

YENİ KORONAVİRÜS (COVID-19) SALGINIYLA MÜCADELEDE MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ÇALIŞMALARI

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC STUDIES IN COMBATING THE NEW CORONAVIRUS (COVID-19) OUTBREAK

Pervin Elvan TOKGÜN¹ , Sude DEDEOĞLU² , Ayşe Gaye TOMATIR³ 

¹Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

²Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Denizli, Türkiye

³Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

ORCID ID: P.E.T. 0000-0001-9025-4140; S.D. 0000-0002-6684-2599; A.G.T. 0000-0001-9251-9632

Atf/Citation: Tokgun PE, Dedeoglu S, Tomatir AG. Yeni koronavirüs (covid-19) salgınıyla mücadelede moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022;5(1):41-49. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-946582>

ÖZ

İnsandan insana bulaşan ve Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromuna (SARS) neden olan yeni tip koronavirüs (SARS-CoV-2) 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmıştır. Damlacıklar yoluyla insandan insana bulaşan koronavirüsün kesin tanısı PZR tabanlı testler ile verilmektedir. COVID-19 pandemisinin devam etmesi SARS-CoV-2 'ye karşı etkili bir aşı geliştirmenin gerekliliği ortaya çıkmıştır. COVID-19'a karşı geliştirilen aşilar inaktive edilmiş / canlı virüs aşiları, rekombinant protein aşiları / vektörlü aşilar ve RNA/ DNA aşiları olarak sınıflandırılabilir. Bu derlemede SARS-CoV-2 virüsünün moleküler yapısı ve genetik özellikleri, laboratuvar teşhis metotları, potansiyel terapötik ilaçlar ve aşı çalışmaları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: SARS-COV-2, Moleküler genetik yöntemler, COVID-19 tedavisi, Aşı çalışmaları

ABSTRACT

The new type of coronavirus (SARS-CoV-2), which is transmitted from person to person and causes Severe Acute Respiratory Distress Syndrome (SARS), emerged in Wuhan, China in December 2019. The definitive diagnosis of the coronavirus, which is transmitted from person to person through droplets, is given through PCR-based tests. The continuation of the COVID-19 pandemic has made it necessary to develop an effective vaccine against SARS-CoV-2. Vaccines developed against COVID-19 can be classified as inactivated/live virus vaccines, recombinant protein vaccines/ vectored vaccines or RNA/DNA vaccines. This review aims to give information about the molecular structure and genetic features of SARS-CoV-2 virus, laboratory diagnostic methods, potential therapeutic drugs and vaccine studies.

Keywords: SARS-COV-2, Molecular genetics methods, COVID-19 treatment, Vaccine strategies

GİRİŞ

İnsandan insana bulaşan ve Ağır Akut Solunum Yetmezliği Sendromuna (SARS) neden olan yeni tip koronavirüs (SARS-CoV-2) 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmıştır. SARS-CoV, MERS-CoV ve COVID-19 için birincil rezervuar yarasalar denilse de SARS-CoV Çin'deki Misk kedilerinden, MERS-CoV'nin, Orta Doğu'daki develerden, COVID-19'un ise pangolinlerden bulaşmış olabileceği ihtimali çıkmıştır. SARS-CoV-2 virüsü 2002 yılında ortaya çıkan SARS-CoV ile ~%79,5, %96 oranında yarasa *koronavirüs* (BatCoV) RaTG13 ve 2012'de ortaya çıkan MERS-CoV ile yaklaşık %51,8 genomik benzerlik görülmüştür

(1). Salgına neden olan bu üç virüs insanlarda enfeksiyona neden olan Beta koronavirüs cinsine aittir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), koronavirüsün reseptörüdür ve virüsün insan hücrelerine girişi bu reseptör ile gerçekleşir. Virüsün insandan insana damlacıklar yoluyla yayıldığı, doğrudan temas ve dışkı-ağız yolu gibi diğer olası bulaşma yolları ile bulaştığı görülmüştür. COVID-19 semptomu gözlenen olası vakaların pozitiflik durumunun analizi için solunum yolu numunelerinden kantitatif RT-PZR tabanlı analizler önerilmiştir (2). Tüm dünyada uygun tedavi seçenekleri arayışına girilmiştir ve virüsün yayılmasını önlemek için güvenilir ve hızlı tanı testleri oluşturulmuştur. Bu derleme ile SARS-CoV-2 virüsünün moleküler yapısı ve genetik

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Pervin Elvan TOKGÜN E-mail: parslan@pau.edu.tr

Başvuru/Submitted: 01.06.2021 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 11.08.2021 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 27.08.2021 •

Kabul/Accepted: 02.09.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 20.01.2022



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

özellikleri, laboratuvar teşhis metotları, potansiyel terapötik ilaçlar ve aşı çalışmaları hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

KLİNİK VE ARAŞTIRMA ETKİLERİ

1.COVID-19'UN MOLEKÜLER YAPISI

COVID-19 SARS-CoV ve MERS-CoV gibi koronavirüs ailesinden olan ve akut solunum yetmezliği sendromuna neden olan zarflı bir RNA virüsüdür. Bu virüsün bulaşma yolunun SARS-CoV ve MERS-CoV'da olduğu gibi zoonotik enfeksiyon olduğu düşünülmektedir (1). Virüsün sadece Çin'de değil diğer Asya ülkeleri ile Avrupa ve Amerika kıtasında insandan insana bulaşarak yayıldığı görülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 30 Ocak 2020 tarihinde COVID-19'u "uluslararası endişe verici bir halk sağlığı acil durumu"; 11 Mart 2020'de salgını küresel bir pandemi olarak ilan etmiştir (3).

1.1.Koronavirüs Sınıflandırılması

Koronavirüsler, *Nidovirales* takımı *coronaviridae* ailesinin *orthocoronavirinae* alt grubu içinde yer almaktadır. Orthocoronavirinae alt ailesi dört cins içermektedir ve cinsler altında da Alfakoronavirüs (a-CoV), Betakoronavirüs (b-CoV), Deltakoronavirüs (d-CoV) ve Gamakoronavirüs (g-CoV) alt-cinsleri yer almaktadır. Bunların arasında sadece alfacoV ve betaCoV'un insanları enfekte ettiği gösterilmiştir (4, 5).

