

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Açısından SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 in Terms of Medical Microbiology Laboratory

Sibel AYDOĞAN¹, Bedia DİNÇ^{1,2}

¹ Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği

² Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği



ÖZ

Coronaviridae ailesinde yer alan koronaviruslar (CoV), vahşi ve evcil hayvanlarda farklı şiddette gastrointestinal, respiratuvar ve sistemik hastalıklara neden olurken, insanlarda bağışıklık durumuna göre soğuk algınlığından pnömونيye kadar farklı klinik tablolara yol açabilir. Günümüze dek insanlarda enfeksiyon etkeni olarak yedi koronavirus türü tanımlanmıştır; bunlardan HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 ve HCoV OC43, tipik olarak immünokompetan bireylerde soğuk algınlığı semptomlarına neden olurken, SARS-CoV (Ciddi Akut Solunum Sendromu Koronavirus), MERS-CoV (Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirus) zoonotiktir ve ciddi solunum yolu hastalıklarına ve ölümlere neden olur. Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan kentinde Aralık 2019'da başlayan ve kısa sürede pandemi olarak tanımlanan COVID-19'un etkeni SARS-CoV-2 insanlarda enfeksiyon etkeni olarak tanımlanan yedinci koronavirusur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün SARS-CoV-2 kaynaklı COVID-19'u pandemi olarak tanımlaması ve dünya üzerinde her geçen gün vaka ve ölüm sayılarının artmasından dolayı, aşı çalışmaları için virüsün yapısı ve salgını kontrol etmede en önemli basamak olan viral tanı yöntemlerinin kullanılması daha da önem kazanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Koronavirus, SARS-CoV-2, Tanı

ABSTRACT

Coronaviruses (CoV), which are in the *Coronaviridae* family, cause different severity of gastrointestinal, respiratory and systemic diseases in wild and domestic animals, and can lead to different clinical manifestations, ranging from colds to pneumonia, depending on immunity. To date, seven types of coronavirus have been identified as infectious agents in humans; of these, HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 and HCoV OC43 typically cause cold symptoms in immunocompetent individuals, while SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus) and MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) is zoonotic and cause severe respiratory diseases and deaths. SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19, is the seventh coronavirus identified as an infection agent in humans, which started in December 2019 in Wuhan, Hubei Province of China and was identified as a pandemic in a short time. Since the World Health Organization (WHO) defines SARS-CoV-2-sourced COVID-19 as a pandemic, and because of the increasing number of cases and deaths worldwide, structure of the novel virus and viral diagnosis methods gained importance respectively for vaccine studies and for controlling the outbreak caused by the virus.

Key Words: Coronavirus, SARS-CoV-2, Diagnosis



AYDOĞAN S : 0000-0001-8820-032X
DİNÇ B : 0000-0001-8318-2556

Çıkar Çatışması: Tüm yazarlar adına, ilgili yazar çıkar çatışması olmadığını belirtir.

Conflict of Interest: On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Yazarların katkısı / Contribution of the Authors: **AYDOĞAN S:** Araştırma ve/veya makalenin hipotezini veya fikrini oluşturan, Sonuçlara ulaşmak için planlama/metodoloji belirleme, Hasta takibinde sorumluluk almak, ilgili biyolojik malzemelerin toplanması, veri yönetimi ve raporlama, deneylerin yürütülmesi, Çalışmanın bütününe veya önemli bölümlerinin yazımında sorumluluk almak. **DİNÇ B:** Araştırma ve/veya makalenin hipotezini veya fikrini oluşturan, Sonuçlara ulaşmak için planlama/metodoloji belirleme, Hasta takibinde sorumluluk almak, ilgili biyolojik malzemelerin toplanması, veri yönetimi ve raporlama, deneylerin yürütülmesi, Araştırma/çalışmanın sorumluluğunu üstlenmek, ilerlemenin seyrini denetlemek, Çalışmanın bütününe veya önemli bölümlerinin yazımında sorumluluk almak.

Atıf yazım şekli / How to cite : Aydoğan S, Dinç B. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Açısından Sars-Cov-2. Türkiye Çocuk Hast Derg 2020; 14(suppl):18-25.

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

Sibel AYDOĞAN

Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Türkiye
E-posta: drs aydogan72@gmail.com

Geliş tarihi / Received : 22.05.2020

Kabul tarihi / Accepted : 22.06.2020

Elektronik yayın tarihi : 27.07.2020

Online published

DOI: 10.12956/tchd.741463

GİRİŞ

Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti Wuhan şehrinde etiyojisi tespit edilmeyen vakaların Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bildirilmesiyle başlayan çalışmalar daha sonraki dönemde pandemi olarak tanımlanacak olan süreci başlattı. DSÖ 12 Ocak 2020'de etkeni 2019 yeni Koronavirüs (novel Coronavirus, 2019-nCoV), takiben 12 Şubat 2020'de etkenin neden olduğu hastalığı ise COVID-19 olarak adlandırdı. Daha sonra etken, Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) tarafından SARS-CoV-2 olarak isimlendirildi (1). Bu derlemede 22 Mayıs 2020 tarihi itibarıyla dünyada 216 ülkede, 4.962.707 konfirme edilmiş vaka ve 326.459 kişinin ölümüne yol açtığı bildirilen SARS-CoV-2'nin mikrobiyolojik özellikleri ve tanı yöntemleri ele alınmıştır (2).

