

Antalya, Türkiye’den Elde Edilen SARS-CoV-2 İzolatlarının Sekans Analizi

Genomic Characterization of SARS-CoV-2 Isolates Obtained from Antalya, Türkiye

Aylin ERMAN DALOĞLU¹(ID), Erley LIZARAZO FORERO²(ID), Nevgün SEPİN ÖZEN¹(ID), Yeşim ÇEKİN¹(ID), Hubert G.M. NIESTERS²(ID)

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Antalya.

¹ University of Health Sciences, Antalya Training and Research Hospital, Medical Microbiology Clinic, Antalya, Türkiye.

² Groningen Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Önleme Anabilim Dalı, Klinik Viroloji Bölümü, Groningen, Hollanda.

² The University of Groningen, University Medical Center Groningen, Department of Medical Microbiology and Infection Prevention, Division of Clinical Virology, Groningen, Netherlands.

Makale Atfı: Erman Daloğlu A, Lizarazo Forero E, Sepin Özen N, Çekin Y, Niesters HGM. Antalya, Türkiye’den elde edilen SARS-CoV-2 izolatlarının sekans analizi. Mikrobiyol Bul 2024;58(4):433-447.

ÖZ

Koronavirüs hastalığı-2019 [coronavirus diseases-2019 (COVID-19)] vakalarının azaldığı, tedbirlerin sosyal kısıtlama şeklinde değil bireysel düzeyde uygulanmaya başlandığı günümüzde şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)], hala önemi korumaktadır ve rutin kullanımda olan solunum yolu enfeksiyonlarına yönelik multipleks moleküler test panellerinde araştırılan ajanlar arasında çoktan yerini almıştır. Bu çalışmada, laboratuvarda pandeminin farklı dönemlerinde SARS-CoV-2 gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu [real-time reverse transcription (rRT-PCR)] testi pozitif çıkan rastgele seçilmiş örneklerden yeni nesil dizileme sistemleri için tasarlanmış, kullanımı kolay, ticari bir kitle tüm genom dizilerinin eldesi ve mutasyon analiziyle genomik çeşitliliğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Rutin tanı amacıyla tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve rRT-PCR ile SARS-CoV-2 RNA pozitif olduğu tespit edilen COVID-19 şüpheli hastalardan toplam 84 nazofareingeal/orofaringeal sürüntü örneği, yeni nesil dizi analizi için farklı dönemlerden rastgele seçildi. Dizi analizinde kütüphane hazırlığı, ticari EasySeq SARS-CoV-2 RC PCR kiti (Nimagen, Hollanda) ile gerçekleştirildi. Illumina MiSeq (Illumina Inc, San Diego, CA, Amerika Birleşik Devletleri) ile üretilen veriler CLC Genomics Workbench’te (CLC, Qiagen, Hilden, Almanya) analiz edildi. Nextstrain adlandırması temel alınarak elde edilen sonuçlar sıklık sırasına göre; 21J (Delta) (%25, n= 21), 21L (Omicron) (%23.8, n= 20), 20B (%19, n= 16), 20A (%15.5, n= 13), 21K (Omicron) (%11.9, n= 10), 19A (%3.6, n= 3) ve 22B (Omicron) (%1.2, n= 1) olarak saptanmıştır. 22B (Omicron) olarak tanımlanan bir hasta örneği hariç, toplam 2829 farklı mutasyon [2076 yanlış anlamlı (missense), 551 sinonim, 192 delesyon ve 10 insersiyon] ortak olarak tespit edilmiştir. Kodlama yapılmayan 5’ “untranslated region” (UTR)’de 100 mutasyon gözlenmiştir. Mutasyonların çoğunluğu spike (S) gen bölgesinde (1120 mutasyon), ardından ORF1a (624 mutasyon), N (315 mutasyon) ve ORF1b (263 mutasyon) gen bölgelerinde yer almıştır. Hastaların örneklem tarihleri Mart 2020 (n= 1), Nisan 2020 (n= 11), Mayıs 2020 (n= 1), Haziran 2020 (n= 2), Temmuz 2020 (n= 3), Ağustos 2020 (n= 1), Eylül 2020 (n= 5), Kasım 2020 (n= 2), Aralık 2020 (n= 6), Aralık 2021 (n= 19), Ocak 2022 (n= 11), Mart 2022 (n= 16), Nisan 2022 (n= 3) ve Haziran 2022 (n= 3) şeklinde olmuştur. Sonuç olarak, sunulan bu çalışmada