1.2.Koronavirüslerin Orijini

İnsanların Betakoronavirüs'le ilk kez Kasım 2002'de Güney Çin Guangdong eyaletinde karşılaşmışlardır. SARS olarak adlandırılan bu enfeksiyon Haziran 2003'e kadar sürmüştür. Virüsün doğal konağı Asya Misk kedileri olsa da COVID-19'a benzer bir şekilde canlı hayvan pazarında yarasadan bulaştığı ortaya konmuştur (6). Suudi Arabistan'da 2012 yılında tek hörgüçlü devenin insana bulaştığı tespit edilen Koronavirüs, MERS hastalığına sebep olup salgın 2016 yılına kadar devam etmiştir (7).

Enfekte olan insanlardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvısı örneklerinde, SARS-Cov-2'nin tüm genomu Sanger dizileme, Illumina ve Nanopore yeni nesil sekanslama tekniklerinin kombinasyonu ile tespit edilip üç farklı suş tanımlanmıştır ve betakoronavirüs 2b soyunda yer aldığı saptanmıştır (8).

1.3 SARS-CoV-2 Genomik Özellikler

SARS-CoV-2 60-100 nm çapında, yuvarlak veya oval şekilli tipik bir koronavirüs yapısındadır ve tüm genomu 29891 ila 29903 nükleotid uzunluğundadır. Genomun 5' ucunda Orf1ab poliproteinleri yer almakla birlikte, 3'ucunun üçte biri S, E, M ve N proteinleri kodlayan genleri içermektedir. SARS-CoV-2 genomu 6 yardımcı proteine (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b ve ORF8 genleri tarafından kodlanan) sahiptir (9).

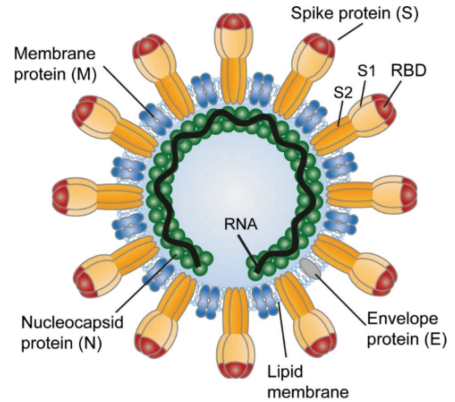
Sars-COV-2'nin fizikokimyasal özellikleri SARS-CoV ve MERS-CoV'a benzemektedir. 56 °C 30 dakika tutularak veya UV ile inaktive edilebilmekle olup çoğu dezenfektanlara (dietyl eter, %75 etanol, klor, perasetik asit ve kloroform, vb) duyarlıdır (10). SARS-CoV-2'nin RNA genomu, 4 yapısal protein (Spike (S) proteini, Membran proteini (M), Zar proteini (E) ve Nükleokapsid (N)) ile birlikte 29 proteini kodlamaktadır (11) (Şekil 1).

Bunların yanında bilinmeyen genleri kodlayan ORF (replicase open reading frame)leri de içermektedir. Yapısal proteinlerinin tümü viral genomun 3' ucundan kodlanmaktadır. En çok bilinen örneği insanlarda ACE-2 reseptörüne bağlanan, virionun dışında bulunup onlara tipik şeklini veren S glikoproteinidir. S proteinleri homotrimerler oluşturarak taç şeklindeki morfolojilerinin oluşumunu sağlarlar. 150 kDa molekül ağırlığındadır; N-terminal ve (Spike HR2 domain) ve C-terminal alt ünitesi (Spike transmembrane domain-S2) olmak üzere iki alt polipeptid birimi vardır. S1 alt birimi ile S proteininin reseptör bağlanma alanını oluştururken, S2 alt birimi spike proteininin sap kısmını oluşturur. S glikoproteini virüsün enfeksiyonunda anahtar rol oynayan bir proteazdır (1).

En çok bulunan yapısal protein olan membran proteini (M) viral zarfa şekil verir ve molekül ağırlığı 25-40 kDa'dır. M glikoproteini golgi aygıtında glikolize edilmekle birlikte 3 tane transmembran bölgeyi barındırmaktadır. Görevi, virüsün hücreye füzyonunu takiben konakçı hücre içerisine girişi ve hücresel süreçlerde etkileşimine yardımcı olmaktır (1).

Ana yapısal proteinlerin en küçüğü olan E proteini ~8-12 kDa molekül ağırlığında ve 76 ile 109 aminoasit uzunluğundadır ve viral bağlanma ve tomurcuklanmada önemlidir. Virüste E proteininin bulunmaması konakta viral yükün daha düşük olduğunu göstermiştir (12).

Nükleokapsid (N) proteini, heliks ve esnek yapıda viral genomik RNA'ya bağlanan tek fosfoprotein N proteindir. N proteini virionun yapısında, koronavirüslerin replikasyonu ve transkripsiyonunda oldukça önemlidir. Bu protein koronavirüslerin hem replikasyon/transkripsiyon bölgesinde hem de virüsün toplandığı ERGIC bölgesinde lokalizedir (1).



Şekil 1: Koronavirüsün yapısal organizasyonu (11)

Hayvandan insana geçişin temeli enfekte bir hayvanın yenmesidir, daha sonra enfekte olan bireylerle yakın temasla sağlıklı bireyler de enfekte olmaktadır. Hastalık temel olarak damlacık ve solunum yoluyla bulaşır. S proteini aracılığıyla konak hücre yüzeyinde bulunan ACE-2 reseptörüne bağlanan virion hücre içerisine geçerek RNA'sını sitoplazmaya bırakır. Sonrasında öncelikle iki tane viral replikaz poliproteini sentezlenir. Bu iki poliprotein proteazlar aracılığıyla 16 tane yapısal olmayan proteine (Nsp1-

16) dönüştürülür ve nsp'ler çift zarlı kesecikleri ile replikasyon ve transkripsiyon kompleksini oluştururlar. Yeni oluşturulan bu yapısal proteinler ve genomik RNA endoplazmik retikulum, Golgi ara kompartmanında (ERGIC) bir araya gelerek yeni virionlar oluşur ve ekzozomları kullanarak hücre dışına çıkarlar (1).

1.4. COVID-19'un Genomik Varyasyonları

Hastalardan elde edilen suşlara ait verilerin %99,98 benzer olduğu ve çok fazla varyasyon olmadığını göstermektedir. SARS-CoV-2 ile ilişkili 103 genoma ait analizler sonucunda iki ana L ve S tipi belirlenmiş olup bunlardan L tipinin daha agresif ve daha hızlı yayıldığı, S tipinin ise aksine daha hafif olduğu bildirilmiştir. Ancak Koronavirüsün bir RNA virüsü olmasından dolayı kolay mutasyonel değişikliğe açık olduğu göz önüne alınmalıdır (13).