KORONAVİRUSLAR- GENEL BAKIŞ

Koronavirüsler *Nidovirales* takımında, *Coronaviridae* ailesinin *Coronavirinae* alt ailesinde yer alırlar. Sekans özellikleri ve filogenetik ilişkilerine göre *Coronavirinae* alt ailesi dört cinse ayrılır; Alfakoronavirüsler, Betakoronavirüsler, Gamakoronavirüsler ve Deltakoronavirüsler. Gammakoronavirüsler ve Deltakoronavirüsler bazı memeli türleri ve kuşları enfekte ederler ancak insanlarda hastalık oluşturmazlar (3). Ancak Alfakoronavirüs ve Betakoronavirüs cinsleri insanlarda solunum yolu enfeksiyonundan, bazı hayvan türlerinde de gastrointestinal sistem enfeksiyonlarından sorumludur. Aralık 2019 tarihine kadar insanlarda enfeksiyon etkeni olan (Human Coronavirus-HCoV) altı Koronavirüs cinsi tanımlanmıştır. Bunlar HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV ve MERS-CoV'dur. HCoV-229E ve HCoV-NL63 Alphakoronavirüs cinsi içinde yer alırken, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV ve MERS-CoV Betakoronavirüs cinsinde yer almaktadır (3).

2002 yılına kadar insanlarda enfeksiyona neden olan sadece iki tip HCoV biliniyordu; bunlar 1960'larda üst solunum yolu enfeksiyonu olan kişilere ait örneklerin hücre kültüründen izole edilmiş olan HCoV-229E ve HCoV-OC43'dü. Yaygın olarak dolaşımda olan diğer Koronavirüsler, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 ise 2000'li yılların başında bronşiolit ve pnömoni kliniği olan kişilerden izole edilmiştir (4).

2002 yılının sonlarında da güney Çin'in Guangdong eyaletinden yayılan, yarasa kaynaklı bir Betakoronavirüs olan Ciddi Akut Solunum Sendromu ile ilişkili koronavirüs, SARS-CoV tanımlanmıştır (5). SARS-CoV enfeksiyonu yaklaşık 30 ülkede görülmüş ve 8273 kişinin enfekte olması ve 774 kişinin ölümüyle sonuçlanmıştır (6).

2012 yılında yine bir Betakoronavirüs tek hörgüçlü develerden Suudi Arabistan'da insanlara yayılmış ve Orta Doğu Solunum Sendromlu Koronavirüs (MERS-CoV) adını alarak SARS ile benzer bir klinik sendroma neden olmuştur. MERS-CoV yaklaşık 27 ülkede, 2500 kişinin enfekte olması ve 858 ölümlle sonuçlanan, 60 yaş üzeri popülasyonda mortalitenin yüksek

seyrettiği, ileri yaş, erkek cinsiyet ve kronik hastalık varlığının kötü prognozda etkili kabul edildiği bir tablo ile sonuçlanmıştır (7,8).

İnsanlarda ortaya çıkan en son Koronavirüs, Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan Şehrinde ortaya çıkmış, hastalardan alınan solunum yolu örneklerinin incelenmesiyle virüsün daha önceki SARS-CoV ile taksonomik olarak ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Önceleri Novel Koronavirüs (2019-nCoV), olarak adlandırılan virusa Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi'nde (ICTV) bir çalışma grubunun önerisiyle SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 kaynaklı enfeksiyonlara ise COVID-19 adı verilmiştir. Vakaların patlamasıyla süreç 11 Mart 2020'de DSÖ tarafından pandemi olarak ilan edilmiştir (9).

SARS-CoV-2; GENEL YAPISI VE REPLİKASYONU

Coronaviridae ailesi, zarflı, pozitif polariteli, tek iplikçikli RNA genomuna sahip virüslardan oluşmaktadır ve SARS-CoV-2'nin genel yapısı, *Coronaviridae* ailesindeki diğer virüslara benzer. SARS-CoV-2 yaklaşık 60-140 nm çapında, protein yapıda çıkıntılı olan, viral genom uzunluğu yaklaşık 30 kb olan, tek sarmallı pozitif polariteli zarflı bir virustur (10-12). Sekans analizleri sonrasında SARS-CoV-2'nin Betakoronavirüs 2b soyunda yer aldığı, nükleotid dizisi olarak SARS-CoV ile %79.0, MERS-CoV ile %51.8 ve yarasa SARS benzeri Koronavirüs izolatu (Bat-SL-CoVZC45) ile %87.6-%89 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (11, 13, 14).

RNA virüsünün genelinde olduğu gibi enfekte ettiği hücrelerin sitoplazmasında replikasyonunu gerçekleştiren virüs, pozitif polariteli olduğu için viral genomun, direkt kalıp olarak kullanılmasıyla çeşitli yapısal ve yapısal olmayan proteinler kodlar. Koronavirüslerde viral genomun değişken sayıda (6-11 arasında) açık okuma çerçevesi (open reading frame, ORF) içerdiği gösterilmiştir. Viral RNA'nın üçte ikisini oluşturan ilk ORF'ler (ORF1a/b) 16 adet yapısal olmayan protein kodlarken, (nsp 1-16), genomun kalan üçte birini oluşturan diğer ORF bölgelerinden, en az dört adet yapısal protein; spike-çıkıntı (S) glikoprotein, envelope-zarf (E) proteini, matriks (M) proteini ve nükleokapsid (N) proteini ve konak immün cevabıyla etkileşen birkaç aksesuar protein kodlanır (15, 16).

