



Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu

Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19)

Gözde Öztan¹ , Halim İşsever² 

ÖZ

İnsandan insana bulaşan ve atipik pnömoni salgınıyla ilişkili yeni bir şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmıştır. Yarasalar, SARS-CoV, MERS-CoV ve COVID-19 için birincil rezervuar olsa da, SARS-CoV'nin, Çin'deki misk kedilerinden, MERS-CoV'nin, Orta Doğu'daki develerden, COVID-19'un yarasadan insana pangolin (pullu karıncayiyen) aracılığıyla bulaşmış olabileceği ortaya çıkmıştır. Epidemiyolojik salgınlara yol açan koronavirüs ailesine ve betakoronavirüs cinsine ait üç insan koronavirüsü (SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2) yaklaşık 32 Kb uzunluğunda pozitif anlamlı tek iplikli RNA'sı olan zarflı virüslerden olup enfeksiyonla ilişkili yüksek mortalite oranlarıyla proenflamatuar yanıtların patogenezinde rol oynamaktadırlar. 2019-nCoV genomu, yarasa SARS benzeri CoVZXC21 ile % 89 ve insan SARS-CoV'siyle % 82 nükleotid benzerliğine sahiptir. Orf1a/b, spike, zarf, membran ve nükleoproteinlerinin filogenetik ağaçları yarasa, misk kedisi ve insan SARS koronavirüslerinininkine yakından ilişkilidir. Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim 2 (ACE2), şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsünün reseptörüdür. Viral protein ve ACE2 reseptörü arasındaki etkileşim, replikasyon döngüsünde önemli bir adımdır. Bu derlemenin amacı SARS ve MERS ile karşılaştırıldığında COVID-19 akut solunum yolu hastalığına neden olan SARS-CoV-2 virüsünün moleküler yapısı ve genetik özellikleriyle hastalığın klinik etkilerini ortaya koymaktır. COVID-19'un spesifik moleküler detaylarının açıklığa kavuşturulması, tedavi hedeflerine ulaşılmasında yol gösterici olacaktır. Böylelikle COVID-19 için moleküler genetik yöntemlerin geliştirilmesi gelecekte virüse karşı kontrol önlemlerimizi arttıracaktır. **Anahtar Kelimeler:** COVID-19, yeni koronavirüs, ACE2, spike protein

ABSTRACT

SARS-CoV-2, transmitted from person to person and associated with the outbreak of atypical pneumonia, first emerged in Wuhan, China. Although bats, SARS-CoV and MERS-CoV are the primary reservoirs for COVID-19, it turns out that SARS-CoV may have been transmitted from the civet in China, MERS-CoV from camels in the Middle East, and COVID-19 from the bat to humans via the pangolin (scaly anteater). SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 are coronaviruses belonging to the Coronaviridae family and Betacoronavirus genus, which cause epidemiological outbreaks, are enveloped viruses with approximately 32 Kb long positive sense, ssRNA, and play a role in the pathogenesis of proinflammatory responses with high mortality rates associated with infection. The 2019-nCoV genome has 89% nucleotide identity with bat SARS-like CoVZXC21 and 82% with human SARS-CoV. ACE2 is the receptor of this severe acute respiratory syndrome coronavirus. The aim of this review is to reveal the molecular structure and genetic features of the SARS-CoV-2 virus and the clinical effects of the disease, which causes COVID-19 acute respiratory disease, and to compare it to SARS and MERS. Clarifying the specific molecular details of COVID-19 will guide researchers to the discovery of its treatment. Thus, the development of the molecular genetic methods for COVID-19 will increase our control measures against the virus in the future. **Keywords:** COVID-19, novel coronavirus, ACE2, spike protein

¹ İstanbul üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

ORCID: G.Ö. 0000-0002-2970-1834;
H.İ. 0000-0002-5435-706X

Sorumlu yazar/Corresponding author:

Gözde Öztan,
İstanbul üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: gozdeoztan@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 24.05.2020

Kabul/Accepted: 24.06.2020

Atf/Citation: Öztan G, İşsever H. Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19). Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 61-71.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-726533>



GİRİŞ

2019 yeni koronavirüsünün (2019-nCoV olarak da adlandırılan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2)) neden olduğu pnömoni yakın zamanda Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmış ve COVID-19 olarak adlandırılmıştır. Hastalığın yayılmasıyla, Çin'in diğer bölgelerinde de benzer vakaların olduğu doğrulanmıştır. 30 Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü, olayın yeni koronavirüs enfeksiyonları tarafından küresel sağlığa büyük bir tehdit teşkil ettiğini belirterek Uluslararası Önemi Haiz Halk Sağlığı Acil Durumu oluşturulduğunu açıklamıştır (1). Koronavirüsler son yirmi yılda iki büyük pandemiye, SARS ve Orta Doğu solunum sendromuna (MERS) neden olmuştur (2). 2019-nCoV, SARS-CoV ve MERS-CoV'yi içeren koronavirüs ailesinin betakoronavirüs cinsinin B soyuna aittir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, ateş, öksürük, miyalji veya yorgunluğun yaygın semptomlar olduğu ve balgam üretimi, baş ağrısı, hemoptizi ve ishalin daha az yaygın semptomlar olduğu bildirilmiştir (3).