2.COVID-19 TANI TESTLERİ

Salgına neden olan COVID-19 virüsünün daha fazla yayılmasını önlemek ve vakalardaki mutasyon durumunu tanımlayabilmek için hassas ve spesifik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde viral hastalıkların tanısında serolojik ve moleküler testler kullanılmaktadır. Fakat sonuçların güvenilirliği için serolojik yanıtın ve hastalığın evresinin göz önünde bulundurulması ve ona uygun testler yapılması gerekmektedir. Bunun yanı sıra numune alınımı sırasında kişisel koruyucu ekipmanların (N95 maske, gözlük, yüz koruyucu) kullanılması ve uygulamayı yapacak kişinin daha önceden koruyucu ekipman kullanımı, numune alınımı, numunenin uygun koşullarda saklanması gibi konularda uzman kişilerden eğitim alması önem arz etmektedir.

Tanı testlerini gerçekleştirebilmek için numune alımı aşamasında virüs ile enfekte kişiden öncelikle orofaringeal sürüntü alınması sonrasında ise aynı swab kullanılarak nazofaringeal sürüntü alınması akabinde ise bu örneklerin aynı viral besi taşıma yerine konulması gerekmektedir. Numune alınımında kullanılacak ekipmanın doğru seçimi de oldukça önemlidir. Kalsiyum aljinat, ahşap veya pamuk içeren çubuklar polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) inhibe edebileceğinden dolayı bunlar yerine alüminyum ve plastik olanları tercih edilmektedir. Daha ağır solunum yolu hastalığı olan bireylerde balgam, endotrakeal aspirat örnekleri ve bronkoalveolar lavaj örnekleri de kullanılabilir. Ancak bu durumda bulaş riski artmaktadır. Viral RNA, hasta örneklerinden Nükleik Asit Pürifikasyon kitleri kullanılarak, hücre kültürü üst fazlarından ise viral RNA mini kiti ile izole edilebilir ve elde edilen viral RNA'lar -80°C'de saklanabilir (4, 9).

COVID-19 tanısında kullanılan testleri moleküler testler, serolojik testler ve radyografik testler olarak sınıflandırılmaktadır. Bu metodların karşılaştırmaları Tablo 1'de maddeler halinde ayrıntılı şekilde verilmiştir.

2.1.Moleküler Testler

COVID-19 tanısında temeli rutin PZR tabanlı metodlar ve viral genomun tespitine yönelik yeni nesil dizileme metodları oluşturmaktadır.

2.1.1.Konvansiyonel PZR

Viral RNA örneklerinde COVID-19 mutasyonunun saptanma-

sında PZR rutin ve güvenilir haline gelen bir tekniktir. Virüsün nükleik asit amplifikasyonu ile moleküler tanı olası hale gelmektedir. Koronavirüslerin saptanması için PZR' den sonra jel elektroforezi ve dizileme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler hem zamanlama hem de yüksek maliyetli olmaları nedeniyle dezavantaj oluşturmaktadır. Sekans verilerinin zenginleştirilmesiyle tasarlanan ve güncellenen spesifik problemler ve primerler nükleik asit amplifikasyon testini (NAAT) ideal bir tanı modu haline getirir. Bu testler, Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rRT-PZR), izotermal amplifikasyon yöntemleri ve CRISPR-Cas tabanlı tespit sistemleri ile tamamlayıcı olmaktadır (14).

2.1.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Viral RNA ilk başta, viral RNA genom dizileri için spesifik olan uygun primerler kullanılarak RNA'ya bağımlı DNA polimeraz (RdDp) kullanılarak kısa cDNA'ya çevrilir ve floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı amplifikasyon gerçekleştirilir. SARS-CoV-2 tespiti için, PZR amplifikasyonu için nükleokapsid (N), zarf (E), spike (S) genleri, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRP), ORF1ab veya ORF8 bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır, nazofaringeal ve solunum yolu örnekleriyle Gerçek Zamanlı PZR, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun kalitatif tespiti için altın standart olarak kabul edilmektedir (15). Bazı çalışmalar SARS-CoV-2 viral nükleik asidin balgam, nazofaringeal sürüntü, bronşiyal aspiratlar, bronkoalveolar lavaj sıvısı (BAL), kan, anal sürüntü ve idrar gibi numunelerde tespit edilebileceğini ileri sürmektedir (16). COVID-19 için rRT-PZR testi birkaç saat içinde sonuç vermesi, konvansiyonel PZR'de olduğu gibi jel elektroforez işlemine ihtiyaç duymaması, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Viral RNA testlerinin doğruluğu viral yükün miktarına, hastalık evresine ve virüsün çoğalma derecesine göre değişmektedir (4).

Tablo 1: COVID-19 Test Karşılaştırmaları

	Moleküler	Antijen	Antikor
Bilinen diğer adı	PZR,NAAT,YND	Hızlı	Serolojik
Numune	Nazofaringeal	Nazofaringeal	Kan
Ne test edilir?	Viral genetik materyal (RNA)	Viral proteinler	Enfeksiyona cevap olarak geliştirilen antikorlar
Test neden yapılır?	Aktif koronavirüs varlığının kesin tayini	aktif viral enfeksiyon tayini	Önceden koronavirüs geçirip/geçirilmediğinin tayini
Sonuçların kesinliği	"Altın standart" yöntem. Tekrar gerektirmez (%95 hassasiyet)	Pozitif sonuçlar doğrudur. Negatif sonuçlar için moleküler test önerilebilir	Hassasiyeti ve özgüllüğü teste göre değişkenlik gösterebilir
Süre	Birkaç gün	15-30 dakika	Aynı gün ya da 1-3 gün

2.1.3. İzotermal Amplifikasyon Teknolojileri

İzotermal amplifikasyon yöntemleri, sofistike termal döngüsel ekipman, maliyetli reaktiflere gereksinimin ortadan kalkmasına ve gerçek zamanlı PZR'dan daha kısa sürede sonuç verilmesine olanak sağlamaktadır (14).

2.1.3.1 Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

Bu yöntem bulaşıcı hastalıkların tanısında kullanılan, hızlı ve ekonomik yöntemlerden biridir. Revers transkripsiyon Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (RT-LAMP) 4-8 primer ile 60–65°C'lik sabit sıcaklıkta DNA polimeraz zincir yer değiştirme aktivitesini kullanarak DNA'yı 13–20 dakikada amplifiye edebilen hızlı nükleik asit amplifikasyon metodudur. LAMP yönteminin SARS-CoV-2 virüsünün 10 kopyasına eşdeğer sentezlenmiş RNA'yı saptayabildiğini ve klinik duyarlılığının kantitatif eş zamanlı PZR ile %97,6 oranında uyumlu olduğunu gösterilmiştir (17).