SARS-CoV-2 proteinlerinin işlevleri daha önceden bilinen Koronavirüslerin proteinleri temel alınarak açıklanmaktadır. Yapısal olmayan proteinlerin çoğunun viral replikasyondaki görevi tanımlanmış olmakla birlikte, bazı yapısal olmayan proteinlerin görevi henüz netlik kazanmamıştır. Dört yapısal protein;

S proteini; virüs yüzeyinde, viral zarfın üzerinde çıkıntılar şeklinde olup, virüsün reseptöre bağlanma ve membran füzyonu ile konak hücreye tutunmasını sağlamaktadır. S proteini konak hücre tropizmini belirleyen önemli viral proteindir. S proteininin S1 ve S2 ilmekleri vardır; S1 temel olarak virüsün konak hücre reseptörüne bağlanmasından, S2 ise membran füzyonundan sorumludur. SARS-CoV ve SARS-CoV-2 S1 proteini içerisinde

50 adet korunmuş proteine sahiptir. Bu veriler SARS-CoV-2'nin de SARS-CoV'da olduğu gibi anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE 2) reseptör olarak kullanabileceğini düşündürmektedir (17-20). ACE 2, akciğerler, mide, ince bağırsak, kolon, cilt, lenf düğümleri, karaciğer safra kanalları, böbrek parietal epitel hücreleri ve beyindeki arteriyel ve venöz endotelial hücrelerde ve arteriyel düz kas hücrelerinde bulunur, ayrıca akciğer alveoler epitel hücrelerinin yüzeyinde ve ince bağırsağın enterositlerinin yüzeyinde eksprese edilir (21).

S proteini koronavirüs enfeksiyon patogenezinde ve ilaç/aşı geliştirilmesi için hedef olabilmesi açısından önemli yere sahiptir.

M proteini; viral partikül oluşumu ve salınımında çok önemli rolü olan zarf proteinleridir. Üç adet transmembran bölümü vardır ve virionları (Virion=tam virus partikülü) şekillendirir ve nükleokapside bağlanır. Nükleokapsid proteininin stabilizasyonunu sağlar. Böylece nükleokapsid-RNA kompleksinin oluşumu ve devamını sağlar. Virus hücre içi dengesinin sağlanmasında önemli rol oynar. Konak hücrenin virüs tarafından duyarlı hale getirilmesinde bu protein önemli rol alır (22).

E proteini; viral parçaların bir araya getirilmesi (assembly), virus salınımı ve rolü tam olarak bilinmemekle birlikte patogeneзде rol oynar. E proteini, virusun tomurcuklanarak hücreden ayrılmasında rol oynayan önemli bir virulans faktörüdür (23).

N proteini; M protein ile birlikte viral partikül oluşumu ve salınımında çok önemli rolü olan zarf proteinleridir. Viral RNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynar. N proteini ayrıca, interferon antagonisti olarak davranır, böylece virusun immün sistem tarafından yok edilmeye çalışılması da inhibe edilmiş olur (24, 25).

SARS-CoV-2'nin konak hücrelerdeki replikasyonu, S proteini aracılığıyla hücresel anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE 2) reseptörüne bağlanmasıyla başlar. Virusun hücre içine girişiyle birlikte öncelikle genomik RNA kalıp olarak kullanılarak poliprotein 1a/1ab translasyonu gerçekleşir ki, buradan replikasyon-transkripsiyon kompleksini (RTK) oluşturmak üzere yapısal olmayan proteinler kodlanır. RTK yapısal proteinlerin replikasyonundan sorumludur. S, E ve M proteinleri endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi aparatına girer ve N proteini, bir nükleoprotein kompleks oluşturmak için pozitif iplikçikli genomik RNA ile birleştirilir. Bu yapısal proteinler daha sonra ER'den Golgi aparatı yoluyla küçük veziküller aracılığıyla taşınacak olan virion öncüsü ile kaynaşır. Virionlar daha sonra enfekte olmuş hücreden ekzositoz yoluyla salınır ve enfekte ederek replike olmak için başka bir konakçı hücre arar (26).

TANI

SARSCoV-2 virusunun etkeni olduğu COVID-19 enfeksiyonlarının henüz kesin bir tedavisi ve etkili bir aşısı bulunmamaktadır. Bu nedenle hasta yönetiminin en doğru şekilde yapılabilmesi ve

pandeminin kontrol altına alınabilmesi için doğru ve hızlı tanının yapılması çok önemlidir.

Doğru tanı için en önemli nokta ise, hasta örneğinin doğru zamanda, doğru yerden ve doğru şekilde uygun ekipmanla alınarak uygun koşullarda (süre, ısı) laboratuvara ulaştırılmasıdır.

SARS-CoV-2'nin moleküler mikrobiyolojik tanısında örnek alımı için en uygun zaman, semptomların başlamasından sonraki ilk 5-7 gündür, zira yedinci günden sonra üst solunum yollarından alınan örneklerde sonucun pozitif çıkma olasılığı düşmekte, testin duyarlılığı azalmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) için alınabilecek üst solunum yolu örnekleri; nazofaringeal/orofaringeal sürüntü, nazofaringeal aspirat örnekleri, alt solunum yolu örnekleri ise; bronkoalveoler lavaj (BAL), bronşiyal yıkama, balgam, trakeal aspirat, transbronşiyal akciğer biyopsi örnekleridir. Test duyarlılığı açısından bronkoalveoler örnekler uygun olmakla birlikte, örnek alan kişi için yüksek risk taşıdığından rutinde çok tercih edilmemektedir. İdeal olarak nazofaringeal ve orofaringeal sürüntünün birlikte alınarak aynı viral transport besiyeri (VTM) içine konulması ve bu şekilde laboratuvara gönderilmesi önerilmektedir. Nazofaringeal örnekler için NAAT çalışırken inhibisyona neden olduğundan kesinlikle pamuk uçlu eküvyonlar önerilmez. Rayon veya dakron uçlu eküvyonlarla örnek alınmalıdır. Tüm solunum yolu örnekleri için geçerli olmakla birlikte, özellikle alt solunum örnekleri alınırken kişisel koruyucu ekipmanların (KKE) kullanılması önem arz etmektedir. Örnekler alındıktan sonra üçlü biyolojik taşıma kapları içinde, en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalı; hemen laboratuvara gönderilemeyecek örnekler +4 °C'de bekletilerek (48 saate kadar) laboratuvara ulaştırılmalıdır (27).

