

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜRKİYE'DE SARS-COV-2'NİN TÜM GENOM DİZİLEME

Nejat Siraj Mohammed

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. Abdurahman Mithat Bozdayı

Temmuz

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Nejat Siraj Mohammed

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Türkiye’de SARS-CoV-2’nin Tüm Genom Dizileme

Nejat Siraj Mohammed

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Abdurahman Mithat Bozdayı

SARS CoV-2, hafif ila agresif solunum sistemi enfeksiyonlarından sorumlu olan RNA virüsüdür. Aralık 2019'dan günümüze kadar bu virüs yaklaşık 173 Milyon insanın morbiditesine ve 3.72 Milyon insanın mortalitesine neden oldu. Bu çalışmanın amacı Türkiye'deki hastalardan izole edilen viral suşların tüm genom dizilimini yapmaktır. Sekanslama işlemi, Illumina Iseq 100'de PARAGON Cleanplex sekanslama paneli kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda 72 örnekler sekanslanabildi ve toplam 84 mutasyon rapor edilmişti. En yaygın görülen nükleotid varyasyonu, genomun ORF1ab, S ve N bölgelerinde mevcuttu. Bu varyasyonlardan bazıları eşanlamlı olmayan amino asit mutasyonları ile sonuçlanmıştır. Çalışmamızda en sık görülen amino asit mutasyonlarından biri olan D614G çoğu örneklerde 14408C>T ve 3037C>T ile birlikte bulunmuştur. Bu birlikte var olan mutasyonlar son zamanlarda Avrupa'da en sık gözlenen varyantlardan birinin karakteristiği olarak tanımlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilen veriler, açıklanan mutasyonların ilaca dirençli viral fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olup olmayacağını görmek için kullanılabilir. Bu mutasyonlar ayrıca virüsün patojenitesini, geçişini ve replikasyon oranını da etkileyebilir. Bu nedenle, mutasyonların kesin sonucunu analiz etmek ve virüsün devam eden evrimini izlemek için daha fazla değerlendirme yapılması önermektedir.

2021, 93 sayfa.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, Mutasyonlar, Genom, Tüm genom dizileme, Filogenetik analizi.

ABSTRACT

MSc Thesis

Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2 Isolates In Turkey

Nejat Siraj Mohammed

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Abdurahman Mithat Bozdayı

SARS CoV-2 is the RNA virus responsible for mild to aggressive respiratory infections. From December 2019 to the present, the virus has caused the morbidity of about 173 million and the mortality of 3.74 million people worldwide. The aim of this study was to perform full genome sequencing of viral strains isolated from patients in Turkey. Sequencing was performed using the PARAGON Cleanplex sequencing panel in the Illumina Iseq 100. A total of 72 viral strains were sequenced and a total of 84 mutations were reported. The most common nucleotide variation was present in the ORF1ab, S, and N regions of the genome. Some of these variations have resulted in amino acid mutations that are not synonymous. In this study, one of the most commonly reported mutation was D614G. In many samples, this mutation was frequently found together with 14408C>T and 3037C>T. These co-existing mutations have recently been identified as characteristic of one of the most commonly observed variants in Europe. In conclusion, the data from this study could be used to see if the mutations described would lead to the emergence of drug-resistant viral phenotypes. These mutations can also affect the pathogenicity, transmission and replication rate of the virus. Therefore, more detailed research is recommended to assess the exact outcome of these mutations and monitor the ongoing evolution of the virus.

2021, 93 pages

Key words: SARS-CoV-2, Mutations, Genome, Whole Genome Sequencing, Phylogenetic analysis.

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın gerekleőmesinde değerli bilgilerini paylaşan, bilim ve araştırma ynnde gsterdiği her yolun hayatıma kattığı nemini asla unutmayaağım saygıdeğer danışman hocam; sayın Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'na sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Bu tez alıőmasında Ankara Üniversitesi Teknokentte'ki MOTAKK laboratuvarında alıőanlarına özellikle sayın Ahmet Turkyılmaz ve zlem Esen'e iőbirliklerinden dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURUMSAL TEMELLER	2
2.1. SARS COV-2 MORFOLOJİSİ VE FİZYO-KİMYASAL ÖZELLİKLERİ	2
2.1.1. VİRÜSÜN KÖKENİ	3
2.2. SARS COV-2 VİRÜSÜNÜN GENOMİK YAPISI VE ORGANİZASYONU	4
2.3. SARS-COV-2 GENOTİPLERİ _____	8
2.4. SARS COV-2'NİN BULAŞMA ŞEKLİ VE PATOLOJİSİ _____	15
2.4.1. VİRÜSÜN BULAŞMA YOLLARI	15
2.4.2. SARS-COV-2'NİN KONAKÇI HÜCRELERE GİRİŞİ VE PATOLOJİ ..	16
2.4.3. SARS-COV-2 BELİRTİLERİ	18
2.5. SARS-COV-2 TEDAVİ SEÇENEKLERİ _____	19

2.5.1.	SARS-COV-2 İÇİN AŞI GELİŞTİRME	19
2.6.	SARS COV-2'NİN LABORATUVAR TANISI	21
2.6.1.	SARS COV-2 TESPİTİ İÇİN TERS TRANSKRİPSİYON GERÇEK ZAMANLI PCR	23
2.6.2.	TERS TRANSKRİPSİYON DÖNGÜ ARACILI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (RT-LAMP)	23
2.6.3.	CRISPR - CAS TABANLI TANI YÖNTEMLERİ.....	24
2.6.4.	SARS COV-2 SEROLOJİK TESTLER	24
2.6.5.	VİRAL HÜCRE KÜLTÜRÜ	25
2.6.6.	TÜM GENOM DİZİLEME	25
2.7.	SARS-COV-2 İLE RE-İNFEKSİYON	26
3.	<u>GEREKÇE VE AMAC</u>	27
4.	<u>MATERYAL VE YÖNTEM</u>	29
4.1.	MATERYAL:	29
4.2.	YÖNTEMLER:	30
4.2.1.	cDNA HAZIRLAMASI.....	30
4.2.2.	RT SONRASI PURİFİKASYONU	31
4.2.3.	MULTİPLEKS PCR REAKSİYONU	32
4.2.4.	DİGESTİON REAKSİYONU	33
4.2.5.	İKİNCİ PCR REAKSİYONU.....	34

4.2.6.	PÜRİFİKASYON SONRASI KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ	35
4.2.7.	ÖRNEK HAVUZ HAZIRLAMA VE ILLUMİNA ISEQ 100 İLE DİZİLEME	35
4.2.8.	MOLEKÜLER KARAKTERİZASYON VE FİLOGENETİK ANALİZİ.	36
5.	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	37
5.1.	NUMUNELERİN DİZİLEME KALİTESİ VE MİKTARI _____	37
5.2.	DİZİLERDEKİ NÜKLEOTİD VARYASYONLARININ ANALİZİ _____	41
5.3.	DİZİLERDEKİ AMİNO ASİT MUTASYONLARININ ANALİZİ _____	47
5.4.	DİZİLERİN SOY SINIFLANDIRMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ _____	52
6.	<u>TARTIŞMA VE SONUC</u>	54
6.1.	TARTIŞMA _____	54
6.1.1.	NUMUNELERİN DİZİLEME KALİTESİ VE MİKTARI	54
6.1.2.	DİZİLERDEKİ NÜKLEOTİD VARYASYONLARININ ANALİZİ.....	54
6.1.3.	DİZİLERDEKİ AMİNO ASİT MUTASYONLARININ ANALİZİ.....	57
6.1.4.	DİZİLERİN SOY SINIFLANDIRMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ.	59
6.2.	SONUÇ _____	59
	<u>KAYNAK LİSTESİ</u>	61
	<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	74
	<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan Koronavirüslerinin sınıflandırılması (12).....	2
Şekil 2.2. SARS CoV-2 yapısı (13)	3
Şekil 2.3.SARS CoV-2'nin genomik organizasyonu (10).....	5
Şekil 2. 4. Akciğerin alveolar hücresinde SARS-CoV-2'nin girişi, replikasyonu ve salınması (60).....	17
Şekil 2.5. Covid-19'un ana semptomları (65).....	18
Şekil 2.6. COVID-19'a karşı halihazırda kullanılan aşılarından bazıları ve etkileri (67)	21
Şekil 5. 1. Sekanslı örneklerde nükleotid varyasyonlarının paternleri ve sıklığı	455
Şekil 5. 2. ORF1ab genindeki nükleotid varyasyonlarının dağılımı	466
Şekil 5. 3. SARS-CoV - 2 genomunda amino asit mutasyonlarının dağılımı	48
Şekil 5. 4. ORF1ab geninde Amino asit mutasyonlarının dağılımı	488
Şekil 5. 5. S genindeki Amino asit mutasyonları ve sıklığı	51
Şekil 5. 6. Örneklerin filogenetik analizi	533

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. SARS-CoV-2'nin yapısal olmayan proteinleri ve önerilen işlevleri (26)	7
Çizelge 2. 3. Endişe verici varyantlarının isimlendirilmesi.	12
Çizelge 2. 4. İlgilenilen varyantlardan ayrıntılı listesi (36).....	13
Çizelge 2. 5. İzleme altındaki varyantların listesi (36)	14
Çizelge 4. 1. Analiz için gerekli malzemelerin listesi	29
Çizelge 5. 1. Illumina Iseq 100'den elde edilen örneklerin dizileme derinliği ve kapsamı .	38
Çizelge 5. 3. Nükleotid eklemeleri ve silmeleri ve genomdaki ilgili yerleri	47
Çizelge 5. 4. ORF1ab'deki Amino asit mutasyonları ve gendeki ilgili yerleri.....	50
Çizelge 5. 5. N ve ORF3a'daki Amino asit mutasyonları ve sıklığı	52

SİMGELER DİZİNİ

2019-nCoV	2019-New Corona virus
ACE2	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
ADAR	Çift sarmallı RNA'ya özgü adenosin deaminaz
APOBEC	Apolipoprotein B Mrna katalitik polipeptit benzeri Düzenleme Enzimi
ARDS	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
BcoV	Yarasa koronavirüsü
BioNTech	Biyofarmasötik Yeni Teknolojiler
BSL2	Biyogüvenlik seviyesi 2 Laboratuvarlar
CAS 12a	Crispr ilişkili protein 12a
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
cDNA	Complementary DNA
CRISPR	Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri
CTD	C-terminal alanı
DENV	Dang virüsü
DEPC	Dietilpirokarbonat
DETECTTR	Endonükleaz hedefli CRISPR Transporter
DMV	Çift Membranlı Veziküllerde
DNA	Deoksi ribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

E	Envelope protein
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Tahlili
FAM	6-karboksifloresein
Fosun Pharma	Shanghai Fosun Farmasötik Grubu
GISAID	Tüm Grip Verilerini Paylaşma Küresel Girişimi
HAT	İnsan Hava yolu Tripsin
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
IFN- α	Alfa İnterferon
IFN- γ	Gamma İnterferon
IL-12	İnterleukin 6
IL-18	İnterleukin 18
IL-1 β	İnterleukin Beta 1
IL-6	İnterleukin 6
M	Membran protein
MEGA	Moleküler Evrimsel Genetik Analiz
MERS	Orta Doğu Solunum Sendromu
N	Nükleokapsid protein
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
NGS	Yeni Nesil Dizileme
nM	Nanomolar

NSP3	Yapısal olmayan Protein 3
NTD	N-terminal alanı
ORF	Açık okuma çerçeveleri
PANGOLIAN	Adlandırılmış Küresel Salgın Soylarının Filogenetik Ataması
pM	Picomolar
RBD	Reseptör Bağlanma Alanında
RNA	Ribo nükleik asit
rRT-PCR	Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTC	Replikasyon-Transkripsiyon Kompleksinin
RT-LAMP	Ters Transkripsiyon Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon
RT-qPCR	Ters Transkripsiyon Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	Başak proteini
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SHERLOCK	Spesifik Yüksek Hassasiyetli Enzimatik Muhabir Kilitini
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
TMPRSS-2	Transmembran Proteaz Serin Proteaz-2
TMPRSS-4	Transmembran Proteaz Serin Proteaz-4
TNF	Tümör Nekrosis Faktör
ZIKV	Zika Virüsü

1. GİRİŞ

Endemik, epidemik ve pandemi, enfeksiyonları ve diğer sağlık sorunlarını tanımlamak için kullanılan terimlerdir. Bir hastalığa, belirli bir süre boyunca vaka sayısına ve coğrafi dağılıma bağlı olarak bu terimlerden biri verilir (1). Hastalık salgını, bir hastalığın beklenen normal miktardan daha fazla ortaya çıkmasıdır. Hastalık salgınlarına genellikle enfeksiyon neden olur (2). Bir salgındaki vaka sayısı, kişiden kişiye temas, hayvandan insana temas veya çevreden veya diğer ortamlardan oluşan hastalığın bulaşma şekline ve nedensel ajanın özelliklerine bağlıdır (3). Epidemik, daha geniş bir coğrafi alana yayılan salgındır. Brezilya'da başlayan ve birçok Latin Amerika ülkesine yayılan Zika virüsü salgını ve 2014 ile 2016 yılları arasında Batı Afrika'da meydana gelen Ebola epidemik örnek olarak verilebilir (1).

Pandemik, ülkelere veya kıtalara yayılan hastalık salgınıdır. Etkilediği kişi sayısı ve coğrafi dağılımı epidemiden daha fazladır (3).Pandemilere genellikle hızlı bir şekilde yayılan yeni bulaşıcı ajanlar (bakteri veya virüsler) neden olur. 2009 domuz gribi salgını ve 1918 İspanyol gribi salgını, geçmiş yılların iyi bilinen salgınlarından bazılarıdır (4).

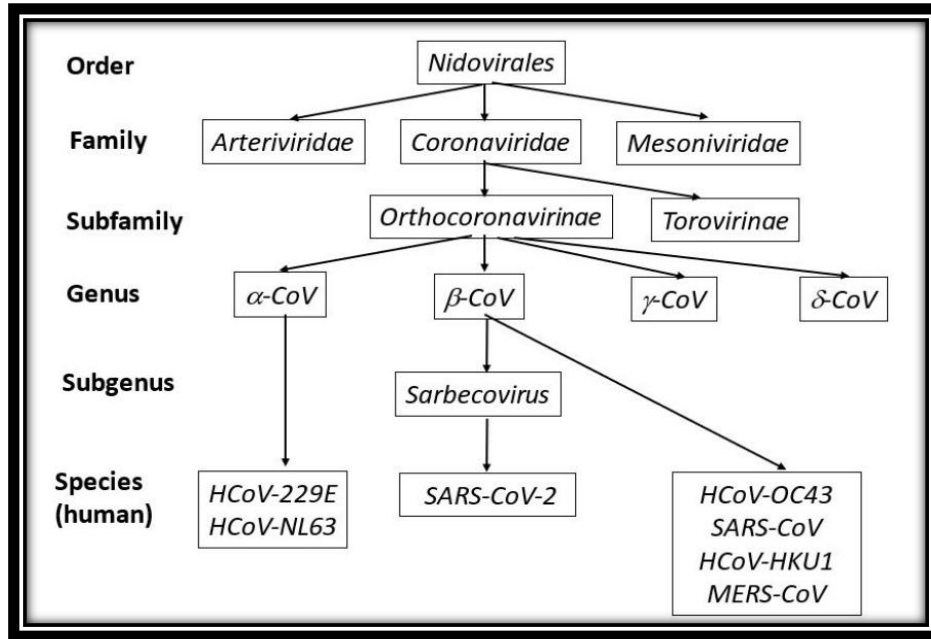
Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde Koronavirüslerin neden olduğu düşünülen yeni bir pnömoni vakası görüldü. Bu Koronavirüs, başlangıçta Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 12 Ocak 2020'de 2019 yeni Koronavirüs (2019-nCoV) olarak adlandırıldı ve O zamandan beri virüs dünyanın her köşesinde görülmektedir (5). Tanımlanmasından birkaç ay sonra, virüs dünyanın birçok yerine yayılıp mortalite ve morbiditenin artmasına neden oldu. Bu nedenle, 11 Mart 2020'de DSÖ bu hastalığı pandemik olarak sınıflandırdı (6). İlk vakanın tespit edilmesinden bu yana virüs dünya çapında çok hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Aralık 2019'dan günümüze kadar bu virüs yaklaşık 173 Milyon insanın morbiditesine ve 3.72 Milyon insanın mortalitesine neden oldu (7)

2. KURUMSAL TEMELLER

2.1. SARS COV-2 MORFOLOJİSİ VE FİZYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

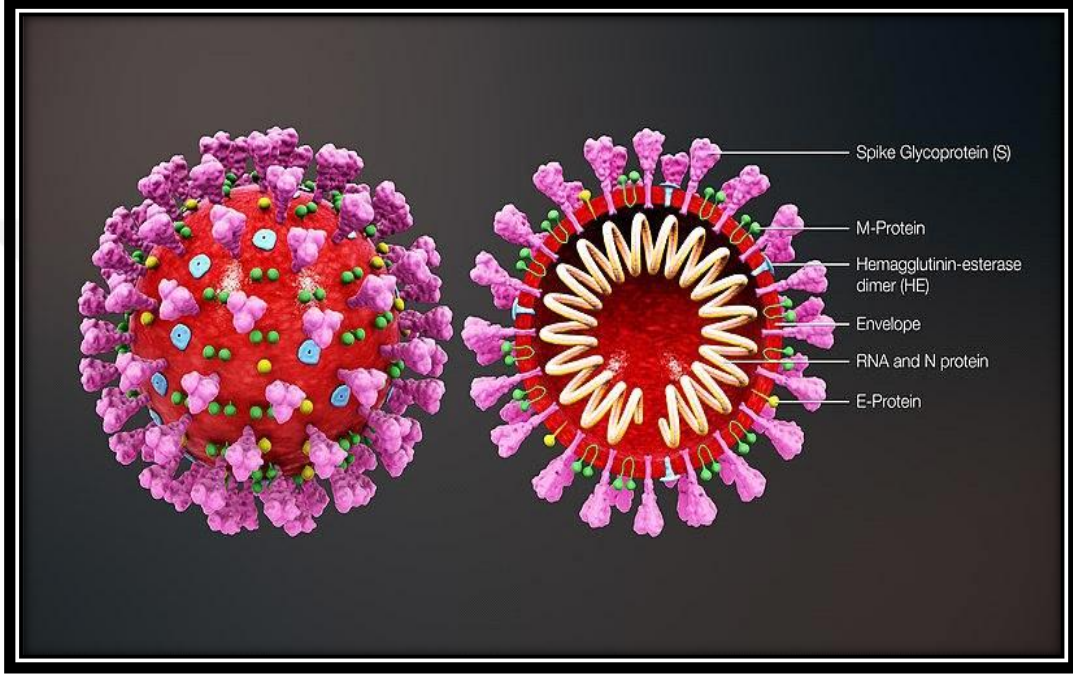
Koronavirüsler, *Coronaviridae* ailesindeki *Coronavirinae* alt ailesinin üyeleridir (8). Bu alt aile ciddi insan solunum yolu hastalığına neden olan üyeler virüsler Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) içermektedir (9). Bu virüs grubu ayrıca insanlarda, kuşlarda, çiftlik hayvanlarında ve yarasa ve fare gibi vahşi hayvanlarda gastrointestinal, hepatik ve sinir sistemi enfeksiyonlarına neden olabilir (10). Koronavirüs ailesi, filogenetik analizlere ve antijenik kriterlere göre üç grupta kategorize edilmiştir:

- A. Alpha- Koronavirüsler (İnsanlar ve hayvanlarda gastrointestinal bozukluklardan sorumlu olan grup).
- B. Beta- Koronavirüsler (Yarasa koronavirüsü (BCoV), SARS virüsü ve MERS virüsü)
- C. Gamma- Koronavirüsler (kuşlara enfekte eden) (8).



Şekil 2.1. İnsan Koronavirüslerinin sınıflandırılması (12)

SARS-CoV-2, matris proteininden oluşan bir kapsid içindeki bir nükleoprotein ile ilişkili tek sarmallı (pozitif-sens) RNA içeren 70-90 nm çapında, küresel zarflı bir virüstür (11).



Şekil 2.2. SARS CoV-2 yapısı (13)

2.1.1. VİRÜSÜN KÖKENİ

Yirmi dört Ocak'ta SARS-CoV-2'nin ilk genomu yayınlandı ve virüsün (SARS-CoV) ile çeşitli genomik ve filogenetik benzerliklere sahip olduğunu ortaya çıkardı. Bu benzerlik, S geni ve Reseptör Bağlanma Alanında (RBD) belirgindir (15). Virüsün genomik dizisi SARS-CoV ile % 75-80 benzerlik gösterse de, bazı yarası Koronavirüsleri (özellikle SARSr-CoV RaTG13) ile daha fazla benzerlik görülmektedir (12).