2.1.3.2.Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (RPA)

COVID-19 tespiti için Hızlı İzotermal Nükleik Asit Tespiti (FIND) olarak da adlandırılan rekombinaz polimeraz amplifikasyonuna (RPA) dayalı bir teşhis testi geliştirilmiştir. Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA), patojenlerin tespitinde yaygın olarak kullanılan, 15-20 dakika içinde sonuç verebilen, bir yöntemdir ve reaksiyonlar düşük sabit sıcaklıklarda (37-42°C) gerçekleştirilebilmektedir (18).

RPA'nın LAMP yönteminden farkı, nükleik asitleri 37°C ya da daha düşük sıcaklıklarda hızlı bir şekilde çoğaltabilmesi ve rekombinaz proteinlerini kullanmasıdır (14).

2.1.3.3. Yuvarlanan Daire Amplifikasyonu (RCA)

Yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA), hedef aracılı bir asma kilit probu (PLP) ve phi 29 , Bst DNA polimeraz ları kullanan başka bir verimli izotermal DNA amplifikasyon tanı yöntemidir. Bu yöntem, 90 dakika içinde her daire için amplifikasyon sinyallerini 10⁹ kat artırmaktadır. Femtomolar seviyedeki ultra yüksek hassasiyeti ve tek bazlı varyantları bile ayırt eden özgülüğü, onu dikkat çekici bir moleküler tanı aracı haline getirmektedir (19).

2.1.3.4. Diğer İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri

Diğer mevcut izotermal amplifikasyon teknikleri arasında nükleik asit sekansı bazlı amplifikasyon (NASBA), transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA), çoklu sarmal yer değiştirme amplifikasyonu (SDA), izotermal helikaza bağlı amplifikasyon (HDA) bulunur ve tamamı nükleik asit tespiti için kullanılabilir. Kullanımları kolaydır, ısı bloğu veya su banyosu gerektirir ve sabit sıcaklık sağlar (20). SARS-CoV-2 saptaması için, 41 ° C'de Nükleik Asit Dizisine Dayalı Amplifikasyon (NASBA) ve Yeni Nesil Dizileme teknolojileri olmak üzere iki aşamalı test yaklaşımı önerilmiştir ve INSIGHT (Isothermal NASBA-Sequencing based HIGH-throughput Test) olarak adlandırılmıştır (21).

2.1.4. CRISPR-Cas testleri

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri) ile ilişkili Cas (CRISPR Associated: CRISPR ilişkili

Genler) proteinlerinin genom düzenleme aracı olarak kullanılabilirliği söylenmiştir ve patojenleri tespit etmede, hastalığın izlenmesinde hızlı, ucuz ve ultra duyarlı bir teşhis aracı olabilir (14). SARS-CoV-2 teşhisinde önerilen CRISPR sistemleri, hedef RNA'yı tespit etmek için Cas 12, Cas-12a, Cas-13 ve Cas-9 gibi farklı Cas enzimlerinin yardımcı katalitik aktivitesini kullanmaktadır. SHERLOCK (Sherlock BioSciences, Amerika) ve DETECTR (Mammoth Biosciences, Avustralya) SARS-COV-2 için piyasada mevcut olarak bulunan CRISPR tabanlı kitlerdir.

2.1.6. Sanger Dizileme

Sanger dizileme platformu, yeni nesil dizileme yöntemlerini kullanma olanağı olmayan laboratuvarlarda dizileme işlemi gerçekleştirmek için iyi bir alternatif yöntemdir. Bu yöntem ile COVID-19 şüphesi bulunan hastalardan toplanan nazofarengal sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2'den RNA'yı tespit etmek için tasarlanmış bir primer çifti ile SARS-CoV-2 dizileri ve bir spike-in dizisi amplifiye edilir. Yöntem, 6 saatten daha kısa süre içerisinde %99.97 hassasiyetle analize olanak sağlamaktadır (22).

2.1.7. Yeni Nesil Dizileme

Mevcut PZR testi yalnızca virüsün varlığını belirlemektedir fakat virüsün genetik dizisi, ko-enfeksiyonun varlığı veya hastanın bağışıklık yanıtı hakkında herhangi bir bilgi vermez. COVID-19 salgınının başlangıcından bu yana, dünya çapında bulaşıcı ajanların kökenlerini izlemek ve evrimini anlamak, salgınların yayılma ve bulaşma zincirlerini araştırmak ve etkili ve hızlı moleküler tanı testlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmanın yanı sıra tedavi ve aşı arayışına katkıda bulunmak için çeşitli yeni nesil dizileme (YND) tabanlı stratejiler başarıyla kullanılmıştır. SARS-CoV-2 genomlarına çeşitli yaklaşımlar ve sekanslama yöntemleri uygulanabilir. Bugüne kadar, gerçekleştirilen çalışmalarda (i) shotgun metatranskriptomiks, (ii) hibrit yakalama-zenginleştirme, (iii) amplikon dizileme ve (iv) doğrudan RNA dizileme olmak üzere farklı dört yaklaşım uygulanmıştır (23). Fakat her teknoloji ve dizileme yaklaşımının avantajları ve sınırlamaları vardır (Tablo 2). YND, SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmek, sağkalım ve epidemiyolojik araştırmalar yapmak, virüsteki mutasyonel değişiklikleri izlemek, tarafsız patojen keşfini sağlamak ve SARS-CoV-2 enfeksiyonuna potansiyel yakınlık ve cevabı analiz etmek için kullanılabilir (24).

2.2. Serolojik Testler

Serolojik testler, semptom gösteren ve semptomsuz vakaların da tanımlanabilmesine hızlı bir şekilde olanak sağlayan testlerdir. Klinik örneklerden SARS-CoV-2 'ye karşı antikorları (IgM, IgA, IgG ve total antikorları) tarayan serolojik testler (ELISA vb) moleküler testlere kıyasla daha az komplikedir. ELISA testlerinde sıklıkla hedef nükleokapsid (N) ve "Spike" (S) proteinleri hedef olarak seçilmektedir (25). Jin ve arkadaşlarının CLIA yöntemiyle yaptıkları çalışmada, Ig M duyarlılığının %48,1 özgülüğünün %100, Ig G için duyarlılığın %88,9, özgülüğünün %90,9 olarak bulmuşlardır (26). Pan ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada, 15. günden sonra IgM, IgG ve total antikor seviyelerinin en yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ilk müdahale ekibindeki IgG antikorlarının yaygınlığı araştırılmıştır ve SARS-CoV-2 IgG seroprevalansı genel topluluktan üç kat daha fazla olarak saptanmıştır (27).