Genel olarak enfeksiyon etkenlerinin mikrobiyolojik tanısında etkenin kendisi ya da bir antijenini saptayan direkt testler ve konağın etkene karşı geliştirdiği özgül antikor yanıtını gösteren indirekt testler kullanılır. Bugün için SARS-CoV-2 rutin tanısında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) öncelikli olarak 'real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PZR)' yöntemini kullanan testleri önermekle birlikte, diğer yöntemleri esas alan farklı testler de geliştirilmeye devam etmektedir.

1. Hücre kültürü

İnsan Koronavirüsünün (HCoV) hücre kültüründen tanı amaçlı izolasyonu permisif hücre hatlarının yetersizliği, sonuçlanma süresinin uzunluğu, yoğun uğraş ve uzman ekip gerektirmesi ve kültürün doğrulanması için gerekli antiserumların eksikliğinden dolayı rutin olarak uygulanmamaktadır (28). SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 primer maymun hücrelerinde ve Vero ve LLC-MK2 gibi hücre hatlarında üremekte fakat şüpheli olguların tanısında rutin tanı laboratuvarlarında biyogüvenlik şartları nedeniyle yapılması önerilmemektedir. Bununla birlikte elde edilen izolatların özelliklerinin tanımlanmasında ve aşı ve terapötik ajanların geliştirilmesinde virusun üretilmesi kritik önem taşımaktadır (29,30).

2. Dizi analizi

Şüpheli pozitif sonuçların doğrulanmasında virus kaynağının belirlenmesi, yayılma yollarının izlenmesi, zaman içinde virusun uğradığı değişikliklerin tanımlanarak bulaşıcılık, reseptöre tutunma, virulans, tedavi seçenekleri gibi enfeksiyon parametrelerini etkileyebilecek mutasyonların belirlenmesini sağlayacağından, düzenli aralıklarla elde edilen örneklerden virus genetik diziliminin analizlerinin yapılması önerilmektedir (31,32).

3. Nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT)

SARS CoV-2 virusu ile enfekte hastalarda gözlenen semptomlar nonspesifiktir ve bunların çoğu diğer solunum sistemi enfeksiyonlarında da izlenmektedir. Enfeksiyonun tanısında virusa yönelik olarak en yaygın yöntem moleküler testlerdir. Moleküler tekniklerin geliştirilmesi patojenin proteomik ve genomik kompozisyonunun ya da enfeksiyon sırasında ve sonrasında konaktaki protein/genlerin ifadelerindeki değişikliklerin anlaşılmasına bağlıdır (33). Virusun ilk sekans analizi metagenomik RNA dizileme yöntemi ile yapılmış ve bulgular resmi olarak açıklandıktan sonra dizileme 10 Ocak 2020 tarihinde GenBank sekans bilgi havuzuna eklenmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ve Çin'in ortak raporuna göre, Aralık 2019-Şubat 2020 tarihleri arasında 104 suş izole edilmiş ve dizilemesi yapılmıştır. Genom dizileme, primer ve probe tasarlamada ve diğer nükleik asit testlerinin geliştirilmesinde araştırmacılar için en önemli ihtiyaçtır (34,35).

SARS CoV-2'yi genetik olarak saptayabilecek çok sayıda rRT-PZR kiti tasarlanmaktadır. RT-PZR yöntemi ile viral RNA'dan ilk önce komplementer DNA (cDNA) elde edilmekte ve ardından cDNA'daki spesifik bölgelerin çoğaltılması sağlanmaktadır. Test tasarımı genellikle iki ana basamaktan oluşur. İlk olarak, genom dizisi hizalanır ve RNA'nın çoğaltılması için en uygun primer tasarımı yapılır. Ardından yöntem optimize edilir ve test geliştirilir (36). Corman ve ark. (37), etkeni saptamada kullanılabilir 3 adet en iyi korunan gen dizisini göstermiştir. Bunlar:

1. ORF1ab bölgesinde RdRp (RNA bağımlı RNA polimeraz) geni,
2. Zarf (E 'Envelope') protein geni
3. Nükleokapsid (N) protein geni.

İlk 2 gen etkeni saptamada daha yüksek analitik duyarlılık göstermiştir. Bundan sonraki aşamada yöntemin optimizasyonu (kullanılacak reaktifler, test inkübasyon zamanı ve ısı gibi) geliştirilmiştir (37).

Günümüzde çok sayıda nükleik asit ve antikor saptama kitleri tanıda kullanılmak üzere onay almış olmakla birlikte, RT-PZR solunum yolları örneklerinde etkenin saptanması için en yaygın kullanılanıdır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), SARS CoV-2 varlığını saptamada tek basamaklı rRT-PZR yöntemini kullanmaktadır. Uygulamada viral RNA örnekten ekstrakte edilmekte ve ardından master miks bileşeni eklenmektedir.

Master miks bileşeni içinde nükleaz içermeyen su, iki adet primer (forward ve reverse), floresan özellikli bir probe ve enzim, magnezyum, nükleotidler gibi bileşenlerden oluşan bir reaksiyon içeriği bulunmaktadır. Master miks ve RNA bir ısı döngü cihazına yüklenir ve tanımlanan ısılarda ve sürelerde reaksiyon gerçekleştirilir. Test sürecinde bir örnekteki RNA'nın çoğalması eş zamanlı olarak floresan sinyalin görülmesi ile saptanır. Sonuçların doğru yorumlanması için her testte pozitif ve negatif kontrollerin kullanılması gereklidir. SARS CoV-2 için CDC, nCoVPC olarak isimlendirilen pozitif kontrol sağlamıştır (38).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2 Mart 2020 tarihinde yayımladığı geçici rehberde, COVID-19 salgınında tanı testlerinin farklı bulaş senaryolarında ne şekilde uygulanabileceğine dair bir algoritma belirlemiştir. Buna göre virusun dolaşımında olmadığı ülkelerde ilk olgunun tanısının doğrulanması için ilk aşamada virus genomunda en az iki farklı bölgeyi hedefleyen NAAT testi ile alınan pozitif sonucun ardından virusun kısmi ya da tüm genom dizilmesinin yapılması, SARS-CoV-2'nin yaygın olarak görüldüğü ülkelerde ise tek ayırt edici bir hedef bölge kullanarak RT-PZR ile tarama yapılması önerilmiştir. Ancak bir ya da daha fazla negatif sonuç enfeksiyon olasılığını dışlamayacaktır (39).

