzemeler

- KKE ve ihtiyaç duyulan diğer malzemeler (temiz su, dezenfektanlar, sabun, alkollü el antiseptiği ve kâğıt havlu gibi) gerektiği miktarda temin edilmelidir.
- KKE ve diğer malzemeler tüm laboratuvar çalışanlarınca ulaşılabilir olmalıdır.
- Gerekenden daha az malzeme sağlanması çalışanlarda güvensizlik ve korkuya, fazlası ise kaynakların müsrif kullanımına neden olabilir.
- Uygulanacak işlemlere göre uygun KKE seçilmelidir. Yanlış seçim ya da KKE'nin doğru şekilde kullanılmaması olumsuz sonuçlara yol açabilir.

4. Mühendislik önlemleri

- Laboratuvarın yapısı, havalandırma sistemi, hava akımı ve bireysel hareketler başta olmak üzere birçok faktörün ortam atmosferi üzerine etkisi bulunmaktadır.
- Vorteks ile karıştırma, parçalama, pipetaj ya da santrifüjleme gibi işlemler, aerosol oluşumuna yol açacağı için hava akımı ile olan bulaşmada önemli role sahiptir.
- Laboratuvar içi riskli alanlara kontrollü geçiş sağlanmalıdır.
- Temas izolasyon önlemleri alınmalıdır.
  - El yıkama alanlarında muslukların sensörlü ya da ayakla kumanda edilebilir olması tercih edilmelidir.
  - El yıkama sonrası ellerin kurulanması için kâğıt havlu kullanılmalıdır.
  - Risk analizi sonrasında gerek görülen yerlerde kapıların kendiliğinden açılabilen sensörlü donanımı olması sağlanmalıdır.

5.1 Genel Kurallar

Laboratuvarlarda yapılan tüm işlemler gözden geçirilerek mevcut kaynaklar saptanmalı, personelin yeterlilik ve yetkinlik seviyesi belirlenmeli, laboratuvarda bulunan cihaz ve ekipmanın uygunluğu tanımlanmalı ve risk analizi yapılarak olası tehlikeler tanımlanmalıdır.

Risk analizi şu başlıkları içermelidir

- Sosyal mesafe (2 m) sağlanarak laboratuvar alanında gerçekçi ve güvenli bir biçimde çalışabilecek en az teknisyen sayısı belirlenmeli ve mesai düzenlemesi mümkün olduğunca buna uygun şekilde planlanmalıdır.
- Laboratuvara giriş çıkışlar kısıtlanmalıdır. Personel trafik akışı belirlenmeli, laboratuvar alanında mümkün olan her yerde tek yönde akış sağlanmalıdır.
- Tüm alanların ve laboratuvarda kullanılan ekipmanın temizlik prosedürleri ve işlem sorumluları belirlenmelidir. Laboratuvar çalışanları, kendi çalışma alanlarının temizliğinden sorumlu olmalıdır.
- Acil durum iletişim ağı kurulmalıdır.
- Tüm kurumlarda pandemiye yönelik acil eylem planı hazırlanmalı ve tüm çalışanlarla paylaşılmalıdır. Bu plan en azından şunları içermelidir:
  - Personelin sorunlarını iletebileceği bir sorumlu belirlenmelidir.
  - Çalışanlara enfeksiyon kontrolüne ilişkin standart önlemlerin yanında COVID-19 bulaşma ve korunma yollarına yönelik eğitim verilmelidir. Bu eğitimler belli aralıklarla tekrarlanmalıdır.
  - Laboratuvardaki insan gücünü doğru kullanmak için, yönetimin de onaylaması durumunda, COVID-19 testlerini çalışacak personel diğer laboratuvar çalışanlarından ayrılmalıdır. Kabul edilen örneklerde ve görev tanımlarında düzenlemeler yapılmalıdır. Bu personel, süreç sonuna kadar diğer birimlerde görevlendirilmemelidir.
  - Bu personelin ikili/üçlü (ya da işin gerektirdiği sayıda) takımlar halinde, dönüşümlü (vardiyalı) çalıştırılması sağlanmalıdır. En az üç vardiya oluşturulması, personele yeterli dinlenme süresi sağlanması açısından önemlidir.

- Temaslı sayısının en aza indirilmesi için, takımlar arasında personel değişimi olmayacak şekilde düzenleme yapılmalıdır. Takımlardan birinde geçici süreli bir eksilme olduğunda, yerine görevlendirilecek personel önceden belirlenmiş olmalı, bu kişi diğer takımlar içinden seçilmemelidir.
- Laboratuvar çalışanlarının herhangi bir semptomu olduğunda, sorumluya bilgi verilmelidir.
- Laboratuvar çalışanlarının kendisi, ailesi ve temaslı oldukları yakın çevrelerinde, herhangi bir semptomu olan biri varsa, sorumluya bilgi verilmelidir.
- Çalışanlardan birinde **hastalık ortaya çıktığında;**
    - Temaslılar belirlenmeli ve Hastane Uygulama Prosedürleri gereği "Çalışan Sağlığı ve Güvenliği Birimi (ÇASAGÜB) ve/veya Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi'ne (HEKK) bilgi verilerek temaslıların Sağlık Bakanlığı tarafından oluşturulan güncel rehberler doğrultusunda izlenmesi sağlanmalı, işe devam-başlangıç süreçleri takip edilmelidir.
    - Teması olmayan personel belirlenmeli ve destekleyici planlar oluşturulmalıdır.

- Tüm çalışanlar, örneklerin güvenli taşınması konusunda bilgilendirilmeli ve herhangi bir kimyasal ve/veya biyolojik dökülme-saçılma durumunda nasıl müdahale edeceği konusunda bilgi sahibi olmalıdır. (*bkz.* Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Laboratuvar Güvenliği Rehberi; KLİMUD KORONAVİRÜS HASTALIĞI (COVID-19) LABORATUVAR GÜVENLİĞİ REHBERİ)

Laboratuvarda çalışırken saçlar toplanmalı, tercihen bone takılmalı, takı takılmamalı, tıbbi zorunluluk yoksa lens yerine gözlük kullanılmalı, kapalı ayakkabı giyilmelidir.

Laboratuvar kıyafeti temiz ve ütülü olmalı, düzenli yıkanmalıdır. Laboratuvar dışında laboratuvar kıyafeti giyilmemelidir. Çalışma esnasında üstüne laboratuvar önlüğü giyilmelidir. Laboratuvarda giyilen önlük beyaz ve temiz olmalı, en az diz uzunluğunda ve uzun kollu olmalı, kol manşetleri bilekleri sarmalıdır. Çalışırken önlüğün önü kapalı tutulmalıdır (Resim 5.1).

- Laboratuvarda kişisel eşyalar (mobil telefon, dizüstü bilgisayar, USB bellek vb.) bulundurulmamalı ve kullanılmamalıdır.
- Yüksek riskli alanlarda mümkünse galoş kullanılmalı ya da ayrı ayakkabı giyilmelidir.
- Genel biyogüvenlik kuralları gereği, laboratuvar içinde hiçbir şey yenip içilmemelidir.

Resim 5.1. Uygun laboratuvar önlüğü (yanda)

5.2 Sosyal Mesafe

- Çalışanlar arası dönüşümlü çalışma saatleri ayarlanarak sosyal mesafe (2 m) önerilerine uyum sağlanmalıdır.
- Çalışma alanları ve ortak kullanılan ekipmanların yerleşimi, ortamda kalabalık oluşumuna izin vermeyecek şekilde düzenlenmelidir. Mümkün değilse, bariyerler yerleştirilerek çalışanlar arası sosyal mesafe korunmalıdır.
- Yüz yüze temas gerektiren laboratuvar içi toplantılar gibi faaliyetler azaltılmalı, mümkün olduğunca bilgisayar ortamında uzaktan erişimle gerçekleştirilmelidir.
- Laboratuvardaki personel dinlenme odalarındaki düzenlemeler de sosyal mesafe kurallarına uyacak şekilde yapılandırılmalıdır.

5.3 Yüz Koruma

- Çalışma ortamına ve aktiviteye özgül risk değerlendirmeleri yapılarak kullanılacak olan maske türü belirlenmelidir.
- Maskeler kuralına uygun şekilde takılmalı ve çıkarılmalı; kullanım süresi bitene kadar uygun şekilde (hava geçirebilen kağıt veya kumaş zarf/poşet içinde) saklanmalı ve uygun şekilde bertaraf edilmelidir (https://www.youtube.com/watch?v=ZrrdRrPoHUY&feature=youtu.be)
- Maskelerin çapraz kontaminasyona neden olabileceği unutulmamalı ve sık sık elle temas edilmemesi, temas sonrası ellerin yıkanmadan yüze ve göze sürülmemesi konusunda çalışanlar uyarılmalıdır.
- Özel bir gereklilik olmadığı sürece laboratuvar çalışanları Tip IIR medikal (cerrahi) yüz maskesi kullanmalıdır (Tablo 5.1).
- Laboratuvar ortamında kullanılan maske laboratuvar dışında kullanılmamalıdır.
- Maskeler nemlendiğinde, kontamine olduğunda, yırtıldığında veya hasarlandığında değiştirilmelidir. Partikül filtreli maskeler (FFP2 ve FFP3) sekiz saatten uzun süreyle kullanılmamalıdır.

Tablo 5.1 Cerrahi maske çeşitleri*

Deney	Tip I	Tip II	Tip IIR
Bakteri Filtrasyon Verimliliği (%) (En Az)	95	98	**98**
Değişim Basıncı (Pa/cm2) (En Fazla)	40	40	**60**
Damlacık Direnç Basıncı (kPa) En Az	-	-	**16**
Mikrobiyal Temizlik (cfu/g) (En Fazla)	30	30	**30**

* Tablo EN14683 standardından alınmıştır.

Maske kullanımı nasıl olmalıdır?

Maskenin doğru takılması ve çıkarılmasına ilişkin görsel uyarılar (poster, afiş vb) hazırlanmalı ve ortak kullanım alanlarına asılmalıdır

Maske nasıl takılır?

- Maskeyi takmadan önce eller en az 30 saniye süreyle su ve sabunla yıkanır veya el antiseptiği ile en az 20 sn süreyle ovuşturularak el hijyeni sağlanır.
- Maskenin üst tarafındaki metal şerit burun köprüsünün üzerine gelecek şekilde takılır.
- Metal şerit burun köprüsünün üzerine hafifçe bastırılarak yerleştirilir.
- Lastikler kulak arkasına takılır. Maskenin yüze tam oturmaması durumunda lastikler kısaltılmalı veya enseye takılan maske tutucular kullanılarak yüze göre ayarlanmalıdır. İpli maskelerde ipler, maske yüze tam oturacak şekilde başın arkasından ve enseden bağlanır.

Maske nasıl çıkarılır?

- Maske, yoğun kirlenmenin olduğu ön kısma dokunulmadan çıkarılmalıdır. Sadece lastik ya da ip kısmına dokunulabilir.
- Maske lastikli ise kulak arkasındaki lastiklerden, ipli ise önce ense bölgesindeki alt ipleri, sonra başın arkasındaki üst ipleri çözülerek çıkarılır.
- Çıkarılan maske lastiklerinden veya iplerinden tutularak tıbbi atık çöpüne atılır ve çöpün sürekli kapalı kalması sağlanır.
- Maskeyi çıkardıktan sonra eller en az 30 saniye süreyle su ve sabunla yıkanır veya el antiseptiği ile en az 20 sn süreyle ovuşturularak el hijyeni sağlanır.

Maskelerin kullanımı ya da takma çıkarma sırasında, maskenin ön yüzüne temas olması durumunda el hijyeni sağlanmalıdır

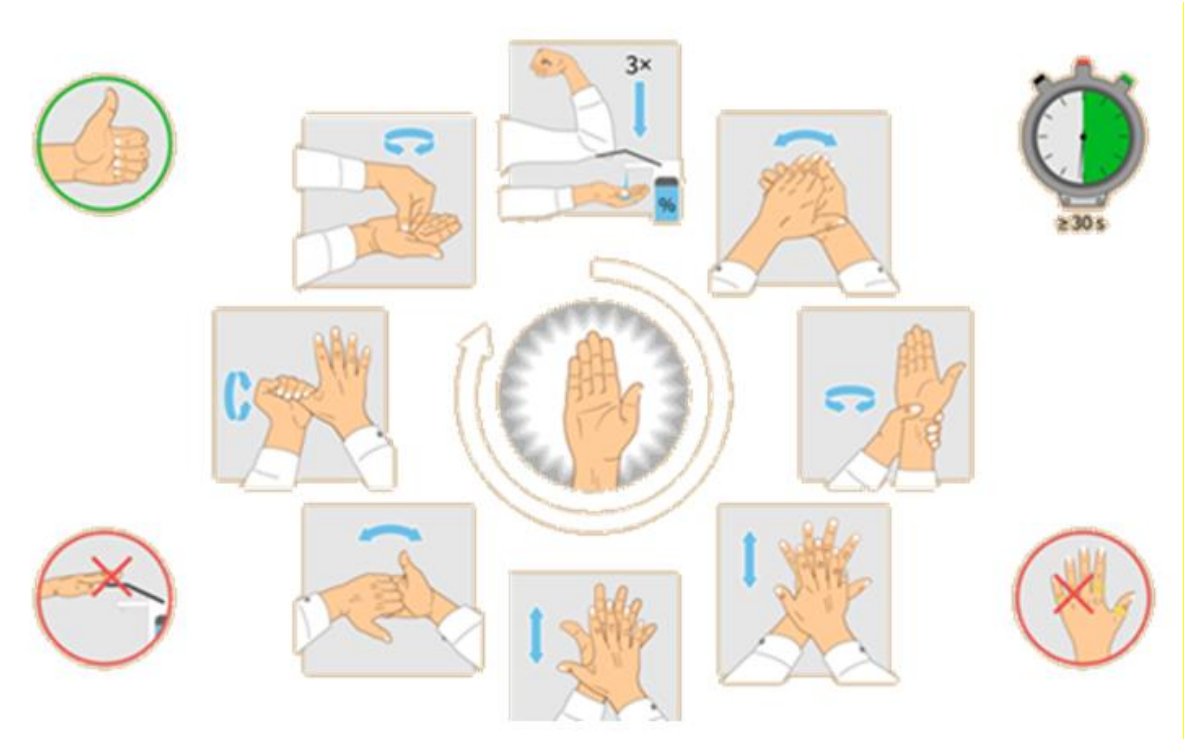
Sosyal mesafenin sağlanamaması durumunda, aeresol oluşturucu ya da sıçrama/dökülme tehlikesi olan işlemler yapılırken maskeye ek olarak yüz siperi, gözlük gibi fiziksel bariyer önlemleri alınmalıdır

5.4 El Hijyeni

El hijyeninin ve sık el yıkamanın önemini anlatan görsel uyarılar (poster, afiş vb) hazırlanmalı ve ortak kullanım alanlarına asılmalıdır.

- Sıvı sabun, el antiseptiği ve kâğıt havlunun sürekliliği sağlanmalıdır.
- Sıvı sabun ve kâğıt havlu kutuları boşaldığında kuralına uygun olarak doldurma işlemi yapılmalıdır.
- Laboratuvar çalışması sırasında biyolojik materyal ile çalışıldığında mutlaka nitril eldiven kullanılmalıdır.
- El hijyeni aşağıdaki durumlarda sağlanmalıdır:
  - Laboratuvara girmeden önce
  - Laboratuvardan çıkmadan önce
  - Eldiven giymeden önce
  - Eldiven çıkarıldığında,
  - Biyolojik materyal ile temas sonrasında
  - Ortak kullanılan yüzeylere el ile temasın olduğu durumlarda
- **Şekil 5.1**'de el hijyeni basamakları görülmektedir.
- Eller en az 30 sn süreyle su ve sabunla yıkanmalıdır.
- El antisepsisi için %70 etanol veya %70 izopropil alkol içeren ve gliserin eklenmiş, alkol bazlı antiseptikler tercih edilmelidir.
- Elde ve bileklerde yüzük, bilezik gibi herhangi bir takı bulunmamalıdır.
- Tırnaklar, tırnak eti hizasında kesilmiş ve ojesiz olmalıdır.
- Ellerde yara, kesik, çatlak vb. cilt bütünlüğünün bozulduğu herhangi bir lezyon olması durumunda bunların üstü su geçirmez yara bandı ile kapatılmalı ve çalışma esnasında mutlaka nitril eldiven giyilmelidir.

Biyolojik materyal ile kontaminasyon durumunda, **eller su ve sabun ile yıkanmalı**, alkol bazlı antiseptiklerle el antisepsisi yapıl**ma**malıdır!



Şekil 5.1 El hijyeni basamakları
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:04_Hegasy_Hand_Disinfection_Wiki_EN_CCBYSA.png)

5.5 Çalışma Alanları ve Ekipman Dekontaminasyonu

- Çalışma alanları ve ekipmanlar SARS-CoV-2 için uygun dezenfektanlar ile dekontamine edilmelidir.
- Dezenfektanların kullanımında, konsantrasyon, kullanım süresi, temas süresi, uygulama şekli ve materyal uyumu konusunda üretici firma önerilerine uyulmalıdır.
- El ile temasın fazla olduğu yüzey ve ekipmanların temizlik ve dezenfeksiyonunun yapıldığından emin olunmalıdır.
- Genel temizlik alanlarının dışında, birden fazla kişinin çalıştığı yerler için de düzenlemeler yapılmalıdır. Bu amaçla her personel çalışmaya başlamadan önce ve çalışması bittikten sonra kendi çalışma alanının temizlik ve dezenfeksiyonunu yapmalıdır.

Kullanılan pipetler ve bloklar üretici firma önerisi doğrultusunda dekontamine edilmelidir.

Temizlik malzemesi ve dezenfektanların miktarı yapılan işin gerekliliklerine uygun şekilde üst sınırda tutulmalı ve tüm laboratuvara dağıtılarak personelin, yüzeyleri ve ekipmanları daha sık temizlemesi teşvik edilmelidir.

5.6 Pandemide Genel Laboratuvar İşleyişi

- COVID-19 kuşkulu hastalara ait klinik örnekler ve moleküler testler, **BGD2** şartlarını karşılayan laboratuvarlarda çalışılmalıdır. Bu laboratuvarlarda aşağıda yer alan işlemler mutlaka sınıf IIA **BGK** içinde yapılmalıdır:
  - Klinik örneklerin işlenmesindeki ilk basamaklar
    - Direkt mikroskobik analiz için preparat hazırlanması ve tespiti
    - Kültür için ekim yapılması
  - Ekstrakte edilmiş nükleik asit örneklerinin PCR karışımına pipetlenmesi
  - Damlacık ya da aerosol oluşturma riski bulunan tüm işlemler

SARS-CoV-2 virüs kültürü yapılacaksa biyogüvenlik düzeyi-3 (**BGD3)** koşullarını karşılayan laboratuvarda çalışılmalıdır.

Diğer tanı amaçlarıylarıyla solunum soulunum yolu ve dışkı örneklerinin çalışıldığı alanlarda da COVID-19 bulaşmasına yönelik önlemler (çalışma alanı ve KKE yönünden) alınmalıdır.

- Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarları pandemi süresince normal işleyişine de devam etmelidir. Ancak bazı durumlarda (örn; laboratuvar insan gücü ve ekipman yetersizliğinde, pandemide olgu sayısının artmasına paralel olarak klinik örnek sayısının aşırı artmasında), merkezler kendi dinamiklerini göz önünde bulundurarak, örnek işleyiş ve kabulünde aşağıda yer alan kısıtlamalara gidebilir.
- Kültür için laboratuvar işlemleri merkezileştirilebilir.
- Gerekli hallerde kültür ve seroloji testleri önceliklendirilebilir. Bazı çalışmalar geçici süre durdurulabilir. *Örneğin;*
  - Yoğun bakım ünitesi dışındaki birimlerden istenen tarama testleri (metisiline dirençli Staphylococcus aureus [MRSA], vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. [VRE], karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* [CRE] vb.),
  - Acil durumlar (pnömoni, ensefalit/menenjit vb.) ve acil örnekler (beyin-omurilik sıvısı [BOS], kan vb.) dışında rutin kültür işlemleri,
  - Tanı değeri kısıtlı olduğu için bazı sürüntü örneklerinin kabulü,
  - *Helicobacter pylori* antijen ve antikor testleri durdurulabilir.
- Viroloji testleri;
  - Rutin influenza ve diğer solunum virüs testleri azaltılabilir.
  - Ancak semptomları ağır olan, yoğun bakım ünitesinde yatan ve COVID-19 PCR testi negatif çıkan özellikli hasta gruplarına uygulanmalıdır.

5.7 Atık Yönetimi

Üretilen atıkların insan ve çevre sağlığı açısından güvenli ve etkili şekilde yönetimi sağlanmalıdır. Mevcut atık yönetim planına uygun davranılmalı, atıkların kaynağında ayrıştırılması, atıkların uygun koşullarda taşınması, uygun şartlarda geçici depolanması sağlanmalı ve bertaraf için gerekli işlemler mevzuata uygun olarak yapılmalıdır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), A.B.D. Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC)'nin COVID-19 hastasına ait atıklar için, diğer tıbbi atıklardan farklı uygulama yapılmasına ya da herhangi bir bekleme süresinden sonra atılmasına ilişkin ek önerileri bulunmamaktadır.

Hastane ortamında olası ve kesin COVID-19 hastasına ait her türlü atık, **enfeksiyöz atık** olarak kabul edilerek **tıbbi atık** kutusuna atılmalıdır.

Klinik örnekler işlem gördükten sonra, örnek kaplarının kapakları kapanarak, diğer tıbbi atıklarla birlikte atılmalı ve mevzuata uygun olarak toplanmalıdır.

Atık toplayan personel çapraz kontaminasyon ve enfeksiyon riskleri yönünden eğitilmiş olmalı, uygun KKE kullanması (bot, önlük, uzun kollu tulum, kalın eldiven, maske, gözlük veya yüz siperliği) sağlanmalıdır. Atık kap ve torbalarına eldivensiz doğrudan temastan kaçınılmalıdır.

Kaynaklar

1. Lippi G, Adeli K, Ferrari M, Horvath AR, Koch D, Sethi S, Wang CB. Biosafety measures for preventing infection from COVID-19 in clinical laboratories: IFCC Taskforce Recommendations. Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 25;58(7):1053-1062.
2. Pan American Health Organization / World Health Organization. Requirements and technical specifications of personal protective equipment (PPE) for the novel coronavirus (2019-ncov) in healthcare settings, Interim recommendations. Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Available from: https://www.paho.org/en/documents/requirements-and-technical-specifications-personal-protective-equipment-ppe-novel
3. Pan American Health Organization / World Health Organization. Interim laboratory biosafety guidelines for the handling and transport of samples associated with the novel coronavirus 2019 (2019-nCoV). Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Available from: https://www.paho.org/en/documents/interim-laboratory-biosafety-guidelines-handling-and-transport-samples-associated-novel.
4. World Health Organization. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). WHO/WPE/GIH/2020.2. Geneva: WHO; 2020. Available from: https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19).
5. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Healthcare Personnel During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic (Updated Dec. 14, 2020). Atlanta: CDC; 2020. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/infection-control-recommendations.html
6. Centers for Disease Control and Prevention. Using Personal Protective Equipment (PPE) (Updated Aug. 19, 2020). Atlanta: CDC; 2020. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/using-ppe.html
7. Türk Standartları Enstitüsü, TS EN 14683`+AC; Eylül 2019 ICS 11.140 TS EN 14683:2019 yerine, Tıbbi yüz maskeleri – Gereklilikler ve deney yöntemleri.
8. Türk Standartı, TS EN 149 +A1; Temmuz 2010; Solunumla ilgili koruyucu cihazlar - parçacıklara karşı koruma amaçlı filtreli yarım maskeler - özellikler, deneyler ve işaretleme
9. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/cloth-face-cover-guidance.html
10. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-to-wear-cloth-face-coverings.html
11. https://www.youtube.com/watch?v=ZrrdRrPoHUY&feature=youtu.be

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 6

COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: PREANALİTİK SÜREÇ

Mikrobiyolojik tanıda analiz basamağına kadar geçen sürecin doğru ve etkin yönetimi son derece kritiktir. Pandemiye neden olan etkenin ve enfeksiyonun özelliklerine göre uygun test(lerin) ve örnek(lerin) seçimi; örneklerin alınma biçimi, örnek alma araçlarının, taşıma – saklama ortamlarının ve koşullarının açık ve net bir şekilde tanımlanmasına ihtiyaç vardır. Bu sürecin doğru tanımlanabilmesi, algoritmanın belirlenebilmesi için etkenin özellikleri, enfeksiyon patogenezi ve dönemleri hakkında bilgi sahibi olunması gerekir.

