

# Türkiye’de Tespit Edilen İlk MERS Olgusunun Moleküler Tanısı ve Filogenetik Analizi

## Molecular Diagnosis and Phylogenetic Analysis of the First MERS Case in Turkey

Fatma BAYRAKDAR<sup>1</sup>, Ayşe Başak ALTAŞ<sup>1</sup>, Gülay KORUKLUOĞLU<sup>1</sup>, Selmur TOPAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Viroloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>1</sup> Public Health Agency of Turkey, Department of Microbiology Reference Laboratories, Virology Laboratory, Ankara, Turkey.

<sup>2</sup> Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı, Ankara.

<sup>2</sup> Public Health Agency of Turkey, Department of Communicable Diseases, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 21.11.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 03.03.2015

### ÖZ

İnsan ve hayvanlarda solunum yolu ve intestinal sistemde enfeksiyonlara neden olan koronavirüs (CoV) lar, zarflı, sferik, tek iplikli pozitif polariteli RNA viruslarıdır. Yakın zamana kadar bilinen beş tip insan koronavirüsüne (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E, SARS-CoV) ek olarak, MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) 2012 yılında Suudi Arabistan’da tanımlanmıştır. *Coronaviridae* ailesi, *Coronavirinae* alt ailesi, *Betacoronavirus* cinsi, C kökenine (clade) dâhil edilen MERS-CoV, akut solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmakta ve insanlar arasında solunum yolu ve yakın temasla yayılmaktadır. Bu çalışmada, ülkemizde saptanan ilk MERS olgusunun moleküler olarak tanımlanması ve virusun filogenetik analiz sonuçlarının sunulması amaçlanmıştır. Cidde’de işçi olarak çalışan 42 yaşında bir Türk vatandaşı, 25-26 Ekim 2014 tarihinde ateş ve halsizlik şikâyetleri ile Cidde’de tıbbi bakım almış, ancak durumu kötüleşince Türkiye’ye dönmüştür. Hasta, 6 Ekim’de ateş, halsizlik, solunum yetmezliği, terleme ve öksürük şikâyetleri ile Hatay’da bir hastanenin yoğun bakım ünitesine yatırılmış; 8 Ekim’de üniversite hastanesine sevk edilmiş ve 11 Ekim’de hayatını kaybetmiştir. Olgunun ölümünden önce alınan trakeal aspirat örneği, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Referans Laboratuvarları, Viroloji Bölümü Laboratuvarına gönderilmiştir. Viral RNA varlığı, MERS-CoV protein E (upE), ORF1a ve ORF1b gen bölgelerini hedefleyen bir ticari kit (hCoV-EMC Real-Time RT-PCR, Fast Track Diagnostics, Lüksemburg) ile araştırılmış; doğrulama için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün referans yöntemi (Superscript III One Step RT-PCR, Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Çalışmada her iki yöntem ile de MERS-CoV RNA pozitifliği saptanmıştır. Nükleokapsid (N) ve RNA’ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) gen bölgelerinin amplifikasyonu ise hem-nested PCR yöntemiyle (Invitrogen, ABD) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra N gen bölgesinin 204 nükleotidik kısmının dizi analizi yapılmış ve N geninin filogenetik ağacı MEGA6 programı kullanılarak oluşturulmuştur. Dizilenen bu bölge Londra’da tedavi edilen hastaya ait numune izolatında iki aminoasit

**İletişim (Correspondence):** Dr. Bio. Fatma Bayrakdar, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Viroloji Laboratuvarları, İnfluenza ve Diğer Solunum Yolu Virusları Birimi, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye.

