



**Anatolia Tanı ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. ve Tic. A.Ş.'de çalışmakta olan Ürün Geliştirme Sorumlusu, Yüksek Biyomühendis Emre Dönmez Viral Enfeksiyonların Tanısı ve Türkiye'de Tanı Kiti Geliştirme ve Üretimi Üzerine KMO İstanbul Şubesi Biyomühendislik Meslek Dalı Komisyonu'nun (Biyo-MDK) Sorularını Cevapladı.**

## **1. Temel olarak virüsün varlığı nasıl belirlenir? Mevcut test yöntemleri nasıl çalışıyor?**

Virüsün tespit edilmesi için moleküler ve seroloji temelli test yöntemleri kullanılmaktadır. Moleküler temelli testlerde direkt olarak virüsün genetik materyali hasta örneklerinden izole edilmekte, sonrasında *polimeraz zincir reaksiyonu* (PCR) olarak adlandırılan metot ile çoğaltılarak tespit edilmektedir. Serolojik testlerde ise direkt olarak virüse özgü viral proteinlerin (antijenlerin) veyahut enfeksiyon varlığında hastanın bağışıklık sistemi tarafından virüse karşı oluşturulmuş spesifik antikorların tespit edildiği 2 farklı test yöntemi bulunmaktadır.

## **2. Genel hatlarıyla, bir tanı kitinin tasarlanmasından üretimine kadar olan süreç nasıl işliyor?**

Firmamızda üretilen kit, cihaz, ekipman, yazılım, sistem dahil tüm ürünlerin ve operasyonların tüm aşamaları TS EN ISO 9001:2015, TS EN ISO 13485:2016 standartları, Vücut Dışında Kullanılan Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği, ilgili tarafların ve faaliyetleriyle ilişkili olan yasal gereklilikler, mevzuat, müşteri ve sözleşme şartları uyarınca gerçekleştirilmektedir.

Bu bağlamda firmamızda Real-time PCR tanı kitlerinin son ürün haline gelmesi için gereken süreci çok kısaca özetlemeye çalışırsak;

İlk olarak kitin içerisinde kullanılacak bileşenlerin tasarlanması ve *in silico* analizler ile bu bileşenlerin çalışma koşullarının bilgisayar ortamında modellenmesi, test edilmesi ve sonrasında oluşturulacak ürün ile ilgili gerekli risklerin ayrıntılı değerlendirilmesini içeren risk analizi yapılmaktadır. Tasarlanan ve çalışma koşulları bilgisayar ortamında doğrulanmış/modellenmiş bileşenler uluslararası standart kontrol malzemeleri kullanılarak laboratuvarında doğrulama çalışmaları yapılmaktadır. Doğrulan, çalışma koşullarının

uluslararası standart kontroller ile optimizasyonun sağlandığı sistemin tüm performans kriterleri ürün için gerekli direktifler göz önünde bulundurularak yapılan çalışmalar ile belirlenmektedir ve yapılan klinik-performans çalışmaları ile de geçerli kılınarak sonrasında üretime aktarılmaktadır.

### **3. Firmanızda daha çok RT-PCR kitlerinin üretildiğini ve sizin daha çok bu kitlerin tasarımında görev aldığınızı biliyoruz. Bize kısaca kitin çalışma prensibini, tasarımının nasıl yapıldığını, dikkat edilmesi gereken noktaların neler olduğunu anlatır mısınız?**

RT-PCR kitlerimiz Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi üzerinden çalışmaktadır. Bu yöntem, bir DNA bölgesini çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir. Reaksiyon tekrar eden ısıtma ve soğutma döngüleri sayesinde gerçekleşir. PCR'ın ana bileşenleri; primerler, dNTP'ler, Taq polimeraz enzimi, tampon çözeltisi ve "template" olarak adlandırılan DNA/ RNA kalıbıdır. Primerler, kalıbın spesifik bölgelerine bağlanarak sentezi başlatan kısa, sentetik DNA'lardır. Taq polimeraz DNA kalıbını çoğaltır. Tampon çözeltisi, reaksiyon için gereken pH ayarını sağlar, kalıp ise sentez için hedef bölgeyi içerir.

Real Time PCR tekniğinde, konvansiyonel PCR'ın aksine, PCR ürünü reaksiyon sırasında izlenebilir. Böylelikle Real-Time PCR tekniğinde, jel elektroforezi gibi ek analiz yöntemlerine gerek kalmaz ve böylece kontaminasyon riski de azalır. Konvansiyonel PCR malzemelerine ek olarak, reaksiyona dahil edilen çifte işaretli probalar, çoğaltılan DNA bölgesinin yüksek hassasiyetle saptanabilmesini sağlar.