Pandeminin hızı ve testlerin uygulanacağı toplumun özelliklerine göre algoritmalar belirlenirken, kullanılacak klinik örnekler ve testlerin etkinlikleri ile sınırlılıkları da tanımlanarak açıklanmalıdır.

Farklı sistemlerde, farklı etkenlerin neden olduğu salgınlarda örnek seçimi ve preanalitik sürecin yönetimi için KLİMUD- Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri ve Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberleri kaynak olarak kullanılabilir. Ancak, her salgın için kendi özelinde ayrıntılı kılavuzlar hazırlanmalıdır.

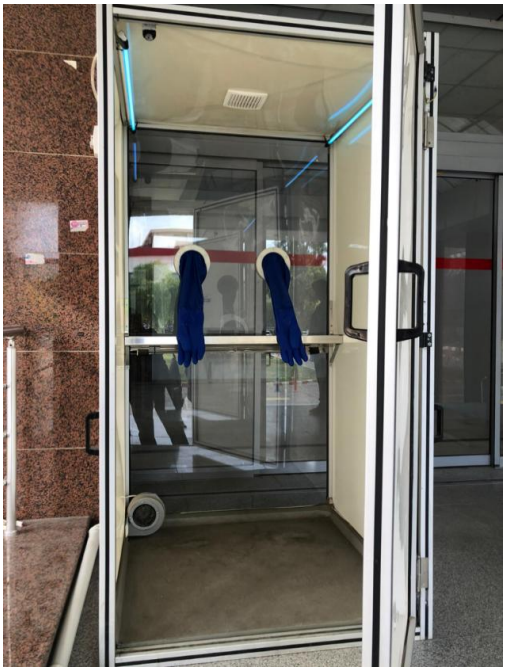
Bu rehberde, yaşanan deneyimlerden de faydalanılıp, COVID-19 pandemisine yönelik süreçler daha ayrıntılı açıklanmış, pandemide uygulanabilecek bir kılavuz örneği olması amaçlanmıştır. Bu nedenle solunum yolu örnekleri üzerinden açıklamalar yapılmaktadır.

6.1 Örneklerin Alınması

- Örneklerin nasıl alınacağı ve laboratuvara nasıl gönderileceği konusunda **SUP** hazırlanmalıdır.
- Örneği alacak kişilere, örneğin alınması, saklanması ve uygun şartlarda laboratuvara gönderilmesi konusunda **eğitim** verilmelidir.

6.1.1 Genel uyarılar

- Tüm klinik örnekler enfektif kabul edilmelidir.
- Örnek alırken BGD-2 kurallarına ve BGD-3 KKE uygulamalarına uyulmalıdır.
- Sağlık kurumunda sağlık çalışanı ile hastayı tamamen ayıran **örnek alma kabini varsa** (Resim 6.1), her hasta giriş ve çıkışında, hasta yüzünü gören kabin yüzeyi alkol bazlı yüzey dezenfektanı ile silinmeli, kabin içi ortam dezenfekte edilmeli veya en az beş dakika süreyle havalandırılmalıdır. Kabin içi havalandırılabilir olmalı ya da negatif basınçlı oda koşulları sağlanmalıdır.



Resim 6.1: Örnek alma kabini

- **Örnek alma kabini yoksa**, örnek alınan odanın negatif basınçlı oda koşullarına uygun olması ya da havalandırılabilir olması sağlanmalıdır. Örnek alımı sırasında kapılar kapalı olmalı, odada örnek alan sağlık çalışanı ve hasta dışında kimse olmamalıdır.
- Örneklerin alınması sırasında uygun KKE kullanılmalıdır:
  - Maske
    - **Örnek alma kabini kullanılıyorsa**, en az tip IIR medikal (cerrahi) maske,
    - **Örnek alma kabini yoksa**, en az partikül filtreli maske/solunum maskesi [FFP2 /N95] (valfli maskelerde üstüne bir kat cerrahi maske takılması gereklidir)
  - İzolasyon önlüğü / tulum
  - Gözlük / yüz siperliği
  - Eldiven
  - Bone (merkezin gerekliliklerine göre)

- KKE'lerin;
  - **uygun sıra ile giyilmesi** [bone → önlük → maske → gözlük/siperlik → eldiven (https://www.youtube.com/watch?v=Th-bubo5lFc&t=15s)] ***ve***
  - **uygun sıra ile çıkarılmasına** [eldiven → önlük → gözlük → bone → maske. (https://www.youtube.com/watch?v=ObyNYtlrkm4&t=25s)]

    dikkat edilmelidir
- **Her örnek alımı sonrasında**, eldivenler çıkarılmalı ve mutlaka el hijyeni sağlanmalıdır.
- *Siperlik kullanılmıyor*, koruyucu gözlük kullanılıyorsa, *partikül filtreli maske* üzerine cerrahi maske takılmalıdır. Cerrahi maske en fazla iki saatte bir ya da görünür kirlenme olduğunda değiştirilmelidir.
- Dinlenme aralarında ya da boş zamanlarda partikül filtreli maskenin kuralına uygun şekilde çıkarılarak havalanabilen *kağıt/kumaş materyal* içinde saklanması gereklidir.
- Bu şekilde solunum maskeleri günde sekiz saate kadar kesintisiz kullanılabilir.
- Kullanım süresi sekiz saati geçen ya da görünür kirlenmeye maruz kalan maskeler değiştirilmelidir.
- Siperlik ya da gözlük, kullanımdan önce ve kullandıktan sonra %70'lik alkol veya alkol bazlı yüzey dezenfektanı kullanılarak dekontamine edilmeli ve korunaklı bir yerde saklamak üzere kaldırılmalıdır.

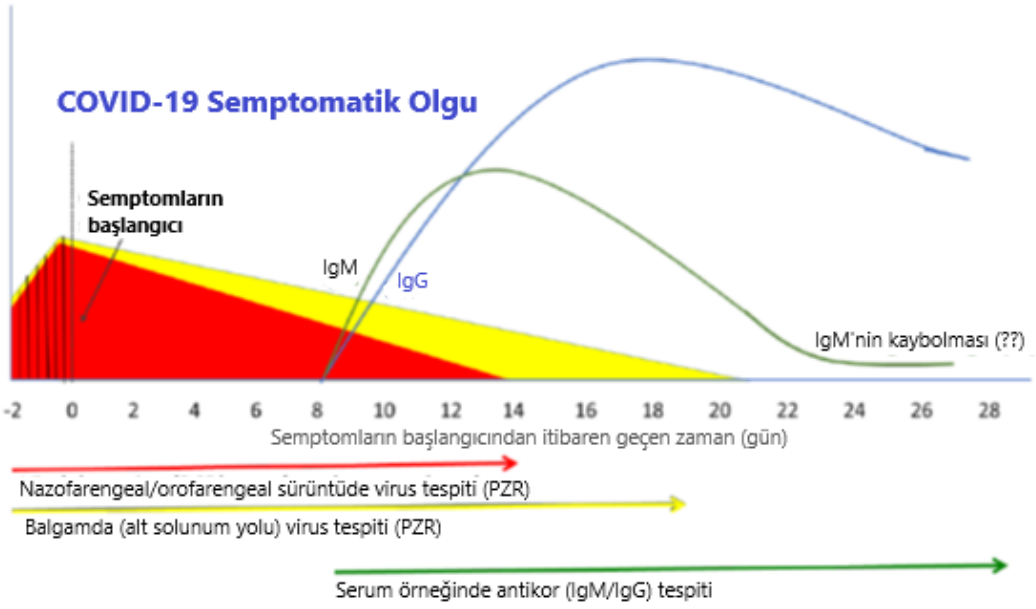
Siperlik kullanılıyorsa solunum maskesi üzerine cerrahi maske takmaya gerek yoktur.

- Oda temizliği rutin olarak günde **en az iki kez** yapılmalıdır. Ancak gerekli görüldüğü durumlarda (vücut sıvıları ile kirlenme olduğunda vb) sürenin dolması beklenmeden temizlik tekrarlanmalıdır.
- Sık kullanılan ve temas edilen kritik yüzeylerin (masa, sandalye kolları, kapı kolu, elektrik düğmesi vb.) dekontaminasyonu, alkol bazlı yüzey dezenfektanı veya 500 ppm klor çözeltisi içeren dezenfektanlar kullanılarak yapılmalıdır.
- Bunun dışında, örnek alımı esnasında görünür kirlenme ve bulaşma olduğunda önce deterjan ile temizlik yapılmalı ardından 5000 ppm klor çözeltisi içeren veya diğer yüksek düzey dezenfektanlar ile dekontaminasyon yapılmalıdır.
- Hastaya ait olan ve/veya hasta ile temas sırasında kullanılan her türlü materyal tıbbi atık torbasına atılmalı; tıbbi atıklar toplanıp (torbanın 2/3 lük kısmı dolduğunda, ağzı sıkıca kapatılarak) ortamdan uzaklaştırılmalıdır.
- Örnek alınan ortamda örnek alınan kişiye yakın konumda el antiseptiği olmalıdır.

6.1.2 Örnek ne zaman alınmalıdır?

Pandemilerde etkenin hangi klinik örneklerde ve ne zaman saptandığı Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlarının da yer aldığı multidisipliner araştırmalarla tespit edilmelidir. Akut enfeksiyonda en doğru sonucun elde edilmesinde hangi klinik örneğin alınacağının bilinmesi önemlidir.

- COVID-19 hastalarında klinik bulgular başladıktan sonraki 5-6 gün süresince hem üst hem de alt solunum yollarında yüksek miktarda virüs bulunmaktadır (Şekil 6.1).
- Semptomlu hastalardan hemen, temaslı hastalardan ulusal/uluslararası rehberlerin önerileri doğrultusunda uygun zamanda örnek alınmalıdır.



Şekil 6.1 COVID-19 enfeksiyon seyri (https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52138/PAHOPHEIHMCOVID-19200015_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

6.1.3 Hangi örnekler uygundur?

COVID-19 tanısı için mutlaka bir solunum yolu örneği alınmalıdır. Tarama ya da tanı amaçlı nazofarengeal sürüntü (NFS) ve/veya orofaringeal sürüntü (OFS) örneğinin alınması önerilmektedir (Tablo 6.1).

- NFS ve OFS örneğin birlikte alınması tercih edilmelidir. Kaynakların etkin kullanımının sağlanması açısından hastadan aynı eküvyon kullanılarak önce NFS, daha sonra OFS örneği alınmalı ve transport ortamı içine eküvyon konmalıdır.
- OFS örneği alımında hastanın öğürme ve öksürme refleksi daha yoğun aeresol oluşumuna yol açmaktadır. Bu nedenle, ayrıca virüsün NFS örneklerinde tespit sıklığının OFS örneklerine kıyasla daha yüksek olması nedeniyle, tek örnek alınması planlanıyorsa NFS örneği tercih edilmelidir.
- Tanı için alınması uygun olan diğer klinik örnekler;
  - Burun sürüntüsü
  - Nazofarengeal yıkama sıvısı/aspirasyon sıvısı ya da nazal yıkama sıvısı/aspirasyon sıvısı
  - Ekspektore balgam örneği (**indüklenmiş balgam önerilmez**)
  - Bronkoalveolar lavaj (BAL)
  - Alt solunum yolu aspiratı (derin trakeal aspirat, endotrakeal aspirat vb.)
  - Diğer solunum sistemi örnekleri (plevra sıvısı, akciğer biyopsi örneği vb.)

Tablo 6.1 COVID-19 kuşkulu semptomatik hastalardan ya da temaslılardan nükleik asit amplifikasyon testi için alınabilecek klinik örnekler (DSÖ)

Örnek türü	Örnek alınma zamanı
Üst solunum yolu örnekleri **Nazofarengeal sürüntü** **Orofarengeal sürüntü** **Nazofarengeal yıkama/nazofarengeal aspirat**	Hasta başvurduğu an.
Alt solunum yolu örnekleri **Balgam** **Trakeal aspirat** **Bronkoalveolar lavaj**	
Diğer örnekler **Tükürük / ağız çalkantı suyu, dışkı, idrar, kan, konjunktiva sürüntü örneği, plasenta, amniyon sıvısı, BOS, anne sütü**	

DİKKAT: Hastalığın erken evrelerinde ve ağır alt solunum yolu enfeksiyonu gelişen bazı olgularda nazofarenks ve/veya orofarenksten virüs saptanamayabilir. Bu nedenle tekrar örnek alınması veya alt solunum yolu örneklerinin değerlendirilmesi gerekebilir.

- İnfluenza virus ve RSV gibi diğer solunum yolu virüsleri ayırıcı tanıda unutulmamalı, klinik gereklilik halinde araştırılmalıdır.

- Solunum yolu örnekleri dışında laboratuvardan çalışılması talep edilen diğer klinik örnekler (tükürük / ağız çalkantı suyu, dışkı, idrar, kan, konjunktiva sürüntü örneği, plasenta, amniyon sıvısı, BOS, anne sütü vb) için mevcut moleküler tanı testleri henüz valide değildir.

- Ölüm veya adli gereklilik olması durumunda otopsi örnekleri de alınabilir. Otopsi, negatif basınçlı odada yapılmalıdır
- Otopsi yapılması durumunda akciğer dokusu ve solunum sistemi örnekleri değerlendirilmelidir

6.1.4 SARS-CoV-2 Ters Transkripsiyonlu PCR (RT-PCR) Testi için Örnek Almada Kullanılacak Ekipman

Örnek alımında kullanılacak ekipman (besiyeri ve eküvyon) önceden hazırlanmalıdır.

- İdeal olarak örnekler direkt olarak inaktivasyonu sağlayan *(paraformaldehit, formalin, guanidin türevleri vb. içeren)* bir ortamın içine yerleştirilmelidir.
- 1-3 mL fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, pH:7,2-7,4) veya serum fizyolojik (SF, %0,85-%0,9) de örnek alımı için uygundur. 1 ml'den az hacimler uygun değildir.
- Örneklerin alınmasında sentetik materyalden -**naylon, dakron** ya da **polyester**- yapılmış veya **flok tipte eküvyon** kullanılmalı; eküvyonun sapı **alüminyum** ya da **plastik** olmalıdır.

- Kalsiyum alginat içeren ya da pamuk eküvyonlar ile tahta saplı eküvyonlar bazı virüsleri ve PCR testini inhibe etmesi nedeniyle kullanılmamalıdır.

- Viral transport besiyeri (VTM) sağlanamıyorsa, Amies transport besiyeri, steril SF, PBS ya da nükleik asit koruyucu solüsyon (DNA/RNA shield teknolojisi ile üretilen) kullanılabilir.
- Eğer örnek alımı için steril SF veya PBS kullanıldıysa, saklama ve transfer dahil tüm süreç hızlandırılmalıdır.

- Örnek alma/transport besiyerine hastaya ait barkod yapıştırılmalıdır.
- Örnekler alındıktan sonra laboratuvara gönderilene kadar +4 °C'de saklanmalıdır.

6.1.5 Örnek Alma

Hastalar odaya tek tek alınmalı ve kimlik doğrulaması yapılmalıdır. Hastaya işlem ile ilgili bilgilendirme yapılmalı ve onay alınmalıdır.

NFS ve OFS örneği alınacaksa, burun temizliği, hapşırma/öksürük durumunda ve işlem sonrasında kullanmak için hastaya verilmek üzere kâğıt mendil bulundurulmalıdır. Hastada belirgin burun akıntısı varsa önce burnunu silmesi istenmelidir. Örnek alınmadan önce transport besiyerinin kapağı gevşetilir, eküvyon paketi şaftın bulunduğu uçtan açılır ve eküvyonun ucunun tüm süreç boyunca hiçbir yere değdirilmemeye dikkat edilir.

Örneklerin alınması, saklanması ve transportunda uyulması gereken kurallar Tablo 6.2'de özetlenmiştir.

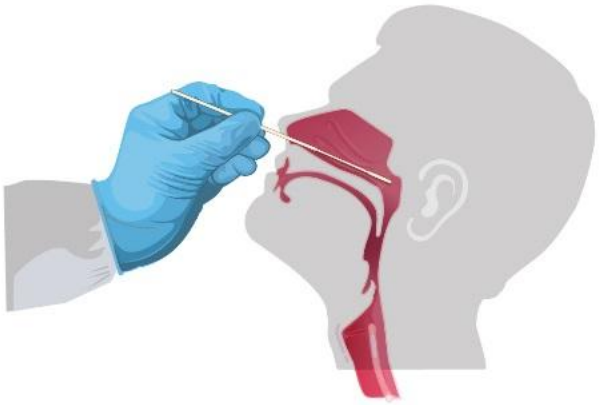
Tablo 6.2 SARS-CoV-2 PCR testi için örneklerin alınması, saklanması ve transportu

Örnek türü	Örnek Kabı	Saklama koşulları	Transport koşulları
Nazofarengeal / orofarengeal sürüntü	Dakron veya polyester eküvyon içeren VTM*	≤5 gün ➔ 2-8 °C >5 gün ➔-70°C (kuru buz)	4 °C
Bronkoalveoler lavaj	Steril kap	≤ 2gün ➔2-8 °C >2 gün ➔-70°C (kuru buz)	
Endotrakeal aspirat, nazofaringeal aspirat, nazal aspirat ya da yıkama sıvısı	Steril kap		
Balgam	Steril kap		
Doku biyopsisi, otopsi materyali	VTM* içeren steril kap		
Dışkı	Dışkı kabı		
İdrar	İdrar kabı	≤5 gün ➔ 2-8 °C: >5 gün ➔ -70°C (kuru buz)	

* VTM: Viral transport besiyeri. Tekrarlayan dondurma-çözdürme işlemlerinden kaçınılmalıdır. VTM sağlanamadığı durumlarda steril tuzlu su kullanılabilir.

6.1.5.1 Nazofarengeal sürüntü örneğinin alınması:

- Örnek; hastanın rahat nefes aldığı burun deliğinden alınmalıdır.
  - Bu nedenle hastadan önce sağ sonra da sol burun deliğini kapatarak tek burun deliğinden nefes alıp vermesi istenir ve bu işlem sonunda hangi burun deliğinden daha rahat nefes aldığı sorgulanır.
- Örnek alınan kişinin yanında durulur, alnından tutularak başı hafifçe arkaya doğru eğdirilir.
- Diğer eldeki eküvyon burun deliğinden damağa paralel olacak şekilde ilerletilir. Kulak memesi ile burun deliği arasındaki mesafenin yaklaşık 2/3'ü kadar eküvyon ilerletilmelidir.
- Nazofarengeal boşluğun arka duvarına ulaştığında yumuşak hareketlerle kendi etrafında döndürülür ve 10 saniye bekleyerek sekresyonların emilmesi sağlanır, sonra nazikçe çekilir (Resim 6.2).
- Bu işlem esnasında hastanın rahatsızlık duyması, gözünün yaşarması, uygun teknikle örnek alındığının göstergesidir.



Resim 6.2 Nazofarinks örneği alma (https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html)

6.1.5.2 Orofarengeal sürüntü örneğinin alınması:

- Dile dokunmadan posterior farinksten sürüntü örneği alınır. Dile ve yanak mukozasına temas ettirilmeden eküvyon ağızdan çıkartılır.

6.1.5.3 Burun sürüntüsü örneğinin alınması

- Eküvyon, burun deliğinden yaklaşık 1 cm içeri girecek şekilde ilerletilir, yumuşak hareketlerle döndürülerek örnek toplanır.
- Orta meatal sürüntü örneklerinin alınmasında eküvyon burun deliğinden yukarı doğru 1-1,5 cm kadar ilerletilir, kendi etrafında 10-15 sn döndürülerek epitel hücreleri toplanır. Bu işlem hastanın kendisi tarafından da gerçekleştirilebilir.

- **Klinik örneğin alındığı eküvyon** alınır alınmaz 2-3 mL steril VTM'ye yerleştirilmelidir.
- VTM; şeffaf, plastik ve ağzı fermuarlı biyolojik örnek poşetine alınmalı, her örnek ayrı bir poşete konulmalıdır. Plastik poşet içindeki örnekler dik bir şekilde ağzı kapalı "örnek taşıma kaplarına" yerleştirilmelidir.
- Transport hemen sağlanmalı, aksi takdirde transport sağlanana kadar uygun saklama koşullarında (+4 °C) bekletilmelidir.
- NFS ve OFS örneği eş zamanlı alındıysa hem testin duyarlılığını arttırmak hem de laboratuvar kaynaklarını minimum harcamak için **aynı VTM** içinde gönderilmelidir.

6.1.5.4 Nazofarengeal yıkama sıvısı/aspirasyon sıvısı ya da nazal yıkama sıvısı/aspirasyon sıvısı

- KKE giyilir, steril aspirat kiti açılır. Aspirasyon tüpüne SF çekilir, içinde yaklaşık 3 mL kalacak şekilde fazlası anjektörden akıtılır. Tüpün etrafı steril kayganlaştırıcı ile nemlendirilir.
- Hastaya prosedür anlatılır.
- Hastada nazal deviasyon veya tıkanıklık olup olmadığı sorulur.
- Hastaya kâğıt mendil verilerek burnunu silmesi istenir.
- Hasta yatırılır, başı sedyenin başucundan sarkıtılarak boynun ekstansiyona gelmesi sağlanır.
- Hastanın prosedür esnasında mümkün olduğunca nefesini tutması ve yutkunmaması söylenir.
- Burun deliğinden tüp yaklaşık kulak memesi-burun mesafesinin 2/3'ü kadar (4-6 cm) ilerletilir, enjektördeki yaklaşık 3 mL steril SF hızlıca verilir ve geri çekilir.
- Tüp enjektörden çıkartılır, enjektörün kapağı kapatılarak laboratuvara gönderilir.

6.1.5.5 Balgam örneği alınması

- Hastaya ağzını suyla çalkalaması, derin bir inspiriyum ve öksürük ardından balgam örneği vermesi söylenir.
- Balgam direkt steril bir kaba toplanır ve laboratuvara gönderilir.

İndüklenmiş balgam örneği alınması önerilmez!

6.1.5.6 Bronkoalveolar lavaj sıvısı alınması

- Deneyimli klinisyen tarafından alınmalıdır.
- Bronkoskopi ile alınan 2-3 mL örnek steril kaba konulmalı ve laboratuvara gönderilmelidir.

6.1.5.7 Diğer klinik örnekler

Solunum sistemi örnekleri dışındaki örneklerde SARS-CoV-2 RT-PCR çalışılması için mevcut kitler valide değildir. Bunlardan biri de t**ükürük örnekleridir.** Yapılmış çalışma sayısı az olmakla birlikte yakın gelecekte kullanılabilecek örnekler arasında yer alabileceği düşünülmektedir.

- Preanalitik dönemde yapılan **hatalar** (yanlış eküvyon kullanılması, yetersiz örnek alınması, yetersiz transport besiyeri kullanılması, kontaminasyon vb) yanlış sonuç alınmasına yol açacaktır.
- Alt solunum yolu enfeksiyonlarında; nazofarinks ve orofarinksten alınan üst yolunum yolu örnekleri ile yalancı negatif sonuç alınabileceği akılda tutulmalıdır. Böyle durumlarda klinik bulgusu olan hastalardan "alt solunum yolu örneklerinin" gönderilmesi istenmelidir.

Antijen testlerinde kültür ve NAAT testleri için alınan örnekler kullanılabilir. Örnek alınmasında ve testin uygulanmasında biyogüvenlik önlemleri alınmalı ve testler hastane ortamında tercihen BGD-2 koşullarında yapılmalıdır. Örnek alan ve testi uygulayan kişilerin başta FFP2 maske ve siperlik olmak üzere KKD kullanıyor olması ve atıkların bertarafında kurumsal atık yönetimine uygun davranması gerekir. Antikor testleri için serum ve plazma örnekleri uygundur.