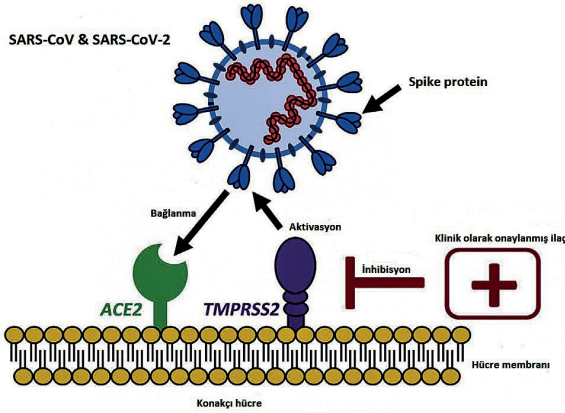
SARS-CoV ve MERS-CoV arasında epidemiyolojik ve klinik özelliklerde benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. SARS-CoV ve MERS-CoV virüslerinin her ikisi de pozitif sarmallı RNA betakoronavirüslerdir. Yarasalardan izole edilen SARS-CoV ve MERS-CoV'nin sıra homolojisi insanlardan veya misk kedisi izolatlarından elde edilen izolatlarla ortaktır bu durum yarasaların rezervuar olduğunu göstermektedir (4).

Viral genom, çoklu gen ürünlerini eksprese eden bir dizi iç içe geçmiş subgenomik RNA'yı kodlar. İnsan Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) ve CD209L, SARS-CoV için hücre reseptörleri olarak tanımlanmıştır. ACE2 baskın reseptör olup CD209L, S proteini için çok daha düşük bir afiniteye sahiptir. MERS-CoV için hücre yüzeyi reseptörü, CD26 olarak da bilinen insan dipeptid peptidaz 4'tür (hDPP4) (5). COVID-19'lu hastaların hem klinik hem de epidemiyolojik özellikleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun, SARS-CoV'ye büyük ölçüde benzeyen klinik bulgularla şiddetli solunum hastalığı kümelerine yol açabileceği ve yoğun bakım ünitesinin kabulüne ve yüksek mortaliteye neden olduğunu göstermektedir (6).

Koronavirüsler 60 nm ila 140 nm çapında değişen pozitif yüklü RNA virüsleridir ve yüzeyindeki spike benzeri çıkıntılar elektron mikroskobu altında saç benzeri bir görünüm vermektedir bu yüzden koronavirüs olarak adlandırılmaktadırlar. HKU1, NL63, 229E ve OC43 şeklinde isimlendirilen dört ayrı koronavirüs, insanların dolaşım sisteminde yer alarak genellikle hafif solunum yolu hastalığına neden olur (7). SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ile % 75 ila % 80 aynı genom dizisine sahip olduğu ve birkaç yarasaya CoV ile daha fazla benzerlik taşıdığı ortaya konmuştur (6).

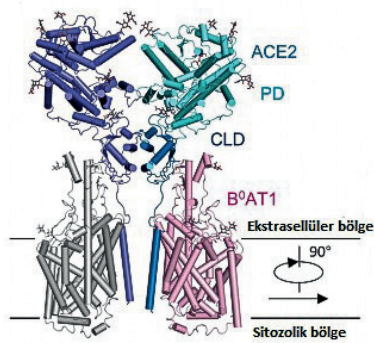
1. SARS-CoV-2 GENOMİK ÖZELLİKLERİ

Yeni koronavirüsün tam genomik uzunluğu 29891 ila 29903 nükleotitten oluşmaktadır. Elde edilen tüm viral genom dizileri, % 99.98'den fazla dizi benzerliği göstermektedir. SARS-CoV-2, SARS-CoV ile % 79 nükleotid dizi benzerliği ve MERS-CoV ile de yaklaşık %50 civarında bir dizi benzerliğine sahiptir. SARS-CoV-2'nin ORF1ab'daki korunmuş yedi replikaz domaini, SARS-CoV ile % 94,6 oranında benzerdir bu durum bu virüslerin aynı türe ait olduğu anlamına gelmektedir (8). ACE2, membrana bağlı aminopeptidazdır. ACE2 enziminin, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerini etkilemede fizyolojik açıdan önemli iki farklı mekanizma ile rol oynadığı tespit edilmiştir. ACE2, anjiyotensin I'de dahil vazodilatör peptitlerin üretimini katalize eder ve anjiyotensin II'nin güçlü vazokonstriktör etkilerinin dengelenmesinden sorumludur. ACE2'nin SARS'a neden olan koronavirüs için fonksiyonel bir reseptör olduğu belirlenmiştir. SARS'ın temel nedeni olan koronavirüs (SARS-CoV), ektoenzime bağlandığında membran füzyonuyla pulmoner endotel hücrelerine girer. Bu etkileşime SARS-CoV spike proteini aracılık eder (9). COVID19'un hücreye girişinin tamamlaması için, spike proteininin TMPRSS2 adı verilen bir proteaz tarafından hazırlanması söz konusudur. Virüs reseptörünün hücresel liganda bağlanması için ACE2 enzimi, virüsün aktivasyonu içinse TMPRSS2 proteazı gerekmektedir. (Şekil 1). 2019-nCoV, konakçı hücreye girip katlanarak virüs RNA genomu kopyalanır ve ardından translasyona uğrar. 2019-nCoV genom rep-



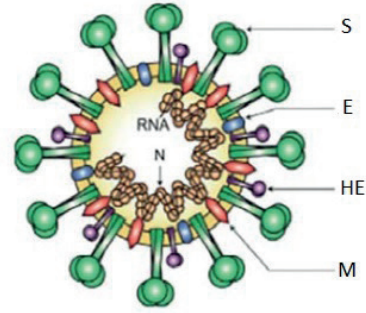
Şekil 1. COVID-19 ve SARS-CoV'nin spike proteini, virüs aktivasyonu için hücresel bağlanma faktörü ACE2 ve hücresel proteaz TMPRSS2'yi kullanır (10)

likasyonu ve transkripsiyon aşamaları, 20 kb replikaz geni tarafından kodlanan viral replikatın aracılık ettiği sürekli ve süreksiz RNA sentezini içermektedir (10). Tam uzunluktaki ACE2, bir N terminal PD ve tek bir transmembran heliks ile biten bir C-terminal kollektin benzeri alandan (CLD) ve ~40 rezidürlük hücre içi segmentten oluşur. ACE2-B⁰AT1 kompleksi, ACE2'nin homodimerizasyonuna aracılık eden kollektin benzeri alanla birlikte heterodimerlerin bir dimeri olarak bir araya gelmektedir (Şekil 2) (11).