Gerçekte RT-PZR testleri, uzun sonuçlanma süreleri, yoğun uğraş-özel ekipman-tecrübeli personel gerektirmesi, pahalı olması ve kontaminasyon riski gibi çok sayıda kısıtlamalara sahiptir. Metodolojik nedenlerinin yanı sıra etken ve enfeksiyonun patogeneze bağlı olarak da negatif sonuçlar alınmaktadır. Örnekteki materyalin niteliği, enfeksiyonun erken ya da geç döneminde örnek alınması, örneğin uygunsuz transportu ya da testin doğasından kaynaklanan teknik nedenler (örn; virus mutasyonu, testte inhibisyon) testin sonucunu etkilemektedir (31). Alt solunum yolu enfeksiyonu ile izole edilen hastalarda başlangıçta negatif ya da zayıf pozitif bulunan PCR testleri ile, sonraki testlerde pozitif sonuç alındığı gösterilmiştir (40).

Çeşitli çalışmalarda asemptomatik hastaların virusu yayabileceği ve PZR testi ile pozitif sonuç alındığı gösterilmiştir. Ayrıca klinik semptom ve radyolojik bulguları olmayan, 2 negatif PCR test sonucu ile taburcu ya da karantinadan çıkarılan hastalarda 5-13 gün sonra PZR testinde pozitiflik saptandığı rapor edilmiştir (41).

Küçük prospektif bir çalışmada, farklı örneklerde viral yük araştırmaları yapılmış, semptomatik ve asemptomatik hastalarda benzer düzeyde bulunmuştur (42). Başka bir çalışmada boğaz sürüntüsü ve balgam örneklerinde semptomlar başladıktan sonra 5-6. günlerde viral yükte 10^4 - 10^7 kopya/ml düzeylerinde pik gösterilmiş ve erken ve ilerleyici evrelerde iyileşme dönemine göre daha yüksek seyrettiği belirlenmiştir (43). Viral yükün hastalığın ciddiyeti ve prognozu açısından belirleyiciliği henüz net olmamakla birlikte yüksek viral yüke sahip hastaların bulaştırıcılık oranlarının da yüksek olacağı kuvvetle muhtemeldir.

SARS CoV-2 RNA için yüksek derecede spesifik ve diğer koronavirüslerle çapraz reaksiyon oluşturmayan bir RT-

PZR testi Ocak 2020 ikinci yarısında Tib-Molbiol tarafından geliştirilmiştir. Bu test virus RNA'sını E ve RdRp genleri aracılığı ile saptamaktadır. E geni ilk taramada kullanılırken RdRp geni doğrulamada kullanılmıştır (44). Diğer bir yaklaşımda virusun ORF1b ve N bölgeleri tek basamaklı RT-PZR yöntemi ile 1 saat 15 dakikada saptanmaktadır. Bu yöntemde N geni taramada, ORF1b ise etkenin doğrulanmasında kullanılmıştır. Ancak bu test SARS CoV ve diğer yakın ilişkili viruslar ile de pozitif sonuç verebildiğinden araştırmacılar pozitif sonuçların dizi analizi ile ayırt edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (45).

RT-PCR testinin dışında izotermal çoğaltma olarak isimlendirilen yöntemi kullanan nükleik asit testleri de geliştirilmektedir. Bunlardan en dikkat çekici olanlarından Xpert[®] Xpress SARS CoV-2 (Cepheid, ABD), 45 dakikada sonuç verebilen tezgah üstü bir sistemdir. Hızlı ve otomatize hasta başı uygulanan bu moleküler test ile SARS CoV-2 virusu nazofarengeal sürüntü, yıkama ya da aspirat örneklerinde kalitatif olarak saptanabilmektedir (46). Diğer bir izotermal nükleik asit amplifikasyon teknolojisini kullanan moleküler hızlı tanı testi olan Abbott ID Now COVID-19 testi ile yalnızca 5 dakikada sonuç alınabilmektedir. Bu test hastane, klinik, muayenehane ya da salgın merkezleri gibi herhangi bir lokalizasyonda kullanılabilir. Küçük bir tost makinesi büyüklüğünde taşınabilen bir sistem olan bu test ile RdRp geni boğaz, nazal, nazofarengeal ve orofarengeal örneklerde saptanmaktadır. Bu tekniği kullanan testler tek bir ısıda çalışır ve özel laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç duymadan PCR testlerine eşdeğer bir analitik duyarlılık sağlar (47).

4. Serolojik testler

Bu başlık altında hızlı antijen testleri ve antikor testleri değerlendirilmektedir. Hızlı antijen testleri teorikte hızlı sonuç verme ve düşük maliyet gibi avantajlara sahip olmakla birlikte, duyarlılık sorunu nedeniyle güven sorunu göstermektedir. SARS CoV-2 için lateral akım, antijen saptama geliştirme aşamasında olan bir hasta başı test yaklaşımıdır. Bir ticari lateral akım testinde kağıt benzeri bir membran şerit üzerinde iki ince şerit bulunmaktadır. Bunlardan biri altın nanopartikül-antikor konjugat, diğeri ise yakalayıcı antikorlar ile kaplanmıştır. Hasta örneği membran üzerindeki bölgeye aktarıldıktan sonra kapiller akımla hareket eder. Eğer örnekte spesifik antijen varsa ilk şerit üzerindeki konjugat antikor ile bağlanır ve membran üzerinde birlikte hareket ederler, ardından bu kompleks ikinci şerit üzerindeki yakalayıcı antikor tarafından tutulur ve renkli sonuç bandı oluşur. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü IgM için %57 ve %69, IgG için %81 ve %100 olarak değerlendirilmiştir (48).