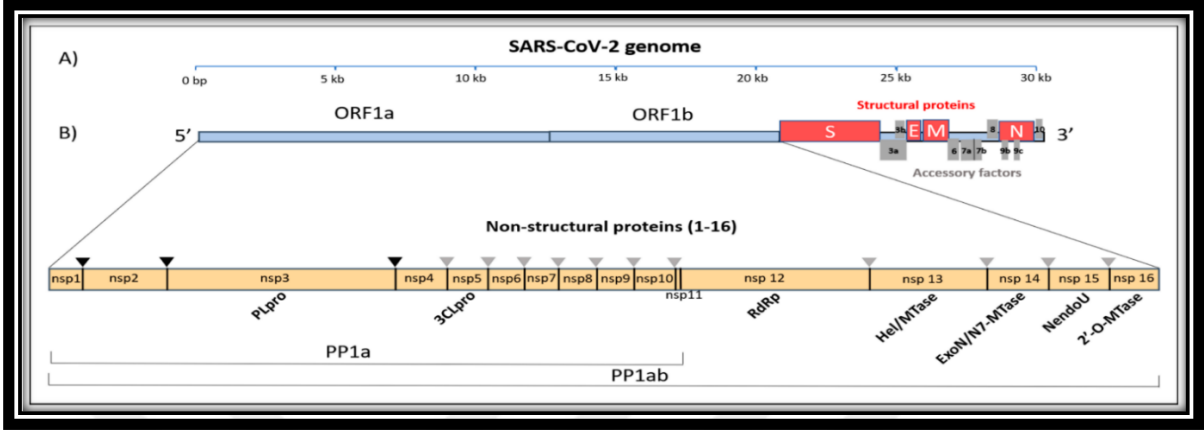
Protein dizilerine ve korunmuş bölgelerine göre SARS-CoV-2, yarası CoV bat-SL-CoVZXC21, yarası SARS Koronavirüs HKU 3-1 ve SARS gibi farklı korona virüsü türleri arasındaki benzerliği incelemek için bir çalışma yapılmıştır. Çalışmaya göre, SARS CoV-2 ve Bat - SL - CoVZXC21 arasında tüm proteinler için diğer iki virüse göre yakın bir homoloji

vardır. SARS CoV-2 protein sekanslarının %91.1'i Bat- SL - CoVZXC21 protein sekansı ile benzemektedir. Onun yerine, HKU 3-1 ile %79.7 ve SARS CoV protein sekansları ile %77,1' benzemektedir (8). Buna ek olarak, diğer çalışmalar, RaTG13 olarak adlandırılan bir *Rhinolophus affinis* yarasasından elde edilen virüsün nükleotid sekans seviyesinde SARS-CoV-2'ye yaklaşık %96 benzer olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, SARS-CoV-2 ve RaTG13, S proteininin S1 ve S2 alt birimlerinin kesişimlerindeki eklemeler dahil olmak üzere bazı genomik özelliklerde farklılık gösterir. Virüsün enfektivitesini arttırdığı düşünülen Polibazik (furin) bölünme bölgesi insersiyonu RaTG13'te mevcut değildir (13).

Başka bir çalışma, SARS-CoV-2'nin kodlama bölgelerinin yarası Koronavirüsleri benzer bir genomik organizasyona sahipken, SARS-CoV ile %79 ve MERS-CoV ile %50 genetik benzerliğe sahip olduğunu ortaya koydu. Bu nedenle, SARS-CoV-2'nin MERS-CoV'ye göre SARS-CoV ile daha yapısal ve patojenik benzerlikler taşıdığı sonucuna varılabilir. Ancak, SARS-CoV-2'nin S proteininin, yarası koronavirüsleri, SARS-CoV ve MERS-CoV'nin S proteinlerine kıyasla daha uzun olduğunu bildirilmiştir (14).

2.2. SARS COV-2 VİRÜSÜNÜN GENOMİK YAPISI VE ORGANİZASYONU

Koronavirüsler, 5' cap yapısı ve 3' poly - A kuyruğu olan tek sarmallı bir pozitif anlamlı RNA'ya sahiptir (10). Bu virüs grubu, RNA virüsleri arasında 26.4-31.7kb olan en büyük genoma sahiptir ve G + C konsantrasyonları %32-%43'e ulaşır. Virusun genomu, ORF1ab, Başak (S), zarf (E), Membran (M) ve Nükleokapsid (N) gibi bazı korunmuş genleri içermektedir. Genlerin arasında ve nükleokapsid geninin aşağısında bulunan küçük ORF'leri de içermektedir (15). Virüs, poliprotein 1a / 1ab'yi çevirmek için genomik RNA'yı kullanır. Bu poliproteinler, Çift Membranlı Veziküllerde (DMV) Replikasyon-Transkripsiyon Kompleksinin (RTC) oluşumunda rol alan yapısal olmayan proteinleri kodlar (10).



Şekil 2.3.SARS CoV-2'nin genomik organizasyonu (10)

Transkripsiyonun sonlandırılması ve ardından bir lider RNA'nın edinilmesi, subgenomik haberci RNA'nın transkripsiyon düzenleyici sekanslarında meydana gelir. Bu, açık okuma çerçeveleri (ORF'ler) arasında bulunmaktadır. Virüsün genomu ve alt genomları en az 6 ORF içermektedir (16). Virüsün konakçı hücreye girmesinden sonra, Yapısal Olmayan Proteinler (NSP) ORF1a ve ORF1b'nin çevrilmesiyle üretilir (10). ORF1a tarafından üretilen polipeptit 1a, yapısal olmayan 11 proteine bölünür. ORF 1b, yapısal olmayan 15 proteine bölünen daha büyük bir polipeptit üretir. Bu süreçte, Papain benzeri ve 3C benzeri proteaz alanları içeren proteazlar Yapısal olmayan Protein 3 (NSP3) ve NSP5, proteolitik bölünmeye aracılık eder (17).

Koronavirüslerin dört ana yapısal proteini vardır. Bunlar Nükleokapsid proteini (N), Transmembran proteini (M), Zarf proteini (E) ve Başak (S) proteindir. Nükleokapsid proteini, RNA genomuna bağlanma işlevi gören Koronavirüslerinin yapısal bileşenidir (18). Bu protein yüksek oranda fosforillenmiştir ve bir N-Terminal Alanı (NTD) ve C-Terminal Alanı (CTD) içerir (19). N proteini genellikle viral replikasyon döngüsünde işlev görür (20). Endoplazmik retikulum-golgi bölgesine yakınlığı nedeniyle, bu proteinin virüsün tomurcuklanması ve toplanmasında işlev görebileceği ileri sürülmektedir (21). Bununla birlikte, bazı araştırmalarda, N'nin geçici ekspresyonunun, bazı Koronavirüslerde Virüs Benzeri Partiküllerin (VLP'ler) üretimini önemli ölçüde artırabileceği gösterilmiştir. Bu, proteinin viryon oluşumunun tamamı için kullanılabileceğini gösterebilir.

Virüsün integral bir membran proteini olan Koronavirüs Membran (M) proteini, viral birleşmede önemli bir rol oynar. Koronavirüsün genomunu kapsüllemek ve apoptozu indüklemek için, bu proteinin N proteini ile etkileşime girmesi gerekir (22). Bu protein, Koronavirüslerde en bol bulunan proteindir. M proteinleri arasındaki etkileşimler, viryon zarfı oluşumu için önemli olabilir, ancak tam bir viryon oluşumu elde etmek için M proteininin, virüsün kalan yapısal proteinleri ile bazı etkileşimlere girmesi gerekir (23). Örneğin, S'nin M proteinleri ile etkileşimi, S'nin ER-Golgi ara bölmesinde tutulması ve yeni viryonlara dahil edilmesi için gereklidir (18). Buna ek olarak, M proteini, nükleokapsidi ve virionun iç çekirdeğini stabilize etmek için N proteini ile bağlanmalıdır. M ve E proteinleri arasındaki etkileşim ve yukarıda belirtilen etkileşimler daha sonra viral birleşmenin tamamlanmasına, virüsün üretilmesine ve VLP'lerin salınmasına yol açar (24).

Tüm yapısal proteinler arasında en önemlisi, virüsün konakçı hücrelere bağlanmasından sorumlu olan Başak (S) glikoproteindir. Endoplazmik retikulumla girmek için, S proteini, yoğun şekilde glikosile edilmiş N-terminal sinyal dizisini kullanır (23). Koronavirüslerde, S proteinleri sınıf I viral füzyon proteinleridir ve aktive edilmeleri için bölünmeleri gerekir (20). Çoğu koronavirüsde, S, bir konak hücre proteazı tarafından, S1 ve S2 olarak adlandırılan iki ayrı polipeptide bölünür. Daha büyük olan S1 polipeptidi, bir reseptör bağlanma alanı olarak işlev görürken, S2, sivri uçların sapıdır (19).

Virüs suşlarına ve hücre tiplerine bağlı olarak, Koronavirüs S proteinleri, Furin, Tripsin, Katepsinler, Transmembran Proteaz Serin Proteaz-2 (TMPRSS-2), TMPRSS-4 veya İnsan Hava yolu Tripsin (HAT) dahil olmak üzere bir veya birkaç konakçı proteaz tarafından parçalanabilir. Bu proteazların hedef hücreler üzerindeki varlığı, virüsün hücrelere plazma membranı veya endositoz yoluyla girip giremeyeceğini belirler (25). SARS-CoV ve SARS-CoV-2'de, TMPRSS2, S proteininin hazırlanmasından sorumludur ve Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2), virüslerin girişi için bir reseptör görevi görür (23).

8,4 ile 12 kilo Dalton (Kda) arasında değişen 76-109 amino asitlik entegre bir zar proteini olan E proteini, SARS-CoV-2 dahil olmak üzere Koronavirüslerin en küçük yapısal proteindir (11).

Protein çoğunlukla endoplazmik retikulum, golgi ve ER-Golgi ara maddesinde bulunur (8). Bazı araştırmalara göre bu protein, M proteininin sitoplazmik kuyrukları ile etkileşime girerek viral birleşmede yer alır. Ayrıca hidrofobik transmembran alanının virüs salımı için gerekli olduğu ve virüsün patogenezinde yer aldığı varsayılmaktadır (20).

Çizelge 2.1. SARS-CoV-2'nin yapısal olmayan proteinleri ve önerilen işlevleri (26)

No.	Ad	Amino asitler	Önerilen İşlev
1.	NSP1	180	Konakçı mRNA bölünmesini indükler
2.	NSP2	638	PHB 1, 2'ye bağlanır
3.	NSP3	1945	Papain benzeri proteinaz aktivitesi
4.	NSP4	500	Membran yeniden düzenlenmesi
5.	NSP 5	306	3C benzeri proteinaz
6.	NSP 6	290	Otofagozom üretir
7.	NSP 7	83	NSP8 ile dimerleşir
8.	NSP 8	198	NSP12'yi uyarır
9.	NSP 9	113	Helikaza bağlanır
10.	NSP 10	139	NSP16'yı uyarır
11.	NSP 11	13	Bilinmeyen
12.	NSP 12	932	Viral RNA polimeraz metilasyonunu (guanin) kopyalar
13.	NSP 13	601	Dubleks RNA'yı (Helicase) çözer
14.	NSP 14	527	3'-5'eksonükleaz, guanin N7-metiltransferaz
15.	NSP 15	346	RNA'yı konakçı savunmasından kaçacak şekilde bozar
16.	NSP 16	298	5'-cap RNA potansiyel antiviral ilaç hedefi), metilasyon (adenin)

Koronavirüs genomunun en değişken kısmı, S proteininde bulunan reseptör bağlanma alanıdır (26). SARS-Cov'da RBD'deki I472, Y442, N479, T487, D480 ve Y4911 amino asitleri, konakçı hücrelerin ACE2'sine bağlanmada önemli bir rol oynar. Bu aminoasitler SARS-CoV-2'de I455, F486, Q493, S494, N501 ve Y505 ile değiştirilir (27).

2.3. SARS-COV-2 GENOTİPLERİ

Genellikle, virüs türlerinin seviyesinin altında sınıflandırmak için evrensel olarak kullanılan bir yöntem yoktur. Bir virüsteki genetik çeşitlilik, filogenetik ağaç üzerindeki bir monofiletik gruba karşılık gelen sınıflar, alt tipler veya genotipler olarak kategorize edilebilir (28). Pandeminin erken evrelerinde SARS-CoV-2 iki türe ayrıldı; bunlar SARS-CoV-2'nin L ve S suşlarıdır. Bu iki suş arasındaki fark, iki Tek Nükleotid Polimorfizminin (SNP'ler) varlığına dayanmaktadır. *Tang ve ark.* 103 SARS-CoV-2 suşunu analiz ettiği çalışmada neucleotid lokasyonu 28,144'te, 72 suşun "CT" (Lösin kodlandı) ve 29 suşun "TC" haplotipi (Serin kodlandı) sergilediğini gösterdi. Buna ek olarak L tipinin S tipine göre daha sık görüldüğü bildirilmiştir (~%70'e karşı~%30) (29). Virüsün genomundaki varyasyonların artmasıyla birlikte, tüm sınıfları içerebilen bir isimlendirme sistemi geliştirmek zorunlu hale geldi. Şimdiye kadar *Rambaut ve ark.*, *Nextrain* ve *Tüm Grip Verilerini Paylaşma Küresel Girişimi (GISAID)* SARS-CoV-2 için birkaç isimlendirme geliştirdi. Bu isimlendirme teknikleri, virüs alt tiplerinin sınıflandırılması ve küresel olarak en çok dolaşan suşların tanımlanması için kullanılabilir (30).

SARS-CoV-2 genotiplerinin PANGOLIAN (Adlandırılmış Küresel Salgın Soylarının Filogenetik Ataması) terminolojisi, ana soy etiketlerinin bir harfle başladığını önermektedir. Bu isimlendirmede A ve B olmak üzere iki soy vardır. Bu iki sınıftan inen alt soylara daha sonra ortaya çıkma sırasına göre sayısal değerler verilir. Örneğin soy A.1 veya B.2. Bu atama, soyun, ataların soyundan ortaya çıkışının filogenik kanıtını göstermesi koşuluyla verilmektedir. Bu Kanıtlar; atasal soy ile bir veya daha fazla paylaşılan nükleotid farklılığına sahip, dizili genoma en az >%95 homoloji içeren, soy içindeki genomlar arasında nükleotid değişikliğini paylaşan ve soy tanımlayıcı düğüm için >%70 bir önyükleme değeri içermektedir (28). GISAID, % 95 SARS-CoV-2 çeşitliliğinin üzerine yayılmış dokuz farklı işaretleyici mutasyonuna dayanarak

virüs sınıflarını sınıflandırır. GISAID'e göre SARS-CoV-2 virüsü, her biri ortak bir nükleotid varyasyonuna sahip farklı kuşaklara sahiptir.

Çizelge 2.2. GISAID dallarına ve PANGOLIN soylarına dayalı mevcut SARS-CoV-2 filogenetik sınıflandırma sistemleri (32)

GISAID	PANGOLIN	Nükleotid Özellikleri	Protein sekansı üzerinde karşılık gelen etkiler
G	B.1	C241T, C3037T, C14408T, A23403G	5'UTR, NSP3:F106F, NSP12b:P314L, S:D614G
GH	B.1	C241T, C3037T, C14408T, A23403G, G25563T	5'UTR, NSP3:F106F, NSP12b:P314L, S:D614G, ORF3a:Q57H
GR	B.1.1.	C241T, C3037T, C14408T, A23403G, GGG28881AAC	5'UTR, NSP3:F106F, NSP12b:P314L, S:D614G, N:RG203KR
S	A	C8782T, T28144C	NSP4:S76S, ORF8:L84S
V	B.2	G11083T, G26144T	NSP6:L37F, ORF3a:G251V
L		G, GH, GR, S, V'yi tanımlayan tüm nükleotitler ve Diğerleri.	

Yukarıda açıklandığı gibi soylar için ana sınıflandırma kriterlerinden biri, belirli mutasyonların varlığıdır. Örneğin, D614G spike mutasyonu, Avrupa'da erken aşamada tespit edilen ve özellikle Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerine olmak üzere tüm dünyaya yaygın bir şekilde yayılmış mutasyondur. SARS-CoV-2 suş sınıflandırmasının GISAID sisteminde, D614G mutasyonunu içeren suşlar G sınıfında kategorize edilir (31). D614G mutasyonu ilk olarak Almanya'da Ocak ayında toplanan bir örnekte tanımlandı ve Mart ayında mutasyon Avrupa'ya yayıldı. Nisan ayına kadar bu varyant baskın olarak Eurpe ve Kuzey Amerika'dan toplanan örneklerde görüldü (32). Bazı araştırmalar, S proteinindeki 614G mutasyonunun ve

ORF1ab'deki varyant 4715L'nin Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 17 eyaletler ve 28 ülke'deki ölüm oranları ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu bulmuştur (33).

CDC ve Avrupa hastalık önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC), virüsün yeni keşfedilen suşlarını 'İlgi varyantları' ve 'Endişe verici varyantları' olarak ayırmıştır (34). Endişe verici varyantları, önceki enfeksiyonlardan üretilen antikoları nötralize etme gücünü geliştiren daha yüksek bulaşma kabiliyetine sahip yeni varyantları içerir. Tedavilerdeki ve tanı testlerindeki başarısızlıkların kanıtları da varyantların belirleyici özelliklerinden bazılarıdır (35). 24 Mayıs 2021'e kadar, halk sağlığı üzerindeki etkilerinden dolayı endişe verici varyantlar olarak kabul edilen 5 çeşitli SARS-CoV-2 varyantları tanımlanmıştır. Bunlar:

- A. B.1.1.7 soyu veya VOC 202012 (İngiltere varyantı)
- B. B.1.351 soyu veya 501Y.V2 (Güney Afrika varyantı)
- C. B.1.1.248/B1.1.28/P1 veya 501Y.V3 (Brezilya varyantı)
- D. B.1.427/B.1.429 soyu (Kaliforniya varyantı)
- E. B.1.617.2 soyu (Hindistan varyantı)'dır (36).

B.1.1.7 varyantı, Aralık 2020'nin ortalarında Birleşik Krallık'ta ortaya çıkan virüsün en yeni suşlarından biridir. Bu suş, SARS-CoV-2 VUI 202012/01 (İncelenen Varyant, 2020 yılı ay 12, varyant 01) olarak adlandırılmıştır (37). Yapılan ilk analizlerde, varyantın insanlar arasında daha kolay yayılabileceğini göstermiştir. Bu varyantın semptomların şiddeti, antikor yanıtı veya aşı etkinliğindeki herhangi bir değişiklik ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için çeşitli araştırmalar da devam etmektedir. Bu varyant, çoğunun RBD'de bulunan 14 mutasyonun varlığı ile karakterize edilir. Bu mutasyonlardan beş amino asit değişikliği (D614G, A222V, N439K, Y453F ve N501Y), bir delesyonun spike proteinde, özellikle RBD bölgesinde yer alması nedeniyle önemli olduğu düşünülmektedir (38). N501, insan ACE2 ile RBD arasındaki ilk temasın meydana geldiği RBD periferik bölgesinde bulunmaktadır. Farede yapılan çalışmalar, N501'deki mutasyonun RBD ve ACE2 arasındaki bağlanma afinitesini artırabileceğini göstermiştir (39). Bu varyanttaki bir başka önemli mutasyon, furin klevaj bölgesinin doğrudan yakınında bulunan P681H'dir. Bu mutasyonun, artan membran füzyonunu teşvik ederek

enfeksiyonu artıracığı tahmin edilmektedir. P68IH, RT-qPCR testlerinde yüksek viral yük ile ilişkilidir (40). 69-70 ve 144 delesyonlar, NTD'deki β -loop halkalarında bulunur. Bu silinmeler ilk olarak Danimarka'daki vizon popülasyonunda SARS-CoV-2 bulaşması sırasında tespit edildi. Normal koşullarda iyileşen COVID-19 hastalarından alınan monoklonal antikorlar, S proteininin NTD'si ile etkileşime girer. Bu nedenle, bu silmelerin varlığının virüse bir antikor direnci verebileceği tahmin edilmektedir (41).

Son zamanlarda keşfedilen bir başka varyant, B.1.351 (N501Y.V2) varyantıdır. Bu varyant ilk olarak 2 Ocak 2021'de Güney Afrika'da tespit edildi. Bu varyantta amino asit mutasyonları ORF1a: K1655N, S proteininde N501Y, E484K, D215G, D80A, K417N, E proteininde P71L ve N proteininde T205I olarak tanımlanmaktadır (42). Bu mutasyonlardan üçü RBD'de bulunur (K417N, E484K ve N501Y). Çoğunlukla yüksek sayıda enfeksiyon ve artmış bulaşıcılıkla ilişkilidir. K417N ve N501Y ile kombinasyon halinde E484K, başak proteininde konformasyonel değişikliklere neden olur ve bu, virüse karşı antikorların kaçmasına neden olabilir (40).

İlk olarak Kasım 2020'de Brezilya da görülen üçüncü endişe verici varyant B.1.1.28'dir. Bu varyant, spike proteinde on mutasyonun (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K ve N501Y) varlığı ile karakterize edilir ve bunlardan üçü RBD'de (L18F, K417N, E484K) bulunmaktadır (43). Bu üç mutasyon, hACE2'nin virüs ile etkileşimini arttırabilir ve bu da virüsün bulaşmasının artmasına neden olabilir. Ek olarak, bu varyant antikorların nötralizasyonunu da sergileyebilir (36).

B. 1.427 ve B. 1.429 soyu veya endişe Kaliforniya varyantları ilk olarak Mayıs 2020'de tespit edildi. Bu Varyantlar, NTD'de S13I, W152C ve S proteininin RBD bölgelerinde I452R amino asit mutasyonlarını içerir (44). I452R mutasyonu, proteindeki yapısal değişiklikleri teşvik ederek RBD ve ACE reseptörü arasındaki etkileşimi artırır (45). Bu Varyantlar ABD'nin 42 eyaletinde ve 29 ülkede tespit edilmiştir. Kaliforniya varyantları, aşılansız ve daha önce enfekte olmuş hastalardan üretilen farklı antikor türleri tarafından nötralizasyona karşı orta derecede direnç göstermiştir (46). Örneğin, *McCallum ve ark.* tarafından yapılan bir çalışma I452R

mutasyonunun, RBD'ye özgü 14 monoklonal antikorun nötralize etme yeteneğini azaltabildiğini veya hatta ortadan kaldırdığını doğruladı (45).

B. 1.617.2 veya T19R, Δ157-158, I452R, T478K, D614G, D950N ve P681R mutasyonlarının varlığı ile karakterize edilen Hint varyantı ilk olarak Aralık 2020'de Hindistan'da bildirilmiştir. Bu varyant, Nisan 2020 ortasına kadar Hindistan'daki en baskın suş olmuştur (47). Bu suş, yüksek buluşma hızı nedeniyle CDC ve ECDC tarafından endişe varyantı olarak kategorize edilmektedir (35)(34). Bu varyanttaki I452R mutasyonu, antikorların nötralizasyonunun azalması ve varyantın iletiminin artması ile ilişkilidir. Benzer şekilde, P681R, yüksek viral yüklerle yol açabilecek replikasyonun artırılmasında rol oynayabilir (48).

Çizelge 2. 3. Endişe verici varyantlarının isimlendirilmesi (35).