**Tel (Phone):** +90 312 565 5564, **E-posta (E-mail):** fbayrakdar@windowslive.com

delesyonu içermektedir. Çalışmamızda tanımlanan ANK/1079/2014 izolatında ise bu delesyon bulunmamaktadır. ANK/1079/2014 izolatında kısmi N geni dizisi, insan *Betacoronavirus* 2c EMC/2012 suşu ile karşılaştırıldığında nükleotid ve aminoasit değişimi gözlenmemiştir. MERS-CoV'un moleküler tanısı için çalışmamızda hedef olarak seçilen gen bölgeleri (UpE, ORF1a, ORF1b, N ve RdRp), DSÖ tarafından önerilen, tanı ve doğrulama için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bölgelerdir. Yapılan çalışmalarda, insan olgularında ilk olarak tespit edilen viral genomların diğerlerinden farklı olduğu ve "clade A" içerisinde yer aldığı; tek hörgüçlü develerden ve insanlardan elde edilen diğer viral genomların ise "clade B" içerisinde olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda, kısmi N geni dizisinin filogenetik analizine göre tanımladığımız ANK/1079/2014 izolatı "clade A"da yer almaktadır. Sonuç olarak MERS-CoV, Arap Yarımadası ve Orta Doğu bölgesinde sınırlı gibi görünse de, bu bölgelere seyahat eden kişilerin virüsü kendi ülkelerine taşınma riski olduğu ve dünyanın diğer bölgelerinde otokton enfeksiyonların görülebileceği akılda tutulmalıdır.

**Anahtar sözcükler:** MERS-CoV; moleküler tanı; filogenetik analiz; Türkiye.

## ABSTRACT

Coronaviruses (CoV) are enveloped, spherical, single-stranded positive-sense RNA viruses causing mainly respiratory and intestinal infections in animals and humans. Until recently five types of human coronaviruses (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E, SARS-CoV) have been known, however a novel CoV has been identified in 2012 in Saudi Arabia. This virus, namely MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), was classified within *Coronaviridae* family, *Coronavirinae* sub-family, *Betacoronavirus* genus, clade C. It causes acute respiratory infections in humans and transmits via respiratory route and close contact between humans. The aim of this study was to present the first MERS case from Turkey identified by molecular methods and the results of viral sequence analysis. A 42-year-old male Turkish citizen who worked as an employee in Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia, admitted to hospital with the complaints of fever and malaise on 25-26 September 2014. Since his symptoms went on and got worse, he returned to Turkey, and hospitalized in a hospital's intensive care unit in Hatay on 6<sup>th</sup> of October with the symptoms of fever, malaise, sweating, cough and respiratory distress. He transferred to a university hospital on 8<sup>th</sup> of October and died on 11<sup>th</sup> October. The tracheal aspirate sample obtained before he died was sent to Virology Unit of Reference Laboratories of the Turkish Public Health Institution. Detection of viral RNA was performed by using a commercial real-time PCR kit (hCoV-EMC Real-Time RT-PCR, Fast Track Diagnostics, Luxembourg) targeting the MERS-CoV E protein (upE), ORF1a and ORF1b gene regions. The reference method Superscript III One Step RT-PCR (Invitrogen, USA) recommended by World Health Organization (WHO) was also applied for confirmation. Both of the methods yielded positive results for MERS-CoV RNA. For the amplification of nucleocapsid (N) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) genes, hemi-nested PCR (Invitrogen, ABD) was conducted, followed by sequence analysis of 204 nucleotide part of N gene. Phylogenetic tree of N gene was obtained with the use of MEGA6 software. N gene was chosen as it comprised a two aminoacid deletion in the corresponding published sequence from the patient treated in London, United Kingdom. There was no nucleotide or aminoacid change in our isolate, namely ANK/1079/2014 when compared with human *Betacoronavirus* 2c EMC/2012 reference strain found in Genbank database. The target gene regions selected in our study (UpE, ORF1a, ORF1b, N and RdRp) which were also recommended by WHO, shown to have high specificity and sensitivity for the diagnosis and confirmation of MERS-CoV, and also recommended by WHO. The previous studies indicated that, the viral genomes detected in the earliest cases of humans (clade A) are genetically distinct from the others (clade B) which were isolated from dromedary camels and humans. In our study, according to phylogenetic analysis of partial N gene segment, isolate ANK/1079/2014 has taken place within clade A. In conclusion, MERS-CoV appears to have limited circulation in Arabian Peninsula and Middle-Eastern countries, it should be considered in mind that travel-related cases may export the virus outside these regions leading autochthonous infections in the other parts of the world.

