



COVID-19 Hastalığına Neden Olan SARS-COV-2 Virüsünün Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

Detection of SARS-COV-2 Virus Causing COVID-19 Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Sevde Hasanoğlu¹ , Emrah Yücesan²

¹Bezmalem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

²Bezmalem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: S.H. 0000-0003-2378-1535;
E.Y. 0000-0003-4512-8764

Sorumlu yazar/Corresponding author:
Emrah Yücesan, Bezmalem Vakıf Üniversitesi,
Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi,
İstanbul, Türkiye
E-posta: emrahyucesan@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 24.04.2020
Kabul/Accepted: 30.04.2020

Atf/Citation: Hasanoğlu S, Yücesan E. Detection of SARS-COV-2 Virus Causing COVID-19 Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(Suppl.1): S24-S30.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-S1-0003>

ÖZ

2019 yılının Aralık ayında nedeni belirlenememiş bir pnömoni vakası Çin'de Wuhan şehrinde bildirilmiştir ve ardından bu hastalık COVID-19 olarak isimlendirilmiştir. 2020 yılının Mart ayında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 hastalığı pandemi olarak ilan edilmiştir. DSÖ tarafından asemptomatik ya da hafif semptomlu vakalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğinin tanı koyma amacıyla uygulanabileceği belirtilmiştir. Ülkemizde, SARS-CoV2 kesin tanısının konması amacıyla gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) uygulamaları DSÖ'nün kılavuzunda belirttiği ve Sağlık Bakanlığının onayladığı şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu derlemede, COVID-19 hastalığına neden olan SARS-COV-2 virüsünün RT-PCR ile tespitine ilişkin süreç özetlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, polimeraz zincir reaksiyonu, virüs tespiti

ABSTRACT

In December 2019, an undetermined cause of pneumonia was reported in the city of Wuhan in China, and then this disease was named COVID-19. In March 2020, COVID-19 disease was declared as a pandemic by the World Health Organization (WHO). It has been stated by WHO that the polymerase chain reaction technique may be applied for diagnosis in asymptomatic or mild symptomatic cases. In our country, RT-PCR applications are carried out in accordance with the WHO guideline and approved by the Ministry of Health in order to make an exact diagnosis of SARS-CoV2. This review summarizes the process of detecting SARS-COV-2 virus by RT-PCR, which causes COVID-19 disease.

Keywords: COVID-19, polymerase chain reaction, virus detection



GİRİŞ

Alt ve üst solunum yollarını tutan ve çocuklarda klinik tabloya neden olan virüslerin anlatıldığı 2005 senesinde yayımlanan bir derlemede, koronavirüs ailesinin birçok üyesinin belirlendiği ve bunların ciddi akut respiratuvar sendroma neden oldukları ve bu aileye mensup başka virüslerin de büyük olasılıkla çevremizde dolaşmakta olduğu ancak şimdilik belirlenmedikleri bildirilmiştir (1). Yani koronavirüs ailesinden olan virüslerin solunum yolları üzerinden etki gösterdikleri ve ciddi klinik tablolara yol açmaları uzun süredir bilinmektedir. Hatta bu aileye üye virüslerin küresel ölçekte ciddi salgınlara neden oldukları de 2003 senesi Şubat ayında tanımlanan Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu (SARS-*Severe Acute Respiratory Syndrome*) ve 2012 senesi Eylül ayında tanımlanan Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS-*Middle East Respiratory Syndrome*) örneklerinden beri yine açıkça bilinmektedir (2,3).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporuna göre SARS, dünya genelinde 8098 kişiyi etkilemiş ve 774 kişi SARS tanısı ile vefat etmiştir (4). SARS, 21. yüzyılın ilk pandemisidir ve ilk ortaya çıkışı 2002 senesi sonuna doğru Çin Halk Cumhuriyeti'nin Guangdong bölgesinde atipik bir pnömoninin görülmesiyle tanımlanmıştır (5). Hemen sonra günümüzde ülke içinde ve ülkeler arasında mobilitenin artan bir ivme ile gelişmesi neticesinde hastalık 2003 senesi Şubat ve Mart aylarında Hong Kong ve sonra Vietnam, Singapur, Kanada ve başka ülkelerde de tanımlanmıştır (4,6). Ancak olumlu bir gelişme olarak, DSÖ raporlarına göre 2004 senesi itibarıyla SARS nedeniyle ölüm bildirilmemiştir (7).