WHO	PANGOLIN	GISAID	Nextstrain	Spike protein mutasyonları
Alpha	B.1.1.7	GRY (GR/501Y.V1)	20I (V1)	N501Y, D614G, P681H
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V
Gamma	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A	L452R, T478K, D614G, P681R
Epsilon	B.1.427/B.1.429	GH/452R.V1	21C	L452R, D614G

İlgilenilen Varyantlar, reseptör bağlanmasını, antikorlarla etkileşimi etkilediği ve tedavilerin etkinliğini azalttığı tahmin edilen mutasyonlara sahip varyantları ifade eder (34). İlgilenilen varyantlardan bazıları Çizelge 2.3.'te listelenmiştir.

Çizelge 2. 4 İlgilenilen varyantlardan ayrıntılı listesi (36)

Soy	Ülke	Mutasyon	Tespit yılı	Artmış Bulaşma	Bağışıklık üzerindeki etkisi
B.1.525	Nijerya	E484K,D614G, Q677H	Aralık 2020	Bilinmiyor	antikor nötralizasyonu
P.3	Filipinler	E484K,N501Y, D614G, P681H	Ocak 2021	var	antikor nötralizasyonu
B.1.616	Fransa	V483A, D614G, H655Y, G669S	Şubat 2021	Bilinmiyor	antikor nötralizasyonu
B.1.617.1	Hindistan	L452R, E484Q, D614G, P681R	Aralık 2020	var	antikor nötralizasyonu
B.1.617.3	Hindistan	L452R, E484Q, D614G, P681R	Şubat 2021	var	antikor nötralizasyonu
B.1.620	Belirsiz	S477N, E484K, D614G, P681H	Şubat 2021	Bilinmiyor	antikor nötralizasyonu
B.1.621	Kolombiya	R346K, E484K, N501Y,D614GP 681H	Ocak 2021	var	antikor nötralizasyonu

ECDC ayrıca başka bir varyant grubunu izleme altındaki varyantlar olarak sınıflandırmıştır. Bu varyant grubunun, endişe varyantları ile benzer özellikler içerdiği düşünülmektedir, ancak kanıtları doğrulamak için daha fazla değerlendirme yapılmalıdır.

Çizelge 2. 5.İzleme altındaki varyantların listesi (36)

Soy	Ülke	Mutasyonlar	Tespit yılı
B.1.214.2	Belirsiz	Q414K, N450K, ins214TDR	Aralık 2020
A.23.1+E484K	İngiltere	V367F, E484K, Q613H	Aralık 2020
A.27	Belirsiz	L452R, N501Y, A653V,H655Y	Aralık 2020
A.28	Belirsiz	E484K, N501T, H655Y	Aralık 2020
C.16	Belirsiz	L452R, D614G	Ekim 2020
C.37	Peru	L452Q, F490S, D614G	Aralık 2020
B.1.351+P384L	Güney Afrika	P384L, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V	Aralık 2020
B.1.351+E516Q	Belirsiz	K417N, E484K, N501Y, E516Q, D614G, A701V	Ocak 2021
B.1.1.7+L452R	İngiltere	L452R, N501Y, D614G, P681H	Ocak 2021
B.1.1.7+S494P	İngiltere	S494P, N501Y, D614G, P681H	Ocak 2021
C.36+L452R	Mısır	L452R, D614G, Q677H	Aralık 2020
AT.1	Rusya	E484K,D614G, N679K, ins679GIAL	Ocak 2021
B.1.526	ABD	E484K, D614G, A701V	Aralık 2020
B.1.526.1	ABD	L452R, D614G	Ekim 2020
B.1.526.2	ABD	S477N, D614G	Aralık 2020
B.1.1.318	Belirsiz	E484K, D614G, P681H	Ocak 2021
P.2	Brezilya	E484K, D614G	Ocak 2021
B.1.1.519	Meksikalı	T478K, D614G	Kasım 2020
AV.1	İngiltere	N439K, E484K, D614G, P681H	Mart 2021

2.4. SARS COV-2'NİN BULAŞMA ŞEKLİ VE PATOLOJİSİ

2.4.1. VİRÜSÜN BULAŞMA YOLLARI

SARS-CoV-2 ile enfeksiyon, hasta ile yakın temasın bir sonucu olarak ortaya çıkar. Yakın temas, enfekte solunum yolu salgılara veya damlacıklarına maruz kalma içermektedir (49). Virüsün damlacıklar ile bulaşması, çapı $>5-10 \mu\text{m}$ olan damlacıkları içerir. Virüsün bulaşması, 1 metre yakınlıkta damlacıklara maruz kalması nedeniyle gerçekleşir. Enfeksiyon, damlacıkların bulaşıcı virionlar içerdiği düşünüldüğü için gerçekleşir. Ancak bu damlacıklar havada ve canlı kalırsa, bu virüslerin uzun menzilli insandan insana enfeksiyona neden olup olmayacağı kesin değil (50). Aerosollerde SARS-CoV-2'nin yarı ömürleri, yaklaşık 1.1-1.2 saat olan SARS-CoV ile neredeyse benzerdir. Bu süre içinde, enfekte olan kişiden 1-2 metreden daha uzakta soluma ve enfeksiyon meydana gelebilir. Bunun yanı sıra, bir çalışma, laboratuvarında oluşturulan aerosollerde virüsün enfektivitesini yaklaşık 16 saat koruyabildiğini bildirdi (51).

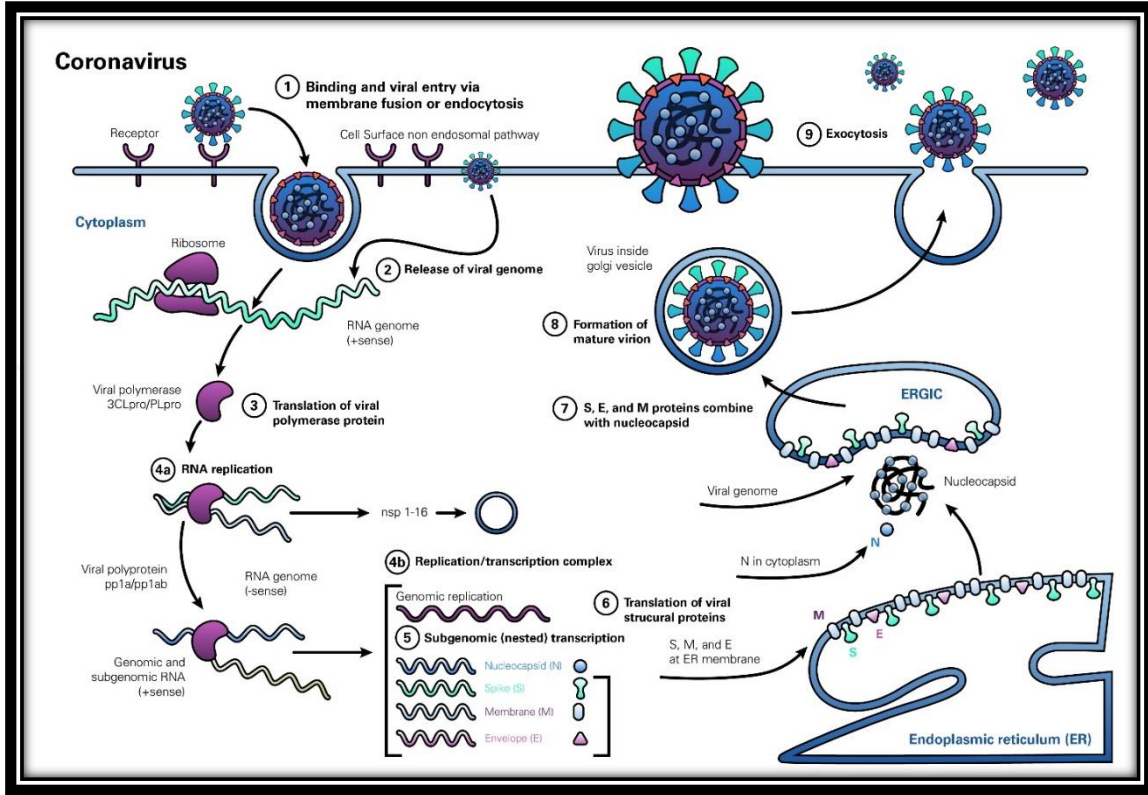
Enfekte olan solunum damlacıkları kontamine olabilir fomitler (kontamine yüzeyler) oluşturabilir. Bu yüzeyler, sıcaklığa, neme ve ayrıca yüzey tipine bağlı olarak RT-PCR ile saatlerce veya günlerce hala tespit edilebilen viral RNA'yı içerebilir (52). Ancak bu kontaminasyonların enfeksiyonlara neden olup olamayacağı hala net değil çünkü şu ana kadar fomitelere bağlı enfeksiyon bildirilmemektedir (53).

SARS-CoV-2 RNA, hastaların idrarı ve dışkısı gibi diğer biyolojik numunelerde de tespit edilmiştir. Dışkıda, klozet oturmağında ve lavabo örneklerinde SARS-CoV-2 RNA'nın varlığının, virüs dışkı örneklerinde yaklaşık 4 gün canlı kalabildiğinden, olası bir bulaşma yolu olarak fekal-oral yolu düşünülmektedir (54). Ancak bugüne kadar, SARS-CoV-2'nin dışkı yoluyla bulaştığına dair yayımlanmış bir rapor bulunmamaktadır. *Monique I. Andersson ve ark.* virüsün kan hücrelerinde replike edildiğini ve serumda SARS-CoV-2'nin RNA'sı saptandığını bildirmişler. Ancak plazma ve serumdaki düşük viral titreler, kan ile bulaşma riskinin düşük olabileceğini düşünülmektedir (55).

Şu anda, SARS-CoV-2'nin infekte olan hamile kadınlardan fetüslerine intrauterin dikey geçişine dair belgelenmiş bir kanıt yoktur, ancak sınırlı veri mevcuttur. SARS CoV2'nin hamile anneden rahimde veya doğum sırasında fetüse dikey olarak aktarılıp aktarılamayacağı belirsizdir ve mevcut veriler çelişkilidir (53) (56). DSÖ tarafından yayınlanan raporda, SARS-CoV-2 ile infekte annelerin birkaç anne sütü örneğinde viral RNA bulunduğunu, ancak izolasyon işlemi sırasında hiçbir canlı virüs elde edilmediğini bildirilmiştir (53).

2.4.2. SARS-COV-2'NİN KONAKÇI HÜCRELERE GİRİŞİ VE PATOLOJİ

SARS-CoV-2 de konak hücrelerine girmesi için ACE2 reseptörünü ve S protein hazırlama için TMPRSS2 serin proteazlarını kullanır (24). S proteininin ACE2 reseptörüne bağlanması, endozomal yolla girişi takiben viral zarf proteininin konak hücre membranı ile füzyonuna yol açan S proteininde konformasyonel değişikliklere neden olur (57). Bu, viral RNA'nın konakçı sitoplazmaya salınmasına yol açar. Hücreye giren RNA translasyona uğrar ve virüs kodlu proteinazlar tarafından küçük proteinlere parçalanan replikaz poliproteinleri pp1a ve pp1b üretir. Koronavirüs replikasyonu, çeviri işlemi sırasında ribozomal çerçeve değiştirmeyi içerir ve ilgili viral proteinleri kodlayan transkripsiyonla hem genomik hem de subgenomik RNA türleri oluşturur (58). Virionun birleşmesi, viral RNA ve proteinin endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi kompleksinde etkileşimi yoluyla gerçekleşir. Bu viryonlar daha sonra veziküller yoluyla hücrelerden dışarı salınır (9).

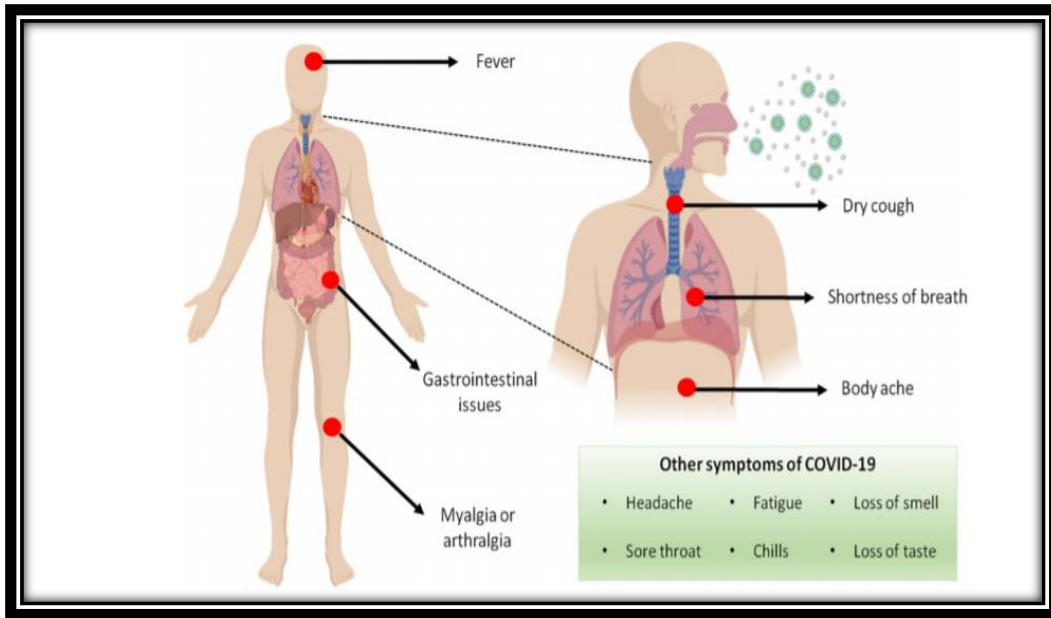


Şekil 2. 4. Akciğerin alveolar hücresinde SARS-CoV-2'nin girişi, replikasyonu ve salınması (60)

Çoğaldıktan sonra virüs akciğerlere ulaşır ve akciğer keselerinin alveollerinde iltihaplanmaya neden olarak pnömoniye yol açar Akciğer iltihabı, semptomların başlangıcından itibaren 8 ila 15 gün içinde enfekte bir kişi için zor nefes alma ile sonuçlanır. Ağır vakalarda bu, Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu (ARDS) olarak adlandırılan bir rahatsızlığa dönüşebilir (59). ARDS'nin enflamatuar yanıtı, esas olarak 'sitokin fırtınaları' olarak bilinen büyük miktarlarda proinflamatuar sitokinlerin salınmasından kaynaklanır (60). SARS-CoV-2 enfeksiyonu, viral sepsisi ve iltihaplanmaya bağlı akciğer hasarını tetikleyen "sitokin fırtınasına" uğrar ve pnömoni, solunum yetmezliği, ARDS, şok, organ yetmezliği ve potansiyel olarak ölüm gibi komplikasyonlara yol açar (59). Sitokin fırtına mekanizması sırasında sitokinler (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α ve diğerleri) ve kemokinler vücuda salınır (59)(60).

2.4.3. SARS-COV-2 BELİRTİLERİ

SARS-CoV-2 enfeksiyonu öncelikle hafif ila şiddetli hastalık ve ölüm arasında değişen solunum yolu hastalıklarına neden olur. Ancak virüsle enfekte olan bazı kişiler hiçbir zaman semptom geliştirmez. COVID-19'un yaygın klinik özellikler ateş, öksürük, boğaz ağrısı, yorgunluk, baş ağrısı, miyalji ve nefes darlığıdır. Bazı hastalarda ilk haftanın sonunda hastalık zatürre, solunum yetmezliği ve ölüme kadar ilerleyebilir. Bu ilerleme, IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A ve TNF α dahil enflamatuvar sitokinlerde aşırı artışla ilişkilidir (61). Bir çalışmaya göre, semptomların başlangıcından nefes darlığına kadar geçen medyan süre 5 gün, hastanede yatış 7 gün ve akut solunum sıkıntısı sendromunun (ARDS) başlangıcı 8 gün olabilir. Etkilenen hastaların %25-30'u yoğun bakıma yatma ihtiyacı olarak bildirilmiştir. Bildirilen komplikasyonlardan bazıları akut akciğer hasarı, ARDS, şok ve akut böbrek hasarıdır (62). Başka bir çalışmada, iyileşmenin 2. veya 3. haftada başladığını bildirirken iyileşenlerde ortanca hastanede kalış süresi 10 gün olduğunu açıkladı. Bu çalışma ayrıca virüsün genel ölüm oranının %2-3 olduğunu ve ölümcül vakaların çoğunun (%50-75) yaşlı hastalar ve diğer altta yatan komorbiditeleri olan hastalar olduğunu bildirmiştir (5).



Şekil 2.5. Covid-19'un ana semptomları (65)

2.5. SARS-COV-2 TEDAVİ SEÇENEKLERİ

Şu anda SARS-CoV-2'nin tedavi seçenekleri olarak bir dizi terapötik seçenek mevcuttur. Bunlar, Remdesivir gibi antiviral ilaçlar, Deksametazon gibi antiinflamatuvar ajanlar, Baricitinib gibi immünomodülatör ajanlar, Tocilizumab ve anti-SARS-CoV-2 monoklonal antikorları içerirmektedir (63).

Remdesivir başlangıçta Ebola ve Marburg virüslerine karşı antiviral bir ilaç olarak geliştirilmişken, Favipiravir daha önce influenza tedavisinde kullanılıyordu. Bu ikisinin COVID-19 için umut verici tedaviler olduğu düşünülmektedir. Bu ajanlar, viral RNA çevirisini inhibe ederek çalışır ve parenteral olarak uygulanır (64). Deksametazon olarak bilinen bir kortikosteroid de COVID-19 tedavisi için adaylardan biridir (36). Bu ajan, intravenöz ve inhalasyon uygulamasından sonra makrofaj deposunun gelişimini tetikler ve daha önce HIV'de bir miktar başarı göstermiştir. Bazı çalışmalar Deksametazon ile tedavi edilen COVID-19 hastalarının mortalitede azalma gösterdiğini göstermiştir (64). Ayrıca Hidroksiklorokin gibi sıtma ilaçları ve SARS-CoV-2'yi in vitro kontrol edebilen güçlü bir antiviral özelliğe sahiptir. Hidroksiklorokin, SARS-CoV-2'yi inhibe etmede klorokin'den daha başarılı olduğu kanıtlandı (59).

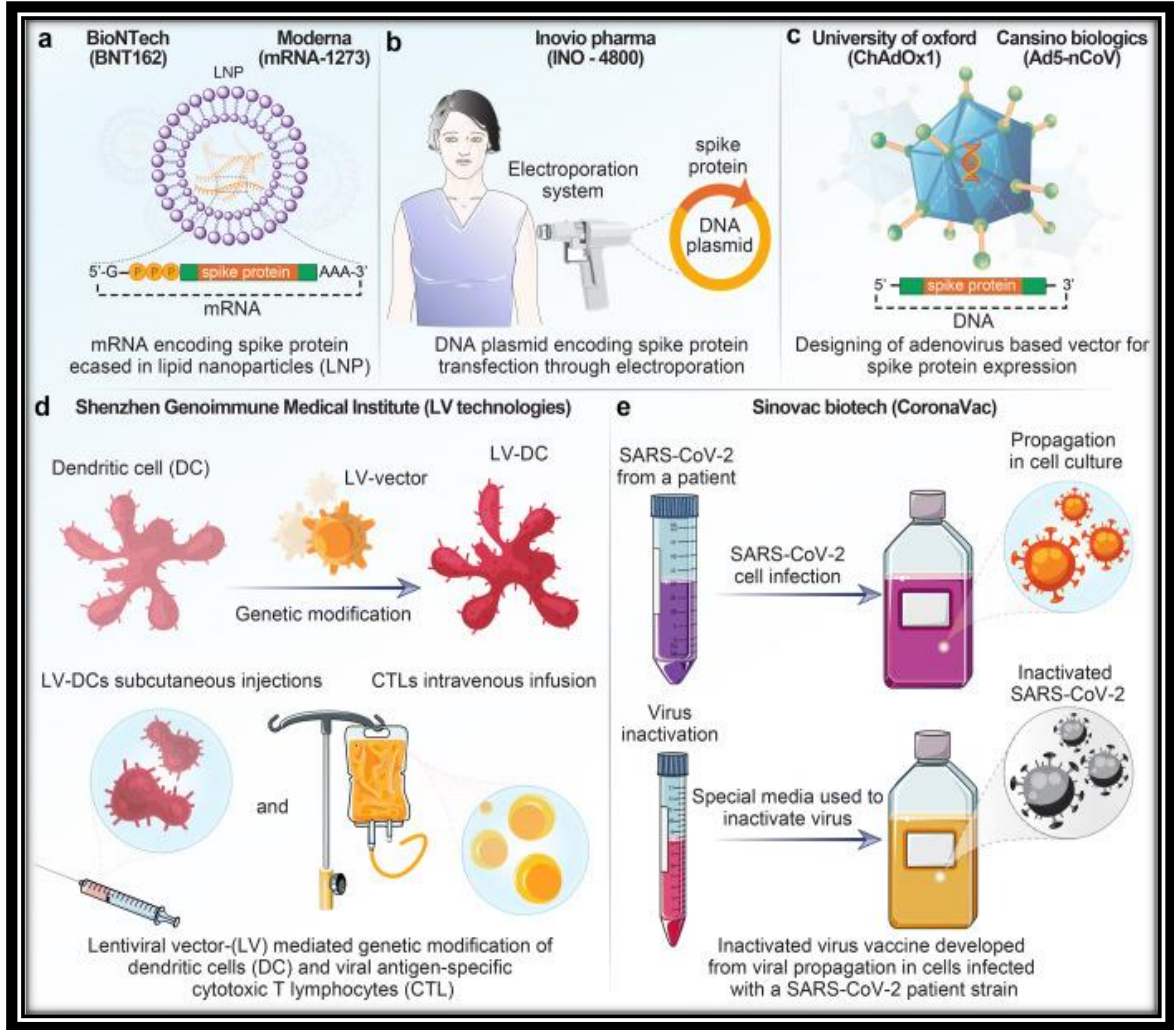
SARS-CoV-2 olan hastaların tedavisi için iyileşme plazması da dahil olmak üzere anti-SARS-CoV-2 nötralize edici antikor ürünleri de kabul edilmektedir. Ciddi yaşamı tehdit eden COVID-19 hastalarına nekahat eden plazma uygulaması FDA tarafından onaylanmıştır. Buna ek olarak, ABD'de yapılan bir çalışma, iyileşen plazmada daha yüksek bir anti-SARS-CoV-2 IgG antikor titresinin, iyileşen plazma transfüzyonu alan hastalarda daha düşük bir ölüm riski ile ilişkili olabileceğini bildirdi (36).

