

SARS-CoV-2'nin Laboratuvar Tanısı

Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2

Alper Togay ¹, Nisel Yılmaz ²

Derleme
Review

Öz

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde, yeni bir koronavirüs nedeniyle bir salgın başladı ve hızla dünyaya yayıldı. Bu virüs son yirmi yılda iki önemli salgına neden olmuş olan şiddetli akut solunum sendromu (SARS) ve Ortadoğu solunum sendromunun (MERS) etkeni olan beta koronavirüsler ile genomik yapısı, yayılımı, patogenezi açısından benzer SARS-CoV-2'dir. Bu derleme, tüm dünyaya yayılmış koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) salgınına odaklanarak SARS-CoV-2'yi test etmek için mevcut laboratuvar yöntemlerini gözden geçirmektedir. SARS-CoV-2'nin hızlı ve kesin laboratuvar tanısı, karantina önlemlerinin erken alınarak, hastalara tedavileri planlanıp, salgının yayılımını önlemek için gereklidir. Viral pnömoniler pürülan balgam üretimiyle sonuçlanmadığı için, nazofaringeal sürüntü örneği en sık kullanılan yöntemdir. SARS-CoV-2'yi moleküler yöntemlerle test ederken nazofaringeal örnekler bazı vakaları atlatabilir; bu nedenle bronkoskopi ile daha derin bir örnek alınması gerekebilir. Ama bronkoskopi oluşturduğu aerosol nedeniyle sağlık çalışanlarına bulaş açısından daha risklidir. Bunun yerine yinelenen nazofaringeal örnekleme yapılabilir, çünkü zamanla nazofarenkste SARS-CoV-2 bulunma olasılığı artar. Antikor testleri için de örneğin alındığı hastalığın evresi çok önemlidir. Antikor oluşumunun doğası gereği birinci haftadan sonra örneklerin uygun testlerle çalışılması gereklidir. Çapraz reaksiyonları engellemek için farklı antijenleri hedefleyen çeşitli testler kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PZR, seroloji

ABSTRACT

In December 2019, an outbreak began in Wuhan City of China; due to a new coronavirus and spread rapidly across the world. This virus SARS-CoV-2 is similar with severe acute respiratory syndrome (SARS) and middle east respiratory syndrome (MERS) which have caused two important epidemics within the last two decades; by their genomic structure, spread, and pathogenesis. This review article goes through current laboratory methods to test SARS-CoV-2, focusing on the worldwide outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19). The rapid and precise laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 is required to take quarantine precautions early, to plan treatment for patients and to prevent the spread of the epidemic. Taking a nasopharyngeal swab sample is the most common method to test viral pneumonias since viral pneumonias do not result in production of purulent sputum. When testing SARS-CoV-2 with molecular methods, nasopharyngeal sampling may miss some cases; so that a sample from deeper layers may be required by using bronchoscopy. However, bronchoscopy is more risky in terms of disease transmission to health-care workers due to the aerosol it generates. Instead of bronchoscopy, repeated nasopharyngeal sampling can be performed, due to the possibility of finding SARS-CoV-2 in the nasopharynx increases in course of time. The disease stage of the patient from whom the sample is taken is also very important for antibody tests. Due to the nature of antibody formation, after the first week samples should be run with appropriate tests. Various tests can be used to target different antigens to prevent cross reactions.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, RT-PCR, serology

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 11 Şubat 2020'de koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırılan yeni koronavirüs kaynaklı pnömoni salgın ölçeğine alınmış ve tüm dünyaya hızla yayılmıştır ⁽¹⁾. Aynı gün uluslararası virüs sınıflandırma komisyonu yeni koronavirüsün ciddi akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırıldığını duyurmuştur ⁽²⁾.