Tablo 2: SARS-CoV-2 Dizileme Yaklaşımlarının Karakteristikleri

	Shotgun metatranskriptomiks	Amplikon dizileme	Hibrit yakalama-zenginleştirme	Doğrudan RNA dizileme
Hedefler	SARS-CoV-2, konak mikrobiota ve konağın enfeksiyon yanıtı	SARS-CoV-2 genomu	SARS-CoV-2 genomu	SARS-CoV-2, konak transkriptom ve epitranskriptom
Koenfeksiyon tayini	Evet	Hayır	Gen paneline bağımlı	Evet
Minimum okuma sayısı	20–50 M	5–20 M	5–20 M	0.5 M
Genom Kaplamı	≥ %99	≥%95–99	≥%95–99	≥%99
SNV tanımlamasındaki kesinlik	Yüksek	Yüksek	Orta Derece	Düşük
Gerekli viral yüklem (Ct)	<24–28	≥24–28	≥24–28	<24–28
RNA input (ng)	10–200	1–50	10–50	≥1000
Örnek tipi	Hasta numunesi	Hasta numunesi, çevresel örnekler	Hasta numunesi, çevresel örnekler	Viral hücre kültürleri

2.3.Radyografik Testler

Akciğerdeki enfeksiyonu değerlendirmek için göğüs radyografisi (CXR) ve toraks bilgisayarlı tomografi (BT) yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bilgisayarlı tomografinin PCR testi negatif olan COVID-19 hastalarında erken dönemde radyografiye göre daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir. SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile ilişkili gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda hastaların bilgisayarlı tomografilerinde (%77,8-%100) buzlu cam opasitesi saptandığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra periferik dağılım, ince retiküler opasiteler ve vasküler kalınlaşma da yaygın olarak görülmüştür. BT tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntem değildir fakat hastada akut pulmoner tromboemboli gibi patolojilerin geliştiği durumda kontrastlı BT gerekebilir (2).

3.COVID-19 Aşı Çalışmaları

Tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemisinin devam etmesi SARS-CoV-2 'ye karşı etkili bir aşı geliştirmenin gerekliliği ortaya çıkmıştır. SARS-CoV-2 salgını, hızlı eylem ve benzeri görülmemiş bir zaman diliminde aşılarda geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu sebeple SARS-CoV ve MERS-CoV için aşılardan elde edilen ilk veriler ışığında buluş aşaması atlanıp faz I / II denemelerine başlanılmış ve faz III denemeleri, faz I / II sonuçlarının ara analizinin ardından, paralel olarak gerçekleştirilen birkaç klinik araştırma ile başlatılmıştır ve geliştirilen aşı adayları içinde hem geleneksel yöntemler hem de yeni teknolojiler kullanılmaya başlanmıştır (28).

3.1. Geliştirilmekte Olan Aşı Türleri

SARS-CoV-2'ye karşı 180'den fazla aşı adayları geliştirilmektedir. Bu aşılarda inaktif edilmiş / canlı virüs aşılarda, rekombinant protein aşılarda / vektörlü aşılarda ve RNA/ DNA aşılarda sınıflandırılabilir.

3.1.1. İnaktif Aşılarda

İnaktif aşılarda, SARS-CoV-2'nin hücre kültüründe çoğaltılması ve virüsün kimyasal inaktivasyonu ile üretilir (29,30). Bu tip aşılarda virüsün tamamı bağışıklık sistemine sunulur, sadece SARS-

CoV-2'nin spike proteini değil aynı zamanda matriksi, zarfı ve nükleoproteini muhtemelen hedeflenir (28). CoronaVac bu aşı türü için bir örnektir.

3.1.2. Canlı Zayıflatılmış Aşılarda

Canlı zayıflatılmış aşılarda, virüsün sınırlı bir dereceye kadar çoğaltılarak genetik olarak zayıflatılmış bir versiyonunun oluşturulmasıyla üretilir, hiçbir hastalığa neden olmaz, ancak doğal enfeksiyon tarafından indüklenmeye benzer bağışıklık tepkileri indükler. Bu aşılarda intranasal yoldan verilebilmeleri ve ardından üst solunum yollarını koruyabilen mukozal bağışıklık tepkileri oluşturmaları önemli bir avantajdır. Bu aşı tipinde virüs aşılama bireyde kopyalandığı için, bağışıklık tepkisi olarak yapısal ve yapısal olmayan viral proteinleri antikorlar ve hücresel yol ile hedeflemesi muhtemeldir (28). Koronavirüsün mutasyon geçirmesi göz önüne alındığında COVID-19 için bu tip bir aşının geliştirilmesi zordur.

3.1.3. Rekombinant Protein Aşılarda

Rekombinant protein aşılarda rekombinant spike protein bazlı aşılarda, rekombinant RBD bazlı aşılarda ve virüs benzeri partikül (VLP) bazlı aşılarda olmak üzere 3'e ayrılır. Bu rekombinant proteinler pek çok farklı sistemlerde (böcek hücreleri, memeli hücreleri, maya ve bitkiler, Escherichia coli vb) ifade edilebilirler (31). SARS-CoV-2'ye karşı pek çok rekombinant protein aşısı adayları preklinik geliştirme aşamasındadır, birkaç spike-protein bazlı ve RBD bazlı aşılarda ile Medicago tarafından üretilen aşı adayları da dahil olmak üzere VLP tabanlı aşı adayları da klinik denemelere girmiştir (32).

3.1.4. Replikasyon-inkompetent Vektör

Bu tür aşılarda tipik olarak, spike proteinini ifade etmek üzere tasarlanmış ve genomunun parçalarının silinmesiyle in vivo replikasyondan çıkarılmış olan başka bir virüse dayalıdır. Bu yaklaşımlarda çoğu, adenovirüs (AdV) vektörlerine dayanmaktadır, ancak modifiye edilmiş aşı Ankara (MVA), insan parainfluenza virüsü vektörleri, grip virüsü, adeno ilişkili virüs ve Sendai virüsü de kullanılmaktadır (32). ChAdOx1 nCoV-19 bu aşı türü için örnektir.

3.1.4. Replikasyon-kompetent Vektör

Bu vektörler tipik olarak, bir transjeni, bu durumda spike proteini, ifade etmek üzere tasarlanmış olan zayıflatılmış virüslerden veya aşı nesillerinden türetilir. Bu yaklaşım, daha sağlam bir bağışıklık indüksiyonu ile sonuçlanabilir, çünkü vektör aşılansız bireyde bir dereceye kadar yayılır ve sıklıkla güçlü bir doğal bağışıklık tepkisini tetikler (28).