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Aylin Erman Daloğlu, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 (505) 834 80 78, **E-posta (E-mail):** draylinerman@gmail.com

Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi, Antalya ilindeki SARS-CoV-2 varyantları ve mutasyonları ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Bulunduğumuz ilde pandemi dönemine ait herhangi bir SARS-CoV-2 genom analizi çalışması ulaşılabildiği kadarıyla bildirilmemiştir. GISAID Instant Audacity sistemine yüklenen çalışmaya ait diziler ile EpiCoV veri tabanı metadatasındaki farklı ülkelerden elde edilen ilişkili genomlar incelendiğinde benzerlik açısından ilk iki sırada yer alan ve virüsün Türkiye'ye ana giriş yolu ile ilişkilendirilebilecek ülkeler Almanya ve Birleşik Krallık olmuştur. COVID-19 pandemisini temel alarak olası yeni pandemilere hazırlıklı olmak için neler yapılabileceğinin tartışıldığı günümüz dünyasında, moleküler süveyans çalışmalarında proaktif olmanın önemi tartışılmazdır. Pandemi kontrolünde bilinen varyantların yanı sıra yeni varyantların da araştırılması ve verilerin paylaşılması açısından gelişmekte olan ülkeler desteklenmeli ve teşvik edilmelidir. Bu noktada farklı coğrafi bölgelerden bildirilen geçmiş pandemi verilerinin de dolaşım ağının tahmininin olası yeni bir pandemide önlem alma açısından değerli olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2; tüm genom; mutasyon analizi; yeni nesil dizileme, Türkiye.

ABSTRACT

As the number of coronavirus diseases-2019 (COVID-19) cases have decreased and measures have started to be implemented at an individual level rather than in the form of social restrictions, severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) still maintains its importance and has already taken its place in the spectrum of agents investigated in multiplex molecular test panels for respiratory tract infections in routine diagnostic use. In this study, we aimed to present mutation analysis and clade distribution of whole genome sequences from randomly selected samples that tested positive with SARS-CoV-2 specific real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) test at different periods of the pandemic in our laboratory with a commercial easy-to-use kit designed for next-generation sequencing systems. A total of 84 nasopharyngeal/oropharyngeal swab samples of COVID-19 suspected patients which were sent for routine diagnosis to the medical microbiology laboratory and detected as SARS-CoV-2 RNA positive with rRT-PCR were randomly selected from different periods for sequence analysis. Library preparation for sequencing was performed with the commercial EasySeq SARS-CoV-2 RC PCR kit (Nimagen, the Netherlands). The data generated from the Illumina MiSeq system (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) were analysed using CLC Genomics Workbench (CLC, Qiagen, Hilden, Germany). Next-strain clades detected in order of frequency were 21J (Delta) (25%, n= 21), 21L (Omicron) (23.8%, n= 20), 20B (19%, n= 16), 20A (15.5%, n= 13), 21K (Omicron) (11.9%, n= 10), 19A (3.6%, n= 3), and 22B (Omicron) (1.2%, n= 1). Excluding one patient sample which was identified as 22B (Omicron), a total of 2829 common distinct mutations (2076 missense, 551 synonymous, 192 deletions and 10 insertions) were detected. 100 mutations were observed in the non-coding 5' untranslated region (UTR). The majority of the mutations were located in the Spike gene region (1120 mutations), followed by the ORF1a (624 mutations), nucleocapside (315 mutations) and ORF1b (263 mutations) gene regions. Sampling times of the patients were March 2020 (n= 1), April 2020 (n= 11), May 2020 (n= 1), June 2020 (n= 2), July 2020 (n= 3), August 2020 (n= 1), September 2020 (n= 5), November 2020 (n= 2), December 2020 (n= 6), December 2021 (n= 19), January 2022 (n= 11), March 2022 (n= 16), April 2022 (n= 3), and June 2022 (n= 3). As a result, in this study, SARS-CoV-2 variants and mutations in the Mediterranean Region of Türkiye, Antalya province were analyzed in detail. To the best of our knowledge, no SARS-CoV-2 genome analysis study from the pandemic period has been reported in our province. When the sequences from our study were uploaded to the GISAID Instant Audacity system and the related genomes obtained from different countries in the EpiCoV database metadata were examined, the top two countries in terms of similarity and which could be associated with the main entry route of the virus into Türkiye were Germany and the United Kingdom. In today's world, where it is discussed what can be done to be prepared for possible new pandemics based on the COVID-19 pandemic, the importance of being proactive in molecular surveillance studies is indisputable. Developing countries should be supported and encouraged to research new variants and share data in addition to known variants in pandemic control. At this point, we believe that past pandemic data reported from different geographical regions will also be valuable in terms of predicting the circulation network and taking precautions in a possible new pandemic.