COVID-19 koronavirüsün neden olduğu ilk ciddi solunum yolu hastalığı salgını değildir. Yalnızca son yirmi yılda koronavirüsler COVID-19, Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) olmak üzere üç salgın hastalığa neden olmuştur ⁽³⁾. COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2'nin viral çoğalım ve yayılımın dinamik profili ile viral antijene

Alındığı tarih: 11.05.2020

Kabul tarihi: 27.05.2020

Online Yayın tarihi: 10.07.2020

Alper Togay

Tepecik Eğitim Araştırma
Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Laboratuvarı,
İzmir - Türkiye

✉ alpertogay@gmail.com

ORCID: 0000-0002-5256-0064

N. Yılmaz

ORCID: 0000-0001-7435-2461

Tepecik Eğitim Araştırma
Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Laboratuvarı,
İzmir, Türkiye

Cite as: Togay A, Yılmaz N. SARS-CoV-2'nin laboratuvar tanısı. Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi. 2020;30(Ek sayı):70-5.



© Telif hakkı T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eğit. ve Araşt. Hastanesi. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Association of Publication of the T.C. Ministry of Health İzmir Tepecik Education and Research Hospital. This journal published by Logos Medical Publishing.

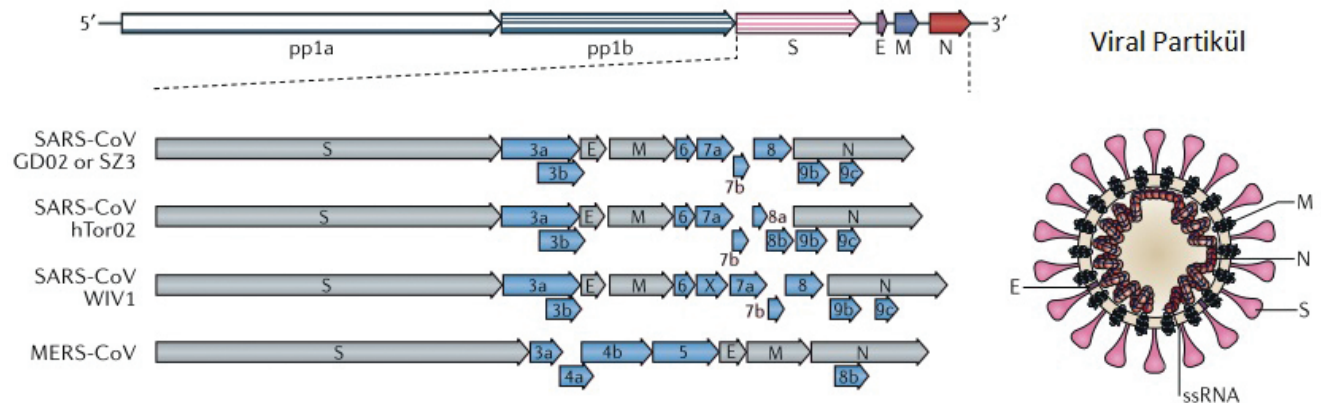
Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

spesifik antikor yanıtları bildirilmeye başlanmıştır, ancak bunların yapıları üzerinde halen bir fikir birliği yoktur ⁽⁴⁾. Viral RNA ve antikor yanıtının profilleri, düşünce tanı, tedavi, enfeksiyon kontrolü ve aşı tasarımına rehberlik etmek için acilen gerekmektedir.

Virüsün Yapısı

Koronavirüsler Coronaviridae ailesi içinde Coronavirinae alt ailesinde yer alırlar. Bunlar pozitif iplikçikli tek sarmallı RNA genomuna (26-32 kbç) sahip zarflı virüslerdir. Şimdiye kadar α , β , γ , δ olmak üzere dört koronavirüs cinsi tanımlanmıştır ⁽⁵⁾. İnsanlarda endemik ve epidemik olarak solunum yolu hastalıklarına neden olan bu virüslerden, α koronavirüs ailesinde HCoV-229E, HCoV-NL63; β koronavirüs ailesinde ise MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 virüsleri yer alır ⁽⁶⁾. Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan β koronavirüslerin son üyesi SARS-CoV-2'nin genomik sekanslama ile yarasalarda belirlenen β koronavirüslere %88, SARS-CoV'ye %79 benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur ⁽⁷⁾.