2.5.1. SARS-COV-2 İÇİN AŞI GELİŞTİRME

Bir aşının geliştirilmesi karmaşıktır ve güvenliğine yönelik uzun süreli invitro ve invivo araştırma aşamaları nedeniyle onaylanması yaklaşık 12-15 yıl alabilir. COVID-19 durumunda, klinik araştırmacıların hızlı yanıtları, kısa bir süre içinde SARS-CoV-2'ye karşı yeni aşılardan

geliştirilmesine yol açmıştır. 2020'nin sonunda, SARS-CoV-2'ye karşı 52 aşı denemelerden geçiyordu. Bunlardan dokuzu Aşama 3'te, üçü Aşama 2'de, 18'i Aşama 1/2 ve 22'si Aşama 1'de idi (65). Bu aşular, 13'ünün protein alt birimini kullandığı, 11'inin replike olmayan viral vektör aşuları olduğu ve 6 adayın zayıflatılmış inaktive edilmiş viral partiküllerin kullanıldığı farklı etki mekanizmaları kullandı. Buna ek olarak 6 adet RNA aşısı ve 4 adet DNA aşısı, dördü replike edici viral vektörlü, iki adet Virüs Benzeri Protein (VLP) ve diğer 6 tanesi diğer tekniklerin kullanıldığı aşılardır (66).

SARS-CoV-2 aşularının geliştirilmesi için ana stratejiler, tam virüs, viral alt birim ve nükleik asit kullananlara sınıflandırılabilir. Tam virüs aşuları, canlı zayıflatılmış aşular ve inaktive edilmiş virüs aşuları kullanan denemeleri temsil eder (67). Şu anda insanlara uygulanan bu aşının bir örneği Sinovac covid-19 aşısı (Coronavac)'dır. Bu, insan vücuduna uygulandığında bağışıklık tepkisini tetikleyebilen inaktive edilmiş bir aşıdır (66). Yukarıda belirtildiği gibi, geliştirilmekte olan aşuların çoğu, bağışıklık tepkisini tetiklemek için bir viral alt birim (protein alt birimi) kullanır. Bu aşular, antikor üretimini indüklemek için çoğunlukla virüsün S proteinini (bütün olarak veya sadece RBD olarak) kullanır (64). Nükleik asit aşuları, gerekli bağışıklık tepkisini uyarmak için hastalığa neden olan virüslerden genetik materyal (DNA ve mRNA) kullanır. DNA aşuları tipik olarak bir veya daha fazla antijeni kodlayan ökaryotik ekspresyon elemanları içeren bir plazmid DNA tarafından üretilir (68). Biyofarmasötik Yeni Teknolojiler (BioNTech), Shanghai Fosun Farmasötik Grubu (Fosun Pharma) ve Pfizer tarafından hazırlanan BNT-162, SARS-CoV-2 için mRNA bazlı aşı adayının tipik bir örneğidir (64).



Şekil 2.6. COVID-19'a karşı halihazırda kullanılan aşılarından bazıları ve etkileri (67)

2.6. SARS COV-2'NİN LABORATUVAR TANISI

DSÖ'nün tavsiyesine göre hastalık belirtileri olan hastalar en azından Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAATs) ile değerlendirilmelidir (69). Şu anda, SARS-CoV-2 için çeşitli tanı yöntemleri farklı laboratuvarlar tarafından kullanılmaktadır (59). SARS-CoV-2 için en sık kullanılan laboratuvar teşhisi Ters Transkriptaz Gerçek Zamanlı PCR(rRT PCR)'dir. RT PCR kullanılarak SARS-CoV-2'nin saptanması için örnek tipi, solunum yolunun üst ve alt kısmından nazofarengeal örnekleri içermektedir (70). En yaygın solunum örneklerine ek olarak, SARS-CoV-2'nin solunum yolu olmayan örneklerde sıklıkla tespit edildiğine dikkat edilmelidir.

Çin'de yapılan araştırmada COVID-19 hastasından idrar örneğinde SARS-CoV-2 tespit edildiği, ancak idrar yolu tahrişi bulunmadığı bildirildi. Aynı çalışmada, virüsün RNA'sı RT-PCR ile 12 COVID-19 hastadan 11'inden tükürük örneklerinde tanımlanmıştır (71). Bu sonuçlar, faringeal swabda %78, kan ve anal swabda %22 ve idrarda %11 SARS-CoV-2 RNA pozitifliği oranlarını bildiren Çin'de yapılan başka bir çalışmada doğrulanmıştır (72).

SARS-CoV-2 virüsünü kullanan in vitro ve in vivo çalışmalardan alınan numunelerin ve ayrıca şüpheli ve/veya doğrulanmış COVID-19 hastalarından alınan numunelerin dikkatli bir şekilde işlenmesi araştırma personelinin güvenliğini sağlamak, çevreye kazara açılmasını önlemek ve araştırma varlık çevreleyen toplumu korumak için önemli olduğu unutulmamalıdır (73). Bu nedenle, numuneyi aldıktan hemen sonra, numune işleme sırasında aerosol oluşumunu azaltmak için deneyler Sınıf II veya daha yüksek bir biyogüvenlik kabininde yapılmalıdır (70).

Dünya Sağlık Örgütü, NAAT, genomic dizileme ve bazı serolojik testlerin Biyogüvenlik Seviyesi 2 (BSL2) laboratuvarlarında yapılabilmesini önermektedir. Bununla birlikte, numunenin ilk işlenmesi uygun biyolojik güvenlik kabininde yapılmalıdır. Ancak virüsün çoğalmasını içeren prosedürler (virüs kültürü, izolasyon veya nötralizasyon testleri) Biyogüvenlik Seviyesi (BSL-3) laboratuvarlarında yapılmalıdır (74). Laboratuvar personelinin göz ve yüz koruma gözlükleri , solunum cihazı veya yüz maskesi, uzun kollu elbise ve eldiven gibi uygun kişisel koruyucu ekipman giymesi şiddetle tavsiye edilir (75). şüpheli veya onaylanmış numuneler UN3373 koduyla taşınmalıdır (biyolojik madde kategorisi B). Virüsü içeren kültürler veya izolatlar UN2814 (bulaşıcı madde kategori A) kodu ile taşınmalıdır (74).

Pandeminin başlangıcından bu yana virüsü tespit etmek için çeşitli laboratuvar teknikleri geliştirilmiştir. Diğer tanı yaklaşımları gibi, bu teknikler de özgüllükleri, duyarlılıkları, tespit limitleri ve kullandıkları örneklem türü bakımından farklılık gösterir. şu anda kullanılan SARS CoV-2 tespit tekniklerinden bazıları, gerçek zamanlı PCR, yeni nesil dizileme, viral kültür ve serolojik testler gibi nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAAT)'dir.

2.6.1. SARS COV-2 TESPİTİ İÇİN TERS TRANSKRİPSİYON GERÇEK ZAMANLI PCR

Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), duyarlılığı, özgüllüğü ve hızı nedeniyle SARS-CoV-2 için altın standart tanıdır (76). SARS-CoV-2 tespit etmek için çeşitli RT qPCR teknikleri birçok laboratuvar tarafından geliştirilmiştir. Bu analizler, virüsün farklı genlerini veya bölgelerini yükseltmek için tasarlanmıştır. SARS-CoV-2 RT-qPCR ile en sık amplifiye edilen genler N, E, RdRp ve S genleridir (59). Bu bölgeler, yüksek korumaları nedeniyle yaygın olarak seçilmektedir (74). Diğer koronavirüslerle potansiyel çapraz reaksiyon riskini azaltmak için RT qPCR kitine en az iki genomik hedef dahil edilmelidir. DSÖ, hedeflerin E geni ve RDRP geni olmasını önerirken, CDC iki nükleokapsid protein hedefi (N1 ve N2) önerir (77). RTqPCR, enfeksiyonun erken evresinde (kuluçka dönemi dahil) ve semptomların kaybolmasından sonra pozitif vakaların saptanmasında daha iyi performans gösterdiği için serolojik testlerden daha çok tercih edilir (74). Diğer laboratuvar testleri gibi, RTqPCR de düşük numune kalitesi, düşük viral yük, numunenin yanlış taşınması ve depolanması ve diğerleri nedeniyle yanlış negatif sonuçlar gösterebilir. Virüsü taşıdığından şüphelenilen bir hastanın negatif çıkması durumunda, test tekrarlanmalı ve başka bir örnek toplanmalıdır (69).

2.6.2. TERS TRANSKRİPSİYON DÖNGÜ ARACILI İZOTERMAL AMPLİFİKASYON (RT-LAMP)

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), bir virüsdeki spesifik genlerin hızlı tespiti için yaygın olarak kullanılır. Tekniğin prensibi, viral genomun altı farklı bölgesine özgü dört primerin kullanılmasını içerir (78). Amplifikasyon hızı, belirli izotermal koşullarda bir döngü yapısının oluşumu ile arttırılır. Bu teknik, geleneksel PCR ve qRT-PCR ile karşılaştırılabilir özgüllük ve duyarlılığa sahiptir (79). RT-LAMP'nın avantajlarından biri, analiz için daha az zaman ve özel laboratuvar ekipmanı almasıdır (69). Daha önce, SARS-CoV 117,118 ve MERS dahil olmak üzere diğer Koronavirüsler için RT-LAMP analizleri geliştirilmiştir. Pandeminin başlangıcından sonra, birkaç çalışma SARS-CoV-2'yi tespit etmek için RT-LAMP kullanımını

göstermiştir (74). *Yun Hee Baek ve ark.* tarafından yapılan bir çalışma SARS CoV-2 RNA'nın RT-LAMP ile tespit sınırının neredeyse qRT-PCR kadar hassas olduğu ortaya çıkardı. Ayrıca, geliştirdikleri RT LAMP, SARS-CoV-2 için spesifik olduğunu ve benzer virüslerin RNA'sı ile daha az çapraz reaktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (79).

2.6.3. CRISPR - CAS TABANLI TANI YÖNTEMLERİ

Yanal akış kimyasının Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPR) teşhisi ile entegrasyonu, Dang virüsü (DENV), İnsan Papilloma Virüsü (HPV) ve Zika Virüsü (ZIKV) gibi farklı virüsler için hızlı, spesifik ve ucuz teşhis kitlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (80). SARS-CoV-2 için CRISPR tabanlı bir algılama platformu geliştirmek için araştırmalar da yapılmaktadır.

Virüsün tespiti için CRISPR/Cas tabanlı platformlardan biri, Spesifik Yüksek Hassasiyetli Enzimatik Muhabir Kilidini (SHERLOCK) kullanır. Bu test, viral RNA'nın basitleştirilmiş ekstraksiyonunu izotermal amplifikasyon ve CRISPR aracılı algılama ile birleştirir. Bu testin ana avantajı, bir saatten daha kısa bir sürede tek bir sıcaklıkta sonuç verebilmesidir (81). Endonükleaz Hedefli CRISPR Transporter (DETECTTR), SARS-CoV-2 için başka bir CRISPR tabanlı algılama sistemidir. Bu teknik, SARS-CoV-2 cDNA ile bağlandıktan sonra Crispr ilişkili protein 12a (CAS 12a) aktivasyonunu kullanır ve 6-karboksifloresein (FAM) ve biyotin ile etiketlenmiş muhabir problemleri keser (80). *Di silva ve ark.* tarafından yapılan çalışma, RT-qPCR ile karşılaştırıldığında, SARS-CoV-2 DETECTTR testinin %95 pozitif prediktif anlaşmaya ve %100 negatif prediktif anlaşmaya sahip olduğunu bildirmiştir (74). CRISPR tabanlı tanı testlerinden elde edilen sonuçlar umut verici olsa da, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmamaktadır.

2.6.4. SARS COV-2 SEROLOJİK TESTLER

Serolojik testler, şüpheli hastaların ve asemptomatik enfeksiyonların hızlı teşhisi için alternatif bir tanı yaklaşımı olabilir. Bu tür testlerin en büyük avantajı, karmaşık laboratuvar

ekipmanlarına ihtiyaç duymadan kısa sürede yapılabilmesidir (69). Virüse karşı antikorları tespit eden serolojik testler, ELISA, kemilüminesans veya hızlı test yanal akış kasetleri üzerinde yapılan testlerin tespit edilmesidir (70). Bu testler, hastalıkla ilgili güçlü epidemiyolojik kanıtlarla ilişkili negatif PCR sonuçları koşullarında kullanılabilir. Bu gibi durumlarda virüse karşı antikorlar, akut ve iyileşen fazda serum örnekleri toplanarak değerlendirilebilir (74). Bununla birlikte, bu tür testlerin ana dezavantajlarından biri, diğer SARS-CoV suşlarına karşı üretilen antikorların yüksek reaktivitesidir. Bu nedenle, bu testlerin duyarlılığı %34 ila %80 arasında değişmektedir (70).

2.6.5. VİRAL HÜCRE KÜLTÜRÜ

Viral kültür, diğer tanı yaklaşımları uygulanmadan önce virüsün genel davranışını ve özelliklerini incelemek için çoğunlukla bir salgının erken evrelerinde kullanılır (69). DSÖ, SARS CoV-2'nin saptanması için viral hücre kültürünü önermez, çünkü zaman alıcı, emek yoğun ve BSL3 laboratuvarları gerektirir (82). Bu nedenle esas olarak araştırma amaçlı kullanılır. SARS-CoV - 2'nin ilk izolatları Vero E6 ve Huh7 hücrelerinden elde edildi. Bu hücre kültürleri pnömonili bir hastadan bronkoalveolar lavaj ile inkübe edildi. Virüsün inkübasyonu ve izolasyonundan sonra, özellikleri ve kimliği antiSARS-CoV Rp3N antikor, RT-qPCR ve metagenomik sekanslama ve immünofloresan ile doğrulandı (74).

2.6.6. TÜM GENOM DİZİLEME

Tüm genom dizilimi, virüs hakkında önceden bilgi sahibi olmadan virüsleri ve suşlarını tanımlamanın ve ayırt etmenin etkili bir yoludur (83). SARS-CoV-2, İlk olarak Yeni Nesil Dizileme (NGS) tekniği kullanılarak erken salgın sırasında Çin'de tanımlanmıştır (84). NGS, enfeksiyon kaynağının ve iletim modunun tanımlanmasını sağlar. Ayrıca terapötikler ve antimikrobiyal direnç genleri için olası hedefler hakkında bilgi sağlayabilir (85). Virüsün teşhisini doğrulamanın yanı sıra, bu teknik virüsün genomundaki devam eden değişiklikleri değerlendirmek ve mutasyonları izlemek için kullanılabilir. Ayrıca hastalığın bulaşma kalıplarını izlemede yardımcı olabilir (74). Tüm genom dizilemesinin ana dezavantajı, zaman

alıcı olması ve yüksek teknik eşiklere sahip karmaşık aletler gerektirmesidir. Bu nedenlerden dolayı teknik rutin klinik kullanımlar için kullanılmamaktadır (69). Ancak teknikten elde edilen analizler, tanı, moleküler epidemiyoloji, ilaçlar ve aşılar için hedeflerin belirlenmesi ve konağın virüse karşı bağışıklık tepkisi ile ilgili çalışmalara rehberlik edebilir (74).

2.7. SARS-COV-2 İLE RE-İNFEKSİYON

Bazı hastalar, yanlış RT-PCR sonuçları, tekrarlayan virüs dökülmesi veya başka bir suşla yeniden enfeksiyon ve virüse ikincil maruz kalma gibi nedenlerden dolayı iyileşmeden sonra SARS-CoV-2 testleri için pozitif sonuçlar sergiler (86). CDC, hasta ilk enfeksiyondan kurtulduktan ve 90 günden fazla bir süre boyunca PCR için negatif test edildikten sonra çıkan COVID-19 pozitif tanısı re-enfeksiyon olarak tanımlar. Re-enfeksiyon onayı doğrulanmış ilk enfeksiyon, CT 35'ten daha az RT-PCR sonuçları ve iki enfeksiyon arasında negatif PCR sonuçları kanıtı içerir (87). İlk reenfeksiyon vakası Ağustos 2020'de Hong Kong'da bildirildi ve sonra birkaç benzer vakalar farklı yerlerden yayınlandı. Ocak 2021 itibariyle Hong Kong, Hollanda, Belçika, Ekvador, İsrail, Hindistan, Avustralya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde COVID-19 reenfeksiyon vakaları bildirilmiştir (88).

Bu durumlarda akla gelen ilk soru, önceki enfeksiyon sırasında üretilen antikorların yeniden enfeksiyonla mücadele edip edemediğidir. Bu vakaların bazılarında, hastalar ikinci enfeksiyonda daha agresifleştirilmiş semptomlara sahipti, bu da daha önce kazanılan bağışıklığın yeniden enfeksiyonla başa çıkmak için yeterli olmadığını gösterebilir (89). Bu aynı zamanda bazı hastaların ölçülebilir bir COVID-19 antikor titresini elde edemeyeceğini de gösterebilir (90). Birkaç vakaya dayanarak sonuç çıkarmak için çok erken olsa da, reenfeksiyon, daha önce enfekte olmuş kişilerin virüse karşı bağışıklık olarak kabul edilemeyeceğini gösterebilir. Bununla birlikte, bağışıklığın gelişimi ve virüse karşı süresi hakkında daha iyi bir anlayış sağlamak için re-enfeksiyonu ve daha uzun takip süresini kanıtlamak için daha fazla çalışma gereklidir. Bunun yanı sıra, genomdaki mutasyonların ilgili konumlarını bilmek, virüsün bağışıklık kaçışını anlamada büyük bir yardım sağlayabilir (88).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

SARS-CoV-2, halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturan insan solunum yolu hastalığının pandemisine neden olmuştur. Bugüne kadar virüs yaklaşık 173 milyon enfeksiyona ve 3.71 milyon kişinin ölümüne neden oldu ve hala artmaya devam ediyor. Virüsün ölüm oranı SARS-CoV ve MERS-Cov'dan daha düşük olsa da, bu iki virüse kıyasla hızla dünyaya yayılmıştır (33). Bir popülasyonda SARS-CoV-2'nin kökenini belirlemek ve iletim modelini izlemek için, virüsün genomik karakterlerini incelemek, atılması gereken önemli adımlardan biridir. SARS-CoV-2'nin genomik dizilimi, virüsün bir topluluk içinde bulaşmasının yanı sıra kıtalararası yayılımın araştırılmasını sağlayan yüksek çözünürlüklü veriler sağlayabilir (91). Genomların sekans analizi, ilaç geliştirme ve aşı geliştirme araştırma girişimleri için kullanılacak çok sayıda bilgi sağlayabilir (13).

SARS-CoV-2'nin ilk dizisinin yayınlanmasından bu yana GenBank veritabanına her gün yaklaşık 70 yeni dizi yükleniyor. Bu diziler 27 ülke, 34 eyalet ve bir yolculuktan gelen yolculardan kaynaklanmıştır (92). 05 Haziran 2021 tarihine kadar Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplam 5210 SARS-CoV-2 izolatları GSIAID veri tabanına yüklenmiştir (93). Bu diziler, virüsün ortak genotiplerini ve genomdaki en önemli mutasyon sıcak noktalarını belirlemede önemli bir rol oynamıştır. Tipik RNA virüsü olarak, koronavirüsler için ortalama evrimsel oran, her replikasyon döngüsü sırasında ortaya çıkan mutasyonlar, yılda site başına yaklaşık 10^{-4} nükleotid ikameleridir (14). Örneğin, 220 tam genomu içeren çalışma, Asya, Kuzey Amerika ve Avrupa popülasyonları arasında spesifik prevalensi olan 8 yeni mutasyonu tanımladı ve dizi örnekleme tarihlerine dayanarak zaman içinde mutasyonların ortaya çıktığını gösterdi (94). Başka bir çalışma, 86 tüm genom izolatlarından en az bir izolat içinde 93 kadar mutasyonun meydana geldiğini göstermiştir (95). Ek olarak, *Yin ve ark* tarafından hazırlanan raporda, 241C > T, 3037C > T, 14408C > T ve 23403A > G gibi çeşitli mutasyonların daha şiddetli olan Avrupa suşları arasında yaygın olduğu bildirilmiştir (92).

Türk popülasyonundan izole edilen suşlarla ilgili olarakda bir çalışma Türk suşlarının Suudi Arabistan'dan gelen izolatlarla yakın ilişkileri paylaştığını, ancak 23403 A>G, 3037 C>T ve

14408 C>T gibi Avrupa popülasyonlarında yaygın olarak bulunan mutasyonların da görüldüğünü ortaya koydu (96). Bu senaryo, toplumda dolaşan virüsün baskın suşlarını tanımlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyar. Üstelik, virüs daha fazla kişiye bulaştıkça, ortaya çıkan mutasyonların sürekli gözetimi gereklidir. Ek olarak, genomdaki mutasyonlarla ilgili çalışmalar, virüsün patolojik aktivitelerindeki değişikliklerin ve dolayısıyla hastalığın ciddiyetinin araştırılmasına katkıda bulunabilir.