Şekil 2. ACE2-B⁰AT1 kompleksinin atomik modeli. Glikozilasyon bölgeleri çubuklar şeklinde gösterilmiştir (11)

Koronavirüsler genomlarındaki beş yapısal proteinleri kodlar. Bunlar Spike (S), Membran (M), Zarf (E) glikoproteinleri, Hemagglutinin Esteraz (HE) ve Nükleokapsid (N) proteindir (Şekil 3) (12). Zarf glikoproteinleri ve N proteini tüm virionlarda olmakla birlikte HE proteinleri yalnızca beta koronavirüs-



Şekil 3. Koronavirüs virion yapısı yapısal proteinlerle gösterilmiştir. N: Nükleokapsid proteini; S: Spike proteini, M: Membran proteini, HE:Hemagglutinin-Esteraz E: Zarf proteini (12)

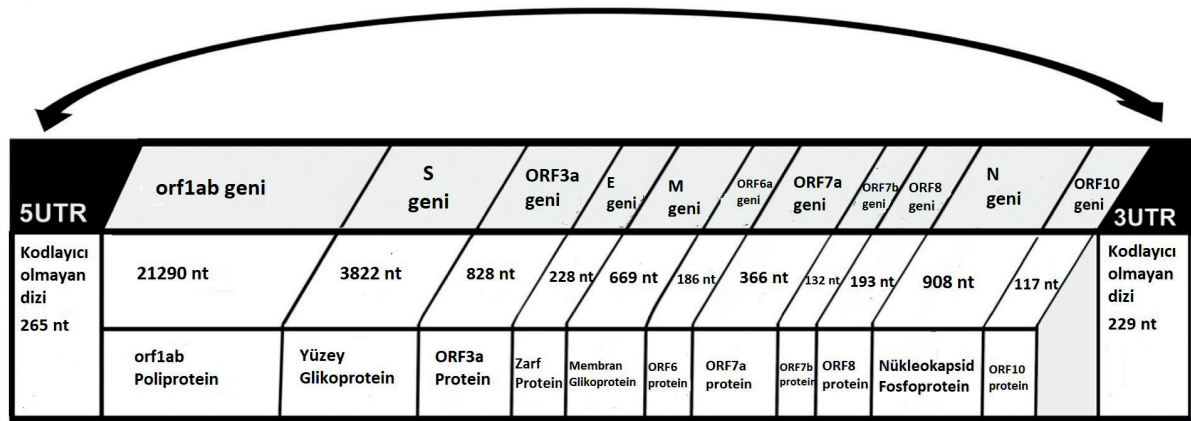
lerde bulunmaktadır (13). S Glikoproteinler virionun dışında bulunur ve viriona tipik bir şekil verir. M proteinleri Golgi cihazında glikozillenir (14). M proteininde meydana gelen modifikasyon, virionun hücreye kaynaşması ve proteinin antijenik hale getirilmesi için gereklidir. M proteini, hücrede virionların yenilenmesinde önemli rol oynar (15). E proteinleri, hücre içindeki virionların birleştirilmesinde ve morfogenezinde fonksiyon göstermektedirler (16). N proteinleri, helikse bağlanabilen ve viral genomik RNA'nın esnek yapısına sahip olan fosfoproteinler olup virion yapısı, koronavirüslerin replikasyonu ve transkripsiyonunda kritik bir etkiye sahiptir (17).

SARS-CoV-2'nin genom boyutu 29.8 kb ila 29.9 kb arasında değişiklik göstermektedir. Genomun 5' ucunun üçte ikisinden fazlası orf1ab kodlayan orf1ab poliproteinlerini içermekle birlikte 3' ucunun üçte biri S, E, M ve N proteinlerini içeren yapısal proteinleri kodlayan genlerden oluşmaktadır. SARS-CoV-2 genomu, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b ve ORF8 genleri tarafından kodlanan 6 yardımcı proteine sahiptir (Şekil 4) (18).

2. SARS-CoV İLE KARŞILAŞTIRILDIĞINDA 2019-nCoV'NİN GENEL SEKANS ÖZELLİKLERİ

Yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2 amino asit seviyesinde SARS-CoV ile karşılaştırıldığında, SARS-CoV-2'nin SARS CoV ile oldukça benzer olduğu bulunmuştur ancak 8a, 8b ve 3b proteinlerinde bazı

SARS-CoV-2 Tüm Genom (29903 nükleotid)



Şekil 4. SARS-CoV-2 genomunun yapısı (18)

önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Tüm genom temelli dizi analizi, SARS CoV-2'nin SARS benzeri bat CoV'lere SARS CoV'lerden daha yakın olduğunu göstermektedir. Tüm genom seviyesinde, SARS-CoV-2, SARS-CoV (%70) ve MERS-CoV (%50)'e genetik olarak daha az benzemekle birlikte Bat-SL-CoVZXC2 ile % 87.23 dizi benzerliği ve bat-SL-CoVZC45 ile % 87.99 dizi benzerliğini paylaşır. Protein düzeyinde, SARS-CoV-2 ile bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC21 tarafından kodlanan proteinlerin çoğunun uzunlukları sadece birkaç minör insersiyon ve delesyonla birlikte benzerlik taşımaktadır (19).