6.2 Örneklerin Taşınması

- Örneklerin taşınmasını gerçekleştirecek görevli "eğitimli" olmalıdır.
  - Olası dökülme-saçılma olayları karşısında uygulaması gereken dekontaminasyon işlemlerinin eğitimi verilmelidir.
  - BGD-2 seviyesinde KKE kullanmalıdır.
  - Örnek artması olasılığına karşın yeterli sayıda "örnek taşıma kabı" bulundurulmalıdır.
- Gerek hastane içi, gerekse hastane dışından örnek gönderimlerinde standart üçlü paketleme kuralları yerine getirilmelidir (Resim 6.3).

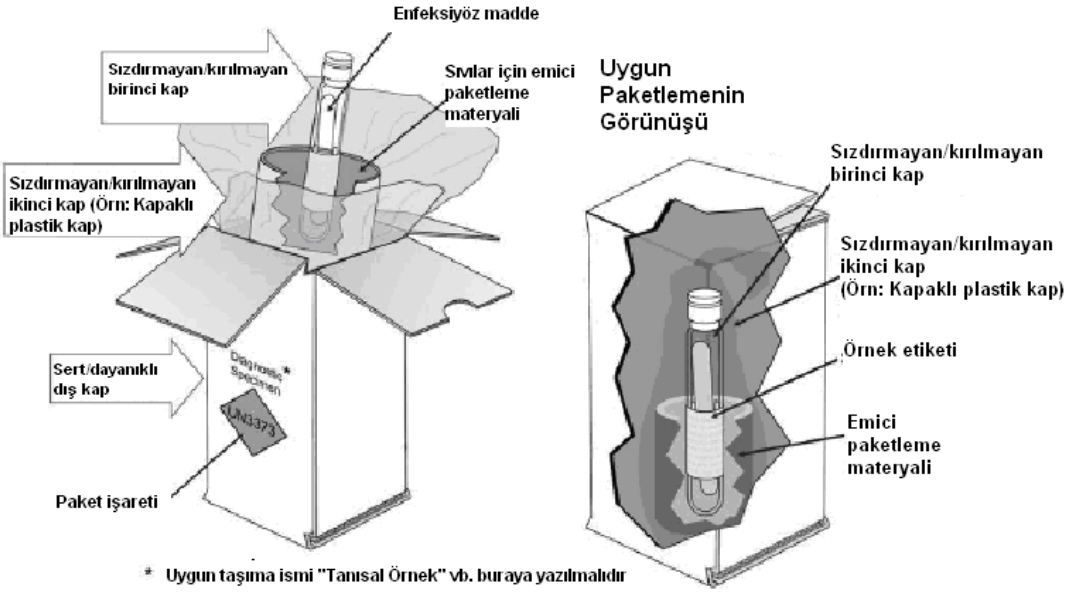
6.2.1 Hastane içinde örnek taşınması

Her merkez kendi dinamikleri doğrultusunda üçlü taşıma gereğini yerine getirmelidir.

- Örneklerin konulduğu plastik tüplerin kapağı sıkıca kapatılmalıdır. Dış yüzeyi %70'lik etanol gibi uygun bir dezenfektan ile temizlenmelidir. Dezenfeksiyon sonrası barkoddaki bilgilerin silinme olasılığına karşın kontrol edilmeli ve gerekirse yeni bir barkod yapıştırılmalıdır.
- Örnekler ikincil taşıma kaplarına dik bir şekilde konarak dökülmeden laboratuvara taşınmalıdır.
- Taşıma esnasında örneklerin ısınması engellenmeli, uygun sıcaklık ve sürede örnek nakli sağlanmalıdır.

Örnekler ASLA pnömotik sistemle (vakumlu sistem) gönderilmemelidir!

- Taşıma kutuları her kullanım sonrasında %70 alkol, 500 ppm klor içeren dezenfektan vb. ile dekontamine edilmelidir.
- Dekontaminasyonu yapılmayan örnek taşıma kutuları asla kullanılmamalıdır.



Resim 6.3. Standart üçlü paketleme

6.2.2 Hastane dışından örneklerin taşınması

- Üçlü taşıma sistemi kurallarına uyulmalıdır.
  1. Enfeksiyöz materyalin konulduğu kap
     - Örneklerin konulduğu birinci kabın kapağı sıkıca kapatılmalıdır.
     - Kırılma riskini ortadan kaldırmak için ilk kabın plastik olması tercih edilmelidir.
     - Birincil kabın dış yüzeyi %70'lik etanol gibi uygun bir dezenfektan ile temizlenmelidir.
     - Etrafı emici materyal ile sarılmalıdır.
  2. Su sızdırmaz ikincil kap
  3. Fiziksel zararı önlemeyi sağlayan üçüncü kap
- Kurum dışından araçlarla getirilen örnekler için de dezenfeksiyon kurallarına uyulması, araçların temizliğinin kurallara uygun biçimde yapılması ve örneklerin soğuk zincir kurallarına uygun olarak taşınması gerekmektedir. Bu amaçla araç şoförlerine ve diğer taşıma personeline eğitim verilmelidir.

Örnek alınması ve taşınması basamakları aşağıda sıralanmıştır:

1. Uygun KKE giyilir.
2. Hastaya kimlik doğrulaması yapılır.
3. İşlem ile ilgili bilgi verilerek hastanın onayı alınır.
4. Örnek alımında kullanılacak ekipman hazırlanır.
5. Örnek alınacak taşıma kabı üstüne hasta barkodu yapıştırılır.
6. Örnek, uygun şekilde alınarak uygun taşıma kabı içine konur.
7. Taşıma kabının kapağı sıkıca kapatılır.
8. Birincil kabın dış yüzeyi %70'lik etanol ile silinir.
9. Sırasıyla ikinci ve hastane dışından örnek geliyor ise üçüncü kaba yerleştirilir.
10. Uygun şartlarda ve hızlı bir şekilde taşınması sağlanır.
11. Eldiven çıkarılarak tıbbi atık kabına atılır.
12. KKE uygun şekilde çıkartılır

6.3 Örneklerin Laboratuvara Kabulü

- Tüm örnekler enfektif kabul edilmelidir.
- Örneklerin kabulü, gruplandırılması ve santrifüjleme işlemleri sırasında görevli olan personel BGD2 koşullarına uygun KKE giymelidir.
- Örneği kabul eden personel;
  1. Hasta ve örnek bilgilerinin kontrol edilip eşleştirilmesinden,
  2. Paketin sağlamlığının kontrolü ve dekontaminasyonundan,
  3. Örneğin hazırlanarak çalışılacağı alana taşınmasından sorumludur.
- Klinik örneklerin taşındığı poşetler sınıf IIA biyogüvenlik kabini (BGK) içinde açılmalı ve bundan sonra klinik örneğe ilişkin tüm basamaklar BGK kabini içinde gerçekleştirilmelidir.
- Poşetin dış yüzeyi uygun dezenfektan ile silinmelidir. Örnek tüpü/kabı; dezenfekte edilen poşet içinden, BGK kabini içinde çıkarılmalıdır.
- Örnek PCR öncesi laboratuvarda kullanılan ekstraksiyon yöntemine uygun şekilde ekstraksiyona hazırlanmalıdır. COVID-19 pandemisi sürecinde Shield teknolojisi ile üretilen VTM'ler kullanıldığından bu VTM'lerden vorteks ile eküvyondan epitel hücrelerinin dökülmesi sağlandıktan sonra alınan 5 µl örnek PCR analizi için kullanılabilmektedir. Nükleik asit ekstraksiyonu, laboratuvarın kabul ettiği VTM tipi ve ekstraksiyon prosedürüne uygun teknikle gerçekleştirilmelidir. Nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan lizis tamponu içinde virüs inaktivasyonunu sağlayan guanidin türevleri gibi kimyasallar ve denatürasyona yol açmayan deterjan bulunması önerilmektedir.
- **Guanidyum içeren VTM'ler kullanıldığı zaman dezenfeksiyon için toksik etki ortaya çıkacağından 500 ppm klor içeren dezenfektan kullanılmamalıdır.**

Tüplerin kırılma ve dökülmesi durumunda olay bildirimi yapılmalıdır (BKZ "Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Laboratuvar Güvenliği Rehberi, KLİMUD KORONAVİRÜS HASTALIĞI (COVID-19) LABORATUVAR BİYOGÜVENLİĞİ REHBERİ").

- Fazla miktarda örnek akışı olma olasılığına karşın örneklerin işleneceği ve saklanacağı yeterli alan olmalıdır.

- Laboratuvarla iletişimin kesintisiz (7 gün-24 saat) olması için gereken düzenlemeler yapılmalıdır. Ancak bu iletişim düzeni laboratuvarın iş akışını bozmayacak şekilde düzenlenmeli, mümkünse iletişimden sorumlu bir kişi görevlendirilmelidir.
- Örneklerin işlenmesinde gecikme olma durumunda klinik bilgilendirilmelidir.

6.4 Preanalitik Sürece ait Hata Kaynakları

- Hasta ile ilgili
  - Hasta bilgilerinin eksik /yanlış olması
  - Antiretroviral tedavi alan hastalarda test yapılması
  - Hastalığın çok erken veya çok geç döneminde örnek alınması
- Örnek istemi ve alınmasına ait
  - Barkod hataları
  - Örneklerin karıştırılması
  - Örnek miktarının yetersiz olması ya da uygun örnek alınmaması
  - Yanlış eküvyon kullanılması
- Saklama ve transport koşullarının uygun olmaması
  - Sıcaklık
  - Süre
  - Taşıma ortamının cinsi ve miktarı
- Test sonuçlarını etkileyecek maddelerin varlığı
  - Örnekte bulunan hücresel ve kimyasal komponentler (PCR inhibitörleri)
  - Uygun olmayan katkı maddelerinin eklenmesi veya ekstraksiyon aşamalarında inhibitörlerin yeterince uzaklaştırılamaması
- Örneklerin hazırlanması sırasında
  - Örneklerin PCR için hazırlanması esnasında meydana gelen teknik hatalar
  - Çapraz kontaminasyon

Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuç nedenleri için *bkz.* "7.4 RT-PCR'DE KARŞILAŞILAN SORUNLAR ve ÇÖZÜMLERİ, 7.4.1 Yalancı pozitiflik; 7.4.2 Yalancı negatiflik"

6.4.1 Preanalitik hataların bildirimi ve iyileştirilmesine yönelik çalışmalar

- Preanalitik hatalara yönelik bildirimlerin yapılabileceği bir sistem kurulmalıdır.
- Laboratuvar Hata Sınıflandırma Sistemi (LHSS), Güvenlik Raporlama Sistemi (GRS) gibi bildirim sistemlerine bildirimde bulunmaya çalışanlar teşvik edilmelidir.
- Yapılan bildirimler doğrultusunda gerekli iyileştirmeler yapılmalıdır.
- Düzeltici-Önleyici Faaliyet (DÖF) başlatılarak sorunlara çözüm bulma yoluna gidilmelidir.

Kaynaklar

1. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Refearans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, Numune Alma El Kitabı (2019), Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı
2. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Refearans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi (2014), Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı
3. KLİMUD - Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Klinik Örnekten Sonuç Raporuna Uygulama Rehberleri ve Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Rehberleri. https://www.klimud.org/content/44/rehberler
4. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Clin Chem Lab Med. 2020 Jun 5;58(7):1070-1076.
5. Tan SS, Yan B, Saw S, Lee CK, Chong AT, Jureen R, Sethi S. Practical laboratory considerations amidst the COVID-19 outbreak: early experience from Singapore. J Clin Pathol. 2020 Mar 20:jclinpath-2020-206563.
6. Wang K, Zhu X, Xu J. Laboratory Biosafety Considerations of SARS-CoV-2 at Biosafety Level 2. Health Secur. 2020 May/Jun;18(3):232-236
7. Hong KH, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY, Park JS, Kim GJ, Sung H, Roh KH, Kim JS, Kim HS, Lee ST, Seong MW, Ryoo N, Lee H, Kwon KC, Yoo CK. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. Ann Lab Med. 2020 Sep;40(5):351-360.
8. Pan American Health Organization / World Health Organization. Interpretation of laboratory results for COVID-19 diagnosis. Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52138/PAHOPHEIHMCOVID-19200015_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
9. Pan American Health Organization / World Health Organization. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis of COVID-19 Virus Infection. Washington, DC: PAHO / WHO; 2020. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52458/PAHOIMSPHECOVID-19200038_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. T.C. Sağlık Bakanlığı - Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Sağlıkta Kalite, Akreditasyon ve Çalışan Hakları Dairesi Başkanlığı. SKS Işığında COVID-19 Tanı Laboratuvarları Kalite Yönetimi Rehberi. https://shgmkalitedb.saglik.gov.tr/TR-66534/sks-isiginda-covid-19-tani-laboratuvarlari-kalite-yonetimi-rehberi-hakkinda.html.
11. Bain W, Lee JS, Watson AM, Stitt-Fischer MS. Practical Guidelines for Collection, Manipulation and Inactivation of SARS-CoV-2 and COVID-19 Clinical Specimens. Curr Protoc Cytom. 2020 Jun;93(1):e77.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Updated Jan. 6, 2021). Atlanta: CDC; 2020. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html.

14. https://www.youtube.com/watch?v=Th-bubo5lFc&t=15s
15. https://www.youtube.com/watch?v=ObyNYtlrkm4&t=25s
16. CDC. Interim guidelines for clinical specimens for COVID-19 (güncelleme 26 Şubat 2021). https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 7

COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: ANALİTİK SÜREÇ

Salgın kontrolünde enfekte ve indeks olguların hızla saptanması, izole edilmesi ve hastaların tedavi edilmesi; bulaşma zincirini kırmak ve etken olan ajanın yayılmasını engellemek için kritik önem taşımaktadır. Pandemi aşamasına gelindiğinde de toplumsal bulaşma dinamikleri ve koşullar değerlendirilerek doğru tanı algoritmasının oluşturulmasının önemi katlanarak artmaktadır. Bunun için mevcut ve ihtiyaç duyulan testlerin performans özellikleri iyi tanımlanmış olmalıdır.

Testlerin duyarlılık, özgüllükleri, uygulandıkları toplumdaki prevalansa göre pozitif ve negatif öngörü değerleri, hızları, ulaşılabilirlik durumları uygulamada dikkate alınmalıdır. İzolasyon ve kohortlama kararlarında yalancı negatiflik kadar, yalancı pozitiflik de önem taşımaktadır.

Test kapasitesinin arttırılabilmesi ve ihtiyaç olan herkese yapılabilmesi için kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç veren yöntemler tercih edilmekle birlikte, hızlı testlerde genellikle duyarlılık ve özgüllük sorunlarıyla karşılaşılmaktadır.

COVID-19 pandemisinde olduğu gibi etkenin özellikleri ve geçirdiği değişikliklerin testlere etkisi dinamik olarak değerlendirilmelidir.

Pandeminin gidişatını izleyebilmek için toplumun etkenle karşılaşmış olma oranı, bağışıklığı ve aşılama mevcutsa koruyuculuğunun tespit edilmesi anlamlıdır. Ancak, bunun için kullanılan antikor testlerinin güvenilirliği ve bağışıklığın süresinin bilinmesi gerekir.

Mikrobiyolojik tanıda mikroskobi ve kültür gibi klasik yöntemler ne yazık ki pandemide yetersiz kalmaktadır. COVID-19 pandemisinde olduğu gibi etkenin bir solunum yolu virüsü olduğu akut enfeksiyon tanısında nükleik asit testleri altın standart olma özelliğini kazanmıştır. Bu bölümde önce SARS-CoV-2 RNA'sının solunum örneklerinde saptanması için kullanılan ters transkripsiyonlu, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ("Reverse Transcription – real time Polymerase chain reaction" RT-rtPCR) uygulaması açıklanacaktır.

7.1 SARS-CoV-2 RT-PCR Testi

Solunum yolu örneklerinde, SARS-CoV-2 RNA'sını tespit ederek COVID-19 kesin tanısının konmasını sağlar.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), primerlerle sınırlandırılan özgül genomik DNA dizilerinin enzimatik amplifikasyonudur. Çoğaltılmak istenen hedef molekül RNA ise, PCR işleminden önce, reaksiyonda şablon olarak kullanılacak komplementer DNA (cDNA) dizilerinin ters transkriptaz ("reverse transcriptase") enzimi kullanılarak oluşturulması gereklidir.

PCR için istenen gen bölgesinin çoğaltılması, birbirini izleyen ve üç ayrı sıcaklıkta gerçekleşen aşağıdaki reaksiyon basamaklarının, termal döngü cihazlarında 30-40 kere tekrarlanması ile gerçekleştirilir.

- Denatürasyon ("Denaturation"): Kalıp DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması
- Tutunma/bağlanma ("Annealing"): Primer dizilerinin, amplifiye edilmesi istenen hedef gen bölgesini sınırlandıracak şekilde kalıp DNA iplikçikleri üzerindeki özgül dizilere bağlanması
- Elongasyon/uzama ("Elongation"): Isıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak, primerlerle sınırlandırılmış gen bölgesinin çoğaltılması

Gerçek zamanlı PCR analizinde elde edilen amplifikasyon ürünleri, reaksiyon esnasında hedef dizilere probların bağlanması veya ayrılması ile açığa çıkan floresansın ölçülmesi ile tespit edilir. Bu amaçla, çift iplikçikli DNA moleküllerine bağlanan özgül olmayan floresan boyalarla işaretli problar veya çoğaltılmakta olan komplementer dizi ile hibridize olan, yine floresan boyalarla işaretli sekansa-özgü problar kullanılır. Özgül probların elongasyon aşamasında Taq polimeraz enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile ayrılması sonucu açığa çıkan floresansın lazerle eksitasyonunu takiben ölçülmesi sonucu reaksiyon devam ederken amplifiye olan özgül hedefler gözlenebilir. Elde edilen ürünlerin, reaksiyon devam ederken yani, amplifikasyon gerçekleştikçe izlenebilmesi nedeniyle bu tip PCR analizi, "gerçek zamanlı" olarak adlandırılmıştır.

- Sekans analizi, yeni nesil dizileme, metagenomik yeni nesil sekanslama vb. yöntemler SARS-CoV-2'de ortaya çıkan mutasyonları belirlemede kullanılmakla birlikte, rutin tanı için uygun yöntemler değildir.
- Geliştirme aşamasında olan moleküler tanı testleri arasında "loop-mediated isothermal amplification", "multipleks izotermal amplifikasyon ve mikroarray tespit", "CRISPR temelli deney formatları" sayılabilir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), enfeksiyonun yaygın olarak görülmediği bölgelerde ilk tanı için kullanılacak RT-PCR testinin virüsün iki farklı gen bölgesine yönelik olmasını veya beta-koronavirüse spesifik RT-PCR testi ile yapılacak ilk test sonucunun virüse özgü kısmi veya tam genom sekanslama ile doğrulanmasını önermiştir.

Enfeksiyonun yaygın olduğu bölgelerde ise tek gen bölgesini hedefleyen RT-PCR testi yeterlidir. Ancak, ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), moleküler tanı testlerinde en az iki nükleokapsid protein hedefinin (N1 ve N2) kullanılmasını önerirken, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), tarama amaçlı *E* geninin kullanılmasını, takiben *RdRp* geni hedef alınarak doğrulama yapılmasını önermiştir.

- Diğer endemik koronavirüslerle çapraz reaksiyonun önlenmesi ve hedef bölgelerde ortaya çıkabilecek olası mutasyonlar sebebiyle, moleküler tanı testlerinde en az iki hedefin kullanılması önemlidir.
- İdeal hedefler bir korunmuş ve bir türe özgü bölgedir.

DSÖ ve CDC önerileri doğrultusunda, ülkemizde de tek veya iki gen bölgesini hedefleyen tanı kitleri geliştirilmiş olup yetkilendirilmiş laboratuvarlara kit temini ve dağıtımı T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yapılmaktadır. Ayrıca, piyasaya giren tüm SARS-CoV-2 tanı kitlerinin S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nde (HSGM) onaylama çalışmaları yapılmaktadır. Kitler ancak HSGM'den rutin hasta tanısı için kullanım onayı aldıktan sonra piyasada satışa sunulabilmektedir. Kitler arasında tespit edilen performans farklılıkları sıklıkla, seçilen hedef bölgesi, kullanılan primer-prob dizilerinin uygunluğu, reaksiyon şartlarının optimizasyonu gibi parametrelere bağlıdır.

RT-PCR ile SARS-CoV-2 RNA tespiti için geliştirilen ticari kitlerde kullanılan moleküler hedefler şunlardır.

- Zarf "spike" glikoproteini (S) geni
- Zarf (E) geni
- Transmembran proteini (M) geni
- Helikaz (Hel) geni
- Nükleokapsid (N) geni gibi yapısal genler
- RNA-bağımlı RNA-polimeraz (RdRp) geni
- Hemaglütinin esteraz (HE) geni
- "Open-Reading Frame" 1a (ORF1a) ve 1b (ORF1b) gibi viral replikasyon için gerekli türe özgü aksesuar genler

Bu bölgeleri amplifiye etmeye yönelik olarak kullanılan primer-probların ve uygulanan test protokollerinin analitik ve klinik performanslarını değerlendiren çalışmalar, *RdRp/Hel* hedefine yönelik testlerin alt saptama sınırının ("limit of detection", LOD) diğerlerinden daha düşük; duyarlılık ve özgüllüklerinin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Laboratuvar;

- Alacağı kitin kullandığı hedef bölgesi, analitik performans özellikleri, testin çalışma protokolü, testin içerdiği internal kontrollerin özellikleri, probların özellikleri ve kullanılan boyalara bağlı olarak okumanın hangi kanallardan gerçekleştirileceği, sonuçların yorumlanmasında kullanılacak değerlendirme parametreleri gibi özelliklerine hâkim olmalıdır.
- Testin tüm basamaklarında iyi laboratuvar uygulamaları, kalite standartları ve nükleik asit ile çalışma kurallarına uyulmalıdır.

7.2 RT-PCR İşlem Basamakları

7.2.1 Klinik örnekten nükleik asitlerin (DNA ve/veya RNA) elde edilmesi

PCR ile hedef nükleik asitlerin başarılı bir şekilde amplifiye edilebilmesi için sağlam ve temiz bir DNA/RNA şablonu elde edilmesi önemlidir. Ekstraksiyon sırasında, klinik örnekte bulunan konak hücreleri ile mikroorganizmaların hücre yapıları parçalanır, ortamda bulunan hücre artıkları, çeşitli proteinler, lipitler ve kimyasallar, nükleik asitlerden ayrılarak ortamdan uzaklaştırılır. Böylece, yoğunlaştırılmış ve saf bir şekilde nükleik asitler elde edilmiş olur. Klinik örnekten nükleik asit ekstraksiyonu, "**kirli alan**" olarak ayrılan alanda gerçekleştirilmelidir. Klinik örneklerin açılması ve nükleik asit ekstraksiyon işlemleri, BGD-2 kabin içinde ve BGD-3 şartlarına uygun kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanılarak gerçekleştirilmelidir.

Klinik örnekten nükleik asitlerin ekstraksiyonunda birçok yöntem kullanılabilir:

- Isıtma ile ekstraksiyon
- Fenol-kloroform ekstraksiyonu
- Trizol ekstraksiyonu
- Hazır ticari kitlerle ekstraksiyon
- Otomatik sistemlerle ekstraksiyon, vb.