Bu araştırmanın genel amacı, SARS-COV 2 VİRÜSÜNÜN TÜRKİYE'DE POZİTİF OLAN HASTALARDAN TAM GENOM SEKANSLAMADIR. Bu çalışmanın özel amaçlar ise:

1. Türkiye'de bulunan SARS-COV 2'nin moleküler karakterizasyonunu yapması,
2. Suşlar arasında yaygın olarak korunan bölgeleri tespit etmesi.
3. Virüsün önemli bölgelerdeki herhangi bir mutasyon türü araştırılması ve en sık bulunan SNP'nin saptanması,
4. Sekanslanmış genomun diğer ülkelerdeki virüslerle karşılaştırılması hedeflenmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL:

Yüz Covid-19 pozitif hastadan toplanan SARS-CoV-2 RNA ekstraktları İbn Sina Hastanesi'nden elde edildi. Bu numuneler, önerilen soğuk zincir numune taşıma protokolü kullanılarak Ankara Üniversitesi TEKNOKENT'teki Moleküler Tanıda Dış Kalite Kontrol (MOTAKK) laboratuvarı'na aktarıldı. Numuneler daha fazla işleme kadar -80°C'de saklandı. Örneklerin 96'sı, Iseq100 ile dizilmek üzere PARAGON Clean Plex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim paneli kullanılarak işlendi. Analiz için gerekli malzemeler Çizelge 4.1.'de listelenmiştir.

Çizelge 4. 1. Analiz için gerekli malzemelerin listesi

S.No.	Malzemeler	Miktar
1.	SARS-CoV - 2 RNA İzolatları	100
2.	Thermocycler (BIO-RAD T100)	1
3.	PARAGON Clean Plex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim paneli (Paragon Genomics, San Francisco, CA, ABD)	1
4.	Manyetik raflar	1
5.	Illumina Iseq 100	1
6.	Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer	1
7.	Centrifuge (Hettich- Universal 320)	1
8.	Vortex (Biosan V-1 plus)	1
9.	Ultra low Freezer (Innova)	1
10.	PCR Cabinet (Ankyra Lab)	1
11.	%90 Etanol	500ml

4.2. YÖNTEMLER:

cDNA hazırlama, multipleks PCR amplifikasyonu ve indeksli primerler kullanılarak ikinci PCR amplifikasyonu PARAGON Clean Plex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim paneli (Paragon Genomics, San Francisco, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

4.2.1. CDNA HAZIRLAMASI

Bu prosedürde, belirli miktarda RNA ekstresi, 14 µl hacimli atotal karışım elde etmek için DEPC arıtılmış su ve 3 µl RT Primer karışımı DP ile karıştırılır. Bu prosedürde kullanılacak RNA ekstraktının miktarı, nanodrop kullanılarak ölçülen ekstraktın viral RNA yüküne bağlıdır. DEPC ile muamele edilmiş nükleaz içermeyen su miktarı, alınan RNA ekstraktının miktarına göre de belirlenir.

1. 1 µl RNA ekstraksiyon, aşağıdaki hacimde DEPC ile muamele edilmiş nükleaz içermeyen su ve RT Primer Karışımına eklenir.

DEPC su	8 µl
RT Primer karışımı	3 µl
RNA ekstraksiyon	2 µl
Toplam hacim	14 µl

2. Tüpler, termocycler'da 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilir.

3. Tüpler, ters transkriptaz reaksiyonu için ana karışım hazırlanana kadar inkübasyondan hemen sonra buz üzerine konulur.

2. Tüpler, termocycler'da 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilir.

4. RT reaksiyon karışımı aşağıdaki konsantrasyonda hazırlanır:

RT Tamponu	5 µl
RT Enzim	1 µl
cDNA	14µl
Toplam hacim	20µl

5. Tüpler aşağıdaki sıcaklıkta termocyclers içine yerleştirilir:

8 ° C	10 dakika
42 ° C	80 dakika
4 ° C	∞

6. Döngü tamamlandığında, tüplere 2 µl durdurma tamponu eklenir ve vorteksenerek karıştırılır.

4.2.2. RT SONRASI PURİFİKASYONU

Bu işlem, AMPURE X manyetik boncuk süspansiyon saflaştırma çözeltisi ile gerçekleştirilir.

1. Manyetik boncuk süspansiyonu kuvvetlice vortekslendi ve 39.6 µl çözelti 22 µl cDNA ürününe eklenir.

2. Bu karışım, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.

3. Tüpler manyetik rafta yerleştirildi ve sıvı berraklaşana ve boncuklar tüplerin bir tarafına çekilinceye kadar 2 dakika inkübe edilir.

4. Süpernatant, boncuklar manyetik raftayken dikkatlice çıkarılır ve atılır. Kalan tüm süpernatant, boncuklar alınmadan tüpün / kuyucuğun altından dikkatlice çıkarılır.

5. Her bir tüpe 200 µl taze hazırlanmış %70 Etanol ilave edilir ve tüp manyetik rafa, tüplerin şeffaf tarafının mıknatısa dayanacağı şekilde yerleştirilir. Boncukların etanol yoluyla diğer tarafa tamamen göç etmesine beklenir ve süpernatant dikkatlice çıkarılır.

6. İkinci yıkamadan sonra, tüpler kalan sıvıyı toplamak için kısa bir süre santrifüjlenir ve manyetik rafa yerleştirilir. Kalan etanol dikkatlice çıkarıldı ve tüpler oda sıcaklığında 5 dakika kurumaya bırakılır.

7. Kurutulmuş boncukları yeniden süspansiyon etmek için 10 µl elüzyon tamponu ilave edildikten sonra tüpler vortekslenir.

4.2.3. MULTİPLEKS PCR REAKSİYONU

1. Multipleks PCR ana karışımı 2 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl 5X mPCR Mix, 1 µl 10X SARS-CoV-2 primer havuzu1 veya Primer havuzu 2 ile hazırlanır.

2. İki havuzun ana karışımına 5 µl cDNA eklenir ve yaklaşık 5 saniye vortekslenir (iki havuz ayrı olarak hazırlanır).

3. Örnekler Termocycler'da aşağıdaki thermal cycling protocol kullanarak çoğaltılır.

ilk denatürasyon	95 °C	10 dakika
Denatürasyon	98 °C	15 saniye
Annealing	60 °C	5 dakika
Bekleme sıcaklığı	10 °C	∞

4. Döngü tamamlandığında, tüplere 2 µl durdurma tamponu eklenir ve vortekslenerek karıştırılır.

5. Her örnek için iki havuz multipleks PCR ürünleri toplam 24 µl hacim olmak üzere karıştırılır.

6. Örnekler, prosedür 4.2.2. ile aynı işlemde AMPURE X manyetik boncuklarla saflaştırılır.

4.2.4. DİGESTİON REAKSİYONU

Multipleks PCR reaksiyonundan sonra, spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri ve ekstra multipleks PCR primerleri, aşağıdaki malzemeler ve prosedür kullanılarak PCR ürününden çıkarılır:

1. Aşağıdaki hacime göre digestion reaksiyonu ana karışımını hazırlanır.

Nükleaz içermeyen Su	7 µl
CP Reaktif tamponu	2 µl
CP Digestion reaktifi	1 µl
Toplam hacim	10 µl

2. Digestion reaksiyonu karışımı, 10 µl saflaştırılmış multipleks PCR ürünü ile karıştırılır.

Digestion Reaksiyonu Master Mix	10 µl
Saflaştırılmış örnek	10 µl
Toplam hacim	20 µl.

3. Bu reaksiyon vorteksenerek karıştırılır ve 37 ° C'de 10 dakika inkübe edilir.

4. Döngü tamamlandığında, tüplere 2 µl durdurma tamponu eklenir ve vorteksenerek karıştırılır.

5. Örnekler, prosedür 4.2.2. ile aynı işlemde AMPURE X manyetik boncuklarla saflaştırılır.

4.2.5. İKİNCİ PCR REAKSİYONU

Bu reaksiyon, dizileme işlemi sırasında gerekli olan endeksli primerlerin kullanımını içermektedir. İşleme başlamadan önce, her örnek için çift indeksli primerlerin (i7 ve i5 indeksleri) benzersiz bir kombinasyonu verilir.

1. Endeksli primerler önce çözülür ve iyice vortekslenir.
2. Multipleks PCR ürünleri, numuneye özgü indeksli PCR primerleri ile karıştırılır ve ikinci PCR reaksiyonun ana karışımı aşağıdaki hacimde hazırlanır.

Nükleaz içermeyen su	18 µl
5X ikinci PCR Mix	8 µl
Toplam hacim	26 µl

3. Bu ana karışım, aşağıdaki hacimde saflaştırılmış multipleks PCR ürünü ve indekslenmiş PCR primerleri ile karıştırılır.

İkinci PCR Reaksiyon master karışımı	26 µl
Saflaştırılmış multipleks PCR ürünü	10 µl
İllumina için i5 çift indeksli PCR primer	2 µl
İllumina için i7 çift indeksli PCR primer	2 µl
Toplam hacim	40 µl

4. Örnekler Termocycler'da aşağıdaki thermal döngüsü protocol kullanarak çoğatılır.

İlk denatürasyon	95 °C	10 dakika
Denatürasyon	98 °C	15 saniye

Annealing	60 °C	75 saniye
Bekleme sıcaklığı	10 °C	∞

5. Örnekler, önce bahsedilen aynı prosedür (prosedür 4.2.2.) kullanılarak saflaştırılır.

4.2.6. PÜRİFİKASYON SONRASI KONSANTRASYON ÖLÇÜMÜ

1. 199 µl Qubit tamponu 1 µl Qubit reaktifi ile karıştırılarak 1: 200 çalışma solüsyonu oluşturulur.
2. Bu çalışma solüsyonunun 199 µl'si, 1 µl saflaştırılmış ikinci PCR ürünü ile karıştırılır.
3. Örnekler vorteksenir ve 2 dakika oda sıcaklığında tutulur.
4. Daha sonra tüpler, DNA konsantrasyonu için Qubit Fluorometer ile ölçülür.

4.2.7. ÖRNEK HAVUZ HAZIRLAMA VE ILLUMİNA ISEQ 100 İLE DİZİLEME

Qubit ile miktar ölçümünden sonra, her numune ayrı ayrı Nanomolar (1nM)'a sulandırılır. Bu 1nM örnek tekrar 100 pikomolar (pM)'a seyreltilir. Son olarak, seyreltilmiş numunenin her birinden 10 µl eklenerek 100pM örnek kütüphanesi hazırlanır. Her adımda hazırlanan çözeltiler Qubit Florometre ile ölçülür.

Iseq100 Illumina'da kullanılan kartuş, numunelerin cihaza yüklenmesinden önce en fazla 18 saat oda sıcaklığında tutulur. Buna ek olarak, her bir numune için indeks kombinasyonu, cihazdaki ekranın numune kayıt kısmına dikkatlice girilir. Tüm bunlar tamamlandıktan sonra, numune havuzu kartuşa yüklenir.

Akış hücresi ve numune kütüphanesi eklendikten sonra, kartuş cihazdaki tepsiye yerleştirilir ve cihazın iç kısmına girilir. Ekranın sol tarafında, bulunan panelde her şey tarandıktan sonra dizileme başlatılır.

4.2.8. MOLEKÜLER KARAKTERİZASYON VE FİLOGENETİK ANALİZİ

Numunelerin sekans verileri Iseq100'den FASTQ formunda elde edilir. Bu veri formu, Genome Detective olarak bilinen platform kullanılarak analiz edilir (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/virus/>). Sekanslanan numunelerin her birinin toplam kapsamı, okumaları ve derinliği bu platformdan çıkarılır. Buna ek olarak, nükleotid varyasyonları ve amino asit mutasyonları hakkında bilgi de elde edilir. Genom Detective platformu ayrıca, her bir numunenin FASTQ verilerini, daha fazla analiz için indirilen ve kullanılan FASTA'ya çevirmek için kullanılır.

Her örnek için kalite, kapsama ve nükleotid varyasyonları, Nextclade olarak bilinen başka bir platformdan elde edilen sonuçlarla da çapraz kontrol edilir (<https://clades.nextstrain.org/>). Nextclade platformu ayrıca her numunenin ilgili klad belirlemek için kullanılır. Buna ek olarak, izolatların soy sınıflandırması için da PANGOLIN (<https://pangolin.cog-uk.io/>) kullanılarak yapılır.

Genome Detective'den elde edilen FASTA verileri, refrence genomları ile allignment ve filogenetik ağacın oluşturması için Moleküler Evrimsel Genetik Analiz (MEGA-X) yazılımına aktarılır. Her diziye yüksek kimlik puanı olan dizileri bulmak için GISAID aramaları da yapılır. Filogenetik karşılaştırma, MEGA-X yazılım paket programı kullanılarak mesafe matrisi / UPGMA yöntemi ile p-distance parametresi ve 1000 bootstrap değeri ile yapılır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. NUMUNELERİN DİZİLEME KALİTESİ VE MİKTARI

İzole edilmiş RNA örnekleri Ankara Üniversitesi İbn Sina Hastanesi'nden alındı. PARAGON dizileme kiti kullanılarak toplam 96 örnek dizileme yapıldı. Aşğıdaki sonuçlar, toplam örneklerin 72'sini temsil etmektedir. Kalan 24 örnek, kapsama yüzdesi ve dizileme veri kalitesi düşük olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Analiz edilen 72 örnek için genel kapsamın %85'ten fazla olduğu ve skorun veya okumaların 50,000'den fazla olduğu bulundu. Örneklerin kapsama yüzdesi ve puanı Çizelge 5.1. 'de rapor edilmiştir.

Çizelge 5. 1. Illumina Iseq 100'den elde edilen örneklerin dizileme derinliği ve kapsamı

Örnek ID.	Okumalar	Kapsam	Derinlik
1.	17236	91.8	72.8
2.	33859	97.3	133.8
3.	54220	98.7	211.2
4.	10640	93.8	48
5.	22726	96.7	90.4
6.	16322	68.8	89.6
7.	11548	89.8	45.1
8.	44164	98.1	174.7
9.	11067	88.4	38.5
10.	7637	97.4	34
11.	29464	96.2	117.7
12.	25873	94	105.9
13.	13270	90.4	53
14.	36119	98.7	139.5
15.	12165	88.8	52.2
16.	12165	88.8	52.2
17.	~30000	98.5	~140
18.	90572	98.7	352.8
19.	~20000	89.8	~90
20.	50418	97.4	199
21.	38769	98.2	150.5
22.	23906	95.4	95.6
23.	9165	87.4	40.7
24.	386620	99.7	1284.2
25.	6771	90.1	17.30

Çizelge 5.1. (devam)

26.	21934	99.1	75.5
27.	5992	97.8	13.80
28.	45337	98.9	153.4
29.	34640	93.6	115.1
30.	207881	97.8	710.7
31.	45042	85.8	179.1
32.	5323	95.7	17.90
33.	6238	94.2	15.30
34.	59092	98.9	115.5
35.	98156	99.6	350.9
36.	66970	98.9	240
37.	16428	99	52.7
38.	70000	99.5	~200
39.	60887	99.8	201.9
40.	16120	98.6	44.8
41.	195162	99.5	682.2
42.	28453	99.2	95.9
43.	28895	98.8	88.1
44.	83258	99.5	296.5
45.	28174	98.6	96.5
46.	336835	99.3	1270.3
47.	232731	99.3	886.1
48.	382857	98.8	1516
49.	243037	98.5	949.3
50.	189890	98.4	697.1
51.	116953	99.6	451.4

Çizelge 5.1. (devam)

52.	157167	99	589.1
53.	300793	99.7	1149.9
54.	288352	99.5	1133.5
55.	314026	98.9	1284.8
56.	176716	98.9	687.1
57.	144877	99.3	551.1
58.	538255	99.9	2412.7
59.	201899	99.2	823.2
60.	200910	99.3	819.1
61.	376315	99.7	1615.6
62.	262787	98.7	1041.6
63.	262787	98.7	1041.6
64.	314204	99.3	1290.8
65.	267402	99.1	1073.9
66.	~200000	99.8	~900
67.	226050	99.3	944.1
68.	124542	97.9	442.5
69.	144302	99	546.2
70.	228731	99.2	940.8
71.	460676	99.7	1993.2
72.	380261	99.3	1626.1

5.2. DİZİLERDEKİ NÜKLEOTİD VARYASYONLARININ ANALİZİ

Yüksek dizileme kapsamına sahip 72 örnekte, toplam 84 nükleotid varyasyonu gözlemlendi. Çizelge 5.2. de görüldüğü gibi bu varyasyonlar genomun 3'UTR, ORF1ab, S, ORF3a, M, N ve ORF7a bölgelerinde görülmüştür. E geni, hiçbir mutasyon gözlenmediği için genomun en korunmuş kısmıydı. Bildirilen toplam nükleotid varyasyonlarından 45'i eşanlı olmayan ve kalan 39'u eşanlı mutasyonlardı.



Çizelge 5. 2. Dizilerdeki nükleotid varyasyonları ve genomdaki yerleri

No.	Nükleotid Varyasyon	Bulunduğu Geni	Mutasyon Sıklığı	Mutasyon Tipi
1.	241 C>T	3'UTR	70	Non coding
2.	2416C>T	NSP2	1	Eş anlamlı
3.	900C>T	NSP2	1	Eş anlamlı olmayan
4.	1916A>G	NSP2	1	Eş anlamlı olmayan
5.	2449C>T	NSP2	1	Eş anlamlı
6.	1964A>G	NSP2	1	Eş anlamlı olmayan
7.	2477G>A	NSP2	1	Eş anlamlı olmayan
8.	3037C>T	NSP3	69	Eş anlamlı
9.	4563C>T	NSP3	4	Eş anlamlı olmayan
10.	6416G>A	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
11.	3406A>C	NSP3	2	Eş anlamlı olmayan
12.	2842C>T	NSP3	1	Eş anlamlı
13.	6310C>T	NSP3	19	Eş anlamlı
14.	7303C>T	NSP3	19	Eş anlamlı
15.	3138A>G	NSP3	1	Eş anlamlı
16.	5971A>G	NSP3	1	Eş anlamlı
17.	7201A>G	NSP3	1	Eş anlamlı
18.	8138T>C	NSP3	1	Eş anlamlı
19.	8532C>T	NSP3	1	Eş anlamlı

Çizelge 5.2. (devam)

20.	8537A>C	NSP3	1	Eşanlımlı
21.	4927C>T	NSP3	3	Eşanlımlı
22.	3266A>G	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
23.	7431C>A	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
24.	4486G>T	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
25.	7018T>G	NSP3	1	Eşanlımlı
26.	7019G>T	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
27.	5365C>T	NSP3	2	Eş anlamlı olmayan
28.	3613T>G	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
29.	3621G>A	NSP3	1	Eşanlımlı
30.	2737T>G	NSP3	1	Eşanlımlı
31.	6688T>C	NSP3	1	Eşanlımlı
32.	5683G>T	NSP3	1	Eş anlamlı olmayan
33.	9430C>T	NSP4	1	Eşanlımlı
34.	9803C>T	NSP4	1	Eşanlımlı
35.	9502C>T	NSP4	18	Eşanlımlı
36.	9693C>T	NSP4	2	Eş anlamlı olmayan
37.	8617T>C	NSP4	1	Eşanlımlı
38.	8618G>T	NSP4	1	Eş anlamlı olmayan
39.	9120C>T	NSP4	1	Eş anlamlı olmayan
40.	9319C>T	NSP4	1	Eşanlımlı
41.	8917C>T	NSP4	1	Eşanlımlı
42.	10057T>C	NSP5	1	Eşanlımlı

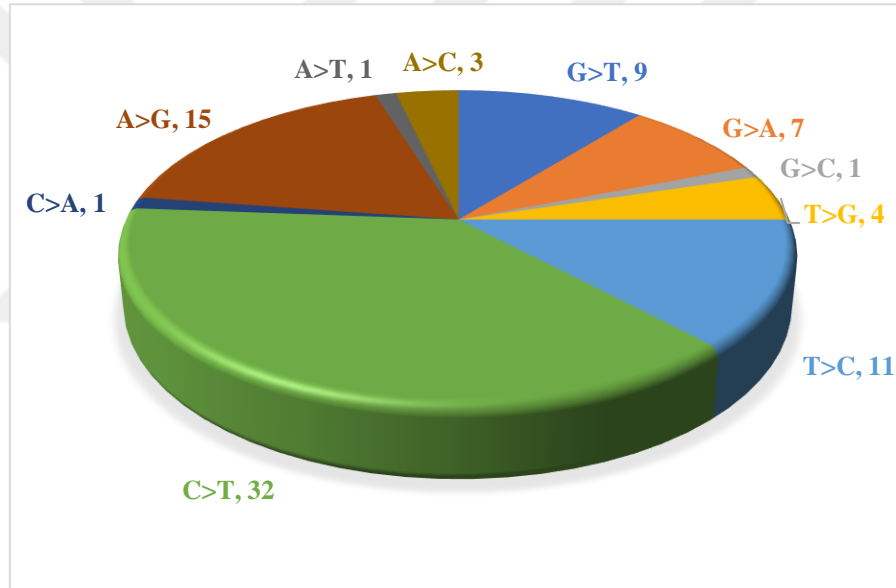
Çizelge 5.2. (devam)

43.	11839A>G	NSP6	1	Eşanlımlı
44.	11686T>C	NSP6	1	Eşanlımlı
45.	12530T>G	NSP8	1	Eş anlamlı olmayan
46.	12529A>G	NSP8	2	Eş anlamlı olmayan
47.	14408C>T	RdRp	70	Eş anlamlı olmayan
48.	14648A>G	RdRp	33	Eş anlamlı olmayan
49.	15894G>T	RdRp	3	Eş anlamlı olmayan
50.	15896T>C	RdRp	1	Eş anlamlı olmayan
51.	15906G>T	RdRp	1	Eş anlamlı olmayan
52.	15009T>C	RdRp	8	Eşanlımlı
53.	14477A>G	RdRp	1	Eş anlamlı olmayan
54.	13509C>T	RdRp	1	Eşanlımlı
55.	13536C>T	RdRp	2	Eşanlımlı
56.	14855T>C	RdRp	2	Eş anlamlı olmayan
57.	14459T>C	RdRp	1	Eş anlamlı olmayan
58.	17898C>T	Helikaz	1	Eşanlımlı
59.	16887C>T	Helikaz	1	Eşanlımlı
60.	18744C>T	3'-to-5' Exonucleaz	4	Eşanlımlı
61.	19839T>C	EndoRNaz	29	Eşanlımlı
62.	20268A>G	EndoRNaz	10	Eşanlımlı
63.	20178C>T	EndoRNaz	1	Eşanlımlı