**Keywords:** MERS-CoV; molecular diagnosis; phylogenetic analysis; Turkey.

## GİRİŞ

*Coronaviridae* ailesinde sınıflandırılan koronavirüsler, insan ve hayvanlarda solunum ve sindirim yolu enfeksiyonlarına neden olan zarflı, sferik, lineer tek iplikli pozitif polari-teli RNA virüsleridir<sup>1</sup>. Dünyada dört koronavirüs (CoV) tipi (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63, HCoV-229E) insanlarda dolaşımını sürdürmektedir. SARS-CoV 2002-2003 döneminde sınırlı bir süre için dolaşımda kalmış olan beşinci tip insan koronavirüsüdür<sup>1</sup>. *Coronavirinae* alt ailesi içinde *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* ve *Gammacoronavirus* olmak üzere üç cins bulunur. Bilinen beş insan koronavirüsü *Alphacoronavirus* (HCoV-229E ve HCoV-NL63) ve *Betacoronavirus* (HCoV-OC43, HCoV-HKU1 ve SARS-CoV) cinsi içerisindedir<sup>1</sup>. İlk kez 2012 yılında Suudi Arabistan’da tanımlanan MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) ise *Betacoronavirus* cinsi, C kökeni (clade) içeri-sinde yer alan ilk insan koronavirüsüdür<sup>2-4</sup>. Yakın akrabaları HKU4 ve HKU5, *Typonycteris pachypus* ve *Pipistrellus abramus* yarasalar türlerinden izole edilmiştir<sup>5</sup>.

MERS-CoV’un genomu 30.1 kb uzunluğunda olup, en az 10 ORF (Open Reading Frame) bölgesi içermektedir. Bunlardan ORF 1a ve 1b, yüzey glikoproteini (S), küçük zarf proteini (E), matriks proteini (M) ve nükleokapsid (N) proteini kodlar<sup>2,6</sup>. Virüsün hücrel reseptörü dipeptidil peptidaz 4 (DDP4; CD26) molekülüdür ve bu molekül insanlarda özellikle akciğer ve böbrek hücrelerinde bulunmaktadır<sup>7</sup>. Virüs, 20°C’de ve %40 nemli ortamda 48 saat canlı kalabilir; ancak virionlar ısı, lipid çözücüler, iyonik olmayan deter-janlar ve ultraviyole ışığa duyarlıdır<sup>8,9</sup>.

MERS-CoV’un insandan insana bulaşının solunum yolu ve yakın temas ile olduğu düşünülmektedir<sup>8-10</sup>. Virüs, 1-2 haftalık inkübasyon döneminden sonra akut alt solunum yolu enfeksiyonlarına (Severe Acute Respiratory Infections; SARI) neden olmaktadır. MERS hastalarında hafif ya da şiddetli solunum yolu semptomları görülebilir. Ölümle sonuçlanan doğrulanmış olgularda en sık rastlanılan bulgular (%87-98) ateş, öksürük ve nefes darlığı olarak tanımlanmıştır<sup>8,9</sup>. SARS ile kıyaslandığında, MERS olgularında solu-num yetmezliği ve akut böbrek hasarının daha hızlı geliştiği ve MERS-CoV’un doku tropizminin daha geniş olduğu belirtilmektedir<sup>11</sup>. Bu çalışmada, Türkiye’de tespit edilen ilk MERS olgusunun laboratuvar tanısı ve virüsün filogenetik analiz sonuçları sunulmaktadır.

## OLGU ve YÖNTEM

Kırk iki yaşında Cidde’de işçi olarak çalışan Türk vatandaşı, 25-26 Eylül 2014’de ateş ve halsizlik şikâyetleri ile Cidde’de tıbbi bakım almış, ancak durumu kötüleşince Türkiye’ye dönmüştü. Hatay’da 6 Ekim 2014 tarihinde, ateş, halsizlik, solunum yetmezliği, terleme ve öksürük ile bir hastanenin yoğun bakım ünitesine yatırılan hasta, 8 Ekim’de üniversite hastanesine sevk edilmiş ve 11 Ekim’de hayatını kaybetmişti. Olgunun ölümünden önce alınan trakeal aspirat (TA) örneği, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları, Viroloji Bölümü, Ulusal Influenza ve Diğer Solunum Yolu Virüsleri Laboratuvarına gönderildi.