Spike glikoprotein, koronavirüslerin yüzeyinde sivri uçlar oluşturarak virüslerin konakçı hücrelere girmesinden sorumludur. Spike glikoprotein molekülündeki reseptör bağlanma alanı (RBD), konakçı hücrelerin yüzeyindeki reseptörleri doğrudan bağlar. 2019-nCoV genomik dizisine GenBank veritabanından (MN908947.3) erişmek mümkündür. DNA ve prote-

in dizileri BLAST programıyla karşılaştırılmaktadır. Spike glikoproteininin ve bu glikoprotein RBD'sinin tüm genomu ve kodlama bölgesi için kapsama yüzdesi ve dizi benzerlik yüzdesi için veriler belirlenmiştir (Tablo 1). 2019-nCoV'un en yakın homologu, %99/87.99 dizi benzerliği ile yarasadan (MG772933.1) izole edilmiş SARS benzeri koronavirüstür (20).

GenBank erişim numaraları, SARS için AY274119, SARSv için AY525636, misk kedisi için AY304486, yarasa için AGZ48806.1 ve 2019-nCoV için MN908947.3'dür. SARS-CoV RBD'sinde ACE2 ile etkileşen amino asit kalıntıları ve diğer virüslerde korunmuş olanlar kırmızı ile vurgulanmıştır. Majör ikincil yapıların altı çizilmiştir (β -tabakası için çift alt çizgi). 2019-nCoV'deki majör değişmiş amino asitler yeşil renkle gösterilmiştir. Disülfür bağları oluşturan sistein kalıntıları ve N-bağlı glikozilasyon bölgeleri, sırasıyla sarı ve camgöbeği renkleriyle işaretlenmiştir (Şekil 5) (20).

SARS	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRIISNCVADYSVLYNSTFESTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKL
SARSv	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKL
Misk kedisi	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKL
Yarasa	324	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKL
nCoV	336	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGDVVRQIAPGQTGVIADYNYKL
SARS	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
SARSv	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
Misk kedisi	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
Yarasa	414	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
nCoV	426	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE

İlmeç 1 Tabaka 5

İlmeç 2 Tabaka 6 İlmeç 3

Şekil 5. Yakın ilişkili beş koronavirüsten spike glikoproteininin RBD'si için amino asit dizi sıralaması (20)

Tablo 1. Koronavirüslerle yakından ilişkili 2019-nCoV'un nükleotid dizilerindeki benzerlik (20)

Tanıml	Erişim numarası	Tüm virüs kapsamı/benzerlik	Spike glikoprotein kapsamı/benzerlik	RBD kapsamı/benzerlik
Yarasa SARS benzeri koronavirüs izolatu bat-SL-CoVZC45	MG772933.1	%99/%87.99	%94/%83.45	%57/%75.52
Yarasa SARS benzeri koronavirüs izolatu Rs4231	KY417146.1	%99/%80.70	%97/%74.4	%100/%72.71
Rhinolophus affinis koronavirus izolatu LYRa11	KF569996.1	%98/%80.60	%94/%75.53	%100/%72.29
Yarasa SARS benzeri koronavirüs Rs3367	KC881006.1	%99/%80.67	%95/%75.16	%100/%74.18
Yarasa SARS benzeri koronavirüs izolatu Rs9401	KY417152.1	%99/%80.66	%94/%74.85	%100/%73.44
Yarasa SARS benzeri koronavirüs RsSHC014	KC881005.1	%99/%80.57	%95/%74.88	%100/%72.89
Yarasa SARS benzeri koronavirüs izolatu bat-SL-CoVZXC21	MG772934.1	%98/%87.23	%92/%83.20	%55/%73.79
SARS koronavirüs ZS-C	AY395003.1	%98/%80.30	%97/%74.56	%100/73.63
SARS koronavirüs civet020	AY572038.1	%98/%80.21	%97/%74.5	%100/%73.21

3. COVID 19 TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

3.1. Virüs izolasyonu ve Nükleik asit ekstraksiyonu

Virüs izolasyonu için, hastalardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvıları veya nazofaringeal bölgenin apikal yüzeyleri yoluyla hava yolu epiteli (HAE) hücreleri kullanılmaktadır. HAE hücreleri, 37 °C'de inkübe edilen bir hava-sıvı arayüzünde tutulmaktadır. Hücreler, ışık mikroskopisi ile sitopatik etkiler açısından günlük olarak izlenerek hücre üst fazları, kantitatif RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere toplanmaktadır (21). RNA, Nükleik Asit Pürifikasyon Sistemiyle hasta örneklerinden ve viral RNA mini kiti ile hücre kültürü üst fazlarından ekstrakte edilir (22).

Nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan örneklerin hacmi ve elüsyon hacmi, örnek tipine ve örneğin mevcut miktarına bağılıdır. Genel olarak, her bir solunum yolu örneği, idrar örneği, rektal sürüntü ve dışkıdan 250 µl, 55 µl'lik bir elüsyon hacmi ile her bir plazma örneğinin 100 µl'si, 25 µl'lik bir elüsyon hac-

miyle ekstraksiyona tabi tutulur. Ekstraktlar kullanılabileceği kadar -80°C'de saklanır (23).

3.2. Primerler ve Problar

SARS-CoV-2'nin farklı gen bölgelerini (RdRp / helikaz [Hel], spike [S] ve N) hedefleyen primer ve prob setleri tasarlanır. SARS-CoV-2'ye spesifik olan problemlerin belirlenmesinde, BLASTn analiziyle yanlış pozitif test sonuçlarına yol açabilecek insan, diğere insan-patojenik koronavirüsler veya mikrobiyal genlerle homolojilerinin olmadığından emin olunmalıdır (23).

3.3. Gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR)

Gerçek zamanlı-ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), tanı virolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Akut solunum yolu enfeksiyonunda, RT-PCR rutin olarak solunum sekresyonlarından kaynaklanan virüsleri tespit etmek için kullanılır. Yapılan testlerde, örneklerdeki viral RNA konsantrasyonu, gerçek zamanlı RT-PCR'ler ve viral yükün mutlak ölçümü için tasarlanmış in vitro transkripsiyonlu RNA standartlarıyla belirlenmektedir (22).