Test, Taq Polimerazın uzatma (extension) aşamasında, 5' ekzonükleaz özelliğiyle çifte işaretli floresan probu kesmesi sayesinde gerçekleşir. Probu 5' ucu floresan röportör ile, 3' ucu ise röportörü baskılayan farklı bir floresan molekül ile (quencher) işaretlenmiştir. İki floresan, yani röportör ile quencher birbirlerine yakinken, röportör ışıkla uyarıldığı halde, floresan yaymaz. Uzatma (extension) aşamasında, Taq Polimeraz kalıba bağlanmış bulunan proba karşılaşır ve keser. Röportör quencher'ın baskılayıcı etkisinden kurtulduğunda floresan sinyal alınmaya başlanır. PCR ürünü çoğaldıkça, röportör tarafından yayılan floresan sinyal de artar. Floresan sinyalin arka planın üzerine çıktığı, gözlemlenebilmesi için gereken minimum değeri (eşik değerini) aştığı döngü sayısına CT (eşik döngüsü) adı verilir. Bir DNA kalıbının log başlangıç miktarı ile eşik döngüsü arasında lineer bir ilişki bulunur, böylece miktarı bilinmeyen kalıpların başlangıç miktarları, başlangıç miktarı bilinen hedef kalıpların CT değerleri kullanılarak oluşturulan standart eğriler aracılığıyla belirlenebilir.

Yoğun literatür, veri tabanı araştırmaları ve sonrasında gerçekleştirilen in-silico analizler ile birçok önemli ayrıntı göz önünde bulundurularak kit içeriğinin önemli bileşenleri olan hedef oligonükleotid (primer-prob) dizileri tasarlanmakta ve çalışma koşullarının in-silico simülasyonu/modellenmesi yapılmaktadır. Ayrıca kit içerisinde kullanılan diğer bileşenlerin,

reaksiyon kuyucuklarının, hedef patojenlerin, kontrol malzemelerinin (internal kontrol/pozitif kontrol/negatif kontrol) ve termal protokollerin yapıları belirlenmektedir.

Tasarlanan oligonükleotidlerin termal, birincil ve ikincil yapıları, birbirleriyle ve kendi içlerinde oluşturdukları dizi ve bağlanma ilişkileri, hedef organizmalara bağlanma özellikleri, analitik reaktivitesi ve istenmeyen çapraz reaktivitesi (benzer başka organizmalara bağlanma riskleri) gibi birçok hassas parametre, tasarım aşamasında dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan bazılarıdır.

#### **4. Türkiye’de geliştirilen test kiti hızlı test kiti midir, yoksa RT-PCR temelli mi?**

Ülkemizde hem hızlı test kiti, hem de RT-PCR temelli test kiti geliştiren firmalar mevcuttur.

#### **5. Hızlı tanı kiti ile RT-PCR kitlerinin sonuç sürelerini karşılaştırabilir misiniz?**

Kullanılan birçok farklı ürünün kullanım protokolleri ile birlikte uygulama süreleri değişiklik gösterebilmektedir. Fakat, genel olarak hızlı tanı kiti ile 10-30 dakika, RT-PCR kiti ile 2-4 saat aralığında sonuç alınabilmektedir.

#### **6. Bu kiti, hastalık kuluçka evresindeyken bile pozitif sonuç veriyor mu?**

Hastalığın kuluçka evresi, bireyin virüse maruz kalması ile semptomların olduğu klinik dönem arasında geçen süre olarak tanımlanır ve genel olarak, bireyler arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Virüse maruz kalan bireylerin büyük çoğunluğunun hiçbir belirti ve/ya şikayetinin olmaması nedeniyle, asemptomatik olarak virüsü taşıyıcı olduğu gözlemlenmiştir. Bu noktada önemli olan, testlerde tespit edilen analitin (virüs RNA, antijen veyahut antikor olabilir), testin saptama limiti içerisinde olabilecek miktarda yani tespit edilebilir seviyede olması için gereken pencere dönemidir.

Hızlı antikor testlerinde, vücutta bağışıklık sisteminin oluşturduğu koronavirüse özgü antikorların test ile tespit edilebilir seviyeye gelmesi yani güvenilir aralıkta olması için, ortalama 10 gün gerektiği uzmanlar tarafından belirtilmektedir.