Çizelge 5.2. (devam)

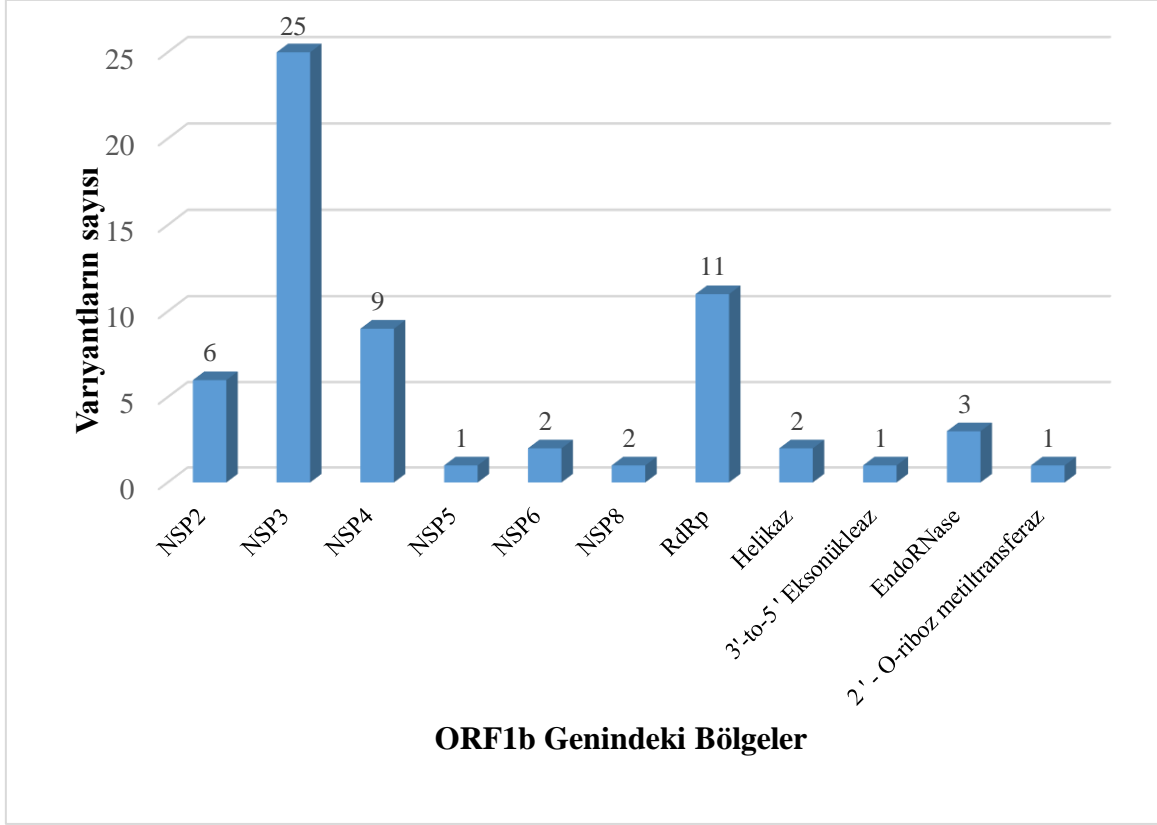
64.	20808G>A	2'-O-ribose methyltransferaz	1	Eş anlamlı
65.	23403A>G	S	50	Eş anlamlı olmayan
66.	24053G>T	S	1	Eş anlamlı olmayan
67.	24453A>G	S	4	Eş anlamlı olmayan
68.	23125A>T	S	3	Eş anlamlı olmayan
69.	23126G>A	S	2	Eş anlamlı olmayan
70.	23919A>G	S	1	Eş anlamlı
71.	22550C>T	S	4	Eş anlamlı olmayan
72.	25348G>T	S	2	Eş anlamlı olmayan
73.	24870T>C	S	2	Eş anlamlı olmayan
74.	21774C>T	S	13	Eş anlamlı olmayan
75.	24684A>G	S	1	Eş anlamlı olmayan
76.	25626C>T	ORF3a	2	Eş anlamlı
77.	25563G>T	ORF3a	1	Eş anlamlı olmayan
78.	26110C>T	ORF3a	4	Eş anlamlı olmayan
79.	27002C>T	M	2	Eş anlamlı
80.	27741C>T	ORF7a	13	Eş anlamlı
81.	28881G>A	N	49	Eş anlamlı olmayan
82.	28882G>A	N	49	Eş anlamlı olmayan
83.	28883G>C	N	49	Eş anlamlı olmayan
84.	29443A>C	N	1	Eş anlamlı olmayan

Virüsün genomunda en nükleotid varyasyonunu sunan kısım ORF1ab'ıdır. Bu bölgede toplam nükleotid varyasyonlarının %75'i gözlenmiştir. Bunu toplamın S bölgesi (%14.2), N bölgesi (%4.8), ORF3a (%3.6), M ve ORF1ab bölgeleri (her biri %1.2) izlemektedir. Buna ek olarak, en sık gözlenen nükleotid varyasyon paterni, nükleotid Sitozinin Timin ile değiştirildiği C>T idi. Şekil 5.1. de görüldüğü gibi toplam 84 nükleotid varyasyonundan 32'si C > T nükleotid varyasyonlarını sergiledi. Buna karşılık, çalışmamızda T>A ve C>G varyasyon paternleri bildirilmemiştir.



Şekil 5. 1. Sekanslı örneklerde nükleotid varyasyonlarının paternleri ve sıklığı

Bölüm 1'de belirtildiği gibi, SARS-CoV-2'deki en büyük gen, yani ORF1ab, farklı proteinleri kodlayan bölgeleri içerir. Bu çalışmada gözlemlenen toplam nükleotid varyasyonlarının %74.6'sı ORF1ab'deki bu farklı bölgelere aitti. Şekil 5.2.'de gösterildiği gibi ORF1ab'deki toplam 63 nükleotid varyasyonunun 25'i, NSP3'ü kodlayan bölgede bulundu.



Şekil 5. 2. ORF1ab genindeki nükleotid varyasyonlarının dağılımı

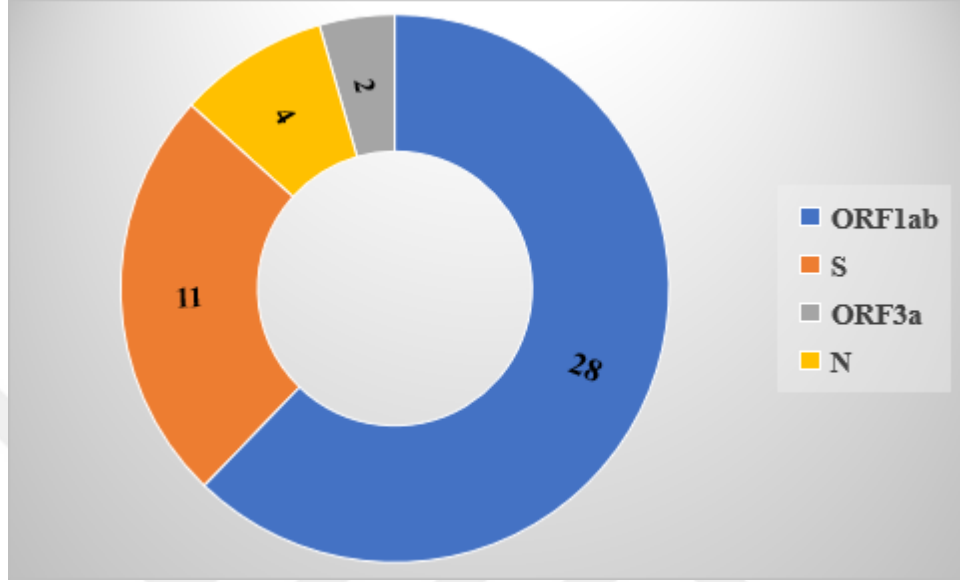
Bu varyasyonlara ek olarak, genomun S, ORF1ab, M ve N bölgelerinde belirli eklemeler ve silmeler (delesyon ve insersiyonlar) tespit edildi. ORF1ab geni, en fazla sayıda nükleotid silme ve ekleme (4 silme ve 1 ekleme), ardından S geni ve N geni sergiledi. M bölgesinde de bir ekleme bildirildi (Çizelge 5.3.).

Çizelge 5. 3. Nükleotid eklemeleri ve silmeleri ve genomdaki ilgili yerleri

No.	Nükleotid İnsersyon/Delesyonları	Gen	Mutasyonun Sıklığı
1.	23119_23120insCCTACACAG	S	6
2.	686_694delAAGTCATTT	ORF1ab	4
3.	18429_18430insCACATTGGC	ORF1ab	3
4.	692_700delTTTGACTTA	ORF1ab	1
5.	326delT	ORF1ab	1
6.	21992_21994delTAT	ORF1ab	1
7.	25115delC	S	1
8.	26693_26694insTGTCTTTAAAAGA	M	1
9.	29093delT	N	1
10.	29443_29444insATTTTGCTGAATA	N	1
Toplam			20

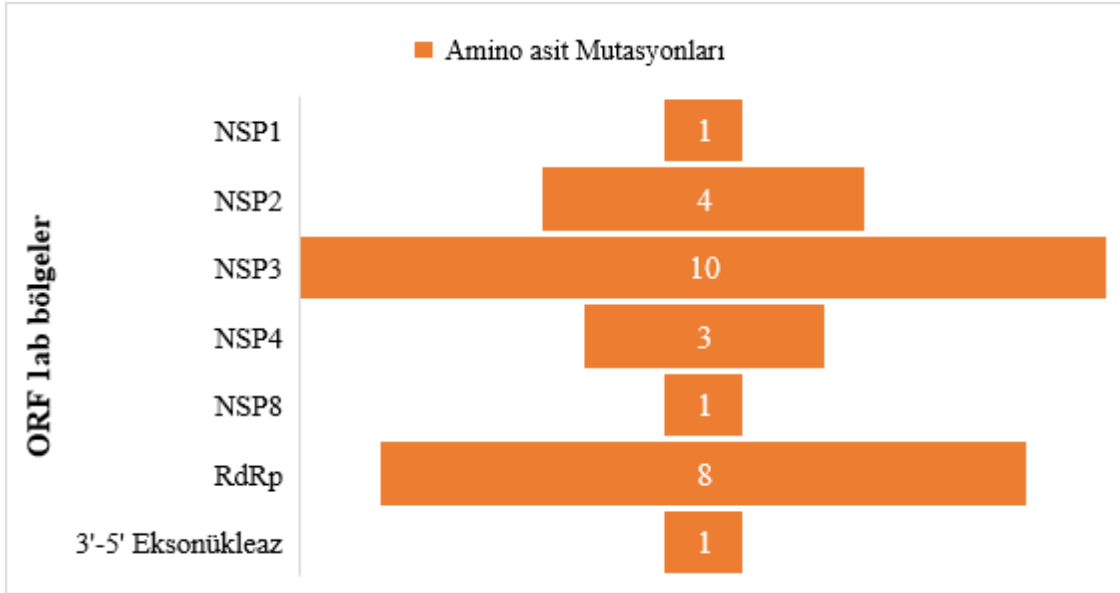
5.3. DİZİLERDEKİ AMİNO ASİT MUTASYONLARININ ANALİZİ

Bu çalışmada toplam 45 amino asit mutasyonu bildirilmiştir. Şekil 5.3.'de belirtildiği gibi en fazla amino asit mutasyonuna sahip gen ORF1ab (28 mutasyon), ardından S geni (11), N geni (4) ve ORF3a (2) idi. Bununla birlikte, genomun geri kalan kısımlarında eşanlı olmayan mutasyonlar görülmedi.



Şekil 5. 3. SARS-CoV - 2 genomunda amino asit mutasyonlarının dağılımı

Bu mutasyonların genin farklı protein kodlama bölgeleri içindeki dağılımı Şekil 5.4'de rapor edilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, ORF1ab geninde bildirilen amino asit mutasyonlarının %35.7'si (10) NSP3'Ü kodlayan bölgede mevcuttur.



Şekil 5. 4. ORF1ab geninde Amino asit mutasyonlarının dağılımı

Bu çalışmada ORF1ab'nin en sık görülen amino asit mutasyonu, ORF1ab'nin RdRp kodlama alanında bulunan P323L (14408C>T) idi. Bu mutasyon 70 hastada görüldü. Yaygın olarak karşılaşılan bir diğer amino asit mutasyonu, RdRp kodlama bölgesinde de bulunan N403S (14648A>G) idi; bu toplam 33 hastada bildirilmiştir (Çizelge 5. 4.)



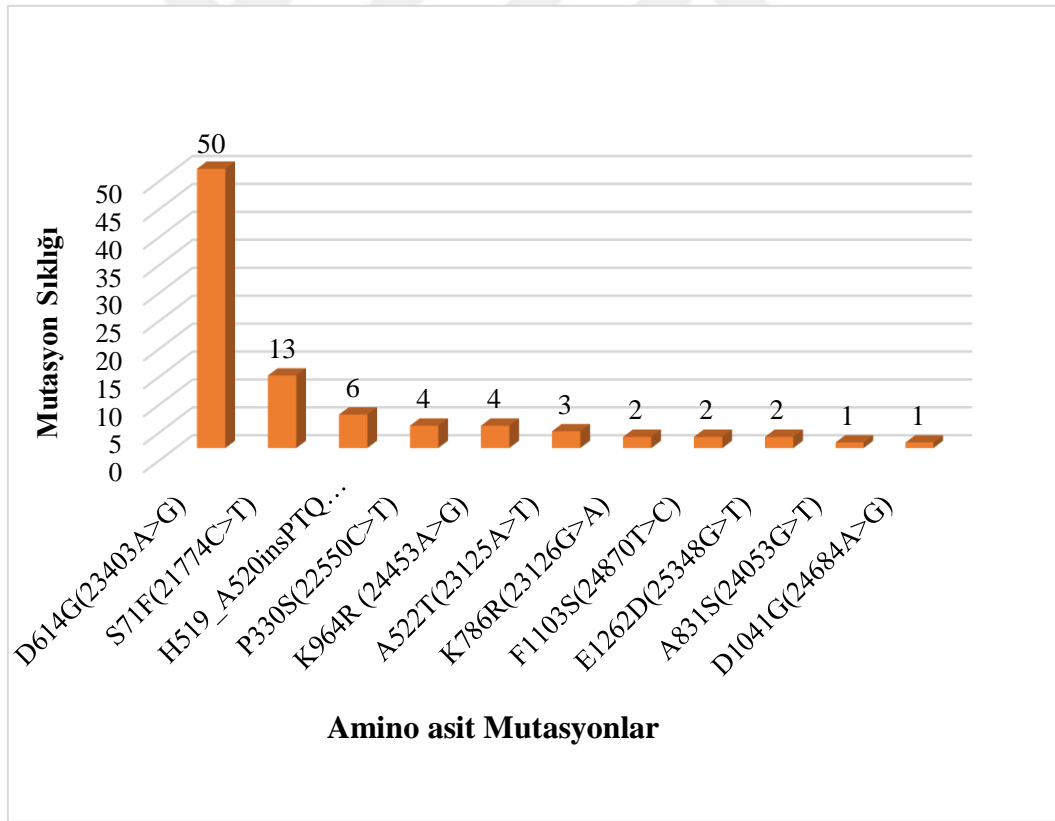
Çizelge 5. 5. ORF1ab'deki Amino asit mutasyonları ve gendeki ilgili yerleri

S.No.	Amino asit Mutasyon	ORF1ab'deki yeri	Mutasyon Sıklığı
1.	K141_F143del (686_694delAAGTCATTT)	NSP1	4
2.	S32L (900C>T)	NSP2	1
3.	T371A(1916A>G)	NSP2	1
4.	I387V (1964A>G)	NSP2	1
5.	E558K (2477G>A)	NSP2	1
6.	S615L (4563C>T)	NSP3	4
7.	V1233I (6416G>A)	NSP3	1
8.	E229D (3406A>C)	NSP3	2
9.	T183A (3266A>G)	NSP3	1
10.	S157I (7431C>A)	NSP3	1
11.	K589N (4486G>T)	NSP3	1
12.	V1434F (7019G>T)	NSP3	1
13.	G301D (3621G>A)	NSP3	2
14.	H298Q (3613T>G)	NSP3	1
15.	M988I (5683G>T)	NSP3	1
16.	A380V (9693C>T)	NSP4	2
17.	A22S (8618G>T)	NSP4	1
18.	T189I (9120C>T)	NSP4	1
19.	F147V (12529A>G,12530T>G)	NSP8	2
20.	P323L (14408C>T)	RdRp	70
21.	N403S (14648A>G)	RdRp	33
22.	M818I (15894G>T)	RdRp	3
23.	L819P (15896T>C)	RdRp	1
24.	Q822H (15906G>T)	RdRp	1

Çizelge 5.4.(devam)

25.	Y346C (14477A>G)	RdRp	1
26.	V472A (14855T>C)	RdRp	2
27.	F340S (14459T>C)	RdRp	1
28.	18429_18430insCACATTGGC	3'-to-5' Exonuclaz	3

S geninde en çok karşılaşılan amino asit mutasyonu D614G (23403A>G) olduğunu Şekil 5.5’de belirtmektedir. Bu mutasyon 50 hastadan toplanan örneklerde bildirilmiştir. Bir başka sık karşılaşılan amino asit mutasyon, 13 hastada görülen S71F(21774 C>T) idi.



Şekil 5. 5. S genindeki Amino asit mutasyonları ve Sıklığı

N genindeki 28881G>A 28882G>A 28883G>C üçlü nükleotid varyasyonları, R203K ve G204R amino asit değişikliklerine yol açar. Çalışmamızda, bu iki varyasyon 49 sekansta mevcuttu. Bunun yanı sıra, iki hastadan ORF3a'daki amino asit varyasyonu P240S (26110C>T) Çizelge 5.6'de bildirilmiştir.

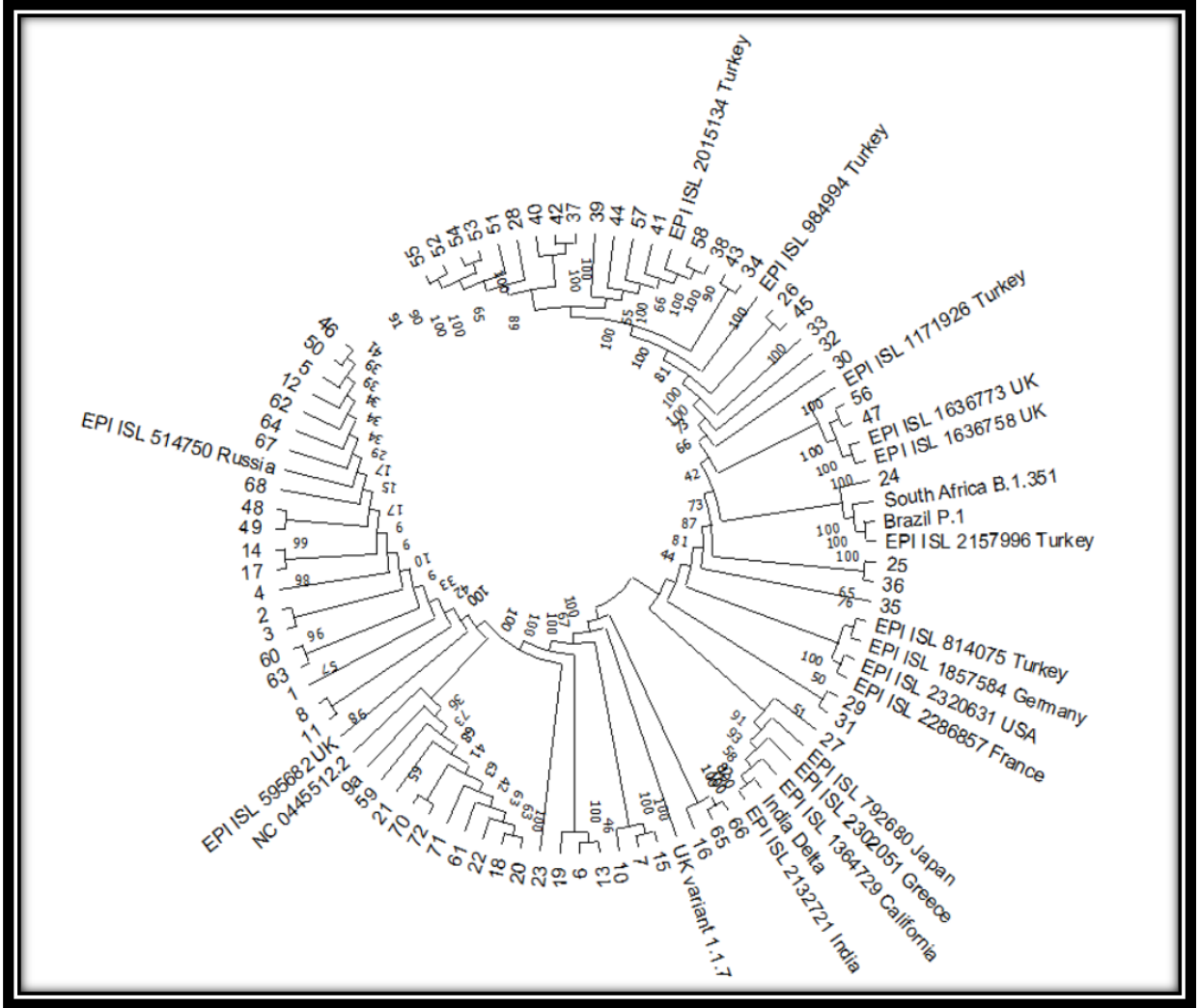
Çizelge 5. 7. N ve ORF3a'daki Amino asit mutasyonları ve sıklığı

S.No.	Amino asit Mutasyon	Bölge	Mutasyon Sıklığı
1.	R203K (28881G>A 28882G>A)	N	49
2.	G204R (28883G>C)	N	49
3.	Q390H (29443A>C)	N	49
4.	Q390_T391insILLNX	N	1
5.	P240S (26110C>T)	ORF3a	4
6.	Q57H (25563G>T)	ORF3a	1

5.4. DİZİLERİN SOY SINIFLANDIRMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ

Soy tanımlama Nextrain platformu kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda viral izolatlarımızın %69.4'ü veya 49'su Klad 20B'ye aitken, kalan %30.6'sı (23 izolatlar) 20A Klad üyeleri idi. Buna ek olarak, izolatların soy Sınıflandırması da kullanılarak yapıldı. PANGOLIN sınıflamasına göre izolatların 46'sı B.1.1 soyunun üyeleri idi, 21 izolatları B.1 soyuna yerleştirildi, 3 izolatları B.1.1.161 soyuydu. Ayrıca, bir izolat B.1.1.317, diğeri B. 1.354 soyunun bir üyesiydi.