RT-PCR, erken enfeksiyonu teşhis etmemize yardımcı olmak için yeterli hassasiyete sahiptir. Gerçek zamanlı RT-PCR testi ile ilgili önemli bir sorun, yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkarma riskidir. COVID-19'un tipik klinik özelliklerine ve özdeş spesifik bilgisayarlı tomografi görüntülerine sahip birçok şüpheli vakanın teşhis edilmediği bildirilmiştir. Bu yüzden, negatif bir sonuç COVID-19 enfeksiyonu olasılığını dışlamaz ve tedavi veya hasta yönetimi kararları için tek kriter olarak kullanılmamalıdır (24).

Gerçek zamanlı RT-PCR ve klinik özelliklerin kombinasyonu, SARS-CoV-2 salgınının yönetimini kolaylaştırdığı görülmektedir. Farklı gen bölgeleri için primerler kullanılan RT-PCR sonuçlarının, viral RNA dizilerinin varyasyonundan etkilenebileceği iyi bilinmektedir. SARS-CoV-2 genomundaki primer ve prob hedef bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, yanlış pozitif sonuç olasılığını en aza indirmek için SARS-CoV-2 Gerçek Zamanlı RT-PCR Teşhis Paneli tasarlamıştır (24).

Üretici protokolüne göre COVID-19 nükleik asit saptama kiti kullanılarak SARS-CoV-2 RT-PCR'i gerçekleştirilir. Spesifik olarak, açık okuma çerçevesi 1ab (ORF1ab) ve nükleokapsid protein (N) dahil olmak üzere iki hedef gen, gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle test edilir. İki ardışık negatif sonuç elde edilirse, semptomların başlaması ile ilk negatif RT-PCR test sonucunun tarihi arasındaki süre viral nükleik asit dönüşüm süresi olarak tanımlanmaktadır (25).

Pfefferle S ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, E genini hedefleyen custom yapımı bir primer / prob seti, otomatik sistemde kullanım için optimize edilmiştir. Kullanılan her iki primer de, primer dimerlerin oluşumunu önlemek için sondan bir önceki bazlarından 2'-O-metil bazları ile modifiye edilmiştir. Master karışım (Mmx) kaseti (96 test için) 84 µL forward primer (400 nM, 5'-ACAGGTA-CGTTAATAGTTAATAGCmGT-3'), 84 µL reverse primer (400 nM, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACAmCA-3') ve 10,5 µL prob (50 nM, 5'-Fam-ACA-CTAGCC/ZEN/ATCCTTACTGCGCTTCG-Iowa Black FQ-3') ile 182 µL su ve 5,640 µl Mmx2 karışımı birleştirilerek hazırlanmıştır. Cobas Omni Utility Channel yazılımındaki (Roche, Los Gatos, ABD) cihaz ayarları ve RT-PCR reaksiyonu için kullanılan sıcaklık profili Tablo 2'de özetlenmiştir (26).

3.4. SARS-CoV-2'nin Tam Genom Analizi

SARS-CoV-2'nin tam genom dizi analizi, betakoronavirüse ait olduğunu ancak geçmişte salgınlara neden olan SARS-CoV ve MERS-CoV'den farklı olduğunu ortaya koymuştur. SARS-CoV-2, Bat_SARS benzeri koronavirüs ile birlikte sarbecovirüsün alt cinsinde farklı bir soy oluşturmaktadır. SARS-CoV-2'nin bir mozaik olmadığını ve Yunnan Eyaletinden yarasalarda tespit edilen BatCoV RaTG13 ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. 2019-nCoV ve RaTG13 arasındaki genetik benzerlik seviyeleri, RaTG13'ün insanlarda salgına neden olan tam varyantı sağlamadığını, ancak 2019-nCoV'nin yarasa-

Tablo 2. SARS-CoV-2 PCR döngü koşulları ve çalışma şablonu oluşturmak için kullanılan Utility Channel yazılım ayarları (26)

Örnek tipi	Alkol bazlı sürüntü (400 µL giriş)				
	1	2:SARS-CoV-2 E-geni	3	4	IC
Kanallar	NA	1.5	NA	NA	Önceden tanımlanmış
RFI	NA	1.5	NA	NA	Önceden tanımlanmış
PCR döngü koşulları	UNG inkübasyonu	Pre-PCR basamağı	1. ölçüm	2. ölçüm	Soğutma
Döngü sayısı	Önceden tanımlanmış	1	5	45	Önceden tanımlanmış
Basamak sayısı		3	2	2	
Sıcaklık		55°C;60°C; 65 °C	95°C;55°C	91°C;58 °C	
Durdurma zamanı		120 s; 360 s; 240 s	5 s; 30 s	5 s; 25 s	
Veri toplama		-	Her döngünün sonu	Her döngünün sonu	

IC: iç kontrol; NA: uygulanamaz; RFI: nispi floresan artışı; UNG: urasil-DNA N-glikosilaz.

lardan kaynaklandığı hipotezinin çok muhtemel olduğunu göstermektedir. 2019-nCoV ve RaTG13 klanları arasında en yakın ortakları Bat_SARS benzeri koronavirüs sekansları ile uyumsuz filogenetik ilişkiler olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (27).

Swab rnekleri, Vero E6 hücreleri üzerine ekilerek sitopatik etki ve N bölgesi için primerler kullanılarak RT-PCR protokolü ile izlenmektedir. İzolatların pasaj 1'inden (P1) elde edilen hücre kültürü süpernatantı toplanır ve RNA, Viral RNA mini kiti ile izole edilir ve in vitro transkribe edilmiş RNA standardı ile niceleir. RNA'nın miktarı ve kalitesi Florometre ve Biyoanalizör kullanılarak değerlendirilir. Her rnek için 100 ng toplam RNA, Zymo-Seq RiboFree Ribozomal deplezyon kütüphanesi hazırlama kiti kullanılarak işlenir. Elde edilen tüm kütüphaneler kalite kontrolünden geçirilerek ekimolar konsantrasyonda toplanmadan önce ölçülür ve standart prosedürler izlenerek Illumina Nano MiSEQ 2x150bp çift uçlu modda dizilenir. Kalite kontrolünden geçen sıralı okumalar (Phred skor ≥ 30) adaptör ve kalite kırılmasına uğrarken, kalan okumalar varsayılan parametre ayarlarıyla Megahit kullanılarak de novo olarak birleştirilir (28).