Virüsün genetik materyalinin tespitini hedef alan RT-PCR kiti ve moleküler temelli testlerde pencere dönemi daha kısa olup, virüs partikülleri hastalık kuluçka dönemindeyken bile yani çok erken dönemde tespit edilerek enfekte bireylerin toplumdan izolasyonu çok daha önceden yapılabilmektedir.

## **7. Sağlık Bakanımız Çin'den gelen antijen kitlerinde sorun olduğunu ve devamını almadıklarını, fakat antikor kitlerinde sorun olmadığını açıkladı? Antijen kiti ve antikor kiti arasındaki fark nedir?**

Antijen kitlerinde virüsün viral proteinleri (antijenleri) direkt olarak tespit edilmektedir, solunum yolu örnekleri kullanılmaktadır. 10-30 dakika civarında sonuç alınabilen hızlı bir testtir. Fakat hassasiyeti düşük bir yöntemdir (%34-%80). Antikor kitlerinde virüs ile enfekte olmuş bireyin bağışıklık sistemi tarafından virüse karşı oluşturulmuş spesifik antikorların kandan tespiti yapılmaktadır. 10-30 dakika civarında sonuç alınabilen hızlı bir testtir. Fakat bu antikorların oluşma süresi, bireyin virüs ile enfekte olmasından sonra günler, haftalar sürebilmektedir (ortalama 10 gün).

## **8. Ürettiğiniz RT-PCR temelli kitin doğru tespit oranının bu kitlerden çok daha yüksek olduğu doğru mu?**

Çoğu ürünümüz gibi bu kitimiz de, ileri bir moleküler teknik olan Real-Time PCR tekniğiyle çalışan bir kit. Bu teknikte hasta numunesindeki virüs direkt olarak saptanıyor. Kitin çalışması için önce hastadan boğaz veya burun sürüntü örneği veya balgamı alınıp, RNA izolasyonu yapılıyor. Bu yaklaşık 30 dakikalık bir işlem. Sonrasında, RNA örneği bizim kitimizle karıştırılıp bir cihaza konuyor ve 1 saat 40 dakikalık analiz ile sonuç alınıyor.

Sahaya baktığımızda, çeşitli ülkelerde 1 milyona yakın hastada kitimizle alınan sonuçlar, kitlerimizin çok başarılı, %100 doğruluk oranına sahip, hassasiyetlerinin çok yüksek olduğunu göstermektedir.

## **9. Son olarak, tasarım ve üretim aşamalarınızda hangi bilgi ve donanıma sahip uzmanlar yer alıyor? Gerekçeleri ile kısaca bahsedebilir misiniz?**

Ar-Ge merkezimizde, %95'i lisans ve üzeri, %60'ı ise yüksek lisans ve doktora derecesine sahip biyomühendislik, genetik, tıp, moleküler biyoloji, mekatronik, endüstri, bilgisayar, elektronik ve makine mühendisliği gibi farklı alanlardan gelen iş ortakları ve 35 kişiyi aşkın kalifiye ekiple kurulan **disiplinlerarası iş birliği** sayesinde, çözüme yönelik verimli ve farklı ürünleri hızla geliştirme kapasitesine sahibiz.

Ar-Ge ekibimiz, bir kısmı yetkili kuruluşlarca, bir kısmı kurum içi olarak verilen; ISO 13485, 98/79/EC Direktifi, ISO 9001, ISO 14971 Tıbbi Cihazlar Risk Yönetimi, ISO 31000 Risk Yönetimi, Proje Yönetimi, Patent Temel Eğitimi, İş Sağlığı ve Güvenliği, Microarray, Hücre Kültürü, DNA dizileme, DNA/RNA izolasyonu, Manyetik Partikül Kullanımı, Real-Time PCR teknikleri, Edge Cam, Mini CNC Router eğitimleri, Sıvı İşleme Sistemleri eğitimlerini almışlardır.

Proje ekibindeki her Ar-Ge Personelinin, kalite yönetimi, iç denetim, iyileştirme faaliyetleri, uygunsuzluk ve uygunsuzluk riskleri, problemlerde kök neden analizi, risk analizi, risk yönetimi konularında eğitim almış ve bizzat uygulama yapmış olması, bu sayede problemleri net olarak tanımlayıp, kök neden analizlerini yapabilen ve etkin çözümlere ulaşır, gerekli bilgiyi proje ekibiyle paylaşarak, firma içinde kalıcı hale getirebilen bireyler olması ve bununla birlikte firmamızın **problemlere akılcı ve sistematik yaklaşım modelini** benimsemiş olması da diğer bir avantajımızdır.