3.1.4. İnaktif Virüs Vektörleri

Şu anda geliştirilmekte olan bazı SARS-CoV-2 aşı adayları, yüzeylerinde spike proteini barındıran ancak sonrasında kullanımdan önce inaktif hale getirilen viral vektörlere dayanmaktadır (31). Bu yaklaşımın avantajı, inaktivasyon işleminin vektörleri daha güvenli hale getirmesidir. Standart viral vektörler kullanılarak, bağışıklık sistemine sunulan antijen miktarı kolaylıkla kontrol edilemez; ancak, inaktif edilmiş vektörlü aşılarla kolaylıkla standardize edilebilir (28).

3.1.5. DNA Aşıları

DNA aşıları, bakterilerden üretilen plazmid DNA'ya dayanmaktadır. Bu plazmitler, memeli ekspresyon promotörlerini ve aşılansız bireyde ifade edilen spike proteinini kodlayan geni içerir. Bu teknolojilerin en büyük avantajı, E. coli'de büyük ölçekli üretim olasılığı, plazmid DNA'nın yüksek stabilitesidir ve düşük immünojeniklik gösterir (28,32). Bu teknolojinin kullanıldığı lisanslı bir aşı bulunmamaktadır.

3.1.5. RNA Aşıları

Hem mRNA (modifikasyonlu) hem de kendini kopyalayan bir RNA kullanılabilir. Kendini kopyalayan RNA'ya kıyasla mRNA daha yüksek dozlar için gereklidir ve RNA genellikle lipid nanopartiküller (LNP'ler) aracılığıyla verilir. SARS-CoV-2'ye karşı potansiyel aşılar olarak, bir dizi RNA aşısı adayı için umut verici klinik öncesi sonuçlar yayınlanmıştır (33). Pfizer and Moderna tarafından geliştirilen aşılar örneklerdir.

Bu zamana kadar 48 aşı klinik değerlendirme altındadır. Bunlardan birkaçı immünojenite göstermiştir ve 11'i şu anda faz 3 klinik etkinlik çalışmalarında değerlendirilmektedir (34). DSÖ belgesine göre Faz 3 aşamasında olan sekiz aşı ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.2.1. COVID-10 Oxford Aşı Çalışması

ChAdOx1 nCoV-19 aşısı (AZD1222), SARS-CoV-2 yapısal yüzey glikoprotein antijen genini içeren bir şempanze adenoviral vektörü ChAdOx1'i kullanılarak geliştirilmiştir. İki dozdan sonra % 70,4'lük etkinlik ve en az bir standart dozdan sonra % 64 ± 1 koruma göstermiştir (35).

3.2.2. Cansino Biological Inc.

Ad5 adlı bir adenovirüse dayalı bir aşıdır. Faz 1 çalışması aşının sağlıklı yetişkinlerde tolere edilebildiği ve immünojenik olduğunu göstermiştir. Fakat aşının yüksek dozunun yüksek ateş, yorgunluk, dispne, eklem ve kas ağrısı gibi reaktifitelere neden olduğu bildirilmiştir. Faz 2 çalışmasında 5×10^{10} viral partikül içeren Ad5 vektörlü COVID-19 aşısının tek bir aşılama etkililiği olduğu gösterilmiştir. Faz 3 çalışması devam etmektedir (36).

3.2.3. Gam-COVID-Vac

Gam-COVID-Vac, her ikisi de SARS-CoV-2 glikoprotein S dizisinin tamamını içeren geni (rAd26-S ve rAd5-S) geni taşıyan rAd tip 26 (rAd26) ve rAd tip 5'e (rAd5)'e dayalı bir kombine vektör aşısıdır. Faz 1-2 çalışmaları sağlıklı katılımcılarda aşının iyi tolere edildiğini ve yüksek oranda immünojenik olduğunu göstermiştir. Faz 3 Gam-COVID-Vac denemesi, aşının COVID-19'a karşı % 91,6 etkili olduğunu göstermiştir (37).

3.2.4. Coronavac, Sinovac, Instituto Butantan (Sinovac, n.d.); Wuhan Institute of Biological Products/Sinopharm; Beijing Institute of Biological Products/Sinopharm

Üç aşı da Çin'de üretilen inaktif virüs aşılardır. CoronaVac, SARS-CoV-2 ile aşılansız Afrika yeşil maymun böbrek hücrelerinden geliştirilen, COVID-19'a karşı inaktif edilmiş bir aşıdır. Evre 1/2 çalışmalarının sonuçları yan etkinin düşük, immünojenitenin yüksek olduğunu, aşılama 14 gün sonra nötralize edici antikorları indüklediğini göstermiştir (38).

3.2.5. Moderna

MRNA-1273 aşısı S2 alt birimindeki merkezi sarmalın tepesinde iki prolin değişimini içerecek şekilde modifiye edilmiş SARS-CoV-2 spike glikoprotein trimeri S-2P'nin stabilize edilmiş bir versiyonunu kodlamaktadır. mRNA-1273 aşısıyla ilişkili advers olayların çoğunlukla hafif veya orta düzeyde olduğunu göstermektedir (39).

3.2.6. Biontech/Fosun Pharma/Pfizer

BNT162b1, SARS-CoV-2 spike proteininin reseptör bağlanma alanını (RBD) kodlayan, lipid nanopartikül ile formüle edilmiş nükleozid modifiye mRNA aşısıdır. LNP ve lipozomla formüle edilmiş RNA aşılarının bulaşıcı hastalıkları önlemek veya kanseri tedavi etmede güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği klinik deneylerde gösterilmiştir. Aşı uygulamasından sonra herhangi bir doz için ciddi advers olay gözlenmemiş ve güçlü, doza bağımlı- aşı ile indüklenmiş antikor cevabı görülmüştür (40).

4.COVID-19 'da Kullanılan İlaçlar

Türkiye'de ve dünyada hastanın klinik durumuna göre hidroklorokin, azitromisin, oseltamivir, lopinavir, ribavirin, ritonavir ve favipiravir kullanılmaktadır (41,42).

4.1. Klorokin ve Hidroksiklorokin

Klorokin ve hidroksiklorokin, SARS-CoV-2'nin Vero hücrelerini enfekte etme yeteneğini engellemektedir. Hücrelerin endozomal pH'ını artırır ve hücre girişi için düşük pH'a bağlı virüsleri inhibe ederler. COVID-19 hastalarını tedavi etmek için önceden kullanılan bir ilaçtır (43).