Genom Detektif Koronavirüs Tiplendirme Aracı, bilinen tüm virüs genomlarını yeni nesil dizileme veri setlerinden hızlı ve doğru bir şekilde bir araya getirmek için kullanılan web tabanlı bir yazılım uygulamasıdır. Bu uygulama, FASTA formatında birleştirilmiş genomlardan filogenetik kümelerin ve genotiplerin tanımlanmasını sağlar. Ayrıca Genom Detektif Koronavirüs Tiplendirme Aracı, koronavirüs türlerinin tüm genom ile test edilmesiyle SARS-CoV-2'nin tüm halka açık verilerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar ve salgın küresel olarak genişledikçe yeni viral mutasyonların izlenmesine de izin verir (29).

3.5. COVID-19 tanısında serolojik testlerin kullanımı

Spesifik IgM ve IgG antikorları için enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) gibi geleneksel serolojik analizler, yüksek verimli bir avantaja sahiptir ve RT-PCR yöntemiyle ortaya çıkan yanlış negatif durumlardan kaçınırlar. Serumdaki koronavirüs S ve N proteinlerinden sorumlu antikorların (IgM ve IgG) konsantrasyo-

nunu tespit etmek için serum rneklерinden ELISA ve kemilüminesans yöntemleri kullanılmaktadır (30).

Kaplama antijenleri olarak saflaştırılmış rekombinant N proteinleri (rNP) kullanılarak SARS-CoV-2'ye karşı IgM, IgA ve IgG antikorlarının saptanması için ELISA protokolü kullanılmaktadır. ELISA için kaplanmış rNP'lerin konsantrasyonu ve plazma dilüsyonları, satranç tahtası titrasyon testleri kullanılarak optimize edilmektedir. ELISA'ların kesim değerlerini belirlemek için, sağlıklı bireylerden alınan plazmanın ortalama değerleri ve SD'leri belirlenir. Antijenin optimal kaplama konsantrasyonu ve optimal plazma dilüsyonları tespit edilir. Cut off değerleri, negatif serumun 450 nm (A450) 'indeki ortalama absorbans ve IgM, IgA ve IgG için sırasıyla belirlenen SD değerlerinin 3 katı olarak hesaplanır (31). SARS-CoV-2'ye özgü IgM ve IgG antikorlarının saptanması da teşhis için kullanılabilir. COVID-19 enfeksiyonu, pozitif spesifik IgM, spesifik IgG'nin negatiften pozitive dönüşümü, iyileşme döneminde IgG titresinde 4 kat artış şeklindeki kriterlerden biriyle belirlenebilmektedir (32). Bununla birlikte, daha yüksek hassasiyetli qPCR deneyleri, IgM ELISA'ları ile birleştirildiğinde tespit yöntemini daha da geliştirebilir (31).

Plazma rneklерinde SARS-CoV-2'ye karşı Ab, IgM antikor ve IgG antikor, üreticinin talimatlarına göre Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co.,Ltd tarafından sağlanan ELISA kiti kullanılarak test edilmiştir. HRP ile konjüge edilmiş antijen ve immobilize SARS-CoV-2 spike proteininin reseptör bağlanma alanını (RBD) içeren çift antijen sandviç immunoassayine (Ab-ELISA) dayalı toplam antikor tespiti için ELISA yöntemi geliştirilmiştir. IgM μ -zinciri yakalama yöntemi (IgM-ELISA), Ab-ELISA ile aynı HRP-konjgat RBD antijenini kullanarak IgM antikorlarını saptamak için kullanılmaktadır. IgG antikorları, bir rekombinant nükleoprotein temelli indirekt ELISA kiti (IgG-ELISA) kullanılarak test edilmiş Ab, IgM ve IgG için assaylerin özgüllüğü, SARS-CoV-2 salgını öncesinde sağlıklı bireylerden toplanan rneklерin test edilmesiyle % 99.1 (211/213), % 98.6 (210/213) ve % 99.0 (195/197) olarak belirlenmiştir (33).

Yapılan alışmalar, SARS-CoV-2'ye karşı IgM ve IgG antikorlarının hastalığın orta ve sonraki aşamala-

rında tespit edilebildiğini ve COVID-19'un serolojik tanısında ELISA tabanlı IgM ve IgG antikor testlerinin COVID-19 tanısı için büyük özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir. Patojen enfeksiyonuna karşı bağışıklık yanıtları sırasında IgM genellikle IgG antikorundan daha erken üretilir. Ayrıca, SARS-CoV-2'ye karşı hem IgM hem de IgG antikorları, semptom başladıktan sonraki 4. gün kadar erken bir zamanda tespit edilmektedir. Spesifik dolaşan antikorlar ELISA yöntemiyle düzgün bir şekilde tespit edilebilir, bu nedenle örnekleme veya solunum sisteminde virüs bulunmaması nedeniyle yanlış negatif sonuçlardan kaçınılır. COVID-19 pnömonisi, belirgin avantajlarla viral nükleik asit saptama-ya alternatif olarak spesifik antikorların seropozitifine dayanarak belirlenebilir (34).

Bu derlemenin, COVID-19'un benzersiz özellikleri hakkındaki bakış açımızı geliştireceği ve gelecekte kontrol önlemlerimizi arttıracığı görüşündeyiz. COVID-19 hastalığına genetik yatkınlığın moleküler temellerinin ortaya konulmasıyla hastalığın etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulması ve çözüm yollarının belirlenmesinde son derecede etkili olacaktır.