Örnekler başka ülkelerden diğer suşlar arasındaki filogenetik benzerlik açısından değerlendirildiğinde, izolatlarımıza en yakın suşlar Rusya'dan EP ISL 514750, İngiltere'den EP ISL 595682, Yunanistan'dan EP ISL 2302051, Türkiye'den EP ISL 2015134 olduğunu Şekil 5.6'de görülen Filogenetik ağaçta gösterilmektedir.



Şekil 5. 6. Örneklerin filogenetik analizi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

6.1.1. NUMUNELERİN DİZİLEME KALİTESİ VE MİKTARI

Bu çalışmada, Clean Plex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim paneli (Paragon Genomics, San Francisco, CA, ABD) kullanılarak toplam 72 RNA izolatu dizilenebilmiştir. Paragon NGS kütüphane hazırlama iş akışı, SARS-CoV-2'nin sıralanması için en hızlı protokollerden biridir (97). Bu 72 örnek için okunan ham veri sayısı 5323-538255 okuma aralığındaydı. Kaydedilen en yüksek kapsama %99.9 ve en düşük %85 idi. Paragon kitini kullanan Türkiye'de yapılan başka çalışma, en yüksek 13,069,752 ham veri okuması ve ortalama %98'den fazla kapsama alanı kaydetti (98).

6.1.2. DİZİLERDEKİ NÜKLEOTİD VARYASYONLARININ ANALİZİ

Çalışmamızda genomun ORF1ab, S, ORF3a, M, N ve ORF7a'larında nükleotid varyasyonları görüldü. E geni, ORF6, ORF7b, ORF8 ve ORF10'da herhangi bir varyasyon bildirilmemiştir. *Karacan ve ark.* tarafından yapılan bir çalışmada, bildirilen mutasyonların esas olarak ORF1ab, S ve N genlerinde bulunduğu benzer raporlar elde edildi (99). Türkiye'den yaygın olarak görülen SARS-CoV-2 mutasyonları üzerine yapılan bir meta-analitik çalışma, ORF1ab, S, ORF3a, M, ORF7a ve N genlerinde mutasyonların varlığını ve bunların çoğunun ORF1ab bölgesinde bulunduğunu bildirmiştir (100). Ayrıca, N geninin ORF1ab geninden sonra en yüksek ikinci nükleotid varyasyonunu sergilediğini bildirmişlerdir. Bu sonuç, S geninde N geninden daha fazla sayıda nükleotid varyasyonunun varlığını belirten raporumuzla çelişkilidir. Ayrıca, ORF1ab ve S genlerinin en yüksek mutasyonlara sahip olduğunu bildiren *Takahiko Koyama* tarafından yapılan bir çalışmadan bizimkine benzer bulgular elde edildi (ORF1ab'da 3328 ve S geninde 687 mutasyonlar). Bu meta-analitik çalışma aynı zamanda ORF1ab'deki mutasyonların çoğunun NSP3'ü kodlayan bölgeye ait olduğunu göstermiştir (101). Bu sonuçlar, ORF1ab, S, ORF31, M, N ve ORF7a dışındaki genomdaki bölgelerin daha korunmuş olarak kabul edilebileceğini gösterebilir. *Hassan ve ark.* tarafından yapılan bir çalışma ayrıca E, ORF6,

ORF7b, ORF8, ORF10'un en az sayıda missense mutasyonu içerdiğini göstermiştir. Ayrıca, NCBI veritabanından elde edilen 3617 SARS-CoV-2 genomu arasında, bu genomların sadece %0.414'ünün E geninde mutasyonlara sahip olduğunu bildirmişlerdir (102).

Bu çalışmada, en sık bildirilen nükleotid varyasyonu, RdRp'yi kodlayan ORF1ab bölgesinde bulunan 14408C>T, NSP3 kodlama bölgesinde bulunan 3037C>T idi. 70 sekansta 14408C>T bildirilirken, 3037C>T 69 vaka görüldü. Benzer bulgular diğer çalışmalardan da elde edilmiştir. Bu, toplam 80 izolatin 59'unda 23403A>G ile birlikte 3037c>T ve 14408C>T varlığını bildiren *Rehman ve ark.* tarafından yapılan çalışmayı içermektedir. Bu araştırma aynı zamanda üç mutasyon arasında bir korelasyon olabileceğini göstermiştir (96). Ayrıca bu üç mutasyon, Temmuz 2020'ye kadar GISAID EpiCoV veritabanına yüklenen Türkiye'den gelen Covid-19 vakalarının yaklaşık %84'ünde bulunmaktadır (100). İlginç bir şekilde, çalışmamızda görülen nükleotid varyasyonlarının bir kısmı Türkiye'den diğer izolatlarda bulunmamaktadır. Bunlardan bazıları 6310C>T, 9502C>T, 14648A>G, 21774C>T, 24453A>G, 23125A>T ve 22550C>T'dir. Çalışmamızda, RdRp kodlayan ORF1ab bölgesinde bulunan 14648 A>G nükleotid varyasyonu 33 izolatta görülmüştür. Halbuki, bu mutasyon Türkiye'den bildirilen izolatların hiçbirinde bildirilmemiştir (98)(99)(100). Ek olarak, önceki sonuçlarda ORF1ab'nin 3'-5' ekzonükleaz kodlama bölgesinde herhangi bir değişiklik bildirilmemiştir. Ancak bu çalışmada, 4 örnekler 3'-5' ekzonükleaz kodlama bölgesinde bir mutasyon (18744C>T) sergilemiştir. 29 izolatta görülen 19839T>C nükleotid mutasyonları ve 10 izolatta bulunan 20268A>G nükleotid mutasyonları da önceki çalışmalarda görülen varyasyonlar arasındaydı. Şaşırtıcı bir şekilde, *Eskier ve ark.* çalışmalarında bu iki mutasyonu sergileyen bir numunenin Ankara'dan elde edildiği bildirilmiştir. Bu sonuç iki mutasyonun diğerleriyle birlikte Ankara'da sıkça karşılaşılan suşların özellikleri olabileceğini gösterebilir. Bu nedenle, bu tür mutasyonların prevalansını ve virüsün patojenitesi ve immün kaçınma kabiliyetine yönelik potansiyel etkilerini değerlendirmek için daha fazla çalışma gereklidir.

Bu çalışmada en sık görülen nükleotid varyasyon paterni, nükleotid Sitozinin Timin ile değiştirildiği C>T idi. Bazı çalışmalar, enfekte konakçı hücrede RNA düzenleme işlemlerinin

bir sonucu olarak SARS-CoV-2 genomundaki C>T mutasyonlarının aşırı olduğunu doğrulamıştır (103). Tek nükleotid varyasyonlarının C>T/G>A ve A>G/T>C varyantlarının genellikle insan Apolipoprotein B mRNA katalitik polipeptit benzeri Düzenleme Enzimi (APOBEC) ve Çift Sarmallı RNA'ya Özgü Adenosin Deaminaz (ADAR) aktiviteleri tarafından baz modifikasyonlarının bir sonucu olarak ortaya çıktığı önerilmektedir (104). Çalışmamızda kaydedilen toplam varyasyonların 31'inde C > T geçiş şekli gözlemlendi. Benzer sonuçlar, C>T nükleotid mutasyon formunun kaydedilen mutasyonların yarısından fazlasını oluşturduğu *Eskier ve ark.* ve *Simmonds* tarafından yapılan araştırmalarda elde edildi (100)(103).

Bu çalışmada, yarısının ORF1ab bölgesinde görüldüğü toplam 4 silme ve 4 ekleme bildirilmiştir. Nükleotid ekleme 23119_23120insCCTACACAG, 6 farklı izolatta rapor edildiği en sık gözlenen ekleme idi. Bu ekleme, 14-685 amino asit kalıntılarını içeren S geninin SI alt biriminde bulunmaktadır. S proteinini konakçı hücrenin reseptörüne bağlamak için gerekli kalıntıların SI alt biriminde bulunduğu dikkat edilmelidir (105). Bu nedenle 23119_23120insCCTACACAG S proteini ve hücre reseptör ile afinitesi üzerindeki etkisi araştırılmalıdır. Bu çalışmadan bildirilen tüm eklemeler en az 9 nükleotid eklemesine sahipti. *Sofya K ve ark.*'a göre uzun eklemeler polimeraz kayması veya sürekli olmayan segmentli RNA'lar oluşumu ile ilişkili şablon anahtarlama sonucu meydana gelen tandem duplikasyon nedeniyle meydana gelebilir (106).

En sık bildirilen delesyon, ORF1ab'de bulunan ve 3 aminoasitin silinmesine neden olan 686_694delAAGTCATTT idi. Çalışmamızda bu delesyon 4 izolatta gözlenirken İsrail, ABD, İsveç, İngiltere, Kanada, Galler ve İzlanda'dan 224 izolatta da bildirilmiştir (107). ORF1ab'deki 21992_21994delTAT, örneklerimizin birinde tespit edildi ve daha önce ABD, Hindistan, Slovenya, Ürdün, Hollanda ve İngiltere'den dizilerde görüldü (108). Ancak küresel endişe varyantlarının ayırt edici özelliği olan delesyonlar (B. 1.1.7 Δ69–70 ve Δ144/145 ve B. 1.351 Δ242–244) bizim izolatlarda mevcut değildi. Bunun bir nedeni, örneğimizin toplandığı zamanda bu varyasyonların mevcut olmaması veya henüz Türkiye'ye yayılmaması olabilir.

6.1.3. DİZİLERDEKİ AMİNO ASİT MUTASYONLARININ ANALİZİ

Yukarıda tartışıldığı gibi, bu çalışmada gözlemlenen 44 amino asit mutasyonundan 27'si SARS-CoV-2 genomunun ORF1ab'sine aittir. Bu mutasyonlar NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP8, RdRp ve 3'-to-5' Eksonükleaz için kodlanan bölgelerde dağıtılmış halde bulunmaktadır.

ORF1ab'de en sık bildirilen amino asit mutasyonu, dizilerimizin 70'inde bulunan P323L (14408C>T) idi. Bu mutasyon, tüm viral RNA moleküllerinin sentezine aracılık eden bir protein olan RdRp kodlayan bölgede bulunmaktadır. Bu mutasyon Avrupa ve Kuzey Amerika'da daha sık görülür ve genomun M ve E bölgelerinde gözlenen mutasyonlarla önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur (109). Hacimli prolidin halkası ile Prolin, RdRp'nin ikincil yapısına katkıda bulunur ve yan zincirleri proteinin omurgasına bağlanır. Lösin, hidrofobik bir amino asit olmakla birlikte, çoğu zaman katlanmış protein yapısında bulunur (110). Bu nedenle, Prolinin 323 pozisyonundaki Lösin'e değişiminin, RdRp proteininin esnekliğine sorumlu olduğunu ve bu da replikasyon/transkripsiyon mekanizmasının ve RNA şablonunun diğer bileşenleri ile etkileşimini etkileyebileceğini düşünülmektedir. Buna ek olarak değişmiş etkileşim sonunda diğer mutasyonların ortaya çıkmasına neden olabilir (96). Bu çalışmadan elde edilen ilginç sonuçlardan biri, izolatların %45'inde amino asit mutasyonu N403S (14648A>G) varlığıdır. Bu mutasyon, şimdiye kadar yayınlanmış olan Türkiye'den gelen izolatların hiçbirinde bildirilmemiştir ve örnek toplama sırasında Ankara'da yayılan mutasyonlarından biri olabilir. Bu nedenle, RdRp'nin işleyişi üzerindeki etkisini belirlemek için bu mutasyonun daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada sıralanan izolatların 50'si, S proteininde D614G mutasyonunu sergilemiştir. Bu mutasyon Şubat 2020'de Avrupa'da yayılmaya başladı. Türkiye, İsrail, ABD'den yapılan diğer çalışmalar ve çalışma katılımcıları arasında bu mutasyonun baskın varlığını bildirmiştir (100)(107)(111). D614G mutasyonu, virüsün artan bulaşma hızı ile ilişkilidir. Bunun nedenlerinden biri, Aspartik asit Glisin ile değiştirildiği için mutant formun komşu protomer ile azaltılmış bir bağa sahip olması olabilir. Azaltılmış hidrojen bağı daha sonra S1 ve S2 arasındaki etkileşimin azalmasına ve viral materyalin dökülmesinin artmasına neden olur (32). Diğer

çalışmalarla uyumlu olarak, bu mutasyon genellikle 14408C>T ve 3037C>T ile birlikte bulunmuştur. Bu birlikte var olan mutasyonlar son zamanlarda Avrupa'da en sık gözlenen varyantlardan birinin karakteristiği olarak tanımlanmıştır (92).

Görülen diğer bir aminoasit mutasyonları arasında S71F (21774C>T), H519_A520INSPTQ (23119_23120INSCCTACACAG), P330S (22550C>T), K964R(24453A>G), A522T (23125A>T), K786R(23126G>A), F1103S(24870T>C), E1262D(25348G>T), A831S(24053G>T) ve D1041G(24684A>G) vardı. Tüm bu mutasyonlar D614G ile kombinasyon halinde de bulunmuştur. Bu mutasyonların sonucu henüz açıklanmamıştır, ancak *Qianqian Li ve ark.* tarafından yapılan bir çalışma, A831S (24053G>T)'nın B38 olarak adlandırılan monoklonal antikora duyarlılığı azalttığını gösterdi. Çalışmamızda bu mutasyon sadece bir izolatta görülmüştür.

Diğer yaygın olarak karşılaşılan eşanlamli olmayan mutasyonlar, N geninde bulunan R203K (28881G>A 28882G>A), G204R (28883G>C) ve Q390H (29443A>C) idi. Bu mutasyonlar izolatlarımızın 49'unda gözlemlendi. Nükleokapsid proteinini kodlayan bölgedeki 28881 pozisyonunda bulunan mutasyon, iki amino asidin, yani 28881 (R'den K'ye) ve (G'den R'ye) ikame edilmesini indükleyen bir çift kodon mutasyonu ile ilgilidir. N proteininin mutasyona uğramış 203/204 bölgesi, viral transkripsiyon ve replikasyonu kontrol etmek için çok önemli bir bölgedir. Bu yeni düzenleme, proteinin işleyişini değiştirebilir, çünkü mutant amino asit, referans protein dizilerinde bulunan orijinal amino aside kıyasla önemli ölçüde farklı bir izoelektrik noktaya sahiptir (98). SARS-CoV'un N proteini, virion montajı sırasında sarmal nükleokapsidin oluşumundan sorumludur (112). Bu protein bir bağışıklık tepkisine neden olabileceğinden, bu mutasyonlar N proteinini içeren aşı araştırmalarında dikkate alınmalıdır.

ORF3a'da en sık bildirilen amino asit mutasyonlarından biri olan Q57H (25563G>T) izolatlarımızda da görülmektedir. Bu mutasyonun *Daniele Mercatelli ve ark.* tarafından SARS-CoV-2 genomunda en sık görülen 20 mutasyondan biri olduğu kaydedilmiştir (31). Bu mutasyon Türkiye'den gelen izolatlarda da yüksek frekansta bildirilmiştir (100). Bu çalışmaların

aksine, Q57H (25563G>T) izolatlarımızdan sadece birinde bildirilmiştir, bu da zamanla görünümünün azaldığını gösterebilir.

6.1.4. DİZİLERİN SOY SINIFLANDIRMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ

Nextrain platformun'a göre şu anda yayılan 5 ana klad vardır. Bu kladlar 19A, 19B, 20A, 20B ve 20C'dir. Bu kladların ana tanımlama özellikleri, özgü bir grup mutasyonun varlığıdır (113). 19B, C8782T ve T28144C nükleotid mutasyonlarının varlığı ile orijinal klad 19A'dan farklıdır. C3037T, C14408T ve A23403G mutasyonları, 20A klad için tanımlayıcı mutasyonlardan bazılarıdır. Yirmi üç izolatımız, esas olarak C3037T ve C14408T'nin varlığı nedeniyle 20A klad olarak kategorize edildi. 49 izolatımız G28881A, G28882A ve G28883C mutasyonların sahip olduğu için 20B'ye sınıflandırmaktadır. Çalışmamızda C1059T ve G25563T içeren 20C mevcut değildir (111).

Ayrıca, PANGOLIN soy sınıflandırmasına göre, izolatların çoğunluğu B.1.1 soyunun üyeleridir. Bu soy ilk olarak 15-02-2020'de bildirilmiştir ve İngiltere, ABD, Japonya, Almanya ve Rusya'da yüksek sıklıkta görülmeye devam etmiştir. Bu soyun tanımlayıcı özellikleri, N genomunda üçlü nükleotid mutasyonları G28881A, G28882A ve G28883C'nin varlığıdır. İzolatların bir diğeri 21'i, bazı Avrupa ülkelerinde Ocak 2020 'de daha önce gözlemlenen B.1 üyeleridir. Çalışmamızda bu iki soyun varlığının artması, Ankara'daki en erken enfeksiyonların esas olarak Avrupa kökenli bu iki soydan kaynaklandığını gösterebilir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışmada, 72 viral izolatın tüm genomu sekanslandı ve genomların kapsama alanı %85-99.8 idi. Genomun analizinde toplam 84 nükleotid varyasyonu gözlemlendi. Bu varyasyonların çoğu ORF1ab, S ve N genlerinde bulunmaktadır. Bu genlerde çok sayıda varyasyonun varlığı diğer çalışmalarda da bildirilmiştir ve bu sonuçlar bu genlerin mutasyon için sıcak nokta alanları olabileceği sonucuna yol açabilir. Bu varyasyonların yarısından fazlasının eş anlamlı mutasyonlar olması, hastalığın ciddiyeti ve bağışıklık kaçırma üzerinde bir etkisi olabileceğini gösterebilir. Ancak, bunların patojenite, replikasyon ve ilaç direnci üzerindeki etkileri hala

bilinmemektedir. Yukarıda bahsedilen mutasyonlar, diğer dizinlerin tanımlanmasına ve aşuların geliştirilmesine yol açabilir. Bu nedenle, bu mutasyonları sürekli takip etmek ve bu mutasyonların reseptör afinitesini, yayılma kabiliyetini ve patojeniteyi nasıl etkilediğini daha fazla araştırmak gerekmektedir. Bu çalışmada en baskınsoy, başlangıçta Avrupa'da görülen B. 1.1 idi. Haziran 2020'ye kadar Avrupa'dan gelen izolatların çoğunluğu bu soyun üyeleri idi. Bu çalışmada bu soyun artan görünümü, örnek toplama zamanında Ankara'da da yayıldığı sonucuna varmamızı sağlayabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, açıklanan mutasyonların ilaca dirençli viral fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olup olmayacağını görmek için kullanılabilir. Verilerimiz, teşhis ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve potansiyel ilaç direnç mekanizmalarının çalışılmasına yardımcı olabilir. Ek olarak, mutasyon sıcak noktalarının tespiti, yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için etkili PCR primerleri ve problemleri tasarlamaya da yardımcı olabilir.

KAYNAK LİSTESİ

1. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. What Is a Pandemic? *J Infect Dis.* 2009;200(7):1018–21.
2. WHO. Environmental health in emergencies [Internet]. Available from: https://www.who.int/environmental_health_emergencies/disease_outbreaks/en/
3. WebMD. Pandemics [Internet]. Available from: <https://www.webmd.com/cold-and-flu/what-are-epidemics-pandemics-outbreaks>
4. Riley E. What Is a Pandemic? Definition, Examples, and How It Compares to an Epidemic [Internet]. Available from: <https://www.goodrx.com/blog/what-does-pandemic-mean-with-examples-vs-epidemic/>
5. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr.* 2020;87(4):281–6.
6. WHO. WHO Timeline - COVID-19 [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/detail/27-04-2020-who-timeline---covid-19>
7. Covid-19 Coronavirus pandemic [Internet]. [cited 2020 Aug 8]. Available from: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
8. Ceraolo C, Giorgi FM. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *J Med Virol.* 2020;92(5):522–8.
9. Santantonio TA, Messina G. Update on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Vol. 14, *The Open Neurology Journal.* 2020. 4–5 p.
10. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418–23.

11. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turkish J Med Sci.* 2020;50(SI-1):549–56.
12. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and Phenotype of COVID 19: Their Roles in Pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2020;
13. Zhang YZ, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* [Internet]. 2020;181(2):223–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
14. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le Infez Med.* 2020;28(2):174–84.
15. Mousavizadeh, Leila SG. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiology, Immunology Infection.*
16. Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (Sars-coV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. *Pathogens.* 2020;9(3):1–15.
17. Ziebuhr EJSD. The non structural Proteins Directing Coronavirus RNA synthesis and processing. *Advances in Virus Research.*, Elsevier Inc.; 2016.
18. Khera G. Coronavirus (COVID-19) Structure [Internet]. 2020. Available from: <https://www.scientificanimations.com/coronavirus-explained-through-3d-medical-animation/>
19. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020;42(1):3–11.
20. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virology.* 2019;16(1):1–22.
21. Y. L. Siu, K. T. Teoh, J. Lo, C. M. Chan, F. Kien, N. Escriou, S. W. Tsao, J. M. Nicholls,

- R. Altmeyer, J. S. M. Peiris, R. Bruzzone BN. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. *J Virol.* 2008;82(22):11318–11330.
22. Ho Tsoi, Li Li, Zhefan S Chen, Kwok-Fai Lau, Stephen K W Tsui HYE. The SARS-coronavirus Membrane Protein Induces Apoptosis via Interfering With PDK1-PKB/Akt Signalling. *Biochemical J.* 2014;464(3):439–47.
23. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
24. Perlman ARF. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Helena Jane Maier EBPB, editor. *Coronavirus Methods and Protocols.* Newbury, UK: Humana Press; 2015. p. 1–23.
25. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun [Internet].* 2020;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>
26. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature [Internet].* 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
27. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020;26(4):450–2.
28. Rambaut A, Holmes EC, O’Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol [Internet].* 2020;5(11):1403–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
29. Anand KB, Karade S, Sen S, Gupta RM. SARS-CoV-2: Camazotz’s Curse. *Med J*

Armed Forces India [Internet]. 2020;76(2):136–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2020.04.008>

30. Alm E, Broberg EK, Connor T, Hodcroft EB, Komissarov AB, Maurer-Stroh S, et al. Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the WHO European Region, January to June 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020;25(32):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410>

31. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. *Front Microbiol.* 2020;11(July):1–13.