- Birçok klinik örnek, PCR üzerine inhibitör etki gösteren çeşitli proteinler/moleküller içerir: Humik asit, polisakkaritler (glikojen vb.), heparin, hemoglobin, polisakkaritler, melanin, immünglobulinler, laktoferrin, üre, vb

- Birçok VTM, viral inaktivatörler, tamponlar, tuzlar vb PCR üzerine inhibitör etkili maddeler içerir: guanidin türevleri, fenol kırmızısı, vb

- ***Ticari ekstraksiyon kitleri* kullanıldığında**, üretici firma önerilerine uyulmalıdır.
- ***Manuel-laboratuvar yapımı yöntemler* kullanıldığında**, geçerli protokoller kullanılarak işlem gerçekleştirilmeli ve validasyon yapılmalıdır

- Nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan birçok kimyasal, uygun miktar/konsantrasyonda kullanılmadığı veya ortamdan yeterince uzaklaştırılamadığında, PCR üzerine inhibitör etki gösterebilir: Fenol-kloroform, sodyum asetat, SDS, N-lauryl-sarcosine, etanol, proteinaz-K, formalin, EDTA, vb

- Numuneler arasında kontaminasyon olmaması için iyi laboratuvar teknikleri uygulanmalı, eldivenler sık değiştirilmeli, örneklerin bulunduğu ve aktarıldığı tüplerin kapakları sıkıca kapatılmalı, işlem sonrasında ve gerektiği takdirde (dökülme-saçılma vb.) uygun yöntemlerle dekontaminasyon yapılmalıdır

- Hasta örnekleri/ekstrakte edilen RNA örnekleri 24-48 saat süreyle -20 °C'de saklanabilir.
- Daha uzun süreli saklama için -80 °C dondurucular kullanılmalıdır

Ekstraksiyon işleminde kullanılacak kitlerin, sarf malzemelerinin ve kimyasalların temininde yaşanabilecek sorunlar ile özellikle manuel yöntemlerin kullanılması durumunda ekstraksiyon işleminin uzun sürmesi ve buna bağlı olarak sonuç verme sürelerinin uzaması gibi nedenlerle pandemi sürecinde lizise dayalı VTM'ler (L-VTM) kullanılmaktadır. Bu tip transport ortamları, konak hücreleri ve mikroorganizmaları parçalayarak nükleik asitlerin serbest kalmasını sağlamaktadır. L-VTM'lerin en önemli avantajı, PCR karışımı içine doğrudan pipetlenebilmeleri sayesinde ekstraksiyon için ek malzeme, emek, zaman ve para harcama gerekliliğini ortadan kaldırmaları ve sonuç alma süresini kısaltmalarıdır. Bununla birlikte, nükleik asitleri saflaştırmaması ve yoğunlaştırmaması nedeniyle, özellikle düşük viral yüke sahip örneklerin PCR analizinde duyarlılık kaybına neden olurlar. Ortamda bulunan inhibitörlerin de uzaklaştırılamaması, inhibitör varlığına bağlı olarak PCR analizinde yalancı-negatif sonuçların alınmasına yol açabilir.

- Klinik şüpheli hastada L-VTM'den alınan örnekten doğrudan yapılan RT-PCR analizinde negatif sonuç alınması durumunda, hasta örneğinden nükleik asit ekstraksiyonu yapıldıktan sonra testin tekrarı önerilir.

7.2.2 RT-PCR analizi için reaksiyon karışımının hazırlanması

Reaksiyon karışımının hazırlanması işlemi, cDNA sentezini ve bunu takiben amplifikasyonu gerçekleştirecek enzimlerin, primer/probların, serbest deoksiribonükleotidlerin (dNTP) ve uygun tamponun bir tüp içinde bir araya getirilmesi ve uygun hacimlerde reaksiyon tüplerine dağıtılmasını kapsar.

RT-PCR analizleri için reaksiyon karışımı, "**temiz alan**" olarak ayrılan ortamda, **mümkünse PCR kabini içinde** hazırlanmalı ve PCR tüplerine/plaklarına dağıtılmalıdır.

Temiz alana dışardan; pozitif kontrol ve klinik örnekler gibi nükleik asit içeren hiçbir örnek alınmamalı, ekstraksiyon ve amplifikasyon alanları gibi kirli alanlardan malzeme sokulmamalıdır.

Temiz alanda kullanılan tüm malzemeler bu alana ait olmalı, dışarıya malzeme çıkartılmamalıdır.

Mümkünse temiz alanda çalışacak personel ayrılmalıdır. Bunun mümkün olmaması durumunda, farklı alanlarda çalışması gereken personelin temiz alanda kullanacağı KKE ayrılmalı; PCR hazırlık basamaklarının temizden kirliye doğru gerçekleştirilmesi (PCR karışımının hazırlanması → ekstraksiyon → PCR karışımına örneklerin pipetlenmesi vb.) sağlanmalıdır.

- Her çalışmadan önce ve sonra çalışma alanı temizlenerek dekontamine edilmelidir.
- Çalışma tamamlandıktan sonra, çalışmada kullanılan tüm malzemeler (pipetler, bloklar vb.) uygun şekilde temizlenip dekontamine edilerek sonraki çalışmaya hazır hale getirilmelidir. .

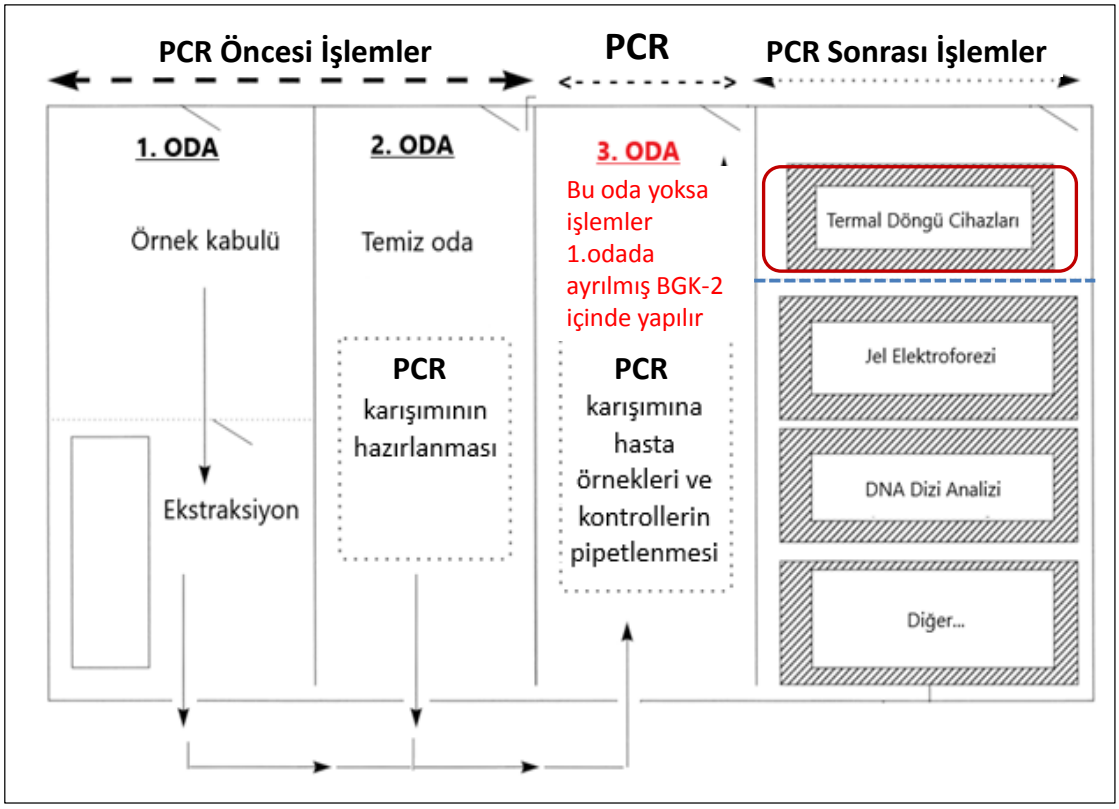
- PCR karışımı, kit üreticisinin önerileri doğrultusunda hazırlanmalı ve önerilenin dışında değişiklik yapılmamalıdır

- **Reaksiyon karışımının hazırlanmasında kullanılacak ve dağıtım yapılacak tüpler/plaklar** önceden kontrol edilerek hazırlanmalı; çatlak, kapağı oturmayan, renk değişikliği tespit edilen tüpler/plaklar kullanıl**ma**malıdır.
- **Reaktifler**, tamamen eridikten sonra ters yüz edilerek ve kısa süreli vortekslenerek karıştırılmalıdır. Spin santrifüj işlemi ile kapaktaki sıvının tüp içine inmesi sağlandıktan sonra kapakları açılmalıdır.
- Kullanılacak karışımın miktarı; çalışılacak numune sayısı, kontroller ve pipet payı (ölü hacim) dikkate alınarak hesaplanmalıdır.
- **Hazırlanan reaksiyon karışımı**, kısa süreli vortekslenerek karıştırılmalı ve spin santrifüj yapıldıktan sonra PCR tüplerine/plaklarına üreticinin önerdiği hacimde dağıtılmalıdır.

- Her çalışmada, kitin ve kit içeriğinde bulunan reaktiflerin son kullanım tarihleri kontrol edilmelidir.
- Tüm işlemler soğuk blok üzerinde veya buz içinde gerçekleştirilmelidir.
- Reaksiyon karışımı hazırlanmasında kullanılacak pipetler kalibre edilmiş olmalı, pipet uçları filtreli olmalı ve pipetlere tam oturmalıdır.
- Tüpler arasında çapraz kontaminasyon olmaması için iyi laboratuvar teknikleri uygulanmalıdır

Ekstraksiyon alanında hasta örneklerinden hazırlanan nükleik asit örneklerinin "temiz alan"da hazırlanan PCR karışımına pipetlenmesi işlemi, ayrı bir alanda (BGD2 koşulları sağlayan "**PCR alanı**" gibi), sınıf II BGK içinde ve uygun KKE kullanan personel tarafından gerçekleştirilmelidir. İdeal bir PCR Laboratuvarının tasarımı Resim-7.1'de görülmektedir.

- Ayrı bir "PCR alanı" yoksa hasta örneklerinden hazırlanan nükleik asit örneklerinin reaksiyon karışımına pipetlenmesi işlemi, ekstraksiyon alanında, BGK-2 kabin içinde gerçekleştirilmelidir



Resim 7.1: İdeal bir PCR laboratuvarının tasarımı

- **PCR karışımı içeren çalışma tüplerine önce hasta örnekleri, en son pozitif kontrol pipetlenmelidir.** Önce negatif kontrol pipetlenmeli, daha sonra sırasıyla hasta örnekleri ve pozitif kontrol pipetlenmelidir. Kontaminasyon kuşkusunda, birden fazla negatif control örneği hasta örnekleri arasına eklenebilir.
- Kontrol ve örneklerin reaksiyon karışımına pipetlenmesinden hemen sonra, tüpün kapağı kapatılmalıdır.
- Amplifikasyon esnasında cihazın optimizasyonu gerçekleştireceği, ***pozitif kontrolü*** içeren tüpün ilk tüp olması önerilmektedir.

- Her çalışmada en az bir negatif kontrol ve bir pozitif kontrol kullanılmalıdır.
- Kite ait kontrollerde ekstraksiyon yapılmamaktadır. Bu nedenle tüm işlem basamaklarını (ekstraksiyon, PCR karışımının hazırlanması ve amplifikasyon) kontrol edebilmek için düşük kopya viral RNA içeren bir hasta örneği gibi bir çalışma kontrolünün de çalışmaya dâhil edilmesi önerilmektedir.

7.2.3 PCR cihazına yükleme ve amplifikasyon

Kit üreticisinin önerisi doğrultusunda, kullanılacak program gerçek zamanlı PCR cihazına yüklenir. Hazırlanan PCR karışımları cihaza, çalışma sırasına uygun olarak yerleştirildikten sonra, kullanılan kite/kit versiyonuna uygun program seçilerek çalıştırılır. Hastalara ait örnek numaraları/hasta adları çalışma dosyasına kaydedilir. Çalışma dosyası, çalışılan günün adı ve çalışılan protokol ile birlikte bilgisayara kaydedilir. Program tamamlandıktan sonra numune tüpleri/plak, cihazdan çıkartılarak kapaklı bir kap/torba içine atılır ve ortamdan uzaklaştırılır.

- Amplikon kontaminasyonunun engellenmesi için cihazdan çıkartılan PCR tüplerinin kapağı **KESİNLİKLE** açıl**ma**malıdır.

7.2.4. Reaksiyon sonuçlarının analizi

Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra, elde edilen amplifikasyon eğrilerinin, cihaz ve kit üreticisinin önerileri doğrultusunda değerlendirilmesi gereklidir.

Bazı cihaz/sistemler, analiz işlemini otomatik olarak gerçekleştirmektedir. Bu cihazlarda, cihazın ham veriyi ("raw data = source data") analiz ederek oluşturduğu görüntü üzerinden kullanıcının değerlendirme yapması ve sonuçları yorumlaması yeterlidir.

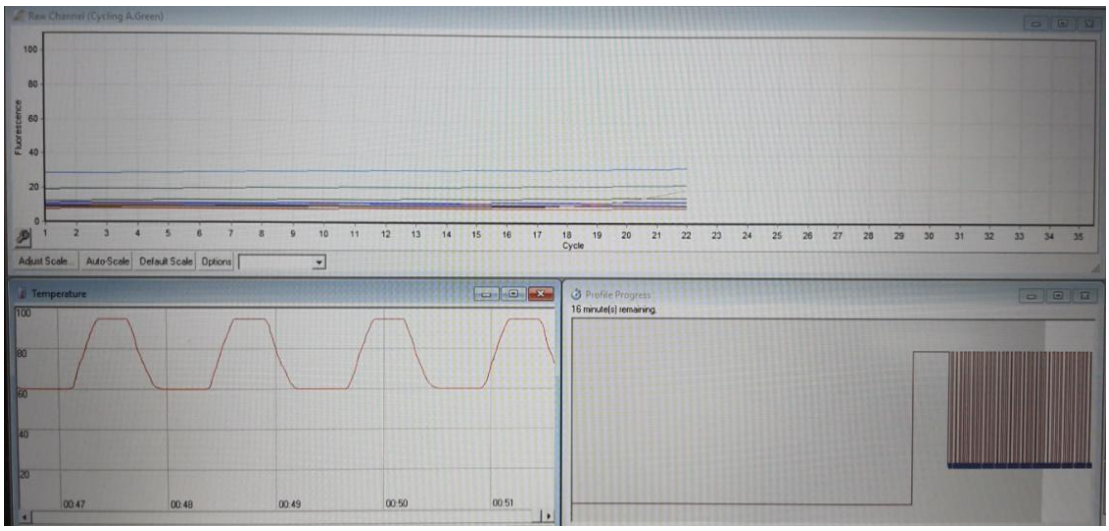
Diğer bazı cihaz/sistemlerde ise ham verinin analizi sonucu cihazın oluşturduğu amplifikasyon eğrileri üzerinde kullanıcı tarafından çeşitli optimizasyon işlemleri gerçekleştirilebilmektedir:

- Art alan ışımasının normalizasyonunu sağlayan "outlier removal",
- Amplifikasyon eğrilerinin tabana yerleştirilmesini sağlayan "slope correct = AutoCT = AutoBaseline",
- Işıma bozukluklarının sık izlendiği ilk siklusların analizden çıkartılmasını sağlayan "ignore first" vb.

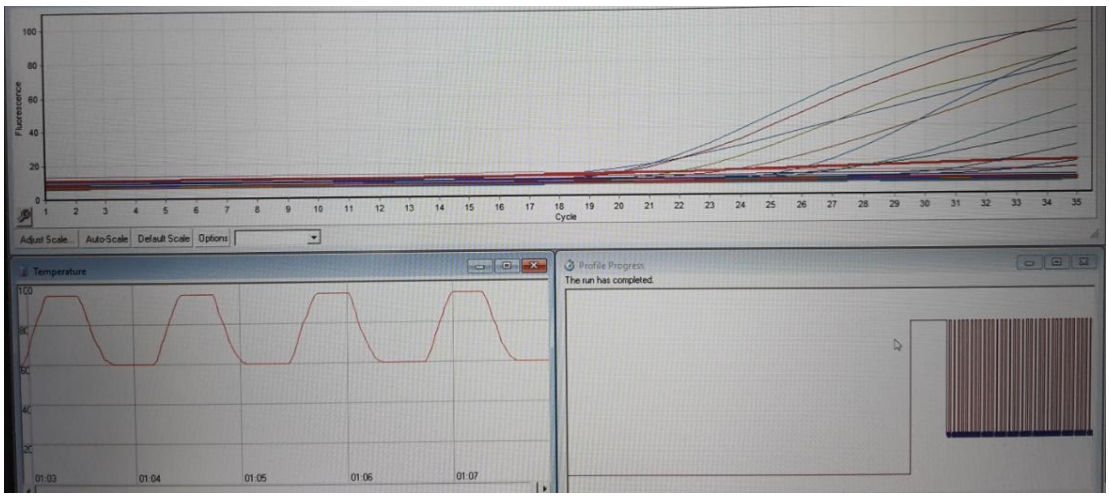
- Cihaz optimizasyon fonksiyonlarının kullanılıp kullanılmayacağına veya ayarlarının nasıl yapılacağına, öncelikle kullanılan kit üreticisinin önerileri, daha sonra cihaz üreticisinin önerileri ve kullanıcının tecrübesi doğrultusunda karar verilmelidir.

7.2.4.1 Ham verinin değerlendirilmesi

Analize başlamadan önce reaksiyon sürecini ve elde edilen ham verileri gösteren ekran değerlendirilmelidir (Resim-7.2, Resim-7.3). Ham veri, cihazın analizine temel oluşturan işlenmemiş veri olduğundan, hasta sonuçları bu görüntüye göre verilmemelidir. Hasta sonuçlarının analizi, cihazın ham veriyi analiz etmesiyle oluşan amplifikasyon eğrileri değerlendirilerek yapılmalıdır. Ancak, değerlendirmede arada kalınan örneklerde, ham veri görüntüleri anlamlı floresans artışı olup olmadığına dair bilgi vermesi nedeniyle analize destek olarak kullanılabilir.



Resim-7.2 Reaksiyon devam ederken program ve ham verilerin görünümü



Resim-7.3 Reaksiyon sonunda program ve ham verilerin görünümü

7.2.4.2. Amplifikasyon sonuçlarının değerlendirilmesi

Amplifikasyon sonunda her tüpte iki ayrı genin amplifiye olup olmadığı değerlendirilir.

- İnternal kontrol (endojen standart) geni,
- Hedef (SARS-CoV-2) gen/genler,

İnternal kontrol kanalında ve hedef gen kanalında, ilk önce reaksiyona dâhil edilen pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları değerlendirilir. Kit içeriğinde kullanılan pozitif veya negatif kontrollerde internal kontrol bulunup bulunmadığı kit prospektüsünden öğrenilmelidir. Pozitif ve negatif kontrol örneklerinde internal kontrol bulunması durumunda bunların da amplifiye olduğunun gözlemlenmesi gerekir. Hedef gen bölgesinin analizinde pozitif kontrolün sonucunun POZİTİF, negatif kontrolün sonucunun NEGATİF olması gereklidir.

İnternal Kontrol: *İnternal kontrol*, reaksiyonun optimum koşullarda gerçekleşip gerçekleşmediği, örnekte reaksiyon üzerine inhibitör etki gösteren bir madde olup olmadığını değerlendirmede önemlidir. İnternal kontrol olarak, klinik örnekte bulunan konak hücrelerinin bazal metabolizmalarını sürdürmek için sürekli eksprese ettiği yapısal genler kullanılabileceği gibi, hasta örneğine dışarıdan eklenen sentetik RNA/DNA gen dizileri de kullanılabilir. Her sisteme ve her duruma uygun tek bir internal kontrol olmadığı için farklı test formatlarında farklı internal kontroller kullanılabilir. Solunum yolu örnekleri için internal kontrol olarak sıklıkla, insan *RNazP* geni tercih edilmektedir. İnternal kontrol olarak sıklıkla kullanılan yapısal genler:

- β-aktin,
- Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH)
- Siklofilin
- Histon proteinleri,,
- Hipoksantin-guanozin fosforibozil transferaz (HPRT),,
- Dihidrofolat redüktaz (DHFR)
- RNazP vb.

İnternal kontrol geni, her hasta örneğinde hedef genle birlikte değerlendirilmelidir. Böylece;

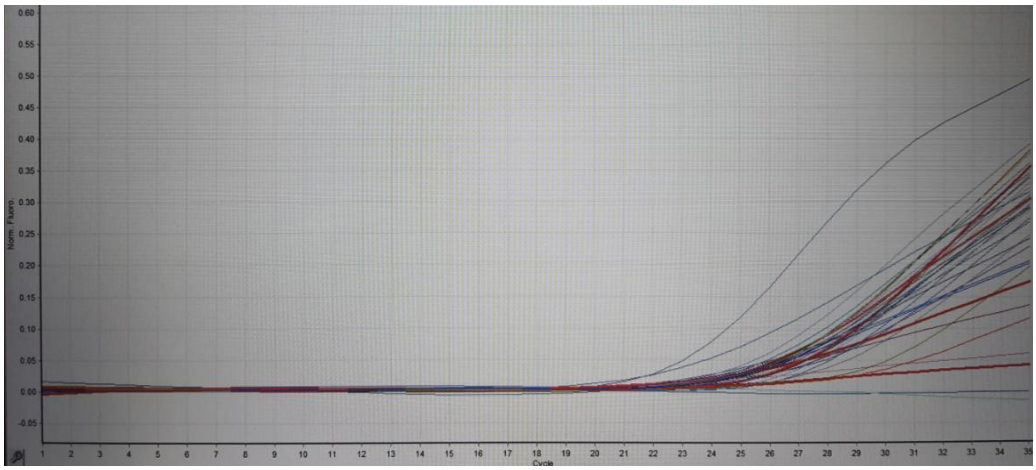
- Örnekte yeterli konak hücresi olup olmadığı,
- Ekstraksiyon ve amplifikasyonun uygun şartlarda gerçekleşip gerçekleşmediği,
- Örnekte inhibitör olup olmadığı anlaşılabilir

İnternal kontrol olarak seçilen gen bölgesine ait problar, hedef genden farklı bir florofor ile işaretlenir. Reaksiyon sonunda içinde yeterli konak hücresi bulunan, ekstraksiyon ve amplifikasyon basamakları uygun şekilde gerçekleşen ve inhibitör içermeyen tüm örneklerde internal kontrolün amplifiye olması beklenir (Resim 7.4).

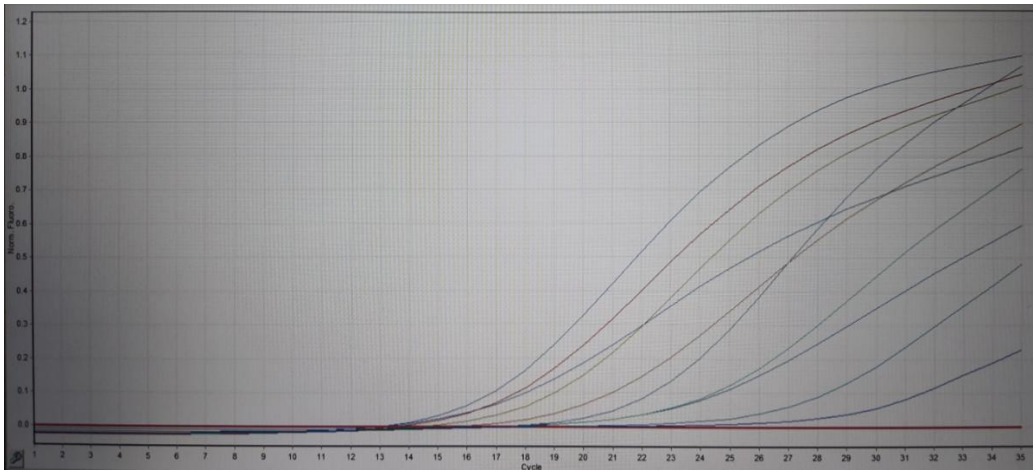
İnternal kontrol genleri işlem kontrolünü sağlamanın yanı sıra, bazı cihazlarda, yukarıda da açıklandığı şekilde, kullanıcının ayarlayabildiği, artalan ışımasının giderilmesi ("outlier removal") ve eğrinin tabana oturtulması ("slope correct") gibi optimizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesinde, dolayısıyla kalibrasyonda da referans olarak kullanılmaktadır.

Hedef gen: Klinik örnekte araştırılan hedefin (SARS-CoV-2 RNA) bulunup bulunmadığının değerlendirilmesini sağlar. Kullanılan kite göre seçilen hedef gen bölgesi ve hedef sayısı değişebilmektedir. Birden fazla hedef gen bölgesi olması durumunda, her bir hedef gen bölgesinin amplifikasyonu bir florofor ile işaretli prob yardımıyla saptanabileceğinden, okumanın yapılacağı kanallar buna uygun olarak seçilmeli ve doğru kanallardan analiz gerçekleştirilmelidir (Resim 7.5).