Keywords: SARS-CoV-2; whole genome; mutation analysis; next-generation sequencing; Turkey.

GİRİŞ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)], koronavirüs hastalığı-2019 [coronavirus diseases-2019 (COVID-19)] adı verilen solunum hastalığına neden olan yeni bir virüstür ve ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde bildirilmiştir¹. Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi ilan edilmesinin ardından Türkiye'de ilk olgu 11 Mart 2020'de belirlenmiştir².

SARS-CoV-2, sık mutasyonlar geliştiren bir RNA virüsüdür. Yeni mutasyonlar daha bulaşıcı, tedaviye dirençli ve öldürücü türlerin ortaya çıkma potansiyelini ortaya çıkarmaktadır. Moleküler karakterizasyon ile yeni suşların kökenini, enfektivitesini ve patojenitesini etkileyen mutasyonlar belirlenebilmektedir. Ayrıca bu veriler aşı geliştirme çalışmaları için değerli bilgiler sağlamıştır^{3,4}. COVID-19 salgını sırasında SARS-CoV-2'nin birçok genetik varyantı ortaya çıkmış ve dünya çapında yayılmıştır. Bu varyantların tespiti ve bu dizilerin Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) sistemi aracılığıyla paylaşılması için tüm viral genom dizilimi, SARS-CoV-2'nin moleküler epidemiyolojisinin yakından izlenmesini sağlamıştır. Türkiye'den ilk SARS-CoV-2 genom dizisi 25 Mart 2020'de GISAID aracılığıyla paylaşmıştır (EPI_ISL-417413)⁵. Üçüncü basamak bir devlet hastanesi bünyesinde yer alan tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarımız, 31 Mart 2020 tarihinde ilk pozitif vakanın tespit edildiği Antalya ilinin tamamına pandeminin başlangıcından bu yana hizmet vermektedir.

Her ne kadar olgu sayıları azalmış, aşılama yaygınlaşmış ve tedbirler sosyal kısıtlama şeklinde değil bireysel düzeyde uygulanmaya başlanmış olsa da COVID-19 günümüz döneminde hala önemini korumaktadır. Geline nokta SARS-CoV-2, rutin kullanımda olan solunum yolu enfeksiyonlarına yönelik multipleks moleküler test panellerinde araştırılan ajanlar arasında çoktan yerini almış durumdadır.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda pandeminin farklı dönemlerinde SARS-CoV-2 gerçek zamanlı revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [real-time reverse transcription (rRT-PCR)] testi pozitif çıkan rastgele seçilmiş örneklerden tam uzunlukta genom dizilerinin elde edilmesi ve üç isimlendirme sistemine (Nextstrain adı, GISAID sınıfı ve Pango soyu) göre genomik çeşitliliğin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından 16.04.2022 tarih ve 2022-04-12T15_53_46 sayılı karar ile onaylandı. Çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 2.6.2022 ve Karar no: 11/9).