Koronavirüs ailesinin bir başka üyesinin neden olduğu MERS; 2012 Eylül ayında ilk olarak Suudi Arabistan'da görülmüş (8) ve kısa süre sonra ilk çıktığı coğrafyadan başka bölgelerde de tespit edilmiştir (9, 10). MERS-CoV virüsünün neden olduğu bu hastalık doğrudan ya da dolaylı yoldan develerden bulaşan bir zoonozdur (11). Tanımlandığı tarihten 31 Mayıs 2019 tarihine kadar 2442 vaka bildirilmiştir

ve dünya genelinde 842 ölüm raporlanmıştır (12). Bu olumsuz özelliklerine rağmen MERS-CoV genellikle yaygın bir bulaş ağına sahip olmamıştır. SARS ve MERS hastalıkları etiyopatogenezlerinde aynı virüs ailesinin yer alması nedeniyle birçok araştırmada birlikte incelenmişlerdir (13-15).

Aynı aileye üye olan ve bu yazının konusunu oluşturan yeni koronavirüs ile Dünya, ilk olarak 2019 senesi Aralık ayının son günü, nedeni belirlenmemiş bir pnömoni vakasının Çin'in Hubei eyaletinin başkenti Wuhan şehrinde bildirilmesiyle tanıştı ve bu hastalığa Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi Koronavirüs Çalışma Grubu tarafından COVID-19 (*Coronavirus Disease-2019*) ismi verildi (16). 11 Mart 2020'ye gelindiğinde ise DSÖ tarafından COVID-19 hastalığı pandemi olarak ilan edildi (17).

2012 senesinde yayımlanan ve SARS-CoV üzerine yazılan bir makalede virüsün özelliklerinden bahsedilirken 30kb uzunlukta ve 14 açık okuma çerçevesine (ORF-*Open Reading Frame*) sahip olduğu, nükleokapsid (N), spike (S), membran (M) ve zarf (E-*Envelope*) olarak isimlendirilen dört majör yapısal protein içerdiği bildirilmiştir (18). 2019 sonunda DSÖ'nün pandemi duyurusu yapmasına neden olan COVID-19 hastalığı etkeni SARS-CoV2 virüsünün; poli-A kuyruğu dahil olmak üzere 29903 baz çifti uzunlukta olduğu bildirilmiştir (GenBank erişim numarası MN908947.3). Tipik olarak beş ORF bulundurur ve bunlar aynı iplik üzerindedir, tüm yapıda ORF1ab poliproteini (7096 aa), spike glikoproteinini (1273 aa), zarf proteini (75 aa), membrane proteini (222 aa) ve nükleokapsid proteini (419 aa) bulunmaktadır (Şekil 1). Genetik dizi analizleri sonucunda SARS-CoV2 viral genomunun, yarasa SL-CoVZC45 ve SARS-CoV Tor2 virüslerinin genetik dizilerine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (19). Bu özellikleriyle pandemik etkeni olan SARS-CoV2 virüsünün Betakoronavirüs ailesi üyesi olduğu kesinlik kazanmıştır (20).

Bu virüslerin taksonomisine evrimsel açıdan bakıldığında doğada sırasıyla, Riboviria, Nidovirales



Şekil 1. Orf: Açık okuma çerçevesi, S: spike protein, E: zarf proteini, M: membran proteini, N: nükleokapsid proteini (Corman VM ve ark'dan (29) değiştirilerek alınmıştır)