- Kullanılan kite göre, internal kontrol ve hedef gen bölgesi için kullanılan prob boyaları farklı olabileceğinden, "hangi kanaldan hangi gene" ait sonucun değerlendirileceği, sonuçların analizinden önce kit prospektüsünden mutlaka kontrol edilmelidir



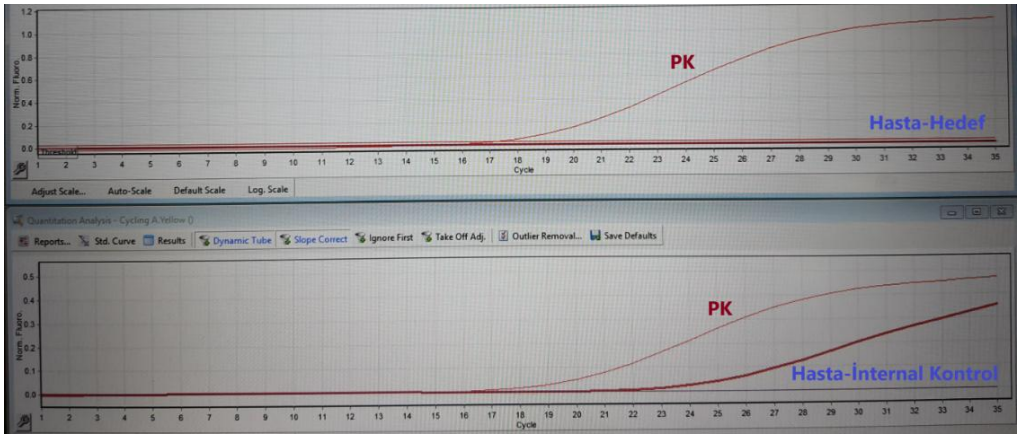
Resim-7.4: İnternal kontrol kanalı görünümü



Resim-7.5: Hedef gen kanalı görünümü

Reaksiyon sonunda;

- Çalışılan örneğin internal kontrolünde amplifikasyon saptanan ancak hedef gen (SARS CoV-2 RNA) bölgesinin saptanmadığı sonuçlar NEGATİF olarak yorumlanır ve raporlanır (Resim 7.6).



Resim-7.6 İnternal kontrol [altta] amplifiye olmuş (çalışmış), hedef gen [üstte] sonucu NEGATİF olan hasta örneğine ait amplifikasyon eğrisi (PK: Pozitif Kontrol) **[Geçerli sonuç; NEGATİF olarak raporlanır!]**

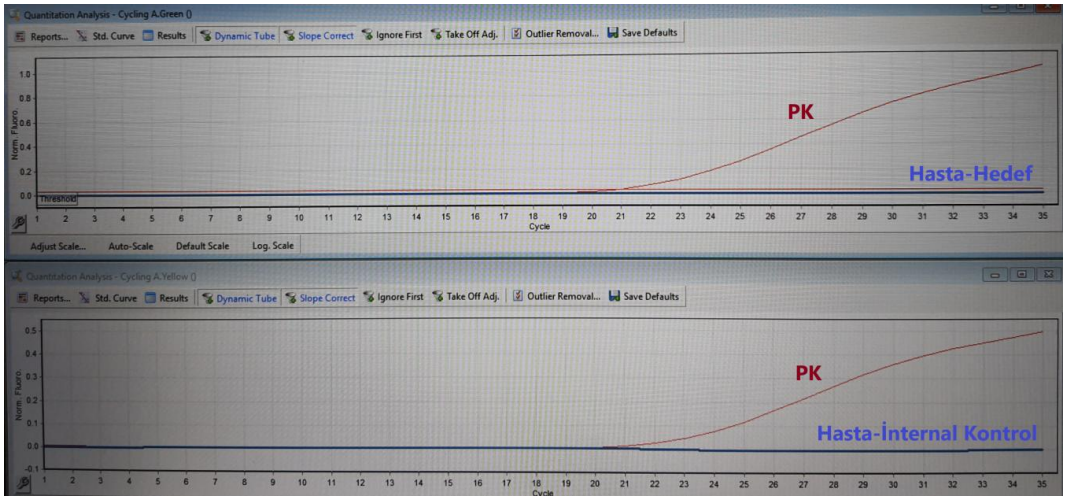
- Çalışılan örneğin internal kontrolünde ve hedef gende (SARS CoV-2 RNA) amplifikasyon saptanan sonuçlar POZİTİF olarak yorumlanır ve raporlanır (Resim 7.7).
- Gerçek bir amplifikasyonda eğrinin hem sigmoidal olması hem de eğrinin başlangıcı ile platoya ulaştığı nokta arasında anlamlı bir ışıma farkı olması beklenir. Ancak, çok az viral kopya bulunan örneklerde ışıma artışı, >35 gibi yüksek döngü eşik değerlerinde (CT) izlenebilir. Bu örneklerde sigmoidal bir eğri görülmeyebilir veya plato ışıma değeri ile başlangıç ışıma değeri arasındaki fark düşük olabilir. Bu durumda;
  - Numuneye ait eğri, pozitif ve negatif kontrol ile karşılaştırılarak yorumlanabilir.
  - Eğriye ait ham veri değerlendirilerek gerçek bir amplifikasyon ile non-spesifik ışımalar ayırt edilebilir.
  - Hastaya ait (varsa) eski sonuçlar dikkate alınarak karar verilebilir.
  - Hastanın kliniği ve diğer görüntüleme/laboratuvar bulguları değerlendirilerek sonuç yorumlanabilir.
  - **Arada kalınan durumlarda doğru karar verebilmek için hastadan yeni bir örnek istenmesi önemlidir.**
  -

Resim-7.7 İnternal kontrol [altta] amplifiye olmuş (çalışmış), hedef gen [üstte] sonucu POZİTİF olan hasta örneğine ait amplifikasyon eğrisi (PK: Pozitif Kontrol) **[Geçerli sonuç; POZİTİF olarak raporlanır]**

- **Özellikle yüksek viral yüke sahip örneklerde**; tüp içindeki hedef ve internal kontrol olarak kullanılan korunmuş gen bölgeleri, amplifikasyon için birbiri ile yarışır. Bu durumda hedefin, ortamdaki serbest dNTP ve enzimleri daha fazla kullanması sonucunda internal kontrol yeterince amplifiye olamayabilir. Bu nedenle, sonucun pozitif olduğu durumlarda, internal kontrol negatif olsa bile sonuç POZİTİF olarak raporlanmalıdır (Resim 7.8).

Resim-7.8 İnternal kontrol [altta] amplifiye olmamış (çalışmamış), hedef gen [üstte] sonucu POZİTİF olan hasta örneğine ait amplifikasyon eğrisi (PK: Pozitif Kontrol) **[Geçerli sonuç; POZİTİF olarak raporlanır]**

- İnternal kontrolün amplifiye olmadığı, hedef gen amplifikasyonunun da gözlenmediği örneklerde sonuç geçersizdir. Testin inhibitör uzaklaştırılarak tekrarlanması veya hastadan yeni örnek istenmesi gereklidir (Resim 7.9).



Resim-7.9 İnternal kontrol [altta] amplifiye olmamış (çalışmamış), hedef gen [üstte] sonucu NEGATİF olan hasta örneğine ait amplifikasyon eğrisi (PK: Pozitif Kontrol) **[GEÇERSİZ sonuç; RAPORLANMAZ, inhibitör uzaklaştırılarak veya yeni örnekle tekrar edilir!]**

Her örnek için internal kontrol ve hedef gen kanalları birlikte değerlendirilmeli ve sonuçlar Tablo 7.1'de belirtildiği şekilde yorumlanarak raporlanmalıdır.

Tablo 7.1 RT-PCR Sonuçlarının Yorumlanması

Örnek		Sonuç
İnternal Kontrol	Hedef Bölge	
Pozitif	Pozitif	SARS-CoV-2 POZİTİF olarak raporlanır
Pozitif	Negatif	SARS-CoV-2 NEGATİF olarak raporlanır
Negatif	Pozitif	SARS-CoV-2 POZİTİF olarak raporlanır
Negatif	Negatif	SONUÇ GEÇERSİZDİR. Test tekrarlanır veya yeni örnek istenir

Hem hedef gen hem de internal kontrolün NEGATİF bulunması durumunda neler akla gelmelidir?

- Klinik örneğin yetersiz olması
- Klinik örneğin uygun ortam ve/veya şartlarda saklanmaması/transfer edilmemesine bağlı olarak hedef nükleik asitlerin degrade olması
- Ekstraksiyon veya amplifikasyon basamaklarında sorun olması
- Klinik örnekte PCR'yi inhibe eden madde varlığı

Çözüm:

- Hastadan yeni örnek istenebilir.
- Aşağıdaki durumlar değerlendirilerek aynı örnekle tekrar çalışılabilir:
  - Örnek dilüe edilerek (steril dH2O veya SF ile 2-10 kat) çalışılabilir. Dilüsyon işlemi, örnekte bulunabilecek inhibitörü de dilüe edeceğinden sıklıkla RT-PCR reaksiyonunda sonuç alınmasını sağlar.
  - L-VTM kullanılmış ve ekstraksiyon yapılmamışsa, klinik örnekten ekstraksiyon yapılarak RT-PCR çalışılabilir.
  - Ekstraksiyon yapılmışsa, ekstraksiyon yöntemi değiştirilebilir (manuel→ ticari, vb.).

DİKKAT! Klinik örneğin dilüsyonu; inhibitörlerin reaksiyonu baskılama potansiyelini ortadan kaldırsa da, düşük viral yüke sahip örneklerde yalancı negatif sonuçların alınmasına neden olabilir. Bu nedenle yüksek oranda dilüsyondan kaçınılmalıdır ve dilüsyon ile hedef negatif bulunduğunda, bu olasılık bildirilmeli, gerekirse yeni örnek istenmelidiridir.

7.2.4.3 Eşik Değer ("Threshold") çizgisinin oluşturulması ve Döngü Eşik Değerinin (C_T) belirlenmesi

Gerçek zamanlı PCR'de ölçümün temel birimi döngü eşik değeridir ("threshold cycle", C_T, C_q). C_T değeri, PCR ürünü birikimine bağlı olarak bir örnekten açığa çıkan ışıma (floresans) sinyalinin, kullanıcı tarafından tanımlanan (örneğin art alan ışımasının 10 katı) bir eşiği geçtiği döngü sayısıdır. Reaksiyonun başında örnekte ne kadar çok hedef RNA varsa, ışımanın artması ve eşik değerin üstüne çıkması o kadar çabuk olur; örneğe ait C_T değeri o oranda düşük bulunur. Düşük C_T değeri veren örnekler, yüksek hedef miktarını/konsantrasyonunu gösterir, plato etkisinden (eksponansiyel olmayan ürün birikimi) daha az etkilenir ve testin duyarlılığını bozmazlar.

Genel bir kural olarak, örnekler arası **her üç C_T'lik fark**, başlangıçta **hedef RNA miktarındaki 10 katlık farkı** yansıtır.

- Eşik değer çizgisinin oluşturulmasında kit ve/veya cihaz üreticisinin önerileri dikkate alınmalıdır.
- Eşik değer eğrisine göre sonucu POZİTİF olan örneklerin amplifikasyon eğrilerinin eşik değer çizgisini kestiği CT değerleri belirlenerek kaydedilir.

Aşağıda yer alan durumlarda sonuç kesinleştirilmeden hasta sonucu raporlanmamalıdır!

- Amplifikasyon sonunda oluşan eğri, kit üreticisinin yorumlama önerilerine göre şüpheli ise
- CT değeri eşik değer çizgisinin altında ise
- Eğri, amplifikasyon eğrisi kriterlerine uygun değil ise (sigmoidal değil veya yüksekliği az)

Bu durumda aşağıdaki çözüm yöntemlerinden biri veya birkaçı uygulanabilir:

- L-VTM kullanılmışsa, örnekten ekstraksiyon yapılarak testin tekrarı
- Ekstraksiyon yöntemi değiştirilerek testin tekrarı
- Mümkün ise alternatif bir RT-PCR testi ile testin tekrarı
- Varsa hastanın eski sonuçları ile birlikte değerlendirme yapılması
- Hastanın klinik/görüntüleme/laboratuvar verileri ile birlikte durumun değerlendirilmesi
- Hastadan yeni bir örnek istenmesi ve çalışılması

Tekrarlayan sıra dışı sonuç veren örneklerin ileri değerlendirme (sekans analizi, mutasyon analizi vb.) için, transfer şartlarına uygun olarak "Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı'na" gönderilmesi uygundur

7.3 SARS-CoV-2 RT-PCR Analizi Sonucunu Etkileyen Faktörler

7.3.1 Örnek türü ve viral yük

- Farklı klinik örneklerde bulunan viral yük ve inhibitör madde miktarındaki farklılıklar, PCR sonuçları üzerine etkilidir.
- Alt solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda en yüksek viral yük sırasıyla, bronkoalveoler lavaj (BAL), trakeal aspirat ve balgam gibi alt solunum yolu örneklerinde olup bunu nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örnekleri izlemektedir.

7.3.2 Taşıma ortamı ve şartları

- Kullanılan VTM içeriği ve taşıma şartlarındaki uygunsuzluklar, PCR sonuçları üzerine etkilidir.
- Kullanılan VTM, en az 48-72 saat süreyle, alınan örnekteki viral hedef ve internal kontrol genlerinin stabilitesini sağlayıcı özellikte olmalıdır.
- Örnek alındıktan sonra, sıcaklık ve süre açısından uygun şartlarda saklanmalı ve laboratuvara transportu sağlanmalıdır.
- Oda sıcaklığında uzun süreli bekletme ve dondurma-çözdürme vb. işlemler, viral RNA'nın degrade olmasına ve yalancı negatif sonuçlar alınmasına neden olabilir.

7.3.3 Nükleik asit ekstraksiyon yöntemi:

- Ticari kitler ve otomatize ekstraksiyon yöntemleri, saf ve yoğunlaştırılmış nükleik asit elde edilmesine olanak verir. Bu nedenle düşük viral yüke sahip örnekler de dâhil olmak üzere virüsün tespit edilme olasılığını artırırlar.
- Ticari kitler ve otomatize ekstraksiyon sistemleri ile viral RNA ekstraksiyonu yapılan örneklerde RT-PCR analizi ile elde edilen CT değerleri, L-VTM'nin doğrudan kullanılmasıyla gerçekleştirilen RT-PCR analizine kıyasla 2-3 siklus düşük olarak tespit edilmektedir.
- Kullanılan ekstraksiyon yöntemi, laboratuvarın iş hacmi ile uyumlu olmalıdır. Örnek yükü fazla olan laboratuvarlarda çok sayıda örneğin eşzamanlı çalışılmasına olanak vermelidir, aksi halde kontaminasyon veya teknik aksaklıklar nedeniyle hastaya sonuç verme süresi uzayabilir.

7.3.4 Kullanılan tanı kitinin analitik performans parametreleri ve verifikasyon:

- Doğruluk ("accuracy"), tekrarlanabilirlik ("reproducibility"), özgüllük ("specificity"), duyarlılık ("sensitivity"), alt saptama sınırı ("limit of detection, LOD"), pozitif öngörü değeri ("positive predictive value, PPD") ve negatif öngörü değeri ("negative predictive value, NPD") gibi analitik parametreler, kitlerin performansı ve elde edilen test sonuçları üzerinde belirleyici etkiye sahiptir.
- LOD, testin %95 güven aralığı içinde saptayabildiği en düşük analit konsantrasyonudur. LOD değeri yükseldikçe, testin düşük kopya pozitiflikleri tespit edebilme yeteneği azalır, yalancı-negatif sonuçlar artar.
- Primer-prob tasarımının uygun olmaması, kit üretiminde karşılaşılan teknik sorunlar, kit komponentlerinin birbiri ile uyumlu olmaması, komponentlerin uygun oranlarda kullanılmaması ve reaksiyon komponentlerinin stabilite sorunları gibi faktörler, kullanılan kitin LOD değeri üzerine etkili olur.

7.3.5 Ekstraksiyon ve amplifikasyon basamaklarında kullanılan malzemelerin uygunluğu:

- Kullanılan malzemenin yapılan işe uygun olmaması, RT-PCR sonuçlarını olumsuz etkiler.
- Kullanılan pipetler kalibre edilmiş ve pipet uçlarıyla uyumlu olmalıdır.
- Kullanılan PCR tüpleri, homojen, çatlaksız/çiziksiz, şeffaf ve sağlam olmalıdır.

- Mümkün olduğunca cihaz/kit üreticisinin önerdiği marka ve kalitede malzeme kullanılmasına özen gösterilmelidir.

7.3.6 İyi laboratuvar uygulamaları

- Pipetlemenin doğru yapılması, RT-PCR gibi düşük hacimlerle çalışılan testlerde doğru ve güvenilir sonuç alınması açısından son derece önemlidir.
- Reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve amplifikasyon işlemi, kit üreticisinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmelidir.
- Kontaminasyonun engellenmesi için kullanılan malzeme ve çalışma ortamı uygun şekilde temizlenmeli ve dekontamine edilmelidir.

7.3.7 Doğru amplifikasyon şartları ve analiz

- Özellikle birden fazla üreticiye ait RT-PCR ticari kitinin kullanıldığı pandemi şartlarında, kullanılan kitin doğru programda çalışıldığından ve sonuç analizinin doğru kanallardan yapıldığından emin olunmalıdır.

7.4 RT-PCR'de Karşılaşılan Sorunlar ve Çözümleri

7.4.1 Yalancı pozitiflik

En önemli yalancı pozitiflik nedeni kontaminasyondur.

Bunun dışında, özellikle geç sikluslarda gözlenen özgül olmayan amplifikasyonlar ve primer-prob ışımaları ve buna bağlı analiz hataları da yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir.

PCR'nin en önemli avantajı olan "amplifikasyon" aynı zamanda en önemli dezavantajıdır. PCR esnasında reaksiyon karışımında bulunan özgül olmayan hedefler de kolayca amplifiye edilebilir. Kontaminasyon, RT-PCR işlem basamaklarının (örneklerin transfer tüplerine aktarılması, ekstraksiyon basamakları, PCR karışımının hazırlanması vb.) herhangi birinde gerçekleşebilir. Sıklıkla, önceki reaksiyonlardan ortamda kalan amplikonların, sonraki reaksiyonları kontamine etmesi ile gözlenen amplikon kontaminasyonu ("carry-over contamination") gözlenir. Ancak, klinik örneklerin alımı ve transportu esnasında örnek güvenliğinin sağlanamaması durumunda da çapraz kontaminasyona bağlı olarak yalancı pozitif sonuçların alınabileceği unutulmamalıdır! Yalancı pozitifliğin nedeni örnek kontaminasyonu ise, hastaya doğru sonuç verilebilmesi için testin yeni örnekle tekrarlanması gereklidir.

- Kontaminasyonun fark edilebilmesi için her reaksiyonda mutlaka negatif kontrol kullanılmalıdır.
- Kontaminasyonun en önemli göstergeleri;
  - Negatif kontrolde amplifikasyon izlenmesi,
  - Çalışılan grupta beklenenden daha fazla pozitiflik saptanması,
  - Ardışık çalışılan örneklerde pozitifliklerin gözlenmesidir.

- Kontaminasyon zamanında fark edilip önlem alınmazsa, sadece tespit edildiği çalışmaya ait sonuçları değil, takip eden diğer reaksiyonları da etkiler ve yalancı pozitif sonuçlara neden olur.

- Kontaminasyon riski/sıklığı; örnek sayısı çok olan, fiziksel koşulları uygun olmayan ve personel yetersizliği bulunan laboratuvarlarda yüksektir. Bu tip koşullarda çalışılırken her reaksiyona dâhil edilen negatif kontrol sayısının arttırılması, kontaminasyonun daha kolay fark edilmesini sağlar.
- Amplikon kontaminasyonunun kontrolü olarak, steril dH2O eklenmiş tampon karışımı veya hedef şablon içermeyen PCR tamponu ("no template control, NTC") kullanılabilir.

Kontaminasyonun engellenmesi için aşağıdaki önlemler alınabilir:

1. Doğru laboratuvar tasarımı ve uygun iş akışının sağlanması

- İyi tasarlanmış bir PCR laboratuvarında dört temel alan olmalıdır (Şekil-1):
  1. Tampon ve kimyasalların hazırlandığı bir **temiz alan**,
  2. Örneklerin kabul edilip ekstrakte edildiği **kirli alan**,
  3. Ekstrakte edilen nükleik asitlerin reaksiyon karışımına aktarıldığı bir **PCR alanı** (ayrı bir alan ayrılamıyorsa, bu işlem ekstraksiyon alanında BGK-2 kabin içinde yapılabilir)
  4. PCR ürünlerinin amplifiye ve analiz edildiği **amplifikasyon alanı**
- Malzeme ve personelin hareket yönü temiz alandan kirli alana doğru olmalıdır.
- Mümkünse ekstraksiyon ve PCR karışımı hazırlanmasında çalışan personel ayrılmalıdır. Personel ayrılması mümkün değilse, personelin kullandığı KKE, her çalışma alanında ayrı olmalıdır.

2. İşlemsel önlemler

- Tüm ekstraksiyon ve amplifikasyon işlemleri için standart uygulama prosedürleri (SUP) hazırlanmalıdır
- Yeni elemanlar eğitim sonrası işe başlatılmalı, belli aralıklarla personel eğitimleri güncellenmelidir.
- Kullanılan tampon solüsyonlar, steril distile su vb parçalara ayrılarak mümkün olduğunca tek kullanımlık olmalı, ertesi güne bırakılmamalıdır.
- Çalışma günü sonunda kabinlerin içi, pipetler, örnek tüplerinin yerleştirildiği bloklar, bankolar vb çalışma alanları dekontamine edilmeli, UV ile muamele edilmelidir.
- Çalışma alanları ve ortamların rutin temizliği ve dekontaminasyonu uygun şekilde gerçekleştirilmelidir.

3. Doğru pipetleme

- Laboratuvarda en önemli kontaminasyon nedeni "aerosol" oluşumudur.
- Uygun teknikle yapılmayan pipetaj işlemi aerosol oluşumu ve kontaminasyon riskini arttırır.

- **Pozitif değişim yapan pipetler**in kullanımı kontaminasyonu büyük oranda engeller.
- Bu tip pipetlerin temin edilememesi durumunda **bariyerli-filtreli pipet uçları** kullanılması, pipetleme işleminin türbülans yaratmadan, kontrollü şekilde gerçekleştirilmesi gereklidir.
- Örneklerin reaksiyon karışımlarına eklenme sırası, **negatif kontrol → klinik örnekler → pozitif kontrol** şeklinde olmalı, pipetaj sonrasında tüpün kapağı kapatılmalıdır.
- Çalışmaya dahil edilen pozitif kontrol sayısı az olmalı, yüksek konsantrasyonda hedef gen bölgesi içeren pozitif kontrol kullanımından kaçınılmalıdır.

4. Kimyasal inaktivasyon (Urasil-N-glikozidaz [UNG] enzimi kullanılması)

- PCR sırasında dUTP kullanılarak, dUTP'li cDNA amplikonları çoğaltılır. Böylece, örnekler UNG ile muamele edildiğinde, ortama, örneklere bulaşmış amplikonların dUTP içeren bölgeleri parçalanır, ürünün iskeleti bozulur ve tekrar amplifiye olamaz. Böylece, sonraki reaksiyonları kontamine etmesi mümkün olmaz.

7.4.2. Yalancı negatiflik:

Yalancı negatif sonuçlar, vakaların erken tanı alarak vaktinde tedaviye başlanmasını engellemenin yanı sıra bu hastaların izole edilememesi nedeniyle enfeksiyonun yayılımına da neden olabileceğinden reaksiyon sonuçları dikkatle değerlendirilmelidir. **En önemli yalancı negatiflik nedenlerinden biri PCR inhibisyonudur.** Klinik örnekte veya ekstrakte edilen nükleik asit sıvısında PCR inhibitörlerinin bulunması durumunda, örnekte hedef nükleik asit bulunmasına rağmen amplifiye edilemeyebilir.

- PCR inhibisyonu kendini sıklıkla İNTERNAL KONTROL geninde amplifikasyon izlenmemesi ile gösterir

Diğer yalancı negatiflik nedenleri şunlardır.