Tüm genom dizileme, ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Executive Committee tarafından onaylanan ESCMID funded observership (observership ID: 1970) kapsamında çalışmanın birinci yazarı tarafından bir aylık süreç içinde Hollanda'nın Groningen Üniversitesi Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Klinik Viroloji Bölümünde çalışmanın ikinci yazarının destekleriyle gerçekleştirildi.

Viral RNA İzolasyonu ve SARS-CoV-2 rRT-PCR

Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniğine COVID-19 şüpheli hastalardan rutin tanı amacıyla gönderilen ve SARS-CoV-2'ye özgü rRT-PCR ile SARS-CoV-2 RNA pozitif tespit edilen farklı dönemlere ait rastgele seçilen toplam 84 nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örneği çalışmaya dahil edildi. Bu dönemlerde COVID-19 ön tanısıyla gelen hastalardan SARS-CoV-2 rRT-PCR için toplanan örneklerden elde edilen pozitiflik sonucunda onam alındı ve numuneler rRT-PCR sonrasında -20 °C'de saklandı.

Örnekler, pandemi döneminde sonuç alma süresini kısaltması ve ayrı bir ekstraksiyon aşamasına ihtiyaç duyulmaması amacıyla 2 ml viral nükleik asit ekstraksiyon tamponu içeren viral nükleik asit transfer tüpü (vNAT) tüplerinde (Bioeksen, Türkiye ve Ayset, Türkiye) toplandı.

SARS-CoV-2'ye özgü rRT-PCR, SARS-CoV-2 genomunun hem open reading frame 1ab (ORF1ab) hem de nükleokapsid (N) gen bölgesini hedefleyen Coronex COVID-19 rRT-qPCR tespit kiti (DS Bio and Nano Technology, Ankara, Türkiye) kullanılarak üretici talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Dizilemede daha net sonuçların elde edilebilmesi ve vNAT tüplerinde ekstraksiyon tamponundaki olası nükleik asit kaybı nedeniyle, döngü eşik [cycle threshold (Ct)] değeri 25'in altında olan viral yükü yüksek örneklerin dahil edilmesi planlandı.

Tüm Genom Dizileme

Tüm genom dizileme ve analizi, Hollanda, University Medical Center Groningen, Tıbbi Mikrobiyoloji Departmanı, Klinik Viroloji Bölümünde gerçekleştirildi. Numuneler, International Air Transport Association tarafından belirlenen kurallara göre kuru buz içeren üç katmanlı ambalajlarda paketlenildi ve 24 saat içinde nakledildi.

Dizileme öncesinde numunelerin ekstraksiyon işlemleri, 190 µl numuneden 50 µl ekstrakt elde etmek üzere EasyMag ve eMAG sistemleri (bioMérieux, Fransa) kullanılarak gerçekleştirildi. Ayrıca, SARS-CoV-2 genomunun RNA bağımlı RNA polimeraz (RdRp)=ORF1b, zarf (E) ve N gen bölgelerini hedef alan Corman protokolü ile SARS-CoV-2'ye özgü rRT-PCR testi tekrar çalışılarak kontrol edildi⁶.

Ekstraksiyon işleminden sonra komplementer DNA (cDNA) sentezi için revers komplementer [reverse complement (RC)] PCR reaksiyonunda kullanılan HiFi polimeraz ile uyumluluğu nedeniyle LunaScript Reverse Transcription Supermix (New England BioLabs, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.