## Moleküler Çalışmalar

Laboratuvarımızda TA örneğinden RNA izolasyonu, Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Almanya) ile internal kontrol eklenerek üreticinin talimatlarına göre yapıldı.

Daha sonra viral nükleik asit amplifikasyonu, gerçek zamanlı multipleks ters transkripsiyonlu polimeraz zincir reaksiyonu (M-RT-PCR) (hCoV-EMC Real-Time RT PCR, Fast Track Diagnostics, Lüksemburg) ile ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, ABD) cihazında üreticinin talimatlarına göre uygulandı.

MERS-CoV konfirmasyonu için, Superscript III One Step RT-PCR kiti (Invitrogen, Life Technologies, ABD) kullanıldı. 12.5 µl 2X reaksiyon tamponu (her dNTP'den 0.4 mM ve 3.2 mM magnezyum sülfat içeren), 1 µl Platinum Taq polimeraz, 0.4 µl magnezyum sülfat, primerler ve probalar [upE gen bölgesi için 400 nM primer upE-Fwd (GCAACGCGGATTGAGTT), upE-Rev (GCCTCTACACGGGACCCATA) ve 200 nM upE-Prob (FAM-CTCTTCACATAATCGCCCCGAGCTCG-TAMRA); ORF1b gen bölgesi için 400 nM primer ORF1b-Fwd (TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT), ORF1b-Rev (TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG) ve 200 nM ORF1b-Prob (FAM-CCCCTAATGCATGTGGCACCAATGT-TAMRA); ORF 1a gen bölgesi için 400 nM Orf1a-Fwd (CCACTACTCCCATTTCGTCAG), Orf1a-Rev (CAGTATGTGTAGTGCGCATATAAGCA) ve 200 nM Orf1a-Prob (FAM-TTGCAAATTGGCTTGCCCCCACT-TAMRA)] kullanılarak üç ayrı tüpte ana karışım hazırlandı. Karışımlara 5 µl RNA eklenerek toplam 25 µl reaksiyon hacminde Real-Time One Step RT-PCR uygulandı<sup>3</sup>.

Dizi analizinde kullanılmak üzere, nükleokapsid (N) ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) gen bölgeleri için hemi-nested PCR çalışıldı<sup>12</sup>. Birinci turda Superscript III One Step RT-PCR kiti kullanıldı. 12.5 µl 2X reaksiyon tamponu (her dNTP'den 0.4 mM ve 3.2 mM magnezyum sülfat içeren), 1 µl Platinum Taq polimeraz, 0.4 µl magnezyum sülfat, RdRp gen bölgesi için 400 nM RdRpSeq-Fwd (TGC TAT WAG TGC TAA GAA TAG RGC; R=A/G, W=A/T) ve RdRpSeq-Rev (GCA TWG CNC WGT CAC ACT TAG G; W=A/T, N=A/C/T/G); N gen bölgesi içinse 400 nM NSeq-Fwd (CCT TCG GTA CAG TGG AGC CA) ve NSeq-Rev (GAT GGG GTT GCC AAA CAC AAA C) primerleri kullanılarak ana karışım hazırlandı ve 5 µl RNA eklenerek toplam 25 µl hacimde çalışıldı. İkinci turda ise RdRpSeq-Rnest (CAC TTA GGR TAR TCC CAW CCC A) ve NSeq-Fnest (TGA CCC AAA GAA TCC CAA CTA C) primerleri kullanılarak Platinum Taq DNA Polymerase kiti (Invitrogen) ile toplam 50 µl hacimde hemi-nested PCR üreticinin talimatlarına göre çalışıldı. Agaroz jel elektoroforezinde RdRp gen bölgesi için 1. turda 242 baz çifti (bç), 2. turda 228 bç büyüklüğünde; N gen bölgesi için 1. turda 306-312 bç, 2. turda 279-285 bç büyüklüğünde bant elde edildi<sup>12</sup>.

DNA dizi analizi, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak üreticinin talimatlarına göre ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) sistemiyle gerçekleştirildi. Elde edilen dizilerin ve referans suşların hizalamaları ClustalW programı ile Mega Software Version.6 ile yapıldı. N geninin filogenetik ağacı, MEGA6'da "Neighbor-joining method substitution model nucleotide p-distance, partial deletion for gap or missing data treatment ve 1000 replicates of bootstrap probabilities" kullanılarak oluşturuldu<sup>13</sup>.