Tipik bir koronavirüs genomu çevrilmemiş 5'gen bölgesi (UTR), açık okuma çerçevesi (ORF), yapısal proteinleri kodlayan dört S (spike, dikensi uç), E (envelope, zarf), M (membrane, membran) ve N (nucleocapsid, nükleokapsid) geninden oluşmaktadır ⁽⁶⁾ (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan betakoronavirüslerin farklı genom, gen ve protein yapıları. Tipik bir koronavirüs genomu, çevrilmemiş 5'gen bölgesi (UTR), açık okuma çerçevesi (ORF), yapısal proteinleri kodlayan dört S (spike, dikensi uç), E (envelope, zarf), M (membrane, membran) ve N (nucleocapsid, nükleokapsid) geninden oluşur. 6 numaralı kaynaktan alıntıdır.

COVID-19'un Tanısı

COVID-19'un tanısı, hastanın klinik belirtileri temas öyküsü ve viral nükleik asitlerin belirlenmesi, bilgisayarlı tomografi ile akciğer bulgularının ortaya konulması, serokonversiyonun gösterilmesi gibi bazı yardımcı tetkiklere dayanmaktadır. SARS-CoV-2 ile enfekte hastaların klinik bulguları olan öksürük, ateş, dispne her zaman olmayabilir. Bu nedenle epidemiyolojik öykü ile birlikte COVID-19 tanısı için yardımcı tanı testlerinin yapılması çok önemlidir.

Laboratuvar Tanısı

COVID-19 kesin tanısı, hastadan gönderilen örnekler içinde SARS-CoV-2 ribonükleik asitinin (RNA) saptanması ile olmaktadır. Viral nükleik asit saptanmasını sağlayan analitik süreç kadar analiz öncesi süreç de viral RNA'nın saptanmasında oldukça önemlidir. Preanalitik süreci en çok etkileyen faktörler hasta örnekleri toplanmasıyla ilgili olan faktörlerdir.

1. Örnek toplanması

Toplanan örneğin cinsi, alındığı bölge, alındığında hastalığın evresi, konulduğu kap ve doğru şartlarda taşınıp çalışılması viral RNA belirlenmesini etkileyen en önemli etkenlerdir.

a. Örneğin cinsi ve alındığı bölge: Test edilen en yaygın örnek tipleri nazofarinks ve/veya orofarinksten alınan sürüntü örnekleridir. Eğer her iki bölgeden alınacaksa birlikte alınıp aynı tüp içinde gönderilebilir. Üst solunum örneklerinin toplanması kolaydır; böylece hafif semptomları olan hastaların testlere erişimini arttırır. Pnömonili hastalarda nazofaringeal ve oral sekresyonlara ek olarak balgam ve brokoalveolar lavaj (BAL) sıvısı gibi alt solunum yolu sekresyonları da test edilmelidir. SARS CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 virüslerinin en hassas tespiti için, hem üst hem de alt solunum yolu örneklerinin (balgam, BAL sıvısı) toplanması ve test edilmesi önerilmektedir ⁽⁸⁾. Bununla birlikte, balgam ve özellikle BAL'ın bronkoskopi yoluyla toplanması aerosol damlacıkları oluşturarak sağlık çalışanları için biyogüvenlik riskini arttırır. Bu nedenle örnek alımında kişisel koruyucu ekipmanların (KKE) sağlık çalışanları tarafından uygun şekilde kullanılması önemlidir. Ayrıca, bronkoskopi için eğitilmiş eleman gereklidir.

SARS-CoV ve MERS-CoV RNA'sı solunum yolu örnekleri dışında dışkı, idrar ve kan örneklerinden de saptanabilir ama bu örnekler genellikle solunum örneklerinden daha az güvenilirdir ⁽⁸⁻¹⁰⁾. Yapılan alışmalarda, SARS-CoV-2 için dışkıdan (%29-40), idrardan (%6.9), kandan (%3-11) virus belirlenebildiği, ama bunun genellikle ciddi vakalarda olduğu görülmektedir ⁽¹¹⁻¹³⁾. Dışkıdaki viral yüklerin kinetiği hala çok açık değildir ⁽¹⁴⁾. SARS-CoV-2 RNA'sının, orofarinks örneklerinde belirlenemese bile anal bölgeden alınan sürüntü örneklerinde bulunabildiği gösterilmiştir ⁽¹⁵⁾. Bu nedenle alt solunum yolu örnekleri alınamıyorsa, dışkı örnekleri test edilerek SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısını arttırmak olası olabilmektedir ⁽¹⁶⁾.