4.2. Favipiravir

Favipiravir (T-705), RNA'ya bağımlı RNA-polimeraz (RdRp) enzimi için bir substrat görevi görmekle birlikte viral protein sentezinin sona ermesine yol açar ve COVID-19 tedavisinde güncel olarak kullanılan ilaçtır (44).

4.3. Lopinavir / ritonavir

Lopinavir (LPV), HIV enfeksiyonu tedavisi ve önlenmesinde ritonavir (güçlendirici) ile kombinasyon halinde kullanılan bir

antiretroviral proteaz inhibitörüdür. LPV /r'nin ateşin daha kısa sürede düşmesi ile ilişkili olduğu, belirgin toksisite göstermediği ve çok az yan etkisi (mide bulantısı, kusma ve diyare) olduğu, ayrıca ilacın kullanımından sonra SARS-CoV-2 RNA testlerinden elde edilen bulgular ile hastaların daha kısa sürede negatif döndüğü bildirilmiştir (45).

4.4. Remdesivir

Remdesivir, COVID-19 hastalarının tedavisi için FDA onaylı tek ilaçtır ve in vitro olarak şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) dahil olmak üzere patojenik hayvan ve insan koronavirüsleri üzerinde inhibe edici etkilere sahiptir (46).

4.5. Ribavirin

Ribavirin, RNA ve DNA virüslerinin replikasyonunu engelleyen bir guanozin analogudur. Ribavirin'in kolay bulunabilirliği ve düşük maliyeti, nCoV enfeksiyonlarının tedavisini önemli ölçüde etkileme potansiyelini desteklemektedir. Fakat diğer antiviral ve interferonlarla kombine kullanımının ilacın etkinliğini artıracak yönde değerlendirmeler bulunmaktadır (47).

4.6. Oseltamivir

Oseltamivir (OTV), antiviral aktiviteye sahip sentetik bir etil ester ön ilacıdır. İnfluenza virüsüne karşı bir nöraminidaz inhibitörü görevi görür ve ayrıca çeşitli kuş gribi virüsü suşları için etkilidir. OTV için SARS-CoV-2'ye karşı in vitro çalışma yapılmamıştır. Bazı klinik denemelerde, OTV diğer büyük terapötik adaylarla kombinasyon halinde kullanılmıştır ve yapılan bir çalışmada, ilacın COVID-19 üzerinde pozitif sonuç göstermediği bildirilmiştir (48).

4.7. Azitromisin

Azitromisin (AZM), azalid sınıfına ait yarı sentetik bir makrolid antibiyotiktir. Yapılan çalışmalarda AZM'nin HCQ ile beraber, COVID-19 hastalarında virüs eliminasyonunda etkili olduğu ve COVID-19 hastalarında ölüm oranında azalma ile ilişkili olabileceği belirtilmiş olmakla birlikte, az sayıda çalışma COVID-19 hastalarının tedavisine dâhil edilen AZM'nin herhangi bir yararlı etki sağlamadığını bildirmiştir (49).

4.8. Umifenovir

Umifenovir (UFV), yaygın olarak Arbidol olarak tanınan bir indolil karboksilik asittir. İlacın Vero E6 hücrelerinde SARS-CoV-2'ye karşı inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda LPV / RTV ile kombine kullanımının COVID-19 hastalarında yalnızca LPV / RTV kullanımına kıyasla daha iyi sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (50).

SONUÇ

COVID-19 ile mücadelede virüsün genomik analizinin yapılması virüsün konağa nasıl bulaştığı, şüpheli vakaların doğrulanması için güvenilir ve hızlı sonuçlar veren tanı testlerine, enfeksiyona karşı korunmada önemli yollardan birisi olan aşuların geliştirilmesi ve tedavi seçeneklerinin oluşturulması için önemli bir adımdır. Bu süreçte enfekte olan hastalarla temastan kaçınılması, el ve solunum hijyeninin sağlanması, ellerin ağız, burun ve gözlerden sakınması, maske takılması ve kişisel önlemler alınarak hareket

edilmesi gerekir. Hastalığın kontrol altına alınması için kurallara uymak önemlidir. Yaşanan bu pandemiden çıkarılacak dersler ileride karşılaşılabileceğimiz potansiyel salgınlara karşı daha hazırlıklı olmamızı sağlar.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- P.E.T.,S.D.,A.G.T.; Veri Toplama- P.E.T.,S.D.; Veri Analizi/Yorumlama- P.E.T.,S.D.,A.G.T.; Yazı Taslağı- P.E.T.,S.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- P.E.T.,A.G.T.; Son Onay ve Sorumluluk- P.E.T.,S.D.,A.G.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- P.E.T.,S.D.,A.G.T.; Data Acquisition- P.E.T.,S.D.; Data Analysis/Interpretation- P.E.T.,S.D.,A.G.T.; Drafting Manuscript- P.E.T.,S.D.; Critical Revision of Manuscript- P.E.T.,A.G.T.; Final Approval and Accountability- P.E.T.,S.D.,A.G.T.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

REFERANSLAR

1. Ünal N. Yeni Koronavirüs Hastalığının Etiyolojisi. Eurasian JHS 2020;3:95-101.
2. T.C. Sağlık Bakanlığı. COVID-19 (SARS-COV-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı, Kasım 2020. Erişim adresi: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid-19rehberigenelbilgierepidemiyolojivetanipdf.pdf>.
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19 -March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19-26-march-2021>.
4. Arabacı Ç, Aydın Tutak G, Eroğlu Kesim B, Ertürk B, Ak K, Ağaç E. The Characteristics of SARS-CoV-2 Virus and Microbiological Diagnosis. Eur Arc Med Res 2020;36(1):10-20.
5. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nat Microbiol 2020;5:562-9.
6. Anderson RM, Fraser C, Ghani AC, Donnelly CA, Riley S, Ferguson NM and et al. Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002-2003 epidemic. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2004;359(1447):1091-105.
7. Peeri NC, Shrestha N, Rahman MS, Zaki R, Tan Z, Bibi S, et al. The SARS, MERS and novel coronavirus (COVID-19) epidemics, the newest and biggest global health threats: what lessons have we learned? Int J Epidemiol 2020;49(3):717-26.
8. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W and et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020;579(7798): 270-3.
9. Öztan G, İşsever H. Yeni Koronavirüsün (COVID-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu SABİAD 2020;3(2):61-71.

10. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses* 2020;12:372.
11. Heinz FX, Stiasny K. Profile of SARS-CoV-2. *Wien Klin Wochenschr* 2020;132: 635–44.
12. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virology* 2019;16 (69):2-22.
13. Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X and et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. *National Science Review* 2020;7(6):1012–23.
14. Aktan Ç. COVID-19 Tanısında Kullanılan Moleküler Analiz Yöntemleri. Sağlık Bilimleri Alanında Akademik Çalışmalar - II, Gece Kitaplığı 2020;2:257-66.
15. Park M, Won J, Choi BY, Lee CJ. Optimization of primer sets and detection protocols for SARS-CoV-2 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) using PCR and real-time PCR. *Exp Mol Med* 2020;52(6):963–77.
16. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. *J Med Virol* 2020;92(9):1676-80.
17. Teoh BT, Sam SS, Tan KK, Johari J, Danlami MB, Hooi PS and et al. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *BMC Infect Dis* 2013;13:387.
18. Qian J, Boswell SA, Chidley C, Lu ZX, Pettit ME, Gaudio BL and et al. An enhanced isothermal amplification assay for viral detection. *bioRxiv* (Preprint) 2020. doi:10.1101/2020.05.28.118059.
19. Gu L, Yan W, Liu L, Wang S, Zhang X, Lyu M. Research Progress on Rolling Circle Amplification (RCA)-Based Biomedical Sensing. *Pharmaceuticals* (Basel) 2018;11(2):35.
20. Kumar S, Kumar A, Venkatesan G. Isothermal nucleic acid amplification system: an update on methods and applications. *J Genet Genom* 2018;2(112):2.
21. Wu Q, Suo C, Brown T, Wang T, Teichmann SA, Bassett AR. INSIGHT: A population scale COVID-19 testing strategy combining point-of-care diagnosis with centralized high-throughput sequencing. *Science Advances* 2021;7(7):eabe5054. doi:10.1126/sciadv.abe5054.
22. Shaibu JO, Onwuamah CK, James AB, Okwuraiwe AP, Amoo OS, Salu OB and et al. Full length genomic sanger sequencing and phylogenetic analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Nigeria. *PLoS One* 2021;16(1):e0243271. doi.org/10.1371/journal.pone.0243271.
23. Chiara M, D'Erchia AM, Gissi C, Manzari C, Parisi A, Resta N and et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform* 2021;22(2):616-30.
24. Tokgun O, Caliskan A, Coskun C, Tokgun PE, Akca H. Whole Genome Sequencing and Phylogenetic Analysis of SARS-CoV-2 strains in Turkey. *J Infect Dev Ctries* 2021;15(4):470-7.
25. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S and et al. Detection of Nucleocapsid Antibody to SARS CoV-2 is More Sensitive than Antibody to Spike Protein in COVID-19 Patients. *J Infect Dis* 2020;222(2):206-13.
26. Pan Y, Li X, Yang G, Junli F, Yueting T, Jin Z and et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID19 patients. *J Infect* 2020;81(1):e28-e32.
27. McGuire SS, Klassen AB, Heywood J, Sztajnkrzyer MD. Prevalence of COVID-19 IgG Antibodies in a Cohort of Municipal First Responders. *Prehosp Disaster Med* 2021;36(2):131-4.
28. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020;586(7830):516-27.
29. Wang H, Zhang Y, Huang B, Deng W, Quan Y, Wang W and et al. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell* 2020;182(3):713-21.
30. Gao Q, Bao L, Mao H, Wang L, Xu K, Yang M and et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* 2020;369(6499):77-81.
31. Chen WH, Tao X, Agrawal A, Algaissi A, Peng BH, Pollet J and et al. Yeast-Expressed SARS-CoV Recombinant Receptor-Binding Domain (RBD219-N1) Formulated with Alum Induces Protective Immunity and Reduces Immune Enhancement. *bioRxiv* (Preprint) 2020. doi: 10.1101/2020.05.15.098079.
32. World Health Organization. Draft Landscape of COVID-19 Candidate Vaccines. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (WHO, accessed 26 September 2020).
33. Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA and et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 2020;586(7830):567-71.
34. World Health Organization. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines—20 March 2020. Available from: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/novel-coronavirus-landscape-ncov.pdf?ua=1> (accessed Nov 8, 2020).
35. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK and et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021;397(10269):99-111.
36. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH and et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2020;396(10249):479-88.
37. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021;397(10275):671-81.
38. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K and et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21(2):181-92.
39. Anderson EJ, Roupael NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M and et al. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* 2020;383(25):2427-38.
40. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M and et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 2020;586(7830):594-9.
41. T.C. Sağlık Bakanlığı. COVID-19 Erişkin Hasta Yönetimi ve Tedavisi. Güncellenme. Erişim adresi: <https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/tedavi/COVID19-EriskinHastaTedavisi.pdf>. Erişim Tarihi: 14.04.2020.

42. T.C. Sağlık Bakanlığı. COVID-19 Erişkin Hasta Yönetimi ve Tedavisi. Güncellenme Erişim adresi: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/40719/0/covid-19rehberieriskinhastayonetimivetedavipdf.pdf>. Erişim Tarihi: 07.05.2021
43. Hoffmann M, Mösbauer K, Hofmann-Winkler H, Kaul A, Kleine-Weber H, Krüger N and et al. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. *Nature* 2020;585(7826):588-90.
44. Agrawal U, Raju R, Udawadia ZF. Favipiravir: A new and emerging antiviral option in COVID-19. *Med J Armed Forces India* 2020;76(4):370-6.
45. Ye XT, Luo YL, Xia SC, Sun QF, Ding JG, Zhou Y, et al. Clinical efficacy of lopinavir/ritonavir in the treatment of Coronavirus disease 2019. *Eur Rev Med Pharm Sci* 2020;24:3390-6.
46. Wang Y, Zhang D, Du G, Du R, Zhao J, Jin Y and et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2020;395(10236):1569-78.
47. Khalili JS, Zhu H, Mak NSA, Yan Y, Zhu Y. Novel coronavirus treatment with ribavirin: Groundwork for an evaluation concerning COVID-19. *J Med Virol* 2020;92(7):740-6.
48. Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(Supp1):i5-i21.
49. Rodríguez-Molinero A, Pérez-López C, Gálvez-Barrón C, Miñarro A, Macho O, López GF and et al. Observational study of azithromycin in hospitalized patients with COVID-19. *PLoS One* 2020; 15(9):e0238681. doi:10.1371/journal.pone.0238681.
50. Deng L, Li C, Zeng Q, Liu X, Li X, Zhang H and et al. Arbidol combined with LPV/r versus LPV/r alone against Corona Virus Disease 2019: a retrospective cohort study. *J Infect* 2020;81(1):e1-e5.