SONUÇ

Koronavirüsler, tek sarmallı RNA virüsleri ailesinden olup, hayvanları ve insanları enfekte ederek solunum, gastrointestinal, hepatik ve nörolojik hastalıklara neden olabilir. Bu zamana kadar, alfa-koronavirüsler (HCoV-NL63 ve HCoV-229E) ve beta-koronavirüsler (HCoV-OC43, HCoV-HKU1), SARS-CoV ve MERS-CoV dahil olmak üzere altı insan koronavirüsü tanımlanmıştır (35).

SARS-CoV olduğu gibi, 2019-nCoV da solunum damlacıkları ile kişiden kişiye doğrudan geçebilir ve temas ve cansız objeler yoluyla da geçebileceği ortaya çıkan kanıtlarla doğrulanmıştır. 2019-nCoV ile enfekte olan bireylerin asemptomatik kuluçka süresinin 1 ila 14 gün (yüksek ihtimalle 3-10 gün) arasında değiştiği tahmin edilmektedir (36). 2019-nCoV, Wuhan, Çin'de şiddetli pnömonili hastalarda tanımlanmasından bu yana hızla yayılmıştır (37). COVID-19 hastalığının bilinen şiddeti, üst solunum yolu enfeksiyonu hafif semptomlarından ciddi pnömoniyeye kadar değişmekle birlikte, bildirilen vakaların

yüksek bir oranı hafif seyretmektedir (38).

SARS-CoV-2, 26-32kb boyutunda tek sarmallı pozitif sarmallı RNA genomuna sahiptir. Virüs, insan hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla insan hücrelerine girer. Reseptör bağlanma bölgesinin girişini belirleyen spike proteini kullanılarak yapılan genom dizisi analizi, hem SARS-CoV hem de SARS-CoV-2 için baskın hücre yüzeyi reseptörünün ACE-2 olduğunu gösterir. MERS-CoV için baskın reseptör, dipeptidil peptidaz 4 (DPP4)'tür. COVID-19 ile enfekte olmuş bir kişiden enfekte olan ortalama birey sayısını veren temel üreme sayısı (R0), 2.2 ila 2.6 arasında değişmekte olup ikiye katlama zamanı 6.4 gündür. R0 1'den büyükse sürekli transmisyon öngörülür. SARS-CoV ve MERS-CoV'nin R0 değeri sırasıyla 1 ve 1,4 - 2,5'ten düşük olarak belirlenmiştir. SARS-CoV-2'nin daha yüksek R0'ı, virüsün daha bulaşıcı doğasını ve SARS-CoV-2'nin bir pandemi olarak potansiyelini göstermektedir (39).

SARS-CoV-2 enfeksiyon mekanizması, koronavirüsün, ACE2'nin membrana bağlı formuna bağlanması ve oluşan kompleksin konakçı hücre tarafından internalizasyonudur. ACE2'nin koronavirüs için ko-reseptör olmasından yola çıkarak, akciğer, kalp, böbrek, beyin gibi ACE2'yi eksprese eden çeşitli dokularda hücresel girişini ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemek amacıyla bu enzimi bloke etmek ve ekspresyonunu azaltmak için yeni terapötikler üzerinde çalışılmaktadır (40).

COVID-19'lu yaşlı olguların mortalitesi genç ve orta yaşlı olguların mortalitesinden daha yüksek olup Pnömoni Şiddet Endeksi derecesi IV ve V olan olguların oranı genç ve orta yaşlı olgularınkinden anlamlı derecede fazladır. COVID-19'lu yaşlı olguların ciddi hastalığa geçme olasılığı daha yüksektir. 2019-nCoV'in risk değerlendirmesini ve yanıtını ortaya koyabilmek için virüsün biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri hakkında daha fazla bilgiye hızlı bir şekilde ihtiyaç duyulmaktadır ve bu durum 2019-nCoV kontrolüne ve önlenmesine fayda sağlayacaktır.

Sonuç olarak; COVID-19'un dünyaya yayılmasını önlemek için alınan tedbirlerle, pandeminin SARS ve MERS'de olduğu gibi iki-üç aylık zaman dilimi içinde

vaka sayılarının azalacağını düşünmekteyiz. Koronavirüs hastalığına karşı geliştirilmiŖ bir aŖı Ŗu anda mevcut değildir. Alınan önlemler daha çok kaynak kontrolü ve bulaŖ yoluna yöneliktir. Yeni koronavirüs ile ilgili temas zincirinin taranarak hastalığın kaynağının belirlenmesi ve gerekli önlemlerin daha yayılmadan alınması COVID19 ile mücadele açasından son derece önem arz etmektedir. 2019-nCoV'un bulaŖmadığı insanları bağışık kılarak, salgının önüne geçmeyi hedefleyen aŖı çalışmalarıyla birlikte var olan olguları tedavi etmeye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları tüm dünyada hızla devam etmektedir. SARS-CoV-2 genom bazlı spesifik aŖılar ve terapötik antikorlar üzerinde denemeler test edilirken, güvenilirlikleri kapsamlı deneme çalışmaları gerektirdikleri için bu süreç uzun zaman almaktadır. Ayrıca; direkt SARS-CoV-2'yi hedefleyebilecek en hızlı tedavi seçeneklerinden biri bu hastalığı atlatan insanların bu virüse karşı antikor içerdiği kabul edilen serum veya plazmalarının gerek koruyucu ve gerekse de tedavi amaçlı olarak kullanılmasını içermektedir.