b. Örnek alınma zamanı: Yapılan alışmalar az olmakla birlikte, COVID-19 enfeksiyonunun semptomlarının başlangıcındaki ilk günlerde balgamdaki viral yük nazofaringeal sürüntü örneklerindeki göre daha yüksektir ⁽¹⁷⁾. Bu nedenle bu günlerde nazofaringeal sürüntü örneklerinde virüs saptanmayabilir ve bronkoskopi ile daha derinden bir örnek alınması gerekebi-

li. SARS hastalarında semptom başladıktan 7-10 gün sonra üst solunum yolu örneklerinde doruğa ulaşan RNA pozitiflik oranları, COVID-19'da da benzer günlerde pik yapar ⁽¹⁴⁾. SARS hastalarında alt solunum yolu örneklerindeki RNA pozitiflik oranlarının, hastalığın başlangıcından sonraki üç hafta boyunca devam ettiği görülmüştür ⁽⁸⁾. Bir çalışmada, altta yatan diyabet hastalığının solunum sisteminde uzun süreli MERS-CoV RNA saptanması ile ilişkili olduğu saptanmıştır ⁽⁹⁾.

c. Örnek taşınması: COVID-19 tanısında viral RNA'nın saptanmasında hastadan alınacak sürüntü örnekleri için gövdesi kolayca esneyebilir, özellikle dacron uçlu özel eküvyonlar kullanılmalıdır. Örnek toplanmasını takiben alınan örnek, virüs taşınması için gerekli ortamı sağlayan sıvı bir taşıma ortamı (viral transport medium) içine alınır. Örnekler alındıktan sonra en kısa zamanda +4°C'de laboratuvara ulaştırılmalıdır ⁽¹⁸⁾.

2. Nükleik asitlerin tespiti

SARS CoV-2, SARS CoV ve MERS-CoV'lerine benzemektedir. Geçtiğimiz yıllarda SARS-CoV ve MERS koronavirüsleri epidemilere neden olmuştur. Bu epidemiler genellikle hayvandan insana virüsün geçişiyle başlamıştır. Ya klinik belirtiler vererek ya da vermeden insanlar arasında yayılmıştır. Her salgında olduğu gibi hızlı, ulaşılabilir ve doğru moleküler tanı testleri mortaliteyi ve morbiditeyi önemli derecede etkilemiştir.

SARS-CoV-2 için yaygın olarak kullanılan iki nükleik asit saptama teknolojisi, gerçek zamanlı (Real Time) polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ve yüksek verimli sekanslamadır. Yüksek verimli sekanslama teknolojisinin klinik tanıda uygulanması her yerde ekipmanın olmaması ve yüksek maliyeti nedeniyle sınırlıdır ⁽¹⁾. RT-PZR ise yaygın ve etkili olup, özellikle solunum yolu örneklerinde patojenik virüslerin saptanması için daha basit bir yöntemdir ⁽¹⁹⁾.

Bu nedenle Çin'de SARS-CoV-2 salgınının başlamasından sonra, birçok şirket klinik tanı için kantitatif RT-PZR test kitlerini geliştirmeye başlamışlardır ⁽²⁰⁾.

Şu anda insanlarda SARS-CoV bulunmadığından, genetik olarak benzeseler de pozitif olan vakalar SARS-CoV-2 enfekte vakalar olarak düşünülmelidir. Geliştirilen yöntemler diğer insan koronavirüs suşları olan MERS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43 ve HCoV-229E için negatif sonuç vermektedir (7).