(Primatlarda), Coronavirinae, Coronaviridae (Hominidlerde), Orthocoronavirinae (Hominilerde), Betakoronavirüs (Homolarda), Sarbecovirus, SARS-ilişkili koronavirüs (Homo Sapienslerde) ve bireysel olarak insanda SARS-CoV, SARS-CoV2, MERS-CoV vs. konumlandırıldıkları ve zarflı, artı yönelimli, tek iplikli ve zoonotik orijinli RNA virüsleri oldukları bilinmektedir (16). RNA virüslerinden olan CoV virüsleri, dört ana sınıfta değerlendirilir, sırasıyla α , β , γ , δ (21). Bu sınıfların arasında özellikle α ve β memelileri enfekte edebilir, diğer iki sınıf ise memelilerin yanı sıra kuşları da enfekte edebilir (22). Bugünkü bilgimize göre koronavirüslerden yedi tanesi insanları enfekte edip solunum yolları hastalıklarına neden olmaktadır ve bunlardan dört tanesi üst solunum yollarını tutar ve kendi kendilerini sınırlandırır, sırasıyla; HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 (23). HCoV-229E ve HCoV-OC43 1960'lardan itibaren bilinmektedir. Yukarıda da kısaca değinilen SARS hastalığının ortaya çıkmasıyla bu virüsler daha fazla dikkat çeker hale geldiler. HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 2004 ve 2005 senelerinde tanımlandılar (24). Bir diğer üye olan MERS-CoV ise 2012 senesinde izole edildi ve tıpkı SARS-CoV gibi alt solunum yollarını tutma eğilimi gösterdiği tespit edildi (25). Bu derlemenin de konusu olan SARS-CoV ise insan hava yollarındaki epitel hücrelerden izole edildi ve yeni nesil dizileme teknolojilerinin yardımıyla, yukarıda da bahsedildiği haliyle yeni bir betakoronavirüs üyesi olarak adlandırıldı (26). SARS-CoV2, tıpkı MERS-CoV ve SARS-CoV gibi alt solunum yollarını tutmaktadır ve toplumun geneline yayılma potansiyeli daha fazla olsa da, klinik seyri bu iki hastalığa kıyasla daha hafiftir (27).

SARS-CoV2 Tespitinde Laboratuvar Yöntemleri

19 Mart 2020 tarihinde DSÖ, SARS-CoV2 tespitinde yararlanılacak laboratuvar tetkiklerine dair genel bilgileri içeren ve daha önce görülen ve yukarıda da değinilen MERS salgınındaki deneyimlerden elde edilen verilerden yararlanarak bir kılavuz yayımlamıştır (28). Bu kılavuzda DÖS, asemptomatik ya da hafif semptomlu vakalarda gerçek zamanlı PCR

(*Real Time Polymerase Chain Reaction/RT-PCR*) tekniğinin tanı koyma amacıyla uygulanabileceğini belirtmiştir. İlave olarak serolojik testler, viral dizileme ve viral kültür de olası testler arasında sayılmıştır ancak yazımızın kapsamı gereği bunlardan bahsedilmeyecektir. Yine aynı raporda şüpheli vakaların da bir nükleik asit amplifikasyon testi olan RT-PCR ile değerlendirilmesi gerektiği yazılmıştır (28). Ülkemizde gerçekleştirilen, SARS-CoV2 kesin tanısının konması amacıyla RT-PCR çalışmaları DSÖ'nün kılavuzunda belirttiği ve Sağlık Bakanlığının onayladığı şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu yazımızda bahsedilen genetik test yöntemi ve süreç, deneyimlerimiz ışığında açıklanmaya çalışılacaktır.

Şüpheli Vakalardan Biyolojik Numunelerin Alınması Sonrasında Laboratuvara Ulaştırılması