## BULGULAR

Hastanın TA örneğinde viral RNA, hem MERS-CoV'un E proteini (upE), ORF1a ve ORF1b bölgelerini hedefleyen ticari bir kit ile (hCoV-EMC Real-Time RT-PCR, Fast Track

Diagnosics, Luxemburg)), hem de Dünya Sağlık Örgütü’nün referans yöntemi ile çalışılmış ve her ikisi ile de pozitif olarak bulunmuştur.

N gen bölgesinin dizilenen 204 nükleotidlik bölgesi, Londra’da tedavi edilen hastaya ait numune izolatında iki aminoasit delesyonu içermektedir<sup>12</sup>. Bu bölgenin dizilenmesi, aminoasit delesyonunun varlığının araştırılması açısından önem arz etmektedir. Bizim izole ettiğimiz ANK/1079/2014 suşunda bu delesyon bulunmamaktadır. ANK/1079/2014 izolatının kısmi N gen dizisi insan *Betacoronavirus* 2c EMC/2012 suşu ile karşılaştırıldığında, nükleotid ve aminoasit değişimi gözlenmemiştir (Şekil 1). Kısmi N geni dizisinin filogenetik analizine göre ANK/1079/2014 izolatı “clade A”da yer almaktadır (Şekil 2).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, ülkemizde saptanan ilk ithal (importe) MERS olgusu ve moleküler yöntemlerle tanımlanan virusun filogenetik analiz sonuçları sunulmuştur. Eylül 2012-Ağustos 2014 tarihleri arasında bildirilen, laboratuvar tarafından doğrulanmış olgu sayısı 855, ölüm sayısı ise 333 olup, bilinen olguların hepsinin doğrudan ya da dolaylı olarak Arap Yarımadası ülkeleri ile bağlantısı bulunmaktadır<sup>14</sup>. Nitekim diğer ülkelerde de (İngiltere, Almanya, Fransa, İtalya, Yunanistan, Hollanda, Tunus, Cezayir, Malezya, Filipinler ve Amerika) otokton MERS-CoV enfeksiyonları, sadece Orta Doğu (Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Katar, Ürdün, Umman, Kuveyt, Yemen, Lübnan ve İran) ve Arap Yarımadasına seyahat öyküsü olan kişilerde bildirilmiştir<sup>4,10,14</sup>.

MERS-CoV’un moleküler tanısında, UpE gen bölgesinin, gerçek zamanlı PCR için uygun hedef bölge olduğu; ORF1a ve 1b genlerinin ise doğrulama bölgesi olarak kullanıldığı bildirilmektedir<sup>3</sup>. Bu gen bölgeleri için kullanılan primerler, bilinen herhangi bir koronavirus tipi ile çapraz reaksiyon vermemektedir<sup>3</sup>. Diğer taraftan, yüksek oranda korunmuş RdRp gen bölgesi için kullanılan primerler, hCoV-OC43 ve -HKU1 dahil olmak üzere betakoronavirusları; N gen bölgesi için kullanılan primerler ise *Betacoronavirus* “clade C” viruslarını tespit etmektedir<sup>12</sup>. Ayrıca, N gen bölgesinin dizilenen 204 nükleotidlik kısmi dizi analizi ile doğrulama sağlamaktadır<sup>12</sup>. Bizim çalışmamızda da, Corman ve arkadaşları<sup>3,12</sup> tarafından son derece duyarlı ve özgül olduğu bildirilen bu gen bölgeleri hedef olarak seçilmiştir.