Çeşitli ülkelerin önemli kuruluşları son yaşanan salgında hızlı bir şekilde önerilerde bulunup deneyimlerini paylaşmıştır. Çin Ulusal Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) ORF 1 lab ve N genini hedefleyen primerler ve probler önermiştir (21). Öneri olarak yalnızca bir bölge pozitif ise, testin yinelenmesini önermektedirler (22). Almanya'da Charite'de yapılan bir çalışmada, E gen analizini tarama testi olarak RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) gen analizini doğrulama testi olarak kullanılıp her ikisinin de pozitif olması gerektiği önerilmiştir (19). Hong Kong Üniversitesinden bazı bilim adamları patojenik koronavirüsler için bir tarama testi olarak N geni ve bir onaylayıcı olarak ORF1b testini önermişlerdir (23). Japonya Ulusal Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü ise, ORF1a ve S genini hedef alan ve N genini hedefleyen içiçe RT-PZR deneyi önermektedir (24). ABD CDC, SARS-CoV-2'nin N1, N2 ve insan RNaz P genlerini hedefleyen üç primer-prob setini kullanmıştır (25). Ülkemizde de Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından RdRp gen analizi yapan kit kullanımı önerilmiş, üretimi yapılmış ve yetkili tüm merkezlere dağıtılmıştır.

Bununla birlikte, bu testlerin herhangi birinin gerçek klinik duyarlılığı halen net olarak bilinmemektedir. SARS-CoV-2 RT-PZR negatif test sonucu, kişinin enfekte olmadığı olasılığını ortadan kaldırmaz. Test sonucu pozitif ise sonuç büyük olasılıkla doğru olsa da viral RNA'nın rastgele test sürecine girmesi (örnek toplanırken, örnekten çapraz kontaminasyon sonucu ya da SARS-CoV-2 ile enfekte bir laboratuvar çalışanı tarafından) gibi nedenler ile yanlış pozitif olabileceği akılda tutulmalıdır. Ayrıca PZR'de viral RNA saptanması RNA'nın canlı virüs olduğu anlamına gelmemektedir. Bu nedenle viral RNA'nın saptanması kesinlikle o hastanın bulaştırıcı olduğu anlamına gelmez.

3. Serolojik testler

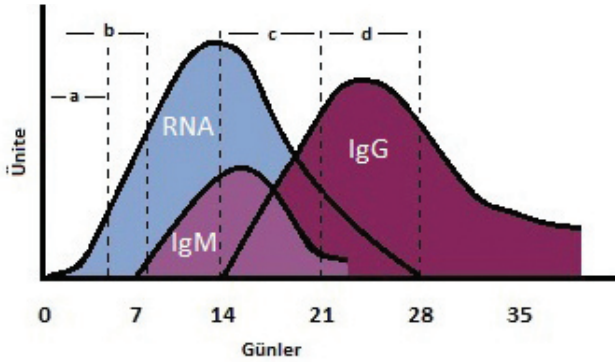
Serolojik testler tanı amacıyla viral RNA'nın belirlenmediği durumlarda, salgının büyüklüğünü belirlemek için asemptomatik bireylerde, enfeksiyonu geçiren kişilerde bağışıklık yanıtın ortaya konulmasında kullanılan önemli testlerdir (26). Virüse özgü antikorların maruziyetten en az bir hafta sonra oluşmasından dolayı testlerin daha erken dönemde yapılmasının yeri yoktur.

SARS-CoV ve MERS-CoV'nin saptanması için, enzim bağımlı immüno-sorbant testi (ELISA), kemilüminesans testi (CLIA), immune floresan antikor testi, western blot, protein mikro dizileme ve nötralizasyon testleri uygulanmıştır. Bu yöntemlerden ELISA ve CLIA, verimliliğinin yüksek olması, kısa işlem süresi ve basit çalışma prosedürü nedeniyle daha uygun yöntemlerdir (14). Bu yöntemler için kan numuneleri kullanılır ve içerisindeki IgM, IgG, IgA tipi spesifik antikorlar veya total antikorlar saptanır.

Antikor saptama testleri oluşturulurken kullanılan antijenin kaynağı çok önemlidir. Koronavirüslerin benzer genetik yapısı nedeniyle çapraz reaksiyon meydana gelmesi olasıdır. Bu yüzden daha immünojenik ve spesifik antijenler seçilmelidir. SARS-CoV ve MERS-CoV'de immünojenik olmaları nedeniyle S ve N proteinlerine karşı oluşan antikorları serumda test etmek için ELISA ve CLIA yöntemleri geliştirilmiştir (27). Ayrıca SARS-CoV-2 ve SARS-CoV'un N proteininin benzerliği %92 civarı olduğundan dolayı olasılıkla SARS-CoV-2'nin N proteini ile diğer insan koronavirüslerine karşı oluşan antikorlar arasında çapraz bir reaksiyon olabilmektedir (15). Farklı antijen bölgelerini hedefleyen farklı analizlere sahip antikorların test edilmesi, çapraz reaksiyon kaynaklı yalancı pozitif sonuçları engelleyebilir.