32. Korber B, Wm F, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2 Introduction : 2020;1–33.

33. Toyoshima Y, Nemoto K, Matsumoto S, Nakamura Y, Kiyotani K. SARS-CoV-2 genomic variations associated with mortality rate of COVID-19. *J Hum Genet* [Internet]. 2020;65(12):1075–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-020-0808-9>

34. CDC centers for DC and P. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions [Internet]. 2021. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-info.html#>

35. Control EC for DP and. SARS-CoV-2 variants of concern as of 24 May 2021 [Internet]. 2021. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern>

36. Napoli. MCMRAASCDR Di. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19) [Internet]. STAT PEARLS Publishing; 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>

37. WHO. SARS-CoV-2 Variant – United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/csr/don/21-december-2020-sars-cov2->

variant-united-kingdom/en/

38. COG-UK update on SARS-CoV-2 Spike mutations of special interest Report 1. 2020;01(December):1–9.
39. Luan B, Wang H, Huynh T. Molecular Mechanism of the N501Y Mutation for Enhanced Binding between SARS-CoV-2's Spike Protein and Human ACE2 Receptor. bioRxiv [Internet]. 2021;2021.01.04.425316. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2021/01/05/2021.01.04.425316.abstract>
40. COG-UK report on SARS-CoV-2 Spike mutations of interest in the UK. 2021;1(January):1–41.
41. Singh J. Structure-function investigation of a new VUI-202012 / 01 SARS-CoV-2 variant Email : Keywords. 2021;1–8.
42. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. Arghavan Alisoltani-Dehkordi [Internet]. 2020;10:2020.12.21.20248640. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.12.21.20248640>
43. Candido S, Mishra S, Crispim MAE, Sales FC, Jesus JG De, Andrade PS, et al. Genomics and epidemiology of a novel SARS-CoV-2 lineage in Manaus , Brazil. 2021;1–45.
44. Long SW, Olsen RJ, Christensen PA, Subedi S, Olson R, Davis JJ, et al. Sequence Analysis of 20,453 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genomes from the Houston Metropolitan Area Identifies the Emergence and Widespread Distribution of Multiple Isolates of All Major Variants of Concern. Am J Pathol. 2021;
45. Veessler D. SARS-CoV-2 immune evasion by variant B.1.427/B.1.429. 2021;

46. Xianding Deng, Miguel A Garcia-Knight, Mir M. Khalid VS, Candace Wang, Mary Kate Morris, Alicia Sotomayor-González DR, Glasner, Kevin R Reyes, Amelia S. Gliwa, Nikitha P. Reddy CS, San Martin, Scot Federman, Jing Cheng, Joanna Balcerek, Jordan Taylor J, A Streithorst, Steve Miller, G. Renuka Kumar, Bharath Sreekumar, Pei-Yi Chen, Ursula Schulze-Gahmen, Taha Y. Taha, Jennifer Hayashi CR, Simoneau, Sarah McMahon, Peter V. Lidsky, Yinghong Xiao PH, et al. Transmission, infectivity, and antibody neutralization of an emerging SARS-CoV_2 variant in California carrying a L452R spike protein mutation. 2021;1–47.
47. Singh J, Rahman SA, Ehtesham NZ, Hira S, Hasnain SE. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat Med.* 2021;
48. Centre E. Emergence of SARS-CoV-2 B . 1 . 617 variants in India and situation in the EU / EEA Event background *Epidemiology.* 2021;(May):1–12.
49. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100–15.
50. Patel KP, Vunnam SR, Patel PA, Krill KL, Korbitz PM, Gallagher JP, et al. Transmission of SARS-CoV-2: an update of current literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(11):2005–11.
51. Priyanka , Om Prakash Choudhary , Indraj Singh GP. Aerosol transmission of SARS-CoV-2: The unresolved paradox. *Travel Med Infect Dis.* 2020;37(January).
52. Patients L, Taylor D, Lindsay AC, Halcox JP. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.* 2020;0–3.
53. Gurusaravanan Kutti-Sridharan, Rathnamitreyee Vegunta, Radhakrishna Vegunta, Babu P. Mohan VRPR. SARS-CoV2 in Different Body Fluids, Risks of Transmission, and Preventing COVID-19: A Comprehensive Evidence-Based Review. *Int J Prev Med.* 2020;11(97).
54. Mukhra R, Krishan K, Kanchan T. Possible modes of transmission of novel coronavirus

SARS-CoV-2: A review. *Acta Biomed.* 2020;91(3):1–11.

55. Andersson MI, Arancibia-Carcamo C V., Auckland K, Baillie JK, Barnes E, Beneke T, et al. SARS-CoV-2 RNA detected in blood products from patients with COVID-19 is not associated with infectious virus. *Wellcome Open Res.* 2020;5:181.

56. Lan Dong, Jinhua Tian, Songming He, Chuchao Zhu, Jian Wang, Chen Liu, MD JY. Possible Vertical Transmission of SARS-CoV-2 From an Infected Mother to Her Newborn. *JAMA.* 2020;323(18):1846–8.

57. B.Coutard, C.Valle, X.deLamballerie, B.Canard, N.G.Seidah ED. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020;176.

58. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;1–10.

59. Kumar M, Taki K, Gahlot R, Sharma A, Dhangar K. A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I - Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;734(336):139278. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139278>

60. Xiaowei Li, Manman Geng, Yizhao Peng, Liesu Meng SL. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal.* 2020;10(2):102–8.

61. Xinjuan Sun, Tianyuan Wang, Dayong Cai, Zhiwei Hu, Jin'an Chen, Hui Liao, Liming Zhi, Hongxia Wei, Zhihong Zhang, Yuying Qiu, Jing Wang AW. Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;53:38–42.

62. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, et al. Review article on Coronavirus. *J Infect Public Health.* 2020;13(5):667–73.

63. Coopersmith CM, Antonelli M, Bauer SR, Deutschman CS, Evans LE, Ferrer R, et al. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. *Crit Care Med.* 2021;49(4):598–622.
64. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Pharmacotherapeutics of SARS-CoV-2 Infections. 2021;
65. Karpiński TM, Ożarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H, Wlodkowic D. The 2020 race towards SARS-CoV-2 specific vaccines. *Theranostics.* 2021;11(4):1690–702.
66. WHO. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
67. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. Current advances in the development of sars-cov-2 vaccines. *Int J Biol Sci.* 2020;17(1):8–19.
68. Marí N, Queiroz GP De, Marinho F V, Chagas MA, Leite LCC, Oliveira SC, et al. Vaccines for COVID-19: perspectives from nucleic acid vaccines to BCG as delivery vector system. 2020;(January).
69. Xu Y, Cheng M, Chen X, Zhu J. Current approaches in laboratory testing for SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020;100:7–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.041>
70. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. Vol. 36, *New Microbes and New Infections.* 2020.
71. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020;27(3):325–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>

72. 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.
73. Bain W, Lee JS, Watson AM, Stitt-Fischer MS. Practical Guidelines for Collection, Manipulation and Inactivation of SARS-CoV-2 and COVID-19 Clinical Specimens. *Curr Protoc Cytom.* 2020;93(1):1–11.
74. Da Silva SJR, Silva CTA Da, Guarines KM, Mendes RPG, Pardee K, Kohl A, et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *ACS Infect Dis.* 2020;6(9):2319–36.
75. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances the Transport of Infectious Substances. Oms [Internet]. 2008;(January 2007):1–56. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149288/1/WHO_HSE_GCR_2015.2_eng.pdf?ua=1&ua=1.
76. Gand M, Vanneste K, Thomas I, Van Gucht S, Capron A, Herman P, et al. Use of whole genome sequencing data for a first in silico specificity evaluation of the rt-qpcr assays used for sars-cov-2 detection. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1–25.
77. Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):1–22.
78. SapnaJain, Mukesh K.Yadav AK. Techniques for Production and Quality Assessment of Genetically Modified Foods. In: *Genetically Engineered Foods Handbook of Food Bioengineering.* Academic Press; 2018. p. 177–202.
79. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):998–1007.

80. Javalkote VS, Kancharla N, Bhadra B, Shukla M, Soni B, Sapre A, et al. CRISPR-based assays for rapid detection of SARS-CoV-2. *Methods*. 2020;(January).
81. Asia S. Detection of Structural Rearrangements in Embryos. *N Engl J Med*. 2020;2018–21.
82. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. 2020;(March):1–7.
83. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2013;98(6):236–8.
84. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727–33.
85. Illumina. NGS for coronavirus detection and characterization [Internet]. 2020. Available from: <https://www.illumina.com/areas-of-interest/microbiology/infectious-diseases/coronavirus-sequencing.html>
86. Dao TL, Hoang VT, Gautret P. Recurrence of SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients: a narrative review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(1):13–25.
87. Yahav D, Yelin D, Eckerle I, Eberhardt CS, Wang J, Cao B, et al. Definitions for coronavirus disease 2019 reinfection, relapse and PCR re-positivity. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.028>
88. Brief TA. Imported from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-reinfection-sars-cov-2>. 2021;(September). Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-brief-reinfection-sars-cov-2>
89. Prado-Vivar B, Becerra-Wong M, Guadalupe JJ, Márquez S, Gutierrez B, Rojas-Silva

- P, et al. A case of SARS-CoV-2 reinfection in Ecuador. *Lancet Infect Dis.* 2020;2(20):30910.
90. Arafkas M, Khosrawipour T, Kocbach P, Zielinski K, Schubert J, Mikolajczyk A, et al. Current meta-analysis does not support the possibility of COVID-19 reinfections. *J Med Virol.* 2021;93(3):1599–604.
91. HEMARAJATA P. SARS-CoV-2 Sequencing Data: The Devil Is in the Genomic Detail [Internet]. American society for Microbiology. 2020. Available from: <https://asm.org/Articles/2020/October/SARS-CoV-2-Sequencing-Data-The-Devil-Is-in-the-Gen>
92. Rouchka EC, Chariker JH, Chung D. Variant analysis of 1,040 SARS-CoV-2 genomes. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(11 November):1–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241535>
93. GISAID. No Title [Internet]. 2020. Available from: <https://www.epicov.org/epi3/frontend#63016a>
94. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* [Internet]. 2020;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
95. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol.* 2020;81(January).
96. Rehman S. Identification of novel mutations in SARS-COV-2 isolates from Turkey. 2020;1–21.
97. Klempt P, Brož P, Kašný M, Novotný A, Kvapilová K, Kvapil P. Performance of targeted library preparation solutions for SARS-CoV-2 whole genome analysis. *Diagnostics.* 2020;10(10):1–12.

98. 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* [Internet]. 2021;15(4):470–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33956645>
99. Karacan I. The Origin of SARS-CoV-2 in Istanbul: Sequencing findings from Epicenter of Pandemic in Turkey. *North Clin Istanbul*. 2020;7(3):203–9.
100. Eskier D, Akalp E, Dalan Ö, Karakulah G, Oktay Y. Current mutasome of sars-cov-2 in turkey reveals mutations of interest. *Turkish J Biol*. 2021;45(1):104–13.
101. Rouchka EC, Chariker JH, Chung D. Variant analysis of 1,040 SARS-CoV-2 genomes. *PLoS One*. 2020;15(11 November):495–504.
102. Hassan SS, Choudhury PP, Roy B. SARS-CoV2 envelope protein: non-synonymous mutations and its consequences. *Genomics*. 2020;112(6):3890–2.
103. Simmonds P. Rampant C->U hypermutation in the genomes of SARS-CoV-2 and other coronaviruses – Causes and consequences for their short and long evolutionary trajectories. *bioRxiv*. 2020;1–22.
104. Di Giorgio S, Martignano F, Torcia MG, Mattiuz G, Conticello SG. Evidence for host-dependent RNA editing in the transcriptome of SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020;(June):1–9.
105. Huang Y, Yang C, Xu X feng, Xu W, Liu S wen. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2020;41(9):1141–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
106. Insertions in SARS-CoV-2 genome caused by template switch and duplications give rise to new variants of potential concern. 2021;
107. Miller D, Martin MA, Harel N, Tirosh O, Kustin T, Meir M, et al. Full genome viral

sequences inform patterns of SARS-CoV-2 spread into and within Israel. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19248-0>

108. Brianna Sierra Chrisman , Kelley Paskov , Nate Stockham, Jae-Yoon Jung , Maya Varma, Peter Washington DPW. Common Microdeletions in SARS-CoV-2 Sequences [Internet]. 2020. Available from: <https://virological.org/t/common-microdeletions-in-sars-cov-2-sequences/485>

109. Eskier D, Karakülah G, Suner A, Oktay Y. RdRp mutations are associated with SARS-CoV-2 genome evolution. *PeerJ*. 2020;8:1–14.

110. Chand GB, Banerjee A, Azad GK. Identification of novel mutations in RNA-dependent RNA polymerases of SARS-CoV-2 and their implications on its protein structure. *PeerJ*. 2020;2020(7):1–11.

111. Hartley PD, Tillett RL, AuCoin DP, Sevinsky JR, Xu Y, Gorzalski A, et al. Genomic surveillance of Nevada patients revealed prevalence of unique SARS-CoV-2 variants bearing mutations in the RdRp gene. *J Genet Genomics* [Internet]. 2021;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.01.004>

112. Yoshimoto FK. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *Protein J* [Internet]. 2020;39(3):198–216. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>

113. Emma B Hodcroft, James Hadfield, Richard A Neher, Trevor BedfordEmma B Hodcroft, James Hadfield, Richard A Neher TB. Year-letter Genetic Clade Naming for SARS-CoV-2 on Nextstrain.org [Internet]. 2020. Available from: <https://virological.org/t/year-letter-genetic-clade-naming-for-sars-cov-2-on-nextstrain-org/498>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nejat Siraj MOHAMMED

Yabancı Dili: İngilizce, Tigrinya, Türkçe, Arapça (Başlangıç seviyesinde) ve Almanca (Başlangıç seviyesinde).

Eğitim Durumu

Lise: Harnet Lisesi, Asmara, Eritre (2005-2011)

Lisans: Asmara College of Health Sciences, Asmara, Eritre (2011-2015)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2018- 2021).

Yayınlar ve Bildiriler

1. Nejat Siraj, John Issac, Mohammed Anwar, Yohannes Mehari, Shushan Russom, Semere Kahsay, And Haben Frezghi. '**Establishment Of Hematological Reference Intervals For Healthy Adults in Asmara**'. BMC Research Notes. 2018; 11: 55. doi: [10.1186/s13104-018-3142-y](https://doi.org/10.1186/s13104-018-3142-y)
2. Nejat Siraj, Oliver Okoth Achila, John Issac, Efrem Menghisteab, Maedn Hailemariam, Semere Hagos, Yosan Gebremeskel, Daniel Tesfamichael. '**Seroprevalence Of Transfusion-Transmissible Infections Among Blood Donors At National Blood Transfusion Service, Eritrea: A Seven-Year Retrospective Study**'. BMC Infectious diseases, *June 2018, 18 (1): 264*. doi: [10.1186/s12879-018-3174-x](https://doi.org/10.1186/s12879-018-3174-x).
3. Nejat Siraj Mohammed. Poster sunumu '**SARS-CoV-2'nin Tüm Genom Dizilime**' 20 Haziran 2021'de 3. Ulusal Viroloji Günleri kongresinde sunulmuştur.
4. İrem Akdemir-Kalkan, Nejat Siraj Mohammed, Güle Çınar, Ezgi Gülten, Elif Mukime Sarıcaoğlu, Zeynep Ceren Kip-Karahan, Abdurrahman Mithat Bozdayı, Alpay Azap. '**Two**

Cases of COVID-19 Reinfection in Turkey’. Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, 2021; 3(2): 100-106 DOI 10.36519/idcm.2021.59

İş Tecrübesi

Kurumu: Asmara College of Health sciences, Department of Clinical Laboratory Sciences, Asmara, Eritre.

Görevi: Graduate Assistant

Yılları: 2015-2017.

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

1. ‘SARS-CoV-2'nin Tüm Genom Dizilime’ başlıklı Poster 20 Haziran 2021’de 3. Ulusal Viroloji Günleri kongresinde sunulmuştur.



Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği
to me

Jun 14, 2021, 5:30 PM (15 hours ago) ☆ ↩ ⋮

🌐 Turkish > English Translate message

Turn off for: Turkish x

Sayın Nejat Siraj Mohammed ,

3. Ulusal Viroloji Günleri kapsamında hazırladığınız " SARS-CoV-2'nin Tüm Genom Dizilemesi " başlıklı çalışmanız için teşekkürlerimizi iletiriz.

Çalışmanız bilimsel kurul tarafından incelenmiş, **P-25 bildiri numarasıyla poster olarak** sunulmak üzere kabul edilmiştir.

Programın son günü olan 20 Haziran 2021 Pazar 11.30-12.30 Poster Tartışması oturumunda çalışmanız tartışılacaktır. Oturumda bulunmanızı rica ederiz.

Posterinizin **tam metnini** ekte bulunan "Poster Şablonu" na uygun hazırlayarak 16 Haziran Çarşamba gününe kadar klimud@gmail.com adresine iletmenizi rica ediyoruz.

Saygılarımızla.

Kongre Düzenleme Kurulu adına

Prof. Dr. Selma GÖKAHMETOĞLU

3. Ulusal Viroloji Günleri

P-25

SARS-CoV-2'nin Tüm Genome Dizileme

¹ Nejat Siraj Mohammed,² Prof.Dr. A.Mithat Bozdayı,
¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü. ² Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü
Email: nejusiraj@gmail.com

GİRİŞ ve AMAÇ

SARS CoV-2, hafif ila agresif solunum sistemi enfeksiyonlarından sorumlu olan RNA virüsüdür. Aralık 2019'dan günümüze kadar virüs, dünyada yaklaşık 173 Milyon insanın morbiditesine ve 3.72 Milyon insanın mortalitesine neden oldu. Bu çalışma, Türkiye'de bulunan SARS-COV 2'nin moleküler karakterizasyonunu yapması, virüsün bölgelerdeki herhangi bir mutasyon türü araştırılması ve en sık bulunan SNP'nin saptanması, sekanslanmış genomun diğer ülkelerdeki virüslerle karşılaştırılması hedeflenmektedir.

YÖNTEM

Yüz covid-19 pozitif hastadan toplanan SARS-CoV-2 RNA ekstraktları İbn Sina Hastanesi'nden elde edildi ve PARAGON Clean Plex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim paneli kullanılarak işlendi. Genom dizilimi için Illumina Iseq 100 kullanıldı.

BULGULAR

Toplam 84 nükleotid varyasyonu gözlemlendi. Bu varyasyonlar genomun 3'UTR, ORF1ab, S, ORF3a, M, N ve ORF7a bölgelerinde görülmüştür. Bildirilen toplam nükleotid varyasyonlarından 44'ü eş anlamlı olmayan ve kalan 40'ı eş anlamlı mutasyonlardı. İzolatların 46'sı B. 1.1 soyunun üyesiydi, 21 izolatları B. 1 soyuna yerleştirildi, 3 izolatları B. 1.1.161 soyuydu. Ayrıca, bir izolat B. 1.1.317, diğeri B. 1.354 soyunun bir üyesiydi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, 72 viral izolatin tüm genomu sekanslandı ve genomların kapsama alanı %85-99.8 idi. Bulunan nükleotid varyasyonların yarısını eş anlamlı mutasyonlar olması, hastalığın ciddiyeti ve bağışıklık kaçırma üzerinde bir etkisi olabileceğini gösterebilir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler, açıklanan mutasyonların ilaca dirençli viral fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olup olmayacağını görmek için kullanılabilir.

Kaynaklar:

1. Zhang YZ, Holmes EC. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. Cell [Internet]. 2020;181(2):223–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>
2. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. Le Infez Med. 2020;28(2):174–84.
3. Mousavizadeh, Leila SG. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. J Microbiology, Immunology Infection.
4. Ashour HM, Elkhatib WF, Rahman MM, Elshabrawy HA. Insights into the recent 2019 novel coronavirus (Sars-coV-2) in light of past human coronavirus outbreaks. Pathogens. 2020;9(3):1–15.



**GENOME EDITING USING CRISPR AND ITS ETHICAL ISSUES**Nejat Siraj Mohammed^{1*}* Ankara University, Institute of Biotechnology, nejusiraj@gmail.com**ABSTRACT**

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) are short motifs of DNA commonly found in chromosomal and plasmid DNA, which are separated with other unique sequences. Even though it was discovered in a bacteria, it has been applied in healthcare, environmental biology, veterinary science and agricultural trials with the most popular application being in cancer research. The technique is commonly used on somatic cells for gene editing; However, its use in germline cells is ethically controversial. The main ethical issues of gene editing by CRISPR that are discussed in this review are; safety issues, its misuse, unequal access to the classes of the population and ecological considerations. Some unsolved technical complications in CRISPR and limited knowledge of human germ cells are some of the obstacles for performing a safe gene editing in humans. In addition to this, due to uncontrolled usage and limited access, the technology may serve for the individual purposes of some people. Future perspectives including regulated usage as well as equal access are also other points of concern which would be achieved by introducing a consensus among all countries.

Keywords: CRISPR, gene editing, germ cells, ethics, regulations.