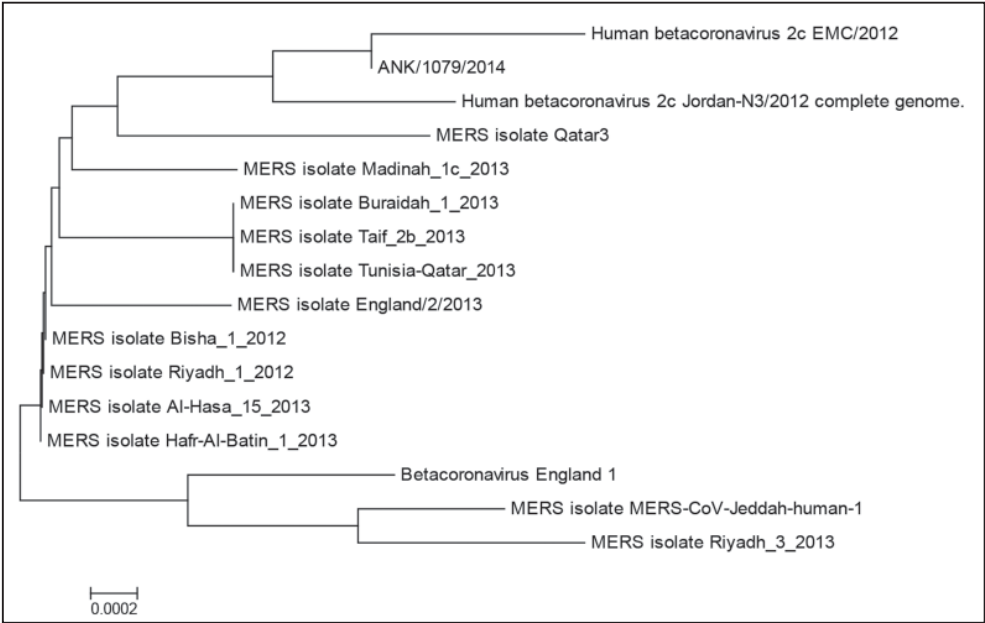
Tek hörgüçlü develerin MERS-CoV için konak olduğu ve insanlara bulaşta önemli rol oynadığı gösterilmiştir<sup>15</sup>. Ürdün, Umman, Katar, Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, Mısır, Etiyopya, Kenya, Nijerya ve Tunus’da tek hörgüçlü develerde yapılan serolojik çalışmalarda, MERS-CoV’na karşı yüksek oranda antikör tespit edilmiştir<sup>16-19</sup>. MERS-CoV’un coğrafi olarak Afrika kıtasında bu hayvanlarda yaygın olduğu düşünülmektedir. Virus, tek hörgüçlü develerde nazal ve dışkı örneklerinden izole edilmiş, ayrıca viral RNA deve sütünde de tespit edilmiştir<sup>20,21</sup>. Tek hörgüçlü develerdeki enfeksiyonun asemptomatik veya hafif solunum yolu bulguları ile seyrettiği bildirilmektedir<sup>15,17,18</sup>.

İnsanlarda MERS-CoV saptanma oranı, alt solunum yollarında üst solunum yollarına nispeten daha yüksektir ve saptanma süresi daha uzundur. Dışkı, idrar ve serum/kan örneklerinde de virus tespit edilmiştir. İnsanlarda, hastalığın başlangıcından 13-30