SARS CoV-2 için monoklonal antikorlar henüz hazırlık aşamasındadır. Bu yöntemlerin tanıda kullanılabilmesi için antijeni konsantre edebilecek ya da saptama fazını arttıracak yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Viral titrelerin en yüksek olduğu dönemlerde örnek alınması ile de hızlı antijen testlerinin tanısal duyarlılığında iyileşme sağlanabileceği düşünülmektedir (49, 50).

Serolojik testler hali hazırda klinik araştırmalarda güvenilirliği kanıtlanmış ticari reaktiflerin yetersizliğinden dolayı insan koronaviruslarının rutin tanısında yer almamaktadır. Diğer yandan bu testlerin yeni ortaya çıkan koronavirusların epidemiyolojisini anlamamız açısından büyük önemi vardır (51, 52).

Enfekte hastalarda antikor cevabı konağa bağlıdır ve zaman alabilir. Serolojik testler ile IgM, IgA, IgG ya da total antikorlar (tipik olarak kan örneklerinde) gösterilmektedir. Hastaların çoğunda antikor cevabının virusla karşılaşma sonrası 7-11. günlerde geliştiği gösterilmekle birlikte bu süre daha da uzun olabilmektedir. Bu nedenle akut enfeksiyon tanısında antikor testleri faydalı olamamaktadır. Ayrıca iyileşen hastalarda gelişen immünitenin süresi ve sonraki enfeksiyonlara karşı koruyuculuğu da bilinmemektedir. Antikor testleri;

1. Temaslı izlenmesi durumunda (ki RNA saptayan testlerde bu durumda kullanılmaktadır),
2. Lokal, bölgesel, ulusal düzeyde surveyans amacıyla,
3. Virusla karşılaşmış ve eğer koruyucu immünite varsa bağışıklığın gösterilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Koruyucu immünitenin var olduğu düşünülürse serolojik bilgiler, özellikle sağlık çalışanları gibi etkenle tekrar karşılaşma olasılığı yüksek olan meslek gruplarında işe dönüş kararının verilmesinde önemli rol oynayacaktır. Serolojik testler aynı zamanda vaka ölüm oranının belirlenmesi gibi istatistiksel araştırmalarda, yeni geliştirilen PZR testlerinin duyarlılığının belirlenmesinde ve PZR negatif şüpheli hastaların tanısında kullanılabilir (31).

Tanısal olarak antikor dinamikleri ile ilgili şu anki bilgilerimizin çoğu SARS-CoV ile yapılan daha önceki çalışmalara dayanmaktadır. Dolayısı ile antikor üretim sürecinin de benzer olacağı varsayılmaktadır (53).

SARS CoV salgını döneminde IFA, ELISA, Western Blot yöntemlerini içeren farklı serolojik testler geliştirilmiştir. IFA testinde virusla enfekte edilmiş Afrikan yeşil maymun böbrek hücreleri, ELISA yönteminde ise enfekte hücrelerin ekstrakt ya da süpernatantları kullanılmıştır. Her iki yöntem esaslı testler yüksek duyarlılık (%85-100) göstermekle birlikte özgüllükleri düşük kalmıştır. Diğer CoV enfeksiyonlarına bağlı çapraz reaksiyonlar ve otoantikorlar nedeni ile yalancı pozitif sonuçlar gözlenmiştir (54). Sonrasında geliştirilen rekombinant antijenler ile yöntem standardizasyonları sağlanmıştır (55). Virusun N proteininin tam sekans analizine göre SARS CoV N proteini alfa koronavirüsler ile %25-29, beta koronavirüsler ile %33-47 benzerlik göstermektedir. Bu oranlar S proteini için sırasıyla %23-25 ve %29 olarak belirlenmiştir (56).

Walls ve ark. (56), SARS CoV tarafından türetilmiş poliklonal antikorların SARS CoV-2'nin hücre içine girişini önleyerek nötralizasyon oluşturduğunu göstermişlerdir. SARS CoV ve SARS CoV-2 S domainleri %75 aminoasit dizisi paylaşımından dolayı, SARS CoV antikorlarının yeni ortaya çıkan SARS CoV-2 virusu üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Okba ve ark.(57) RdRP, N ve S1 antijenlerini farklı in-house ve ticari testleri kullanarak değerlendirmişlerdir. Spike protein antijenleri arasında S1, SARS CoV-2 antikolarını saptamada S' ye göre daha özgül bulunurken, N proteini S1' e göre daha yüksek duyarlılık göstermiştir. Gerçekte serolojik testlerde viral antijenlerle karşılaştırıldıklarında rekombinant proteinler standardizasyon sağlamaları ve daha düşük düzeyde çapraz reaktivite oluşturmaları nedeni ile tercih edilmektedir (57).

Zhao ve ark. (58), doğrulanmış SARS CoV-2 hastalarında serokonversiyonu total (IgA/IgG/IgM), IgM ve IgG antikoları ile sırasıyla %93.1, %82.7 ve %64.7 oranlarında ve 11, 12 ve 14. günlerde saptamışlardır. Diğer bir önemli bulgu olarak nükleik asit testleri ve serolojik testlerin birlikte kullanımının tanısallıkta belirgin bir artış oluşturduğunu öne sürmüşlerdir .