DSÖ ardışık numunelerde ilk serum örneğinin hastalığın birinci haftasında, ikincisinin üç-dört hafta sonra toplanmasını önermektedir. Yalnızca tek bir serum örneği alınabiliyorsa semptomların başlamasından en

az üç hafta sonra toplanması önermektedir⁽²⁸⁾. Bununla birlikte, antikor saptanma zamanları ile yapılan farklı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, SARS'da IgG serokonversiyonu hastaların %93'ünde ortalama 20 günde gösterilmiştir⁽²⁹⁾. COVID-19 için 173 hasta ile yapılan bir çalışmada ise, hastalarda serokonversiyon oranları total antikor, IgM ve IgG için sırasıyla, %93.1, %82.7 ve %64.7 olarak saptanmıştır. Total antikor düzeyi negatif çıkan 12 hastada bu durumun, kan örneğinin erken dönemde alınmış olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Serokonversiyon eğrisi incelendiğinde hastalığın başlangıcından bir ay sonra total antikor düzeyi ve IgM'in pozitifleşme oranının %100'e ulaştığı görülmüştür⁽³⁰⁾. Başka bir çalışmada ise, 285 COVID-19'lu hastanın %100'ünde semptomlar başladıktan 17-19 gün içerisinde IgG pozitifleşirken, semptom başlangıcından 20-22 gün içerisinde hastaların %94.1'inde IgM pozitifleşmektedir. Semptom başlangıcından sonra 3 hafta içerisinde virüs spesifik IgG ve IgM antikorları yükselmekte, fakat 3 haftayı geçen olgularda IgM hafif bir azalma göstermektedir. Ayrıca IgG ve IgM düzeyleri ciddi kliniği olan olgularda daha yüksek saptanmıştır⁽³¹⁾ (Şekil 2).



Şekil 2. SARS-CoV-2 RNA ve antikor paterni. a: Asemptomatik dönem, b: Pencere dönemi, c: Azalma dönemi, d: İyileşme dönemi. 31 numaralı kaynak kullanılmıştır.

İmmünokromatografik test yöntemi ise özel cihazlar gerektirmediği için tanı kapasitesi düşük sağlık kurumlarında tercih edilmektedir. Test süresi oldukça kısadır ve örnek alımı kan numuneleri ile çalışıldığı için daha düşük risklidir. Özellikle semptomların başlamasından bir hafta sonra, yüksek duyarlılığa sahiptir⁽³²⁾ (Şekil 3).



Şekil 3. İmmünokromatografik yöntem ile anti-SARS-CoV-2 total antikorun gösterilmesi. (+) işaretli olan hem kontrol hem de total antikor çizgisinde tutulum olduğu için pozitif hasta. (-) işaretli olan sadece kontrol çizgisinde tutulum olduğu için negatif hasta.

Ancak, SARS-CoV-2'ye karşı antikor saptayan testlerde kan numuneleri enfeksiyonun erken döneminde toplanırsa yalnızca negatif sonuçlar ortaya çıkabileceği; romatoid faktör, non spesifik IgM gibi diğer moleküllerin yalnızca pozitif sonuçlara neden olabileceği unutulmamalıdır.