Human betacoronavirus 2c- EMC/2012	C C A A A G A A T C C C A A C T A C A A T A A G T G G T T G G A G C T T C T T G A G C C A A A A T A T T G A T G C C T A C A A A A C C C T T C C C T A G A A G	[1062]
ANK/1079/2014		[1062]
Betacoronavirus England 1		[1062]
MERS isolate England/2/2013		[1062]
MERS isolate MERS-CoV-Jeddah-Human-1		[1062]
MERS isolate Al-Hesa_15_2013		[1062]
MERS isolate Hahr-Al-Bahrain_1_2013		[1062]
MERS isolate Riyadh_1_2012		[1062]
MERS isolate Riyadh_3_2013		[1062]
MERS isolate Buraidah_1_2013		[1062]
MERS isolate Tall_2b_2013		[1062]
MERS isolate Bischa_1_2012		[1062]
MERS isolate Madinah_1c_2013		[1062]
MERS isolate Tunisia-Qatar_2013		[1062]
MERS isolate Qatar3		[1062]
Human betacoronavirus 2c- Jordan-N3/2012		[1062]
Human betacoronavirus 2c- EMC/2012	G A A A A G A A A C A A A A G G C A C C A A A A G A A G A A T C A A C A G A C C A A A T G T C T G A A C C T C C A A A G G A G C A G C G T G T G C A A G G T	[1170]
ANK/1079/2014		[1170]
Betacoronavirus England 1		[1170]
MERS isolate England/2/2013		[1170]
MERS isolate MERS-CoV-Jeddah-Human-1		[1170]
MERS isolate Al-Hesa_15_2013		[1170]
MERS isolate Hahr-Al-Bahrain_1_2013		[1170]
MERS isolate Riyadh_1_2012		[1170]
MERS isolate Riyadh_3_2013		[1170]
MERS isolate Buraidah_1_2013		[1170]
MERS isolate Tall_2b_2013		[1170]
MERS isolate Bischa_1_2012		[1170]
MERS isolate Madinah_1c_2013		[1170]
MERS isolate Tunisia-Qatar_2013		[1170]
MERS isolate Qatar3		[1170]
Human betacoronavirus 2c- Jordan-N3/2012		[1170]
Human betacoronavirus 2c- EMC/2012	A G C A T C A C T C A G C G G C A C T C G C A C C C G T C C A A G T G T T C A G C C T G G T C C A A T G A T T G A T T A A C A C A C T G A T T A G	[1242]
ANK/1079/2014		[1242]
Betacoronavirus England 1		[1242]
MERS isolate England/2/2013		[1242]
MERS isolate MERS-CoV-Jeddah-Human-1		[1242]
MERS isolate Al-Hesa_15_2013		[1242]
MERS isolate Hahr-Al-Bahrain_1_2013		[1242]
MERS isolate Riyadh_1_2012		[1242]
MERS isolate Riyadh_3_2013		[1242]
MERS isolate Buraidah_1_2013		[1242]
MERS isolate Tall_2b_2013		[1242]
MERS isolate Bischa_1_2012		[1242]
MERS isolate Madinah_1c_2013		[1242]
MERS isolate Tunisia-Qatar_2013		[1242]
MERS isolate Qatar3		[1242]
Human betacoronavirus 2c- Jordan-N3/2012		[1242]

Şekil 1. ANK/1079/2014 izolatının kısmi N geni dizisinin referans suşlar ile karşılaştırılması (noktalar benzer aminoasitleri göstermektedir).



Şekil 2. ANK/1079/2014 izolatının filogenetik ağacı (p-distance, partial deletion for gap or missing data treatment ve 1000 replicates of bootstrap).

güne kadar viral RNA saptanabilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, idrarda 30 gün, oronazal sürüntü örneklerinde 22 gün, trakeal aspirat örneklerinde 30 gün ve dışkıda 16 güne kadar viral RNA varlığı gösterilmiştir<sup>22-25</sup>. Dolayısıyla tanı için hem üst hem de alt solunum yolu örnekleri alınmalı; yüksek viral yük içeren bronkoalveoler lavaj, balgam ve trakeal aspirat gibi alt solunum yolu örnekleri tercih edilmelidir. Eğer imkân varsa viremi süresini ve viral yayılımı tespit etmek için dışkı ve idrar örnekleri de alınmalı ve tekrarlanan örnekleme yapılmalıdır<sup>26</sup>.

Orta Doğu ve Avrupa'da virusun kişiden kişiye bulaşının, hastane, ev ve işyeri ortamlarında olduğu gösterilmiş; yakın temaslar dışında bulaşın olmadığını bildirilmiştir<sup>10</sup>. Ortadoğu'dan Fransa, İngiltere, İtalya, Almanya ve Tunus'a seyahat eden olgularda bulaşın yakın temasla sınırlı olduğu vurgulanmaktadır<sup>27-29</sup>. Yapılan çalışmalar, insan ve develerden elde edilen viral genom dizilerinin çoğunun birbirleriyle benzer olduğunu göstermektedir. İnsan olgularında ilk olarak tespit edilen viral genomlar diğerlerinden farklıdır ve "clade A"da (EMC/2012 ve Jordan-N3/2012) yer almaktadır. Tek hörgüçlü develerden ve insanlardan elde edilen diğer viral genomlar ise "clade B" içerisinde<sup>30,31</sup>. Çalışmamızda tanımlanan ANK/1079/2014 izolatında da, kısmi N geni dizi analizine göre aminoasit değişimi gözlenmemiş ve diğer referans suşlarla benzer olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak, virülansının SARS-CoV'den daha yüksek olduğu anlaşılan MERS-CoV ile ilgili çalışmalar uluslararası düzeyde devam etmekte ve hastalığın patogenezini, klinik özellikleri ve epidemiyolojisi aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