Guo ve ark. (59), 82 doğrulanmış ve 58 muhtemel COVID-19 olgusunu (RT-PZR negatif fakat tipik klinik belirtileri olan) erken humoral cevapyönünden ELISA yöntemi ile değerlendirdiklerinde, IgM ve IgA antikor düzeylerinin ikisinde de 8-14. günler arasında artış gösterilirken, IgG düzeyleri 8-14.günlerde artışa başlayıp 15.güne kadar devam etmiş ve 21. günde plato oluşturmuştur. Araştırmacılar aynı zamanda IgM ile nükleik asit testini birlikte çalışıp tek RT-PZR testi ile karşılaştırdıklarında pozitif saptama oranında önemli düzeyde artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Luo ve arkadaşları karşılaşma sonrası ve semptomlar başladıktan sonraki dönemlerde serokonversiyonu üç farklı yöntemle (ELISA, lateral akım immünoassay-'LFIA', kemilüminesan immünoassay 'CLIA') araştırmışlar; IgM ve IgG antikoları için ortalama serokonversiyon süresini karşılaşma sonrası 18-20. günler, semptomlar başladıktan sonra ise 10-12.gün olarak göstermişlerdir. Antikor düzeyleri 6.gün sonrası hızla artarken beraberinde viral yükte azalma gözlemişlerdir (60).

SARS CoV-2 antikolarının tanısallık performansını değerlendiren önemli çalışmalar olmakla birlikte, bazı kısıtlamalar da söz konusudur. Örneğin, gerçekte hastanın ne zaman enfekte olduğu ya da örnek alımından ne kadar süre öncesinde semptomatik olduğu ile ilgili belirsizlikler görülmektedir. Bununla birlikte pandemi döneminde gerçek bulaş zamanının saptanmasının zorluğu da göz ardı edilmemelidir (53).

Çalışmalarda dikkat çekici nokta izole IgM antikor pozitifliğinin çok düşük oranda saptanmış olmasıdır. Bu durum düşük antikor düzeylerine ya da antikorun kısa süreli bulunmasına bağlı olabilir. Serolojik testlerin kullanımı ile hastalığın seyri boyunca farklı immünooglobulin izotiplerinin kinetikleri hakkında daha fazla bilgi edinilebilecektir. Ardından antikoların ortaya çıkış zamanları, titreleri ve hastalığın şiddeti gibi klinik özellikler arasında korelasyon olup olmadığı belirlenebilecektir. Bu nedenle kantitatif antikor testlerinin (ELISA, CLIA) kalitatif testlere (kromatografik immünoassay) tercih edilmesi daha faydalı olacaktır. Ayrıca bu konuda çok az bilgi olmakla birlikte, tanı dışında klinisyenlere prognozun değerlendirilmesi açısından da faydalı olabileceği öngörülebilir (53, 61).

Amerika Mikrobiyoloji Topluluğu'nun 23 Mart 2020 tarihli uluslararası COVID-19 toplantı raporunda antikor testlerinin temaslı izlemi, yerel, bölgesel, ülke çapında serolojik surveyans, virüsle enfekte olup başışıklık kazananları saptamada, tedavi veya profilaksi için kullanılabilecek nötralizan antikoların temin edilmesi için kaynakları belirlemede ve viral RNA testi negatif şüphelilerde tanı amacıyla kullanılabileceği ifade edilmiştir (31).

COVID-19 etkeninin global yayılımının önüne geçebilecek en önemli uygulama virüsle enfekte kişilerin doğru tanısının erken dönemde yapılmasına dayanmaktadır. Bununla birlikte RT-PZR temelli testler hala bazı enfekte olguları kaçırabilmektedir. Ayrıca bu testlerin özel alt yapısı olan laboratuvarlarda uygulanması gereklidir. Hızlı ve otomatize testler RT-PZR testinin yanı sıra tamamlayıcı yöntemler olarak kullanılabilir (62). Ancak öncesinde bu testlerin klinik performansları ciddi olarak değerlendirilmelidir. Bu durumda bir an önce referans çalışmalar ve rehberler oluşturularak, devam eden bilimsel ve politik çatışmaların önüne geçilmesi hedef olmalıdır. Ayrıca toplum taraması, epidemiyolojik çalışmalar ve yeni salgınların izolasyonu için de kitlerin güvenilirlik kriterlerinin (duyarlılık, özgüllük, doğruluk, kesinlik) göz ardı edilmeden, örneğin; CE (*Conformite Europeenne*) sertifikasyonu gibi kalite şartlarının oluşturulması gereklidir.

SONUÇ

Aralık 2019 tarihinden bu yana hem ülkemiz hem de dünya gündemini yoğun bir şekilde meşgul eden ve ne kadar süreyle meşgul edeceği de bilinmeyen SARS-CoV-2'nin tedavisi ve aşı çalışmaları için viral genomun ve replikasyon aşamalarının tam olarak anlaşılması önem arz etmektedir. Yine tedavi sürecinde önemli bir belirteç olan mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin net olarak belirlenmesi ve hastalığın farklı evrelerinde farklı mikrobiyolojik tanı yöntemlerinin kullanılmasıyla ilgili çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. 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. *Nature Microbiology* 2020;5:536–44.
2. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
3. Cui J, Li F, Daszak P. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Genet* 2018; 17: 181–92.
4. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai A C K, Zhou J et al. Epidemiology, genetic recombination, and Pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol* 2016; 24:490–502.
5. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348: 1953–66.
6. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361:1319–25.