- Doğru zamanda, uygun yerden, uygun teknikle ve yeterli miktarda örnek alınmaması
- Uygun VTM kullanılmaması
- Uygun transport şartlarının (transport süresi ve sıcaklığı) sağlanmaması
- Örneklerin laboratuvara kabulden sonra uygun şartlarda ve sürede saklanmaması
- Kullanılan viral nükleik asit ekstraksiyon yönteminin uygunsuzluğu
- Seçilen testin analitik parametrelerinin yetersizliği

- Örnek alımı, taşınması ve saklama koşullarının uygun olmadığı durumlarda hastadan yeni örnek istenmesi gereklidir.
- Ekstraksiyon yöntemi ve RT-PCR kitine bağlı sorunların giderilmesinde en uygun yaklaşım, yöntem ve kitin değiştirilmesidir.
- Klinik şüpheli olgularda RT-PCR ile negatif sonuç alınması durumunda 24-48 saat sonra tekrar örnek alınmalıdır.
- Özellikle **akciğer tutulumu** bulguları olan hastalarda **alt solunum yolu örneklerinin alınması** doğru tanı şansını arttıracaktır.

PCR inhibisyonunun önlenmesi için aşağıdaki önlemler alınabilir:

1. **RNA ekstraksiyon/saflaştırma yönteminin değiştirilmesi veya L-VTM'den doğrudan amplifikasyon yerine ekstraksiyon yöntemi uygulanması**
2. **Örneğin dilüsyonu:** Şablon konsantrasyonunun, PCR sonucunu olumsuz etkilemeyeceği oranda dilüe edilmesi (örneğin 2-10 kat), inhibitörlerin seyrelmesine neden olarak amplifikasyonun gerçekleşmesini sağlayabilir.
3. **Tekrarlayan dondurma-çözdürme işlemleri:** Hedef nükleik asit DNA molekülü ise uygun olmakla birlikte, RNA'yı degrade edebileceğinden öneril**me**mektedir.

7.4.3 Sigmoidal Olmayan, Geç Başlayan, Alçak Amplifikasyon Eğrileri:

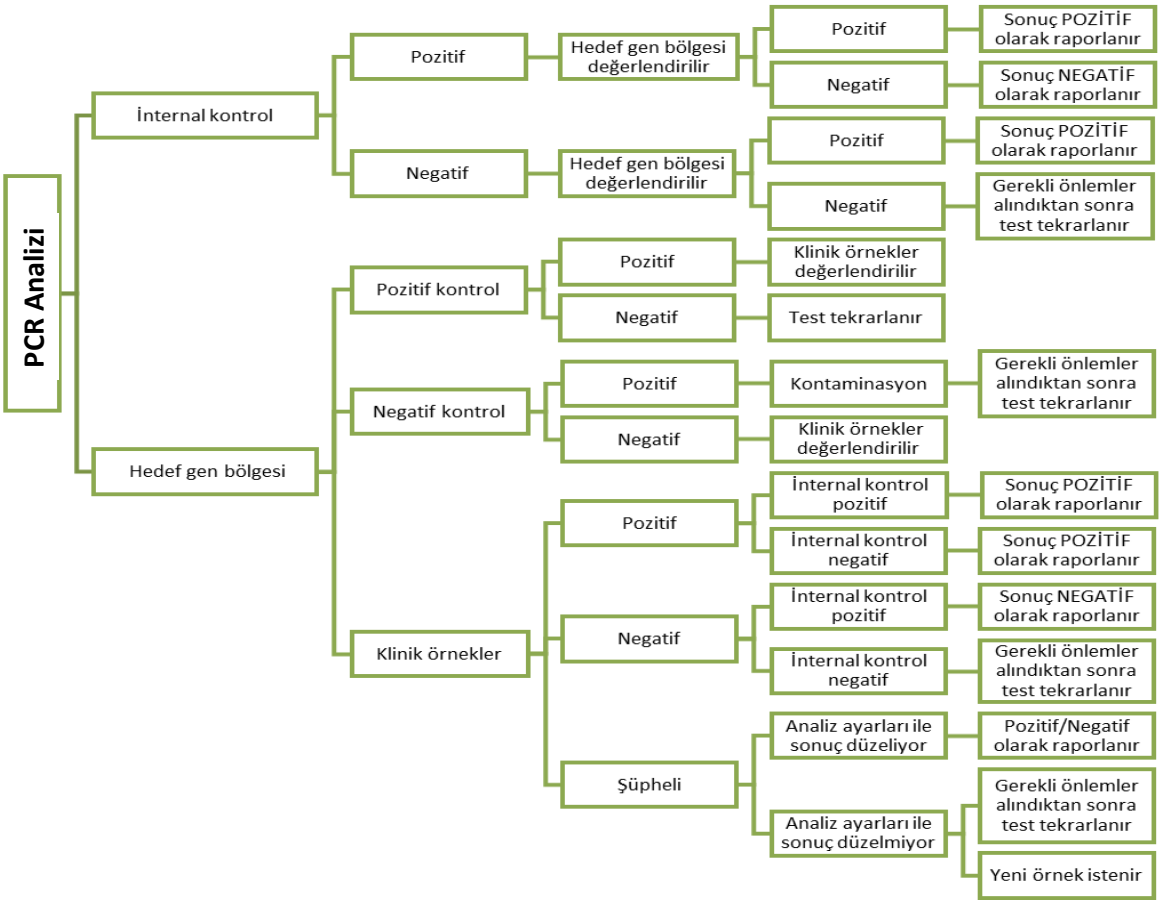
Sigmoidal olmayan, geç başlayan ve alçak amplifikasyon eğrileri olan örneklerin analizi zordur. Bu örneklerde farklı ekstraksiyon yöntemleri ve/veya farklı kitler kullanılarak analizin tekrarlanması sıklıkla doğru sonuç verilebilmesini sağlar. Sorunun tekrarlaması durumunda hastadan yeni örnek istenmesi en doğru yaklaşım olacaktır.

Artalan ışımasının genel olarak yüksek olması veya ilk sikluslarda gözlenen yüksek floresans gürültüsü de analizi güçleştirebilir. Birçok cihaz otomatik optimizasyon yaparak analizi yapılacak eğrilerin ekran görüntüsünü oluşturur. Diğer cihazlarda analiz öncesinde optimizasyon ayarlarının kullanıcı tarafından yapılması gereklidir:

- Artalan ışımasının fazla olması durumunda "outlier removal" ve "slope correct" gibi fonksiyonlar kullanılarak optimizasyon yapılabilir.
- İlk sikluslarda görülen yüksek floresans gürültüsü ise, ilk siklusların değerlendirme dışı bırakılmasını sağlayacak "ignore first" fonksiyonu kullanılarak elimine edilebilir.
- Son sikluslarda artan floresans gürültüleri, düşük kopya pozitifliklerine veya özgül olmayan primer-prob ışımalarına bağlı olabilir. "Outlier removal" fonksiyonu ile en yüksek floresans değerine sahip örnek üzerinden yapılan normalizasyon bu tip geç ışımaları sıklıkla ortadan kaldırır. Kullanılan **kit üreticisi tarafından farklı şekilde önerilmediği sürece** %1-3 değeri, uygun bir ışıma normalizasyonu sağlar, bu değerin %5'in üzerine çıkarılmaması önerilir. %5'in üstündeki değerlerde artalan ışımasının normalizasyonu, düşük kopya pozitifliklere ait geç ortaya çıkan eğrilerin de kaybedilme ve yalancı negatif sonuç verme olasılığını arttırır.
- Taban ayarı manuel olarak yapılıyorsa, en erken amplifikasyona giren (en düşük C_T) örneğe göre ayarlama yapılmalıdır. Aksi halde, amplifikasyon eğrisi daha geç ortaya çıkan örneklerde (yüksek C_T) yeterli artalan gürültüsü elimine edilememiş olabilir.

7.4.4 Özet

PCR analizi basamakları ve yorumu Şekil 7.1'de verilmiştir.



Şekil 7.1 PCR analizi basamakları ve yorumlama

Kaynaklar

1. Farrell RE. RNA Methodologies. Laboratory Guide for Isolation and Characterization, 5th ed., 2017, Elsevier, United Kingdom
2. McInerney P, Adams P, Hadi MZ. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. Molecular Biology ınternational 2014; Article ID 287430
3. Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. J Clin Microbiol 2020; 58:e00512-20.
4. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. JAMA 2020. Doi: 10.1001/jama.2020.3786.
5. Wang X, Yao H, Xu X, Zhang P, Zhang M, Shao J, Xiao Y, Wang H. Limits of detection of six approved RT-PCR kits for the novel SARS-coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Clin Chem 2020; doi: 10.1093/clinchem/hvaa099
6. SKS Işığında COVID-19 Tanı Laboratuvarları Kalite Yönetimi Rehberi. Elektronik Sürüm 1.0 - Temmuz 2020 ISBN: 978-975-590-768-0 Yayın No: 1176 (erişim: https://hastane.ksu.edu.tr/depo/belgeler/SKS%20I%C5%9EI%C4%9EINDA%20COVID-19%20TANI%20LABARATUVARLARI%20KAL%C4%B0TE%20Y%C3%96NET%C4%B0M%C4%B0%20REHBER%C4%B0%20(07.07.2020)_2007091043144289.pdf)
7. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Rehberi. Bilim Kurulu Çalışması-14.Nisan.2020, Ankara.

8. Han H, Luo Q, Mo F, Lang L, Zheng W. SARS-CoV-2 RNA more readily detected in induced sputum than in throat swabs of convalescent COVID-19 patients. Lancet Infect Dis 2020; https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30174-2.

9. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. Lancet 2020; 20: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4.

10. Wang W, Yanli X, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, Tan W. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. JAMA 2020; doi:10.1001/jama.2020.3786.

11. Corman V, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders DGJC, Haagmans BL, van der Veer B, nan den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette J-L, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans MPG, Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (1029-nCoV) by real-time PCR. Euro Surveill 2020; 25(3):pii=2000045. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

12. Yang Y, Yang M, Shen C, Wang F, Yuan J, Li J, Zhang M, Wang Z, Xing L, Wei J, Peng L, Wong G, Zheng H, Wu W, Liao M, Feng K, Li J, Yang Q, Zhao J, Zhang Z, Liu L, Liu Y. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. MedRxiv doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493.

13. Yu F, Yan L, WAng N, Yang S, Wang L, Tang Y, Gao G, Wang S, Ma C, Xie R, Wang F, Tan C, Zhu L, Guo Yi Zhang F. Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. Clinical Infectious Diseases 2020, ciaa345, https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345.

14. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, Tao Q, Sun Z, Xia L. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A report of 1014 cases. Radiology 2020; https://doi.org/10.1148/radiol.2020200642.

15. FDA. Convalescent plasma EUA letter of authorization March 9, 2021. https://www.fda.gov/media/141477/download

16. ECDC. ECDC rapid assessment of laboratory practices and needs related to COVID-19, 18 January 2021. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/covid-19-rapid-assessment-laboratory-practices-and-needs

17. CDC. Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19) (güncelleme 17 Mart 2021). https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html

18. DSÖ 7 Mart 2020 - 4 Kasım 2020 güncelleme dokümanı https://www.who.int/publications/i/item/critical-preparedness-readiness-and-response-actions-for-covid-19 ECDC 19 Kasım 2020, DSÖ 11 Eylül 2020

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 8

COVID-19 MİKROBİYOLOJİK TANI: POSTANALİTİK VE POST-POST ANALİTİK SÜREÇLER

Tanısal laboratuvar testlerinin anlamlı ve etkin bir şekilde sağlık hizmetine sunulmasının başarıyla tamamlanabilmesi için analizin tamamlanmasını takip eden süreçlerin iyi yönetilmesi gerekir.

Bir pandemide de tıbbi mikrobiyolojik testlerin sonuçlarının yorumlanıp, rapor edilmesinden zamanında doğru yere ulaştırılmasına kadar geçen süreçte basamakların etkin bir şekilde planlanmasına hazırlıklı olmak gerekir. Gerekliliklerin hepsi tüm laboratuvarlar tarafından standart bir şekilde uygulanmak üzere belirlenmiş olmalıdır.

Analizin ardından değerlendirilen sonuçların yorumlanması, kayıt altına alınması, güvenilirliğinin geriye dönük incelenmesi, kuşkulu durumlarda gerekliliklere karar verilip uygulanması, anlaşılır ve gerekli bilgilerin tümünü içeren bir formatta rapor edilmesi basamakları **"postanalitik"** süreci oluşturur.

"Post-postanalitik" süreçte ise sonuç raporlarının güvenilir bir şekilde yetkili kişilere ve kurumlara ulaştırılmasının sağlanması, tüm sürecin geriye dönük izlenebilir olmasının garanti altına alınması, kontrolü ve değerlendirilerek gerektiğinde iyileştirmelerin yapılması basamakları yer alır.

Bu basamakların iyi işletilmesi sayesinde laboratuvar süreçlerinin izlenebilirliği ve hesap verebilirlik sağlanır. Böylece, salgın/pandemi yönetimine ve filyasyona yönelik iyileştirmelerde bulunulabilir.

Bu bölümde COVID-19 pandemisinde yaşanan deneyimlerden yola çıkılarak, postanalitik ve post-postanalitik süreçlerdeki uygulamalar örneklerle açıklanmaktadır.

8.1 Postanalitik Süreç Yönetimi

8.1.1 Sonuçların yorumlanması

COVID-19 test sonuçlarının yorumlanması ve raporlanması, değişen kit versiyonları, protokoller, cihazlar göz önüne alındığında deneyimli Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık bilgisini gerektirmektedir. Bu nedenle sonuçların yorumlanması tüm laboratuvar testlerinde olduğu gibi COVID-19 testleri için de oldukça kritik bir aşamadır.

- Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı, hastaya ait klinik bilgileri ve testin tüm süreçlerini bütüncül bir yaklaşımla değerlendiren konsültan kimliğiyle de önemli rol oynar.
- Numune alınma zamanı (semptomların başlamasından veya temastan sonra kaçıncı günde numune alındığı) testin yorumlanmasında çok önemlidir.
- Pozitif PCR sonucu hastanın klinik örneğinde SARS-CoV-2 RNA varlığını gösterir.
  - Her pozitif sonuç aktif enfeksiyon varlığını göstermez. Klinik örneğin alınma zamanı sorgulanmalı, izolasyonun sonlandırılacağı dönemde alınan örneklerde, RNA varlığının canlı virüs göstergesi olamayacağı unutulmamalıdır!
  - Mikrobiyolojik veriler klinik ve radyolojik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir.
- Negatif PCR sonucu hastanın klinik örneğinde SARS-CoV-2 RNA olmadığını gösterir. Bu durumda;
  - COVID-19 tanısının dışlanamayacağı,
  - Numunenin alınma zamanının ve kalitesinin sonucu etkileyebileceği,
  - PCR sonuçları negatif olmasına rağmen klinik şüphenin devam etmesi durumunda, testin 24 veya 48 saat sonra yeni numune ile tekrar edilmesinin uygun olacağı,
  - Alt solunum yolu enfeksiyonu bulguları olan hastalarda, mümkünse alt solunum yolu örneğinin tercih edilmesi gerektiği bildirilmelidir.

Yalancı negatiflik nedenleri

- Enfeksiyon dönemine uygun numune olmaması (üst solunum yolu / alt solunum yolu)
- Numunenin iyi alınmaması
- Taşıma besiyerinin uygun olmaması, miadının geçmiş olması
- Numunenin serviste, transfer edilen araçlarda, laboratuvarda uygun olmayan sıcaklıkta saklanması
- Laboratuvara transfer süresinin uzaması/numunelerin bekletilmesi
- Numunede PCR inhibitörü bulunması
- Numunedeki virüs miktarının testin analitik duyarlılığının altında olması
- Nükleik asit izolasyonunun başarılı olmaması

Yalancı pozitiflik nedenleri

- Çapraz kontaminasyon
  - Numuneler arasında,
  - Reaksiyon karışımları arasında,
  - Pozitif kontrol ile numuneler arasında,
- Özgül olmayan reaksiyon

PCR testinin tekrarlanma nedenleri

Kuşkulu (belirsiz) sonuç elde edildiyse test tekrarlanmalıdır. Tüm süreç gözden geçirilmelidir:

- *Preanalitik süreç;*
  - Klinik ile iletişime geçilerek numune alımı konusunda bilgilendirme yapılmalıdır.
  - Doğru yöntemle doğru anatomik bölgeden/yerden numune alındığından emin olunmalıdır.
  - Numunenin uygun VTM ile transferinin soğuk zincir ile sağlandığı teyit edilmelidir.

Yeni bir numune ile test tekrarında, mümkünse alt solunum yolundan veya birden çok bölgeden numune alımı tercih edilmelidir.

- *Analitik süreç;*
  - Tüm reaktiflerle ve kontrol materyalleri için:
    - son kullanma tarihi,
    - soğuk zincir koşulları,
    - saklama koşulları gözden geçirilmelidir.
  - Cihazlar ve analitik sürece ilişkin kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirilmelidir.
  - Personelin standart uygulama prosedürlerine uyumu değerlendirilmeli, gerektiğinde düzeltici faaliyetler yapılmalıdır.
  - Kontaminasyondan kuşkulanıldığında, çalışma alanları, kullanılan malzemeler ve cihazların dekontaminasyon işlemleri gerçekleştirildikten ve sarf malzemeler değiştirildikten sonra çalışma tekrarlanmalıdır.
  - Özellikle pandemi sürecinin uzaması ile farklı firmalardan farklı kit üretimleri başlamış ya da firmaya ait kitlerde versiyon değişikliğine gidilmiş ve kitler arası farklılıklar karşılaştırılabilir hale gelmiştir.
  - **Kit ve cihaz uyumsuzluğundan kaynaklanan sorunlar;**
    - C_T değerinin kit üreticisinin önerdiği sınır CT değerinin üzerinde olması,
    - Amplifikasyon eğrisi (sigmoidal) kriterlerine uymayan dik/keskin/doğrusala yakın eğri izlenmesi,
    - Bazı kitlerde olduğu gibi iki farklı hedef bölge analizinde bir bölgenin pozitif, diğerinin negatif olması şeklinde görülebilir.
    - Kit ve cihaz uyumsuzluğundan kaynaklanan sorunlar göz önünde bulundurularak firma yetkilileri ile sorun çözülmeye çalışılmalıdır.
    - Bu durumlarda numuneden tekrar nükleik asit izolasyonu yapılarak RT-PCR tekrarı, mümkünse alternatif bir RT-PCR testi ile çalışılması, yeni bir numune istenerek hastanın tüm verileri ile birlikte klinisyen ile değerlendirilmesi önerilir.

Kesin sonuç verilemediği durumlarda; numuneler ileri düzeyde değerlendirilmek üzere Ulusal Viroloji Referans Laboratuvarı'na gönderilmeli ve hastadan yeni örnek istenmelidir.

Kit, cihaz, personel ve diğer ekipmanın test sonuçları üzerindeki etkileri sürekli ve düzenli olarak laboratuvar tarafından takip edilmeli ve kayıt altına alınmalıdır.

Kit markası değişimlerinde ya da aynı kitin farklı versiyonlarında hatta farklı kutularda ya da aynı kitin farklı cihazlarda çalışılmasında saptanan değişiklikler kayıt altına alınarak ilgili firmaya ve HSGM ye (gerekirse tutanak rapor şeklinde) geri bildirim verilmelidir

8.1.2 Sonuçların Raporlanması

- "Yetkilendirilecek COVID 19 Tanı Laboratuvarının İşleyişine İlişkin Görev ve Yetki Sorumlulukları" başlıklı bölümde "k" bendi uyarınca ***Yetkili Mikrobiyoloji Uzmanı*** test onaylarını **en geç 24 saat içinde** tamamlayacak şekilde yapmalı, onaylama nedenli gecikmelere neden olmamalıdır.
- LBYS üzerinden sonuç girişi yapılarak onaylanmalı ve HSYS ve e-nabız portalı üzerinden hekim ve hastaların hasta sonuçlarına erişebilmesi sağlanmalıdır.

Mikrobiyoloji uzmanının onayladığı test sonuçlarının, filyasyon çalışmaları için, İl Sağlık Müdürlüğü yetkilileri ve saha çalışanlarına düzenli bir veri akışı şeklinde ulaştırılması, salgınla kontrolde kilit öneme sahiptir.

Rapor içeriğinde yer alması gereken bilgiler (Resim 8.1)

- Ad-soyad
- TC kimlik numarası (mahremiyete uyularak)
- Doğum tarihi
- Dosya no/ Protokol no
- Yetkili (sorumlu) doktor ad-soyad
- İstem nedeni-ön tanı
- Örnek alma tarih-saati
- Numune kabul tarih-saati
- Referans değer
- Sonuç onay tarihi-saati
- Onaylayan ad-soyad

Sonuç raporları hastaya/klinisyene açıklama yazacak şekilde tasarlanmalı, sonuç raporlanırken gerekli açıklamalar buraya kaydedilmelidir (Resim 8.2).

Sonuç raporlarının iyileştirilmesine yönelik öneriler

- Hastaya ait daha önceki test sonuçlarının da raporda olması:
- Sonuca ilişkin yorum yazılması
  - Test sonucunun pozitif olması, örnekte SARS-CoV-2 RNA varlığını gösterir. Aktif enfeksiyon açısından klinik değerlendirme önerilir.
  - Test sonucunun negatif olması, COVID-19 tanısını dışlamaz. Yüksek temas riski ve/veya klinik şüphe olması durumunda 24 saat sonra test tekrarı önerilir.

1/1

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

Numuneyi Gönderen Kişi/Kurum/Kuruluş :
Fatura Kurumu :
İlgili Yazı Evrak ve Sayısı : /

HASTA BİLGİLERİ		ÖRNEK BİLGİLERİ		
Adı-Soyadı	:	İstem Nedeni / Ön Tanı	:	
T.C. Kimlik No	:	Örnek Alınma Tarih, Saati	:	28.04.2020 / 00:00
Cinsiyet	:	Numune Kabul Tarih, Saat	:	28.04.2020 / 14:16
Doğum Tarihi	:	Laboratuvar No	:	
Dosya No	:	Laboratuvar Kabul	:	28.04.2020 / 14:16
Num.Kabul No	:	Protokol/Sıra	:	2020/3902 / 1

KLİNİK LABORATUVAR

Çalışılan Analiz	Birim	Yöntem	Tayin Limiti	Referans Değer	Analiz Sonuçları	Materyal	Sonuç Tarih - Saati / Onaylayan
Real time PCR 1-5 çift (2019nCoV real time PCR)		Real time PCR			NEGATIF	Kombine Burun Boğaz Sürüntüsü	28.04.2020 18:57 /

Laboratuvar Sorumlusu

Resim-8.1. Raporda bulunması gereken bilgiler

Numuneyi Gönderen Kişi/Kurum/Kuruluş :
Fatura Kurumu :
İlgili Yazı Evrak ve Sayısı : /

HASTA BİLGİLERİ		ÖRNEK BİLGİLERİ		
Adı-Soyadı	:	İstem Nedeni / Ön Tanı	:	
T.C. Kimlik No	:	Örnek Alınma Tarih, Saati	:	03.05.2020 / 00:00
Cinsiyet	:	Numune Kabul Tarih, Saat	:	03.05.2020 / 14:09
Doğum Tarihi	:	Laboratuvar No	:	
Dosya No	:	Laboratuvar Kabul	:	03.05.2020 / 14:09
Num.Kabul No	:	Protokol/Sıra	:	2020/4453 / 1

KLİNİK LABORATUVAR

Çalışılan Analiz	Birim	Yöntem	Tayin Limiti	Referans Değer	Analiz Sonuçları	Materyal	Sonuç Tarih - Saati / Onaylayan
Real time PCR 1 reaksiyon		Real time PCR			NEGATIF	Kombine Burun Boğaz Sürüntüsü	03.05.2020 22:46 /

Analiz Açıklama: Negatif sonuç Covid-19 tanısını dışlamaz.

Laboratuvar Sorumlusu

Resim 8.2. Açıklama alanı doldurulmuş rapor örneği

8.1.3 Numunelerin saklanması ve şahit numuneler

- Konuya ilişkin güncel değişiklikler takip edilmelidir:
  - Pandemi sürecinin başında HSGM tarafından, COVID-19 tanı testlerinin çalışılması için yetkilendirilmiş laboratuvarlardan, her hafta negatif ve pozitif numunelerin gönderilmesi istenmiştir.
  - 21.07.2020 tarihinden itibaren HSGM'den gönderilen resmi yazı ile; negatif numunelerin biyogüvenlik kurallarına göre imha edilmesi, pozitif numunelerin ise laboratuvar imkanları dahilinde saklanması gerektiği bilgisi yetkilendirilmiş laboratuvarlar ile paylaşılmıştır.