Virüs tespiti için numuneler alındıktan sonra mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır. Bu durum tüm çalışmanın devamının düzgün bir şekilde gerçekleştirilmesi için en hayati süreçlerden biridir zira varlığının tespit edilmesi istenen virüs tek iplikli bir RNA virüsüdür ve bilindiği üzere numunenin fiziksel koşullardan, DNA'nın aksine, azami etkilendiği bilinen bir gerçektir. Numuneler orofaringeal ya da nazofaringeal sürüntülerdir. Bu sürüntü numuneleri polyester bir pamuklu çubuk yardımı ile alınıp iki farklı şekilde laboratuvara gönderilebilir: Kuru pamuklu çubuk halinde steril bir flakona konularak ya da antifungal ve antibiyotik içeren viral transport besiyeri bulunduran ve yine steril olan bir flakon tüp içerisine konularak. Viral transport besiyeri yerine nükleaz içermeyen bir sıvı ortam da kullanılabilir. Numuneyi teslim alan laboratuvar personelinin uygun ve optimum güvenlik önlemleri almış olması oldukça önem arz etmektedir. Laboratuvarda çalışacak olan personelin uygun güvenlik önlemlerini alması kişisel korunma açısından çok önemlidir. Bu yüzden personel gözlük, maske, tulum ve eldiven gibi gerekli tüm önlemleri alarak çalışmaya başlamalıdır. Teslim alınan numunelerin dış yüzeyleri %70'lik etil alkol ile temizlenerek negatif basınçlı alana transfer edilir. Gerekli kodlama işlemlerinin gerçekleştirilmesinin ardından numuneler Biyogüvenlik Seviyesi 3 (BSL-3) olan laminar kabin içerisine alınır. Burada

belirtilmesi gereken bir nokta, farklı sıcaklık koşullarına maruziyet ve/veya numunenin uygun şekilde alınmamış olması, genetik materyalde hasara sebep olmakta bu durum yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaktadır.

Numuneden RNA izolasyonu ve RT-PCR ile SARS-CoV2 Virüsünün Tespiti

COVID-19 vakalarının rutin doğrulanması için hali hazırda yararlanılan laboratuvar tekniklerinden RT-PCR en kesin yöntem olarak kullanılmaktadır. Bilindiği üzere RT-PCR yöntemine geçmeden önce viral RNA izolasyonu yapılmalıdır (29). Bunun için numunelerden RNA izolasyonu manuel (yani gereken çözeltilerin laboratuvar personeline ham kimyasal malzemelerden hazırlanmaları ve uygun pH koşullarına getirilip stoklanmaları esasına dayanan uygulama) RNA izolasyonu veya ticari olarak satılan kitler ile iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Bu işlemler için çok sayıda firmanın birçok farklı kiti piyasadan temin edilebilmektedir. RNA izolasyonu sırasında en fazla dikkat edilmesi gereken kısım, RNA'nın doğası gereği dış etkenlere çok açık olması ve aşırı kırılabilir yapısından ötürü tüm izolasyon işlemlerinin buz üzerinde gerçekleştirilmesi gerektiğidir. Sonrasında RT-PCR ile viral genomun varlığı gösterilmeye çalışılır. Bu amaçla tasarlanan RT-PCR çalışması ile virüse ait olan ve hedeflenen (çoğaltılması planlanan) diziler; N (nükleokapsid proteini), E (zarf proteini), S (*spike* proteini) ve RdRP (RNA bağımlı RNA polimeraz) bölgeleridir. 2012'de Corman VM ve ark. tarafından yayımlanan bir çalışmada insan koronavirüsünün PCR ile yüksek çözünürlükte gösterilebildiği ve bunun için bir *assay* tasarlanmanın mümkün olduğu bildirilmiştir. Çalışmada virüsün E proteinin *upstream* bölgesi (upE) ve Orf1b bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (30). Aynı grup tarafından 2020'de yayımlanan bir başka makalede ise bu sefer virüsün RdRP, E ve N bölgelerinin çoğaltılmasıyla SARS-CoV2'nin RT-PCR ile gösterileceği bildirilmiştir (29). Bu çalışmanın en güzel yanlarından birisi çoğaltılması planlanan her gen için ileri ve geri primer dizilerinin konsantrasyonları ile birlikte verilmiş olmasıdır. Literatüre göre SARS-CoV2'nin belirlenmesi için öncelikle virüsün Orf1b bölgesi ve/