SONUÇ

COVID-19 pandemisi, bulaşıcı hastalığın kontrol altına alınmasında ve hastaların tedavisinde tanının hızlı ve doğru şekilde konulmasının ne kadar önemli olduğunu yine gösterdi. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, çapraz reaksiyonu az testler geliştirilmeye çalışıldı ve hala yenileri geliştirilmekte. Virüsün hücre kültürü ile gösterilmesi biyogüvenlik açısından daha yüksek korumalı laboratuvarlar gerektirdiği için tanıda altın standart PZR ile nükleik asitin gösterilmesidir. Ama bu süreç yalnızca analitik süreçte çoğaltılacak olan

gen bölgesinin seçilmesinden meydana gelmez. Preanalitik süreci etkileyen doğru zamanda örneğin alınması, doğru şekilde taşınması gibi durumlar mevcuttur. Bu yüzden multidisipliner olarak çalışılması esastır. Serolojik testler ise PZR ile tanı konulamayan hastalarda tanı açısından önemli olmakla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar için önemli veriler sağlar. Aşının bulunması durumunda antikor yanıtlarının ölçülmesi ya da bağışıklığı oluşmuş kişilerden toplanan plazma ile hastaların tedavisinde antikor miktarının belirlenmesi için önemli veriler sunar.

Çıkar Çatışması: Yoktur.

Finansal Destek: Yoktur.

Conflict of Interest: None.

Funding: None.

KAYNAKLAR

1. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3. [CrossRef]
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species and its viruses - a statement of the Coronavirus Study Group. *Biorxiv*. 2020;1-15. [CrossRef]
3. De Wit E, Van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(8):523-34. [CrossRef]
4. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(5):565-74. [CrossRef]
5. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol*. 2016;24(6):490-502. [CrossRef]
6. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2019;17(3):181-92. [CrossRef]
7. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74. [CrossRef]
8. Cheng PKC, Wong DA, Tong LKL, et al. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2020;363(9422):1699-1700. [CrossRef]
9. Al-Abdely HM, Midgley CM, Alkhamis AM, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus infection dynamics and antibody responses among clinically diverse patients, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(4):753-66. [CrossRef]
10. Poissy J, Goffard A, Parmentier-decrucq E, Favory R, Kauv M, Kipnis E. Kinetics and pattern of viral excretion in biological specimens of two MERS-CoV cases. *Journal of Clinical Virology*. 2014;61(2):275-8. [CrossRef]
11. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in

- Different Types of Clinical Specimens. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;9-10. [CrossRef]
12. Chen W, Lan Y, Yuan X, et al. Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):469-73. [CrossRef]
13. Ling Y, Xu SB, Lin YX, et al. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin Med J (Engl)*. 2020;0(9):1039-43. [CrossRef]
14. Yan Y, Chang L, Wang L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol*. 2020;(March):1-14. [CrossRef]
15. Zhang W, Du RH, Li B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):386-9. [CrossRef]
16. Yongchen Z, Shen H, Wang X, et al. Different longitudinal patterns of nucleic acid and serology testing results based on disease severity of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;1751(May):1-14. [CrossRef]
17. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020;20(4):411-2. [CrossRef]
18. Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı. Numune Alma El Kitabı. Ankara; 2017. <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/kurumsal/plan-ve-faaliyetler/numune-alma-el-kitabi.pdf>
19. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):1-8. [CrossRef]
20. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections-the state of the art. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):747-56. [CrossRef]
21. CDC China. Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus. 2020.
22. National Health Commission of China. Guideline for laboratory testing of COVID-19. 2020.
23. Chan JFW, Choi GKY, Tsang AKL, et al. Development and evaluation of novel real-time reverse transcription-PCR assays with locked nucleic acid probes targeting leader sequences of human-pathogenic coronaviruses. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2722-6. [CrossRef]
24. Japanese National Institute of Infectious Diseases. PCR and sequencing protocols for 2019-nCoV. 2020.
25. US CDC. Coronavirus Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel. 2020.
26. Patel R, Babady E, Theel E, Storch G, Pinsky B, George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 COVID-19. *MBio*. 2020;11(2):1-5. [CrossRef]
27. Qiu M, Shi Y, Guo Z, et al. Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities. *Microbes Infect*. 2005;7(5-6):882-9. [CrossRef]
28. WHO. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. 2020.
29. Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: A prospective study. *Lancet*. 2003;361(9371):1767-72. [CrossRef]
30. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;1-22. [CrossRef]
31. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020;1-4. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41591-020-0897-1>
32. Pan Y, Li X, Yang G, et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J Infect*. 2020. [CrossRef]