8.1.4. Gizlilik ve mahremiyet

- Yetkilendirilmiş laboratuvarlarla yapılan sözleşme gereğince;
  - COVID-19 kapsamında yapılan testler ve sonuçlarıyla ilgili bilgi ve belgelerin gizliliğinin muhafaza edilmesi,
  - Bu bilgi ve belgelerin HSGM dışında kurumun diğer birimleri de dahil olmak üzere hiçbir kurum veya kuruluş ile paylaşılmaması hasta, çalışan ve bilgi güvenliği açısından gerekmektedir.

8.1.5 Kayıt ve Arşiv

"Yetkilendirilecek COVID19 Tanı Laboratuvarının İşleyişine İlişkin Görev ve Yetki Sorumlulukları" başlıklı bölümün "o" bendinde "Yapılan tüm çalışmaların kayıtları, örnek kayıt ve sonuç formları süresiz, kalibrasyon ve kontrol kayıtları ise 10 (on) yıl saklanmalı ve sadece sorumlu kişilerin ulaşabileceği ortamda bulundurulmalıdır" şeklinde ifade edilmiştir.

8.2 Post-Postanalitik Süreç Yönetimi

8.2.1 Sonuç bildirimi

- Test sonuçları LBYS'ye girilmekte, Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanının onayından sonra HSYS'ne aktarılmaktadır.
  - LBYS ile HSYS arasında veri aktarımı gecikmemelidir.
  - Hastane ve İl Sağlık Müdürlüklerinin idarecileri tarafından filyasyon ekiplerine sonuçların bildirimi yapılacağı için gerek kurum içinde gerekse İl Sağlık Müdürlüklerinde yetkisi olan kişiler tarafından hasta sonuçları görülebilir olmalıdır.

Elde edilen sonuçlar sorumlu hekime vakit kaybedilmeden, en kısa zamanda bildirilmelidir.

8.2.2 Laboratuvar süreçlerinin izlenebilirliği ve hesap verebilirlik

Laboratuvar gerek imzaladığı protokol gerekse SKS kapsamında, hasta ve çalışan güvenliği, bilgi güvenliği, hasta mahremiyeti başta olmak üzere tüm süreçler için hesap verebilir olmalıdır.

- Sağlıkta Kalite Standartları çerçevesinde, alınan numunenin ve testin, analiz öncesi, analiz ve analiz sonrası süreçlerinin izlenebilir olması sağlanmalıdır. Aşağıdaki parametreler kullanılarak test süreci ile ilgili geriye dönük kayıtlar izlenebilmelidir.
  - Hastanın adı-soyadı
  - Hastanın yaşı
  - Hastanın cinsiyeti
  - Protokol numarası
  - İstem tarih ve saati
  - İstemi yapan hekimin adı-soyadı, bölümü
  - Numune türü
  - Numunenin;
    - Alındığı tarih ve saat
    - Laboratuvara kabul edildiği tarih ve saat
    - Kim tarafından kabul edildiği
  - Testin çalışıldığı cihaz veya yöntem
  - Varsa test tekrarı ve sonuçları
  - Sonucun onaylandığı tarih ve saat
  - Çalışmanın analizini yapan kişi(ler)
  - Sonucu onaylayan Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar uzmanının adı-soyadı

- **Sürecin izlenebilirliğinde aşağıda yer alan göstergeler (indikatörler) önemlidir:**
  - Numunelerin kurum içi maksimum transfer süresi
  - Numunelerin dış kurumlar maksimum transfer süresi
  - Numune alım zamanı ile laboratuvara kabul zamanı arasındaki süre
  - Sonuç bildirim süresi
  - Laboratuvara numunelerin kabul zamanından sonuç onay zamanına kadar geçen süre

İl bazında hastanelerden gelen numunelerin sonuçlanma süresi ile sahadan yetkilendirilmiş laboratuvarlara gelen numunelerin sonuçlandırılma süreleri belirlenmiş olup, saha koordinatörlerince bu süreler takip edilerek, filyasyon sürelerinin kısaltılmasına yönelik iyileştirmelerde bulunulmalıdır. **Yetkilendirilmiş Laboratuvar Protokolü**nün 5. maddesinin a-t fıkralarında tanı laboratuvarlarının denetimi konusu yer almaktadır.

Kaynaklar

1. SKS Işığında COVID-19 Tanı Laboratuvarları Kalite Yönetimi Rehberi.Sağlık Bakanlığı Kalite, Akreditasyon ve Çalışan Hakları Dairesi Başkanlığı. Elektronik Sürüm 1.0 - Temmuz 2020.Ankara.
2. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Web Sayfası: https://333hsgm.saglik.gov.tr/tr/.
3. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlıkta Kalite ve Akreditasyon Dairesi Başkanlığı (2014). Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları Kalite Yönetimi Rehberi, Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 9

SARS-CoV-2 ANTİJEN TESTLERİ

Antijen (Ag) testleri ile klinik örnekte etkenin özgül proteinleri araştırılır. Teknik olarak nükleik asit amplifikasyon testlerine göre duyarlılık ve özgüllüklerinin daha düşük olması beklenir. Uygulama kolaylıkları ve daha hızlı sonuç verme kapasiteleri nedeniyle mikrobiyolojik tanıda yer almakla birlikte, enfeksiyon etkenine, enfeksiyonun dönemine ve klinik örneğe göre güvenilirlikleri değişir.

COVID-19 mikrobiyolojik tanısında altın standart halen RT-PCR testidir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı kesin vaka tanımında da kabul edilen tanı testi henüz RT-PCR'dir. Bununla birlikte, pandemide geldiğimiz noktada toplumsal hareketliliğin de artmasıyla daha çok test yapılmasına ihtiyaç vardır. Bunun için uygulanabilir, akılcı yeni test stratejilerinde antijen testlerinden yararlanılabilir.

Salgının başlangıcında geliştirilmiş olan antijen testlerinin duyarlılıklarının ve özgüllüklerinin oldukça düşük olması nedeniyle önceleri kullanımları uygun görülmemiştir. Ancak, son dönemde duyarlılık ve özgüllük oranları oldukça yüksek, nazofarengeal ve nazal örnekler için standardize edilmiş antijen testleri kullanıma sunulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü, A.B.D. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), İlaç ve Gıda Kurumu (FDA), Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC) ile birçok ülkenin sağlık otoritesi/kurumları tarafından tanımlanmış hedef populasyonlar için belirlenmiş algoritmalar doğrultusunda kullanılmak üzere acil kullanım onayları verilmiştir. Tükürük örnekleri ile gerçekleştirilen antijen testleri de mevcut olmakla birlikte, yöntem onaylarına ihtiyaç vardır ve kullanımları için kanıtlar şimdilik yeterli değildir. Dünya Sağlık Örgütü, Eylül 2020'de yayımladığı Geçici Kılavuzda nükleik asit testlerine ulaşılamadığı ve acil sonuç gereken durumlarda belirli koşullara dikkat etmek kaydı ile COVID-19 laboratuvar tanısında antijen testlerinin algoritmalara girebileceğini tanımlamıştır.

SARS-CoV-2 antijen testlerinin duyarlılığının nükleik asit amplifikasyon testlerine (NAAT) göre daha düşük olması nedeni ile DSÖ, ECDC ve CDC tarafından tek başına kullanımı henüz önerilmemektedir ve kullanılacağı topluluğun prevalansına göre algoritmalar oluşturulması gerekmektedir.

COVID-19 tanısı için geliştirilmiş mevcut antijen testlerinin başarılı olabilmesi için örnekte yüksek virüs yüküne ihtiyaç vardır.

- Virüs yükünün yüksek olduğu; semptomların başlamasından önceki 1-2 gün ve izleyen 5 gün içinde yapılmaları halinde güvenilir sonuçlar elde edilebilir.
- PCR testlerine ulaşılamadığı veya hızlı ön değerlendirmenin gerekli olduğu durumlarda duyarlılık ve özgüllüklerinin PCR testlerine kıyasla düşük olduğu göz önünde bulundurulmak kaydı ile antijen testlerinden yararlanılabilir.

SARS-CoV-2 PCR yöntemi ile antijen testlerini karşılaştıran çalışmalarda, antijen testlerinin en iyi sonuç verdiği durumun PCR Ct değerinin <25 veya virüs yükünün 1.000.000 kopya/mL olduğu dönem olduğu görülmektedir. Ancak, kullanılan PCR testinin performansına göre Ct değerinin değişeceği akılda tutulmalıdır.

Antijen testinin doğrulamasının gerektiği durumda, RNA testi ile (RT-PCR) doğrulanması 24 saat içinde, en geç 48 saat içinde yapılmalıdır. İki numune alımı arasında iki saatten fazla zaman varsa veya virüsle yeni bir karşılaşma olasılığı varsa, laboratuvarda uygulanan nükleik asit testi antijen testinin doğrulaması olarak değil, ayrı bir test olarak değerlendirilmelidir. Doğrulama testi olarak hızlı NAAT önerilmemektedir, laboratuvarda uygulanan nükleik asit testleri kullanılmalıdır.

Antijen testi sonucu RT-PCR testi ile doğrulanana kadar kişinin risk durumu ve kliniği değerlendirilerek bilgilendirme yapılmalı ve gerekli önlemler alınmalıdır.

SARS-CoV-2 antijen testlerinin çoğunluğu nükleokapsid (NC) proteinlerini saptamaktadır.

Antijen testleri laboratuvar tabanlı otomatize sistemler (EIA/CMIA/ECLIA), lateral akım test prensibine dayalı hızlı testler (immünoktomatografi) olarak bulunmaktadır. Hızlı testler ("point of care"; POC) veya kendi kendine uygulamak üzere geliştirilmiştir. Ancak bu testlerin sonucunun güvenilirliği, numuneyi alan ve testi gerçekleştiren kişinin örneği doğru şekilde ve yeterli miktarda alabilmesi, testi uygularken talimatları doğru takip etmesi, numune alma sırasındaki viral yük ve test öncesi olasılık gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca, test sonuçlarının eksik veya yanlış raporlanması ya da raporlanmaması riskinin, halk sağlığı kontrol önlemlerinin alınamaması, temaslı takibi yapılamaması veya tedavi verilmemesi gibi olumsuz sonuçlara yol açabileceği akılda tutulmalıdır.

Kullanılan testlerin duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması gerekir.

Gereken minimum performans kriterleri

DSÖ: duyarlılık ≥%80, özgüllük ≥ %97

ECDC: duyarlılık ≥%90, özgüllük ≥ %97

Üretici firma tarafından sağlanan bilgi dışında, performansları bağımsız olarak kanıtlanmış ve resmi onay almış olmalıdırlar.

Testlerin performans değerlendirilmesinde kullanılan referans örnekler, gereç-yöntem ve sonuçlar, kullanıcıların seçim yapabilmesi için açık olarak raporlanmalıdır.

- Antijen testleri için de RT-PCR testlerinde olduğu gibi örnek alımında ve testin uygulanmasında biyogüvenlik önlemleri gereklidir.
- Örnek alan ve testi uygulayan kişilerin uygun kişisel koruyucu önlemlerini almış olması ve atıkların bertarafında kurumsal atık yönetimine uygun davranması gerekir.

Test stratejilerinde antijen testleri uygulamaya konulmadan önce planlama ve hazırlıkların yapılması gerekir. Örnek alımında biyogüvenlik önlemleri, testin kalite kontrolü, verilerin kaydı, izlemi ve algoritmalar yapılandırılmış ve tanımlanmış olmalı, kullanıcılara yönelik eğitim programları ve kılavuzlar hazırlanmalıdır.

Test stratejilerinin ve algoritmaların oluşturulmasında ve antijen test sonuçlarının yorumlanmasında uygulanan toplumdaki prevalans/insidans verilerinin bilinmesi ve paylaşılması gerekir. Bu amaçla,

- Belirli bir bölgede ve belirli zaman diliminde 100 000 kişilik populasyonda enfeksiyonun saptanma oranı
- Son 7-10 gün içinde SARS-CoV-2 testlerinin pozitiflik oranının ortalaması kullanılabilir.

Enfeksiyon prevalansının düşük olduğu bir toplumda pozitif test sonuçlarının gerçekten pozitif olma olasılığı (PPV; pozitif öngörü değeri) da düşüktür, yani yalancı pozitiflik olasılığı yüksektir. Bu toplulukta negatif sonuçların gerçek negatif olma olasılığı (NPV; negatif öngörü değeri) ise yüksektir.

Enfeksiyon prevalansının yüksek olduğu bir toplumda ise pozitif test sonuçlarının gerçekten pozitif olma olasılığı da yüksektir. Bu toplulukta negatif sonuçların gerçek negatif olma olasılığı ise daha düşüktür.

Tanı algoritmasında prevalans ile birlikte kişinin klinik özellikleri ve epidemiyolojik öyküsü (temas riski) de değerlendirilerek **test öncesi olasılık (TÖO)** tanımlanmalıdır. Toplumda enfeksiyon prevalansı yüksekse ve test edilen kişi semptomatikse, TÖO genellikle yüksek kabul edilir. Toplumda enfeksiyon prevalansı düşükse, test edilen kişi asemptomatikse ve COVID-19'lu bir kişi ile bilinen bir teması yoksa, TÖO genellikle düşük kabul edilir.

Antijen testlerinin dahil olduğu algoritmalarda toplumun ve ülkenin koşullarına, olanaklarına göre farklılıklar olmakla birlikte genel olarak asemptomatiklerde pozitif sonuçların RT-PCR ile doğrulanması, semptomatiklerde ise negatif sonuçların RT-PCR ile doğrulanması önerilmektedir. CDC geçici kılavuzunda, kişinin son 14 gün içinde COVID-19'lu kişi ile temas riski varsa, sonuçlar negatif olsa da karantina ve olanak varsa test tekrarları önerilmektedir.

Uzun süreli bakım evleri, çocuk yurtları, ceza infaz kurumları, evsiz barınakları gibi kapalı ortamlarda olası enfeksiyonu erken yakalamak üzere antijen testi ile tarama için haftada iki üç kez test tekrarları önerilir. ECDC, halk sağlığı kontrol ve önleme programlarını tamamlayıcı olarak; sağlık çalışanları, öğretmenler, öğrenciler, fabrikalarda çalışanlar, inşaat işçileri, toplu taşım araç sürücüleri, dağıtım çalışanları, market çalışanları gibi bulaşma ve bulaştırma riski yüksek gruplarda 2-3 günde bir tekrarlayarak antijen testlerinin kullanılmasını uygun görmektedir.

Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, antijen testlerine daha temkinli yaklaşmakta, sadece NAAT'ne ulaşılamadığı durumlarda tekrarlayan antijen testlerinin kullanılabileceğini belirtmekte, tek seferlik antijen testi taramalarını önermemektedir. Ameliyat ve riskli girişimler öncesinde, girişimin COVID-19 olan hasta için ciddi sonuçlar oluşturabileceği durumlarda RT-PCR testleri kullanılmalıdır.

Dünya Sağlık Örgütü, TÖO düşük olan bireylerde, sıfır veya sporadik vakaların olduğu yerlerde antijen testleri yerine NAAT yapılması gerektiğini, uygun biyogüvenlik ve enfeksiyon önleme ve kontrol önlemlerinin eksik olduğu durumlarda solunum örneği alınmasının riski nedeniyle uygulanmaması gerektiğini belirtmektedir. Ayrıca, yolcular arasında PPV ve NPV çok değişken olduğundan giriş noktalarında havaalanı veya sınır taraması için antijen testlerinin kullanılmaması gerektiğini belirtmektedir. PPV ve NPV arttırmak için doğrulamaya ihtiyaç olacaktır.

Kaynaklar

1. CDC. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. Güncelleme: 9 Eylül 2021. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html
2. WHO. Antigen detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Interim Guidance 11 September 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334253/WHO-2019-nCoV-Antigen_Detection-2020.1-eng.pdf
3. Ricks S, Kendall EA, Dowdy DW, et al. Quantifying the potential value of antigen-detection rapid diagnostic tests for COVID-19: a modelling analysis. BMC Med 2021; 19:75.

4. European Centre for Disease Prevention and Control. COVID-19 testing strategies and objectives. 15 September 2020. ECDC: Stockholm; 2020

5. IDSA Guidelines on the diagnosis of COVID-19: Antigen testing. 27.05.2021. https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-antigen-testing/

6. SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests: an implementation guide. World Health Organization 2020. 21 December 2020. https://www.who.int/publications/i/item/9789240017740

7. Priority strategies to optimize testing and screening for COVID-19 in Canada: Report from the COVID-19 testing and screening Expert Advisory Panel. January, 2021

   https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/covid19-industry/medical-devices/testing-screening-advisory-panel/reports-summaries/priority-strategies.html

8. https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/testing/regular-rapid-coronavirus-tests-if-you-do-not-have-symptoms/

9. https://www.gov.uk/government/publications/rapid-testing-strategies-for-traced-contacts-comparing-quarantine-quarantine-and-testing-and-daily-testing-16-november-2020

10. European Centre for Disease Prevention and Control. Considerations for the use of saliva as sample material for COVID-19 testing. 3 May 2021. Stockholm: ECDC; 2021.

11. European Centre for Disease Prevention and Control/European Agency for Safety and Health at Work. Considerations on the use of rapid antigen detection (including self-) tests for SARS-CoV-2 in occupational settings. ECDC/EU-OSHA: Stockholm/Bilbao; 6 May 2021.

12. Yokota I, ShanePY, Okada K, et al. A novel strategy for SARS-CoV-2 mass screening with quantitative antigen testing of saliva: a diagnostic accuracy study Lancet Microbe 2021. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00092-6

13. Quilty BJ, Flasche S, Edmunds WJ and CMMID COVID-19 Working Group. Rapid testing strategies for traced contacts: comparing quarantine quarantine and testing, and daily testing. The Lancet. Public Health, 2021, 6(3):e175-e183.

14. Favresse J, Gillo, C, Oliveira M, Cadrobbi J, Elsen M, Eucher C, Laffineur K, Rosseels C, Van Eeckhoudt S, Nicolas J.-B, et al. Head-to-Head Comparison of Rapid and Automated Antigen Detection Tests for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection. J. Clin. Med. 2021, 10, 265.

BÖLÜM 10

SARS-CoV-2 ANTİKOR TESTLERİ

Pandemide enfeksiyonu geçirmiş kişilerin saptanması, toplumdaki yaygınlığın araştırılması (seroprevalans), bağışıklığın gösterilmesi için antikor testleri kullanılabilir. Ancak, her enfeksiyonda antikor testlerinden bu düzeyde faydalanılamayabilir. Öncelikli olarak o enfeksiyonda özgül antikorların ne zaman saptanabilir olduğunun, ne kadar süre kaldığının, enfeksiyona karşı koruyuculuk özelliklerinin ya da hangi antikorların koruyucu olduğunun ve testlerin performanslarının bilinmesi gereklidir.

SARS-CoV-2 Antikor Testleri

İlk kullanıma sunulan COVID-19 antikor testleri SARS-CoV-2 antijenlerine karşı gelişen antikorları kalitatif veya kantitatif olarak saptayan, lateral akım (kart test), ELISA, CMIA, CLIA, ECLIA temelli testlerdir. Bu testlerde virüsün NC veya S proteinine (S1/ S2/ RBD) karşı oluşan IgG, IgM, IgA izotipinde veya total antikorlar saptanmaktadır. Bu testler her zaman nötralizan antikorları göstermediği için **bağlanan antikor testleri** olarak tanımlanmaktadır.

Farklı kitlerle alınan sonuçlar uyumlu ve/veya karşılaştırılabilir olmayabilir.

Semptomların başlangıcından sonraki ilk üç haftada testlerin duyarlılıkları arasındaki farklar daha fazla görülmektedir.

Kantitasyonda birim sorunu (IU, AU, BAU/mL) standardize edilmeğe; buna bağlı olarak da "koruyucu eşik değer" tanımlanmaya çalışılmaktadır. **Antikor testlerinde kantitatif sonuçların anlamı /koruyucu eşik değer henüz bilinmemektedir.**

Dünya Sağlık Örgütü, Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü (NIBSC) uluslar arası referans paneli ve uluslararası birim (IU) geliştirmiştir. Bu şekilde, sonuçlarda laboratuvarlar arası değişkenliklerde önemli azalma olmuştur. Tüm çalışmalarda standart birimin kullanılması verilerin değerlendirilmesi ve karşılaştırılabilmesi için önemlidir.

Lateral akım temelli hızlı antijen ve antikor testleri sağlık kuruluşlarında eğitimli personel tarafından yapılmalıdır.

Sonucunun değerlendirilerek testin sınırlılıkları ve riskler hakkında kişiye bilgi verilmesi gereklidir.

COVID-19 enfeksiyonunda IgM yanıtının özgül olmaması ve IgG yanıtı için semptomların başlangıcından itibaren en az 7-14 gün geçmesi gerektiğinden, antikor tayini, aktif hasta yönetiminde kullanılmaz.

Geçmişe dönük tanı konmasını sağlarlar.

- **SARS-CoV-2 antikor testleri akut COVID-19 tanısında kullanılmaz!**
- **Rutin antikor testleri ile elde edilen kantitatif ya da yarı-kantitatif değerler, aşı olup olmama ya da koruyuculuk düzeyini tahmin etme ile ilgili kararlar için temel alınmamalıdır.**
- **Antikor varlığı kişinin** COVID-19 enfeksiyonundan korunduğunu garanti etmez. Bu nedenle, korunma önlemlerine uyulmasına devam edilmelidir. Kişiler bu yönde uyarılmalı ve bilgi verilmelidir

Serolojik testlerin kullanım amaçları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Plazma donörlerinin belirlenmesi (FDA tarafından belirlenen yüksek antikor titreleri)
- RT-PCR test sonucu negatif olan ancak laboratuvar ve görüntüleme yöntemleri ile klinik tanı konan olgularda **tanıya destek amaçlı ikinci test olarak** (3. haftadan sonra)
- Çocuklarda çoklu-sistem inflamasyonu sendromu (MIS-C) tanısını desteklemek
- Hastalığın geç döneminde (>3-4. hafta) retrospektif tanı koymak
- **Seroprevalans** çalışmaları

Nötralizan antikorları saptayan nötralizasyon testleri tanı değeri yüksek olmakla birlikte rutin tanıda, BGD-3 koşulları gerektirdiği ve hızlı sonuçlanmadığı için kullanılmamaktadır. Temsili nötralizasyon testleri gibi alternatif yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu konuda değerlendirmeye ihtiyaç vardır.

Nötralizan antikor saptama

1. Virüs nötralizasyon testi
   - Plak redüksiyon, mikronötralizasyon
   - Virüs izolatı
2. Pseudovirüs nötralizasyon testi
   - SARS-CoV-2 S proteinini eksprese eden rekombinant virüs (lentivirus vb)
3. Yarışmalı nötralizasyon testi
   - Antikorların, işaretli RBD ile ACE-2 arasındaki bağlanmayı nötralize etme kapasitesini kalitatif olarak değerlendirir.
   - Canlı virüs gerektirmez

- Koruyuculuğun en güvenilir göstergesi olan gerçek nötralizan antikor testleri hücre kültürü gerektirdiği için rutinde yaygın kullanıma uygun değildir, biyogüvenlik 3 düzeyinde çalışılması gereklidir.
- ACE-2 molekülüne bağlanmayı engelleme temeline dayalı temsili nötralizasyon testleri de geliştirilmiştir, ancak bu konuda değerlendirmeye ihtiyaç vardır.
- Bağlanan antikor testleri ile nötralizasyon testlerinin korelasyonu araştırılmaya devam etmektedir. Bu testler içinde anti-S bakan testler, nötralizan antikorlarla tam olmasa da daha uyumlu görünmektedir.