7. 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; 367:1814–20.
8. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2013;13:752–61.
9. Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome - coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr* 2020;63:119-24.
10. 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; 579:270-3.
11. 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;382:727–33.
12. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Commentary Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* 2020;27:325-8.
13. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)* 2020;133:1015-24.
14. Chan JF, Yuan S, Kok KH, To KK, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 2020;395:514-23.
15. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses* 2019;11:59.
16. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:181–92.
17. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol* 2020; 92: 418-23.
18. Hasoksuz M, Sreevatson S, Cho KO, Hoet AE, Saif LJ. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. *Virus Res* 2002; 84: 101-9.
19. Hasoksuz M, Lathrop S, Al-dubaib MA, Lewis P, Saif LJ. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1999;144: 2441-7.
20. Bosch BJ, Van Der Zee R, De Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol* 2003;77:8801-11.
21. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue Distribution of ACE2 Protein, the Functional Receptor for SARS Coronavirus. A First Step in Understanding SARS Pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631-7.
22. Neuman B, Kiss G, Kunding A, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Boil* 2010;174:11–22.
23. DeDiego ML, Álvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E Gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* 2006; 81:1701–13.
24. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In *Therapeutic Antibodies*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany 2015;1282:1–23.
25. Cui L, Wang H, Ji Y, Yang J, Xu S, Huang X, et al. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *J Virol* 2015; 89: 9029–43.
26. Liu YC, Kuo RL, Shih SR. COVID-19: the First Documented Coronavirus Pandemic in History. *Biomed J* 2020;S2319-4170(20)30044-5.
27. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. 19 March 2020.
28. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections-the state of the art. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9:747-56.
29. Kaye M, Druce J, Tran T, Kosteci R, Chibo D, Morris J, et al. SARS associated coronavirus replication in cell lines. *Emerg Infect Dis* 2006;12:128-33.
30. www.cdc.gov May 5, 2020. SARS CoV-2 viral culture at CDC.
31. Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of diagnostic testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *American Society for Microbiology* 2020;11: e00722-20.
32. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS CoV-2. *Gene Reports* 2020;19:100682.
33. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The disease and tools for detection. *ACS Nano* 2020;14:3822-35.
34. Sheridan C. Coronavirus and the race to distribute reliable diagnostics. *Nat Biotechnol* 2020;38:382-4.
35. Miller S, Chiu C, Rodino KG, Miller MB. Point-counterpoint should we be performing metagenomic next-generation sequencing for infectious disease diagnosis in the clinical laboratory? *J Clin Microbiol* 2020; 58:e01739-19.
36. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR. Pitfalls and potential. *BioTechniques* 1999; 26:112-22.
37. Corman V, Bleicker T, Brünink S, Zambon M. Diagnostics detection of Wuhan Coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. WHO: Geneva 2020.
38. CDC-2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel, Division of Viral Disease, U.S. Centers for Disease Control and Prevention: Atlanta GA, 2020.
39. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: Interim guidance, World Health Organization 2 March 2020.
40. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, Kanjilal S, Quach C, Libman M, et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related Coronavirus-2. *Ann Intern Med* 2020;172:726-34.
41. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. *JAMA* 2020;323:1502-3.
42. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hang Z, et al. SARS CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Eng J Med* 2020;382:1177-9.
43. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020; 20:411-12.
44. 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; 25:2000045.
45. Chu DK, Pan Y, Cheng SM, Hui KP, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem* 2020;66:549-55.

46. Xpert[®]press SARS-CoV-2. <https://www.cepheid.com/coronavirus>.
47. Abbott launches molecular point-of-care test to detect novel coronavirus in as little as five minutes. <https://abbott.mediaroom.com/2020-03-27>.
48. Xiang J, Yan M, Hongze L, Ting L, Chenyao L, Shueng H, et al. Evaluation of enzyme-linked immunoassay and colloidal gold- immunochromatographic assay kit for detection of novel coronavirus (SARS-Cov-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19). medRxiv doi.org/10.1101/2020.02.27.20028787
49. Bruning AHL, Aatola H, Toivola H, Ikonen N, Savolainen-Kopra C, Blomquist S, et al. Rapid detection and monitoring of human coronavirus infections. *New Microbes New Infect* 2018; 24:52-5.
50. Sheridan C. Fast portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol* 2020; 38:515-8.
51. Chan CM, Tse H, Wong SS, Woo PCY, Lau SKP, Chen L, et al. Examination of seroprevalence of coronavirus HKU1 infection with S protein-based ELISA and neutralization assay against viral spike pseudotyped virus. *J Clin Virol* 2009; 45:54-60.
52. Shao X, Guo X, Esper F, Weibel C, Kahn JS. Seroepidemiology of group I human coronaviruses in children. *J Clin Virol* 2007; 40:207-13.
53. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological assays for SARS-CoV2 infectious disease:Benefits, limitations and perspectives. *IMAJ* 2020; 22:203-10.
54. Che XY, Qiu LW, Liao ZY, Wang YD, Wen K, Pan YX, et al. Antigenic cross-reactivity between severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus and human coronaviruses 229E and OC43. *J Infect Dis* 2005;191:2033-7.
55. Carattoli A, Di Bonito P, Grasso F, Giorgi C, Blasi F, Niedrig M, et al. Recombinant protein-based ELISA and immuno-cytochemical assay for the diagnosis of SARS. *J Med Virol* 2005; 76:137-42.
56. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, MacGuire AT, Veerler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 2020 Apr 16;181:281-92.e6.
57. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, Lamers MM, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *Emerg Infect Dis* 2020;26. doi: 10.3201/eid2607.200841.
58. 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;ciaa344. doi: 10.1093/cid/ciaa344.
59. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020;pii: ciaa310. doi: 10.1093/cid/ciaa310.
60. Lou B, Li T, Zheng S, Su Y, Li Z, Liu W, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. *Eur Respir J* 2020;2000763. doi: 10.1183/13993003.00763-2020.
61. Jin Y, Wang M, Zuo Z, Fan C, Ye F, Cai Z, et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. *Int J Infect Dis* 2020; 94:49-52.
62. Yang T, Wang YC, Shen CF, Cheng CM. Point of care RNA based diagnostic device for COVID-19. *Diagnostics* 2020;10:165.