veya S bölgesi hedef alınarak dizileme yapılmış, daha sonra yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarda N bölgesinin hedeflenmesi ile hassasiyetin 10 kat arttığı gösterilmiştir. Ayrıca virüsün belirlenmesinde bazen N bölgesine ek olarak koronavirüs ailesinde ortak olan E bölgesi de ikinci bir PCR ile çoğaltılmaktadır. Ülkemizde de testler 2 kanallı (N bölgesi ve internal kontrol olarak RNP geni) veya 3 kanallı (N bölgesi, E bölgesi ve internal kontrol) olacak şekilde yapılmaktadır. Bugün DSÖ'nün belirlediği referans laboratuvarlarda da N bölgesi dizilenmektedir. Benzeri çok sayıda çalışma (özellikle 2020 senesinin ilk aylarından itibaren eksponansiyel bir artışla) literatürde mevcuttur. Belirtilen iki çalışmadan sadece örnek olması açısından bahsetmeyi uygun bulduk. RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra; magnezyum klorür, dNTP, Taq polimeraz ve oligonükleotid içeren karışıma kalıp RNA uygun miktarlarda eklenerek RT-PCR reaksiyonu hazırlanır (30). Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer durum tüm RT-PCR bileşenlerinin bir araya getirilmesinin yukarıda açıklanan nedenlerden ötürü buz üzerinde gerçekleştirilmesidir. RT-PCR işlemi farklı laboratuvarlarda farklı şekillerde gerçekleştirilme ihtimali içerse de tarafımızdan gerçekleştirilen haliyle; 10 uL magnezyum klorür, dNTP ve Taq polimeraz içeren karışıma 5 uL uygun bölge için tasarlanan oligonükleotid ve ardından 5 uL kalıp RNA eklenir. RT-PCR cihazının farklılığına bağlı olarak reaksiyon 0,2 ml hacme sahip konvansiyonel PCR tüplerinde ya da 96 kuyulu plakalarında hazırlanmalıdır. Tasarlanan primerlere özgü belirlenen bağlanma sıcaklıkları dikkate alınarak ön denatürasyon, denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları içeren RT-PCR döngüsü, döngü sayısının belirlenmesinden sonra cihaza kurulum sağlanır (Tablo 1). Tek tüp içerisinde ilk aşamada ters transkriptaz enzimi ile RNA'dan cDNA sentezi ve ikinci basamak reaksiyonda spesifik primerler ile ilgili bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. RT-PCR

Tablo 1. RT-PCR döngüsü

42°C	20 dakika	cDNA sentezi
95°C	30 saniye	Bekleme
95°C	4 saniye	45 döngü
60°C	30 saniye	

işlemi cihazda tamamlandıktan sonra analiz aşamasına geçilir. RT-PCR'de hedeflenen viral genin dizisine özgü primerler ve probalar kullanılır. Kullanılan probalar farklı şekilde floresan boyalarda işaretlenir. Bunların en bilinenleri 535nm dalga boyunda ışımaya veren HEX, 575nm dalga boyunda ışımaya veren ROX ve 494nm dalga boyunda ışımaya veren FAM'dır. Burada HEX internal kontrol olarak ve FAM ise SARS-CoV2 için kullanılır. Aynı zamanda hedeflenen genin haricinde kontrol olarak kullanılmak amacıyla bir referans gene özgü nükleik asit dizileri de farklı bir floresan boya ile işaretlenir (31). İnternal kontroller her numunenin bireysel olarak çalışıp çalışmadığı gösteren önemli kontrol araçlarıdır. Her bir çalışmaya pozitif ve negatif örnekler dahil edilmelidir.

Tüm deneysel süreçlerde olduğu gibi COVID-19 hastalığına neden olan SARS-CoV2 virüsünün RT-PCR ile tespiti çalışmasının da belli başlı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Örneğin; az miktarda hasta materyali içeren numune, numunenin vakanın enfekte olmasından çok önce ya da geç alınmış olması, numunenin uygun şekilde laboratuvara gönderilememiş olması, testin doğasında bulunan PCR inhibisyonu gibi problemler sayılabilir. Aynı zamanda COVID-19 enfeksiyonu şüphesi yüksek olup negatif sonuç elde edilen hastalardan sadece üst solunum yolu numuneleri alındıysa mümkünse alt solunum yolundan da ek numuneler alınarak test tekrarlanmalıdır (28).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.H., E.Y.; Veri Toplama- S.H., E.Y.; Veri Analizi/Yorumlama- S.H., E.Y.; Yazı Taslağı- S.H., E.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.H., E.Y.; Son Onay ve Sorumluluk- S.H., E.Y.; Malzeme ve Teknik Destek- S.H., E.Y.; Süpervizyon- E.Y.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.H., E.Y.; Data Acquisition- S.H., E.Y.; Data Analysis/Interpretation- S.H., E.Y.; Drafting Manuscript- S.H., E.Y.; Critical Revision of Manuscript- S.H., E.Y.; Final Approval and Accountability- S.H., E.Y.; Technical or Material Support- S.H., E.Y.; Supervision- E.Y.