Kaynaklar

1. CDC. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings. Sept. 21, 2021. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html
2. ECDC. The use of antibody tests for SARS-CoV-2 in the context of Digital Green Certificates 10 May 2021. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Use-of-antibody-tests-for-SARS-COV-2-in-the-context-of-Digital-Green-Certificates.pdf
3. ECDC Technical report. ECDC rapid assessment of laboratory practices and needs related to COVID-19. 18 January 2021. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/covid-19-rapid-assessment-laboratory-practices-needs.pdf
4. WHO. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance, 11 September 2020. https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254.
5. WHO. Advice on use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19: scientific brief, 8 April 2020. https://apps.who.int/iris/handle/10665/331713.
6. Lou B, Li TD, Zheng SF, Su YY, Li ZY, Liu W, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection after exposure and post-symptom onset. Eur Respir J. 2020; 56(2).
7. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, Geurtsvan Kessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. Emerg Infect Dis. 2020; 26(7):1478-88.
8. James J, Rhodes S, Ross CS, Skinner P, Smith SP, Shipley R, Warren CJ, Goharriz H, McElhinney LM, Temperton N, Edward Wright E, et al.. Comparison of Serological Assays for the Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. Viruses 2021; 20;13(4):713.
9. Rathe JA, Hemann EA, Eggenberger J, Li Z, Knoll ML, Stokes C, Hsiang TY, Netland J, Takehara KK, Pepper M, Gale M Jr. SARS-CoV-2 Serologic Assays in Control and Unknown Populations Demonstrate the Necessity of Virus Neutralization Testing. J Infect Dis. 2021; 8;223(7):1120-1131.
10. Jiang J-C, Zhang Y. Serological antibody testing in the COVID-19 pandemic: their molecular basis and applications. Biochem Soc Trans. 2020; 18;48(6):2851-2863.
11. Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. Immunol Cell Biol. 2021; 99(1):21-33.
12. Peterhoff D, Glück V, Vogel M, Schuster P, Schütz A, Neubert P, Albert V, Frisch S, Kiessling M, Pervan P, Werner M, Ritter N, Babl L, Deichner M, Hanses F, Lubnow M, Müller T, Lunz D, Hitzenbichler F, Audebert F, Hähnel V, Offner R, Müller M, Schmid S, Burkhardt R, Glück T, Koller M, Niller HH, Graf B, Salzberger B, Wenzel JJ, Jantsch J, Gessner A, Schmidt B, Wagner R. A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. Infection. 2021; 49(1):75-82.
13. Kohmer N, Rühl C, Ciesek S, Rabenau HF. Utility of Different Surrogate Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (sELISAs) for Detection of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. J Clin Med. 2021; 14;10(10):2128

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

BÖLÜM 11

PANDEMİDE VARYANT İZLEMİ VE GENOMİK SÜRVEYANS

Yeni ya da var olan bir etkenin değişimi ile meydana gelen salgınlar, uygun şartlar ortaya çıktığında, etkenin dünya çapında yayılarak pandemiye sebep olması ile sonuçlanabilmektedir. Yeni konak ya da konaklara adapte olan bir etken ya kazandığı yeni avantajlar (örneğin yüksek replikasyon kapasitesi, antijenik değişim, vb.) sayesinde hızla yayılırken bir yandan da yeni adapte olduğu konak(lar)ın kendilerini savunma mekanizmalarının ya da uygulanan korunma/tedavi girişimlerinin baskısı ile hızlanmış bir evrimleşme süreci ile ata kökeninden de farklılaşır. Kendisine karşı uygulanan tedaviler, aşılar, diğer korunma önlemleri ve yeni konak(lar)ın kendilerine özgü faktörleri yeni etken için aşması gereken güçlükler haline gelebilir ve etken de bunları kendisine avantaj sağlayan genetik değişiklikler vasıtası ile aşma yoluna gidebilir. Sonuç olarak doğal evrimsel sürecin bir ürünü olarak ortaya çıkan farklı varyantlar baskın hale gelerek salgın ya da pandeminin dinamiklerini ciddi biçimde etkileyebilmektedir.

Rutin uygulanacak genoepidemiyolojik surveyans ve buradan elde edilecek veriler pandeminin yönetimi açısından kritik önem taşır. Bu sayede daha önce farklı bölgelerde tanımlanmış olan mikroorganizmaların yayılım dinamiklerini ve oluşturdukları tehditi anlamak ve yeni ortaya çıkacak varyantları saptamak mümkün olabilmektedir. Bu varyantların karakterizasyonu, etkenin yayılma kinetiklerindeki değişimi anlamak açısından veri sağlayabileceği gibi hastalığın ciddiyetini, uygulanan tedavi ve aşıların etkinliğini, tanı testlerinin performanslarını değerlendirmek açısından da önemlidir. Bu bakımdan salgın sırasında aşağıdaki epidemiyolojik değişimlerin takip edilmesi ve bu gibi durumlardan etkilenen popülasyonda etkenin genetik değişimlerinin hızlı bir biçimde irdelenmesi, pandeminin kontrolü açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda etkenin;

- Bulaşıcılık, yayılım hızında
- İnsanlarda yol açtığı enfeksiyonun şiddetinde ya da manifestasyonlarında
- Etkenin tanımlanmasında kullanılmakta olan testlerin performanslarında
- Uygulanmakta olan tıbbi tedavilerin etkinliğinde (monoklonal antikorlara ve antivirallere yanıtsızlık ya da bu yanıtlarda azalma gibi),
- Doğal veya aşı kaynaklı bağışıklığın etkinliğinde

değişiklik olup olmadığı ve bu değişikliklerin virüslerin genomunda meydana gelen değişikliklerle bağlantısının olup olmadığının gerçek zamanlı olarak izlenmesi salgın ya da pandemilerin yönetimi açısından çok kritiktir. Ayrıca virüsün evrimleşmesi (konverjans) yakından izlenerek genomunda oluşabilecek değişiklikleri öngörebilmeyi de sağlayacaktır.

Salgın sırasında kullanılan nükleik asit amplifikasyon testleri ile (NAAT'ler) doğru ve hızlı tanı performansının elde edilmesinin yanı sıra virüs genomunda meydana gelen değişiklikler zamanında saptanabilmektedir. Bu testler birden fazla hedefi eş zamanlı olarak saptayacak şekilde tasarlanmaktadır. Dolayısı ile oluşan bir mutasyon, hedeflerden birini etkilese bile diğer hedefler yine de saptanabilir. Böyle örneklerin görülmesi mutasyon tarama açısından ciddi bir alarm durumu yaratmaktadır. Nitekim İngiltere'de ortaya çıkan varyant, hedeflerin birinin amplifikasyonunun başarısız kalması sonucunda hızlı bir şekilde fark edilebilmiştir. Bununla birlikte tek hedef kullanan sistemlerde pozitiflik oranlarında beklenmeyen bir düşüş görülmesi olağandışı bir durum olarak kabul edilmeli ve mutlaka incelenmelidir.

Tedavide kullanılan ilaçlara bağlı olarak virüs genetiğinde değişiklikler oluşabilmektedir. Örneğin monoklonal antikor uygulamalarında enfeksiyonu engellemek için etkenin belli bölgelerini hedefleyen özel olarak tasarlanmış antikorlar kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar, doğal bağışıklık yanıtı sonucu oluşan antikorlardan daha özgüldür. Dolayısı ile ortaya çıkan varyantlara karşı etkinliklerindeki azalma daha çarpıcı ve kolay fark edilebilir. Benzer biçimde aşı veya doğal enfeksiyon sonucunda ortaya çıkan bağışık yanıttan kaçabilmek için virüsün bazı kritik protein(ler)inde mutasyonlar oluşabilir.

Mutasyona yol açabilecek etkenler ile hızlı yayılım, ilaç ve aşıya direnç gibi faktörler göz önüne alındığında, varyantların takibi için algoritmaların hızlı bir şekilde oluşturulması önem taşımaktadır.

Günümüzde varyantlar üç ana başlıkta incelenmektedir;

İlgilenilmeye Değer Varyant (Variant of Interest, **VOI**), reseptör bağlanmasındaki değişiklikler, geçirilmiş enfeksiyona veya aşılama sonucu edinilmiş antikorların nötralizasyon kapasitesindeki düşüşler, tedavilerin etkinliğinin azalması, tanı testlerinin etkilenmesi, bulaşıcılık veya hastalık şiddetinde artış gözlenen ve bu değişikliklerin spesifik genetik belirteçlerle (mutasyonlara, varyasyonlara) bağlantısı olabileceğine dair ipuçları bulunan varyantlar bu sınıfta yer alır. Bu varyantlar yakından izlemeye alınır.

Bulaşmayı, tanıyı, terapötikleri veya bağışıklık sisteminden kaçışı etkileyeceği tahmin edilen belirli genetik belirteçlerin bulunması, artan vaka oranının veya benzersiz salgın kümelerinin nedeni olduğuna dair kanıt bulunması, ilk bildirildiği veya diğer ülkelerde yayılımının sınırlı olması bu varyantlar tanımı için ortak özelliklerdir.

İlgilenilmeye Değer Varyant olarak tanımlanması, ilgili varyantın bulaşıcılığı, neden olduğu klinik hastalığın ciddiyeti, terapötiklerin etkinliği ve uygulanmakta olan aşılar varsa bunların koruyucu etkinliklerinin değerlendirilmesi için gelişmiş DNA dizi analizine dayalı sürveyans, ileri laboratuvar teknikleri ile karakterizasyonu veya epidemiyolojik araştırmalar dahil olmak üzere bir veya daha fazla uygun halk sağlığı eyleminin hayata geçirilmesini gerektirebilir.

Endişe Verici Varyant (Variant of Concern, **VOC**), bulaşıcılıkta bir artış, daha şiddetli hastalık (örn., hastaneye yatışlarda veya ölümlerde artış), geçirilmiş infeksiyon veya aşı sonucu edinilen antikorlar tarafından nötralizasyonda önemli azalma, tedavilerin veya aşıların etkinliğinin azalması veya tanısal tespit başarısızlıklarına dair güçlü kanıtı olan varyantları tanımlamak için kullanılmaktadır.

Bu varyantlar VOI tanımı için gerekli olan ölçütlere ek olarak tanı, tedavi veya aşılar üzerindeki kanıtlanmış olumsuz etkileri, tanı testlerinde kullanılan hedeflerin başarısızlığı, bir veya daha fazla tedavi sınıfına karşı duyarlılığın önemli ölçüde azaldığına dair kanıt olması, geçirilmiş infeksiyon veya aşılama sonrası oluşan antikorların nötralizasyon etkinliğinin önemli ölçüde azalmasına dair kanıt olması, aşıya rağmen şiddetli hastalık oluşabilmesi, artmış bulaşabilirliğin kanıtlanması, artan hastalık şiddetinin kanıtlanması ile karakterizedirler.

Endişe Verici Varyantlar, Uluslararası Sağlık Tüzüğü uyarınca DSÖ'ye bildirimi, yayılmayı kontrol etmeye yönelik yerel veya bölgesel çabaları, aşıların ve tedavilerin etkinliğini belirlemek için araştırmaların yapılmasını gerekli kılmaktadır. Varyantın özelliklerine bağlı olarak yeni tanı sistemlerinin geliştirilmesi veya aşıların ya da tedavilerin modifikasyonu gerektirebilirler.

Ağır Sonuçları Olan Varyant (Variant of High Consequence, **VOHC**) daha önce dolaşımda olan varyantlara göre farmasötik ve nonfarmasötik önlemlerin etkinliği önemli ölçüde düşürdüğüne dair net kanıtlara sahiptir. Bunlar yukarıda sayılan özelliklere ek olarak kanıtlanmış tanı testleri başarısızlığı, aşı etkinliğinde önemli ölçüde azalma, şiddetli hastalığa karşı çok düşük aşı koruyuculuğu olması, birden fazla terapötiğe karşı duyarlılığın önemli ölçüde azalmış olması, daha şiddetli morbidite, mortalite ve artmış hastaneye yatış gereksinimi ile karakterizedir.

VOHC, Uluslararası Sağlık Tüzüğü uyarınca DSÖ'ye bildirimde bulunulmasını, bulaşmayı önleme veya sınırlama stratejilerinin duyurulmasını ve tedaviler ile aşıları güncellemek için tavsiyelerin oluşturulmasını gerektirir.

Yukarıda sayılan ciddi sonuçlar nedeni ile pandemi döneminde etkenin genetik değişimlerinin incelenmesinin önemi açıktır. Genomik surveyansta ana hedefler epidemiyolojik değişikliklere neden olan varyantların özellikle endişe kaynağı olup olmadıklarını belirlemek, bu tip varyantların erkenden saptanarak karakterizasyonu ile varyantların pandemi üzerindeki olası/fiili etkisini değerlendirmek ve bunları izlemek için zaman içinde genetik ve antijenik özelliklerindeki değişiklikler izleyerek halk sağlığı eylemlerine rehberlik etmek olarak özetlenebilir.

Genomik surveyansın hedefleri:

- Virüsün bulaşma dinamiklerini ve yeni genetik varyantların varlığını araştırmak,
- Virüs varyantları ile bulaşıcılık arasındaki ilişki gibi epidemiyolojik verilerin araştırılması, bu sayede hastalık şiddetini ve olası risk gruplarını belirleyerek halk sağlığı eylemine rehberlik edecek veri üretmek,
- Alınan önlemlerin virüs üzerindeki etkisini anlamak ve izlemek,
- Mutasyonların moleküler tanı yöntemlerinin performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek,
- Mutasyonların serolojik yöntemlerin performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek,
- Mutasyonların antijen saptama yöntemlerinin performansı üzerindeki etkisini değerlendirmek,
- Epidemiyolojik kümelenmeler ile varyantların ilişkisini değerlendirerek, temas takibini desteklemek ve diğer halk sağlığı önlemleri için kanıta dayalı veriler üretmek,
- Re-enfeksiyonları değerlendirmek ve doğrulamak,
- İnsanları etkileyebilecek yabani / evcil / çiftlik hayvanı popülasyonlarında ortaya çıkan soyları ve karşılıklı geçişleri izlemek,
- Ortaya çıkan mutasyonların hastalık patogenezine etkisini anlamak ve doğrulamak için araştırmaları teşvik etmek,
- Antiviral ilaçların varyant/mutantlar üzerindeki etkisini değerlendirmek,
- Mutasyonların etkisini değerlendirmek
- Virüsün antijenik özellikleri ve aşı etkisinden kaçışı ile ilgili modellemeler oluşturmak,
- Canlı aşı kullanıldığı durumlarda, aşı suşuna bağlı gelişebilecek enfeksiyonları ve oluşabilecek mutasyonları değerlendirmek

olarak sıralanabilir.

Pandemi döneminde hazırlıklı olabilmek için, genomik sürveyans sistemlerinin yerel ve küresel sağlık uygulamalarına entegrasyonu gereklidir. Genomik sürveyans sistemlerinde önemli olan konular, örnek seçimi, uygulanacak yöntemlerin seçimi ve bilginin hızlı ve şeffaf biçimde paylaşımıdır

Örnek seçimi için kritik öneme sahip olan kişiler/popülasyonlar şunlardır:

- Aşılanmış ya da enfeksiyonu geçirmiş ancak daha sonra tekrar enfekte olan kişiler,
- Çok sayıda hayvanla yakın temas halinde olan, insan-hayvan etkileşiminin sık olduğu meslek gruplarında çalışan kişiler
- Enfeksiyonu ağır geçiren bağışıklığı baskılanmış hastalar
- Antikor/antiviral tedaviye rağmen uzun süreli virüsü saçan kişiler,
- Etkenin bulaşıcılığında ve / veya virülansında beklenmedik bir artış veya değişikliğin gözlendiği popülasyonlar,
- Tanı amaçlı testlerin performansında beklenmedik bir azalma olduğunda (antikor, antijen, NAT) virüsün farklı bölgelerini çoğaltan nükleik asit testleri pozitif bulunan kişilerin örnekleri
- Yukarıdaki özellikte kişiler veya popülasyonlar saptandığı zaman; Kümelenmelerde bulaşma ağının izlenmesi ve toplum içindeki bulaşma dinamiklerinin anlaşılması ve / veya enfeksiyon kontrol prosedürlerinin etkinliğideğerlendirilmelidir
- Varyantların görüldüğü bölgelerden gelen enfekte ya da kuluçka döneminde olan kişi ve yakın çevresi, temaslı olduğu tüm bireyler izlenmelidir.

Bu popülasyonlardan elde edilen veriler varyantların yayılımını engellemek ya da kısıtlayıp kontrol altına alabilmek için hızla yerel ve ulusal halk sağlığı kuruluşları, tanı laboratuvarları, dizileme gibi yüksek altyapı teknolojisi olan kurumlar (kamu ya da özel), analitik gruplar, enfeksiyon kontrol ve korunma ekipleri (hastaneler, yaşlı bakım merkezleri vb), sağlık sunucuları ve hastaları da içeren paydaşlar ile paylaşılmalı ve ortak önlemlerin ivedi biçimde alınması sağlanmalıdır. Herhangi bir değişiklik olmasa bile oluşabilecek değişimleri öngörebilmek için genomik surveyans rutin olarak ve bir sistematik program çerçevesi içinde sürdürülmelidir. Burada taramanın yapılacağı popülasyon için hedeflerin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Bu sayede gerekli olan asgari örneklem sayısı hesaplanabilir. Bu sayı popülasyon büyüklüğüne ve etkenin anlık insidasına bağlı olarak değişmektedir. Tablo 9.1'de Orta hassasiyet (% 95 bağıl CI ±% 25) olacak şekilde belli bir coğrafi bölgede belli zamanda görülen vakalarda, varyant taraması için gerekli olan test sayıları verilmiştir.

Tablo 9.1 İnsidansa ve popülasyon sayılarına göre genomik sürveyansa dahil edilmesi gereken örnek sayıları.

Dolaşan virüsler arasında varyantın beklenen oranı	500 Vaka	1.000 Vaka	5.000 Vaka	10.000 Vaka	50.000 Vaka	100.000 Vaka	>100.000 Vaka
% 25	109	139	173	179	183	184	184
% 10	179	280	459	506	544	550	553
% 5	216	381	815	974	1.128	1.154	1.168
% 2,5	239	457	1.270	1.703	2.236	2.341	2.397
% 1	254	517	1.871	2.991	5.146	5.736	6.085

Varyantların saptanmasında seçilecek yöntem hızlı ve kapsayıcı olmalıdır. Dolaşımdaki varyantları tespit etmede hangi teknolojilerin hangi amaç için kullanılacağına ilişkin kararların alınmasında laboratuvarlara, mikrobiyoloji uzmanlarına ve ilgili paydaşlara danışılmalıdır. Tüm bunlara dikkat edilerek hızlı biçimde ulusal varyantları saptamaya yönelik bir ağ oluşturulmalıdır. Bu ağ üniversite, halk sağlığı laboratuvarları ve diğer rutin hizmet laboratuvarlarını kapsamalıdır.

Varyantların saptanması ve tanımlanmasında farklı yöntemler kullanılabilir.

- Bilinmeyen varyantların saptanması, diğer yöntemler ile elde edilen sonuçların doğrulanması için
  - DNA dizi analizine dayalı yöntemler
  - Tam boy genom analizi (Yeni nesil dizileme analiz yöntemleri ile)
  - Kritik gen bölgesinin dizilenmesi (Yeni nesil dizileme analiz yöntemleri veya klasik Sanger dizileme yöntemi ile)
- Bilinen varyantların saptanmasıve taranması için
  - Drop-out PCR yöntemleri
  - Çoklu Realtime PCR uygulamaları
  - SNP Tarama Yöntemleri
    - Klasik PCR ile
    - Real Time PCR ile
    - İzotermal amplifikasyona dayalı yöntemler ile

DNA dizi analizine dayalı yöntemler (tam boy genom analizi ya da kritik gen bölgesinin dizilenmesi) varyantların saptanması için altın standart olarak kabul edilir. Tam boy genom dizileme, özellikle viral etkenleri genetik olarak karakterize etmek açısından etkili ve önemli bir yöntemdir. Etkenin genomundaki belirli mutasyonların varlığı hakkında önceden bilgi sahibi olmaya gerek kalmadan, tam genom dizi analiz sonuçları VOC'ları saptamak için kullanılır. Protokole bağlı olarak sonuçların oluşturulması birkaç gün sürebilen emek yoğun bir yöntemdir. Bu yöntem uygulanırken biyoinformatik destek alınmalıdır. Bu uygulamalar ile ilgili yaşanan SARS-CoV-2 pandemisi için ECDC'nin teknik kılavuzu, SARS-Cov-2'nin Dizilemesi: ilk güncelleme (Sequencing of SARS-CoV-2: first update)) ve DSÖ'nun SARS-CoV-2 Genomik dizilemesi: Halk Sağlığı Üzerinde Maksimum Etki İçin Uygulama Kılavuzu (Genomic sequencing of SARS-CoV-2 A guide to implementation for maximum impact on public health) çok iyi hazırlanmış iki klavuzdur.

Tam boy genom analizi yapılamadığı ya da gereksiz olduğu durumlarda klasik Sanger dizileme veya yeni nesil dizileme yöntemleri ile kısmi dizileme yapılarak ilgili kritik gen bölgesindeki değişimler incelenebilir.

Dizileme yöntemleri bilinmeyen varyantları saptamada ve diğer yöntemlerin sonuçların doğrulanmasında en önemli mikrobiyolojik uygulamalar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bilinen varyantların saptanması ve tarama için maliyet uygunluğu açısından "Drop-out PCR" yöntemleri kullanılabilir. Özellikle delesyon ve tanı testlerinde kullanılan hedefleri etkileyen varyasyonlar bu test sonuçlarının yalancı negatif olmasına yol açar. Bu durumda varyantlar tanımlanabilir ve bu hedefler çoklu real time PCR uygulamaları ile birleştirilerek hızlı tarama testleri oluşturulabilir. Endişe oluşturan varyantların taşıdığı özgül mutasyonları da real time PCR, klasik PCR ile tekli ya da çoklu formatlarda saptanabilir. Günümüzde izotermal amplifikasyona dayalı yöntemler de varyant taramaları için kullanılabilmektedir. Tüm bu yöntemler tarama testleri olup bunların yalancı pozitiflik ve negatiflik oranlarının yüksek olduğu akılda tutulmalı ve tüm sonuçlar DNA dizi analizi yöntemleri ile doğrulanmalıdır.

Kaynaklar

1. Implementation of an in-house real-time reverse transcription-PCR assay for the rapid detection of the SARS-CoV-2 Marseille-4 variant | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1386653221000810?token=C1885EC51F970AB8AE2170C5252FC400B1CB7CD40F731832CDD6A9168D31A0CE766AE6816C22EEEB0D0C7C336362273B&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210514142047
2. PCR and sequencing based methods for detection and typing of pathogenic microorganisms [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: https://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/40818
3. Wang H, Jean S, Eltringham R, Madison J, Tu H, Jones DM, et al. Title: Mutation-specific SARS-CoV-2 PCR Screen: Rapid and Accurate Detection of Variants of Concern and the Identification of a Newly Emerging Variant with Spike 2 L452R Mutation *Contributed equally. medRxiv [Internet]. 2021 Apr 22 [cited 2021 May 14];2021.04.22.21255574. Available from: https://doi.org/10.1101/2021.04.22.21255574
4. Chattopadhyay A, Lu T-P, Shih C-Y, Lai L-C, Tsai M-H, Chuang EY. COVID-19: Variant screening, an important step towards precision epidemiology. bioRxiv [Internet]. 2020 Oct 19 [cited 2021 May 14];2020.10.19.345140. Available from: https://doi.org/10.1101/2020.10.19.345140
5. Filkins L, SoRelle JA, Schoggins J, Park JY. Laboratory Action Plan for Emerging SARS-CoV-2 Variants. Clin Chem [Internet]. 2021 Apr 29 [cited 2021 May 14];67(5):720–3. Available from: https://academic.oup.com/clinchem/article/67/5/720/6124354
6. Science Brief: Emerging SARS-CoV-2 Variants | CDC [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/scientific-brief-emerging-variants.html
7. Ecdc. [Type here] Sequencing of SARS-CoV-2: first update [Internet]. 2021 [cited 2021 May 14]. Available from: https://cov-lineages.org
8. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St. Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. Cell. 2021;
9. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html
10. Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240018440
11. Methods for the detection and identification of SARS-CoV-2 variants. 2021.

www.klimud.org
Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği (KLIMUD)
Meşrutiyet Cad. Kültür Apt. No: 38/15 Kat: 7 Kızılay-Ankara/Türkiye
Tel: +90 312 230 78 18 • +90 530 693 86 67
info@klimud.org • klimud@gmail.com