**KAYNAKLAR**

1. Robinson CC. Respiratory viruses, pp: 203-48. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, Wiedbrauk DL (Eds), *Clinical Virology Manual*. 2009, 4<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington D.C.
2. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367(19): 1814-20.
3. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 2012; 17(39). pii: 20285.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Severe respiratory disease associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Eleventh update, 21 August 2014. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Middle-East-respiratory-syndrome-coronavirus-Saudi%20Arabia-Qatar-Jordan-Germany-United-Kingdom.pdf>.
5. Drexler JF, Corman VM, Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res* 2014; 101: 45-56.
6. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 2012; 3(6). pii: e00473-12.
7. Raj VS, Mou H, Smits SL, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* 2013; 495(7440): 251-4.
8. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, 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(9): 752-61.
9. Assiri A, McGeer A, Perl TM, et al. Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *N Engl J Med* 2013; 369(5):407-16.
10. Al-Tawfiq JA, Memish ZA. Middle East respiratory syndrome coronavirus: epidemiology and disease control measures. *Infect Drug Resist* 2014; 7: 281-7.
11. van den Brand JM, Smits SL, Haagmans BL. Pathogenesis of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Pathol* 2015; 235(2): 175-84.
12. Corman VM, Muller MA, Costabel U, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 2012; 17(49). pii: 20334.
13. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; 30(12): 2725-9.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Factsheet for health professionals. <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/coronavirus-infections/mers-factsheet/Pages/default.aspx>
15. Chu D, Poon L, Gomaa M, et al. MERS coronaviruses in dromedary camels, Egypt. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(6): 1049-53.
16. Meyer B, Muller MA, Corman VM, et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(4): 552-9.
17. Hemida MG, Chu DK, Poon LL, et al. MERS coronavirus in dromedary camel herd, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(7): 1231-4.
18. Alagaili AN, Briese T, Mishra N, et al. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. *MBio* 2014; 5(2): e00884-14.
19. Corman VM, Jores J, Meyer B, et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, Kenya, 1992-2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(8): 1319-22.
20. van Doremalen N, Bushmaker T, Karesh WB, Munster VJ. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus in milk. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(7): 1263-4.
21. Reusken CB, Farag EA, Jonges M, et al. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Euro Surveill* 2014; 19(23). pii: 20829.



22. Bermingham A, Chand MA, Brown CS, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill* 2012; 17(40). pii: 20290.
23. Reusken CB, Ababneh M, Raj VS, et al. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) serology in major livestock species in an affected region in Jordan, June to September 2013. *Euro Surveill* 2013; 18(50):20662.
24. Guery B, Poissy J, el Mansouf L, et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet* 2013; 381(9885):2265-72.
25. Perera RA, Wang P, Gomaa MR, et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro Surveill* 2013; 18(36). pii: 20574.
26. World Health Organization. Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. Interim recommendations. September 2013, WHO, Geneva. Available from: [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/MERS\\_Lab\\_recos\\_16\\_Sept\\_2013.pdf](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_Lab_recos_16_Sept_2013.pdf).
27. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeh AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *N Engl J Med* 2013; 368(26): 2487-94.
28. Puzelli S, Azzi A, Santini M, et al. Investigation of an imported case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) infection in Florence, Italy, May to June 2013. *Euro Surveill* 2013; 18(34). pii: 20564.
29. Memish ZA, Zumla AI, Assiri A. Middle East respiratory syndrome coronavirus infections in health care workers. *N Engl J Med* 2013; 369(9): 884-6.
30. Cotten M, Watson SJ, Kellam P, et al. Transmission and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus in Saudi Arabia: a descriptive genomic study. *Lancet* 2013; 382(9909):1993-2002.
31. Cotten M, Watson SJ, Zumla AI, et al. Spread, circulation, and evolution of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *MBio* 2014; 5(1). pii: e01062-13.