Hastalığa yakalanan bireylerin klinik tablosunda görülen ileri derecede farklılıklar Covid-19'a yanıtta bireysel genetik faktörlerin önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. SARS-CoV2 virüsünün bloke edilmesini sağlayacak ilaçların üretilmesine yönelik viral zarf glikoproteinlerinin yüzeyinde bulunan glikanları hedefleyebilen proteinlerin (lektinler) kullanımı genetik mühendisliğinin etkili yaklaŖımları arasında yer almaktadır. Genetik yatkınlığa ek olarak, virüsün vücuda girme yolu, viral maruz kalma miktarı gibi diğer olası nedenlerin de hastalığın seyri açasından dikkate alınması gerekmektedir. Ayrıca, COVID-19 ile mücadelede genomun farklı bölgelerine yeni genetik materyalin eklenmesini var olanın ise çıkartılarak değişimine olanak sağlayan CRISPR genom düzenleme teknolojisi, in vitro ortamda COVID-19'un %90'a yakın bir oranında yok edilmesini sağlarken insanlarda hastalığı durdurmak için de kullanılabilceği yönünde ortaya atılan hipotezlerde mevcuttur.

Hakem Değerlendirmesi: DıŖ bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- G.Ö, H.İ.; Veri Toplama- G.Ö, H.İ.; Veri Analizi/Yorumlama- G.Ö, H.İ.; Yazı Taslağı- G.Ö, H.İ.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.Ö, H.İ.; Son Onay ve Sorumluluk- G.Ö, H.İ.; Süpervizyon- G.Ö, H.İ.

Author Contributions: Conception/Design of Study- G.Ö, H.İ.; Data Acquisition- G.Ö, H.İ.; Data Analysis/Interpretation- G.Ö, H.İ.; Drafting Manuscript- G.Ö, H.İ.; Critical Revision of Manuscript- G.Ö, H.İ.; Final Approval and Accountability- G.Ö, H.İ.; Supervision- G.Ö, H.İ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Xu X, Yu C, Qu J, Zhang L, Jiang S, Huang D, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2020;47(5):1275-280.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579(7798):270-73.
3. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* 2020;63(3):364-74.
4. Al-Tawfiq JA, Zumla A, Memish ZA. Travel implications of emerging coronaviruses: SARS and MERS-CoV. *Travel Med Infect Dis* 2014;12(5):422-8.
5. Sutton TC, Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology* 2015;479-480:247-58.
6. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of

- severe and moderate coronavirus disease 2019; *J Clin Invest* 2020; 130(5):2620-9. doi: 10.1172/JCI137244.
7. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr* 2020;87(4):281-6.
 8. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol* 2020;1-9. doi: 10.1002/jmv.25748.
 9. Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernández Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, et al. Structure-Based Discovery of a Novel Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor. *Hypertension* 2004;44(6):903-6.
 10. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2020; doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022. (Epub ahead of print)
 11. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020;367(6485):1444-8.
 12. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. *Adv Virus Res* 2011;81:85-164. doi: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2
 13. Lissenberg A, Vrolijk MM, van Vliet AL, Langereis MA, de Groot-Mijnes JD, Rottier PJ, et al. Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hem agglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J Virol* 2005;79:15054-63.
 14. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol* 2010; 84 (7):3134-46.
 15. de Haan CA, de Wit M, Kuo L, Montalto-Morrison C, Haagmans BL, Weiss SR, et al. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology* 2003;312(2): 395-406.
 16. Ruch TR and Machamer CE. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* 2012;4(3):363-82.
 17. Escors D, Ortego J, Enjuanes L. The membrane M protein of the transmissible gastroenteritis coronavirus binds to the internal core through the carboxyterminus. *Adv Exp Med Biol* 2001; 494: 589-93.
 18. Khailany AR, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* 2020: 1-6. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100682
 19. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 24: 1-7. doi: 10.1007/s10096-020-03899-4 [Epub ahead of print]
 20. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem and Biophys Res Commun* 2020; 525(1):135-40.
 21. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395(10224):565-74.
 22. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 23. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2020;23:58(5) : doi: 10.1128/JCM.00310-20.
 24. Tahamtana A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn* 2020 May;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
 25. Xiao TA, Tong XY, Zhang S. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: a preliminary study from 56 COVID-19 patients. *Clin Infec Dis*. 2020; doi: 10.1093/cid/ciaa460.
 26. Pfefferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-

- CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill* 2020;25(9):200152. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152
27. Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect Genet Evol* 2020;79:104212. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104212.
 28. Licastro D, Rajasekharan S, Dal Monego S, Segat L, D'Agaro P, Marcello A, et al. Isolation and full-length genome characterization of SARS-CoV-2 from COVID-19 cases in Northern Italy. *J Virol* 2020; doi: 10.1128/JVI.00543-20.
 29. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, Karim WA, Giovanetti M, Alcantara LC, et al. Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics* 2020; doi: 10.1093/bioinformatics/btaa145.
 30. Zhong L, Chuan J, Gong BO, Shuai P, Zhou Y, Zhang Y, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci* 2020;25 :1-4. doi: 10.1007/s11427-020-1688-9. (Epub ahead of print)
 31. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020;21: doi: 10.1093/cid/ciaa310.
 32. Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;1-10. doi: 10.1007/s11684-020-0767-8. (Epub ahead of print)
 33. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020;28: doi: 10.1093/cid/ciaa344.
 34. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020; 19: doi: 10.1093/cid/ciaa461.
 35. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis* 2020;94:44-8. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.004. (Epub ahead of print)
 36. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoVdA quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect* 2020; 22(2):69-71.
 37. Li G ve De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(3):149-50.
 38. Lake MA. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. *Clinical Medicine* 2020; 20(2):124-7.
 39. Meethal ME, Ollakkott S, Varma GG. COVID-19 and SARS-CoV-2: Molecular Genetics Perspectives. *Indian J Nat Sci* 2020; 59(10):18751-18757.
 40. South AM, Diz DI, Chappell MC. COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2020;318(5): doi: 10.1152/ajpheart.00217.2020.