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

- Williams JV. (2005): The clinical presentation and outcomes of children infected with newly identified respiratory tract viruses. *Infect Dis Clin North Am* 19(3):569-84.
- Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). 2003 [cited 2020 April]. Available from: <https://www.who.int/csr/sars/en/>.
- Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2019 [cited 2020 April]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>.
- Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;349:2431-41. DOI: 10.1056/NEJMra032498
- Zhao Z, Zhang F, Xu M, Huang K, Zhong W, Cai W, et al., Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangzhou, PR China. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 8):715-20.
- Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM et al., A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* 2003;348(20):1986-1994.
- Suwantarat N, Apisarnthanarak A. Risks to healthcare workers with emerging diseases: lessons from MERS-CoV, Ebola, SARS, and avian flu. *Curr Opin Infect Dis* 2015;28(4):349-61.
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012;367(19):1814-20.

9. Bialek SR, Allen D, Alvarado-Ramy F, Arthur R, Balajee A, Bell D, et al., First confirmed cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection in the United States, updated information on the epidemiology of MERS-CoV infection, and guidance for the public, clinicians, and public health authorities - May 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 2014;63(19):431-6.
10. Ki M. 2015 MERS outbreak in Korea: hospital-to-hospital transmission. *Epidemiol Health* 2015; 37: e2015033.
11. Lu L, Liu Q, Du L, Jiang S. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): challenges in identifying its source and controlling its spread. *Microbes Infect* 2013;15(8-9):625-9.
12. Donnelly CA, Malik MR, Elkholy A, Cauchemez S, Van Kerkhove MD. Worldwide Reduction in MERS Cases and Deaths since 2016. *Emerg Infect Dis.*, 2019;25(9):1758-1760.
13. Casanova LM, Jeon S, Rutala WA, Weber DJ, Sobsey MD. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(9):2712-7.
14. Pyankov OV, Bodnev SA, Pyankova OG, Agranovski IE. Survival of aerosolized coronavirus in the ambient air. *J Aerosol Sci* 2018;115:158-63.
15. Otter JA, Donskey C, Yezli S, Douthwaite S, Goldenberg SD, Weber DJ. Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *J Hosp Infect* 2016;92(3):235-50.
16. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5(4):536-544.
17. Cucinotta D, Vanelli M. (2020): WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed* 2020;91(1):157-60.
18. McBride R, Fielding BC. The role of severe acute respiratory syndrome (SARS)-coronavirus accessory proteins in virus pathogenesis. *Viruses*, 2012;4(11):2902-23.
19. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al., A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020;579(7798):265-9.
20. Phan T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. *Infect Genet Evol* 2020;79:104211.
21. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* 2018;23(2):130-7.
22. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020;92(4):418-23.
23. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus Disease 2019: Coronaviruses and Blood Safety. *Transfus Med Rev.*, Feb 21 2020. pii: S0887-7963(20)30014-6.
24. Enjuanes L, Zuñiga S, Castaño-Rodríguez C, Gutierrez-Alvarez J, Canton J, Sola I. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv Virus Res* 2016;96:245-86.
25. Ding Y, Wang H, Shen H, Li Z, Geng J, Han H, et al., The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *J Pathol.*, 2003;200(3):282-9.
26. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al., A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382(8):727-33.
27. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al., (2020): Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020;395(10223):497-506.
28. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. 2020 [cited 2020 April]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>.

29. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al., Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020;25(3):2000045.
30. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al., Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill*, 2012;17(39). pii:20285.
31. Pas SD, Patel P, Reusken C, Domingo C, Corman VM, Drosten C, et al., First international external quality assessment of molecular diagnostics for Mers-CoV. *J Clin Virol.*, 2015;69:81-5.