Kütüphane hazırlama adımları fragmentasyon, indeks etiketleme, adaptör ligasyonu ve amplifikasyon aşamalarından oluşmaktaydı. Dizileme için kütüphane hazırlığı EasySeq SARS-CoV-2 RC PCR kiti (Nimagen, Hollanda) ile gerçekleştirildi. RC PCR adımında, hedefe özgü RC problemleri indekslenmiş PCR primerlerine transforme edildi ve ardından hedef bölgelerin multipleks amplifikasyonu gerçekleştirildi. Her numune için iki prob-polimeraz

premijs (A ve B) hazırlandı ve bu iki premiks özdeş indeks plaklara (A ve B) ayrı ayrı pipetlendi. Her numune için cDNA, her iki plakanın aynı kuyucuk pozisyonuna ilave edildi. RC PCR programının sonunda numuneler çoğaltılmış, numuneye özgü indeksler ve dizileme adaptörleriyle etiketlenmiş oldu.

Düşük (yüksek Ct) ve yüksek (düşük Ct) viral yüklü numuneler arasındaki okuma derinliği farklılıklarını azaltmak için havuzlanacak RC PCR hacminin her numunenin Ct değerine göre hesaplandığı bir havuzlama stratejisi uygulandı. Havuz A ve B içerisinde olası primer dimerler, tuzlar ve benzeri artıkları ortadan kaldırmak için AmpliClean-CleanUp kit (Nimblegen, Hollanda) içerisindeki manyetik boncuklarla aşamalı saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

Saflaştırılmış kütüphanenin kantitasyonu için Qubit dsDNA HS (Invitrogen, Life Technologies, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Qubit ölçümlerine göre her havuz, 2 nM'lik 50 µl'ye (low TrisEDTA ile) seyreltilti. Her iki havuz da birleştirildi ve toplam 1000 µl (20 pM) hacimde denatüre edildi. Kütüphaneler Agilent 2200 TapeStation Sisteminde (Agilent Technologies, Almanya) 298 baz çiftlik [base pair (bp)] SARS-CoV-2 genomik eklenti ile 435 bp'lik son kütüphane ampikon fragman boyutu olarak doğrulandı. Nihai kütüphane, 20 pM Phix internal kontrolü ile 300 döngü (2 x 150 bp çalışma) olmak üzere Illumina MiSeq v2 (Illumina Inc, San Diego, CA, Amerika Birleşik Devletleri) cihazına yüklendi.

Sekans Verilerinin Analizi

Illumina MiSeq cihazından elde edilen eşleştirilmiş FASTQ dosyaları, CLC Genomics Workbench (CLC, Qiagen, Hilden, Almanya) programı kullanılarak analiz edildi. Haritalama için referans olarak SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 izolatu (Erişim No: NC 045512.2) ve SARS-CoV-2 dizisini yeniden düzenlemek için tasarlanan bir iş akışı kullanıldı.

Nextclade kalite değerlendirmesine göre kalitesi kötü (15/98) olan diziler çalışmanın dışında tutuldu. 31.03.2020 ile 09.06.2022 tarihleri arasında farklı zamanlardan elde edilen 84 SARS-CoV-2 tüm genomu, EPI_ISL_14050592 - 673, EPI-ISL-14051518, EPI-ISL-14051570 erişim numaralarıyla GISAID'e sunuldu.

İstatistiksel Analiz

Araştırmanın istatistiksel analizinde SPSS versiyon 22.0 (SPSS Inc., Chicago, Amerika Birleşik Devletleri) programı kullanıldı. Veriler sayı (n), yüzde (%), ortalama, standart sapma olarak verildi. Yaş gibi sürekli değişkenlerin normallik varsayımı Shapiro-Wilk testiyle gerçekleştirildi. İki bağımsız grup arasındaki ortalamaların farkı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için independent sample T test kullanıldı. Kategorik verilerin analizinde ki-kare testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen $p \leq 0.05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

Toplam 84 (42 kadın, 42 erkek) SARS-CoV-2 rRT-PCR pozitif hastanın sonuçları değerlendirilmiştir. Tüm hastaların yaş ortalaması 37.07 (aralık= 0-88), kadın ve erkek

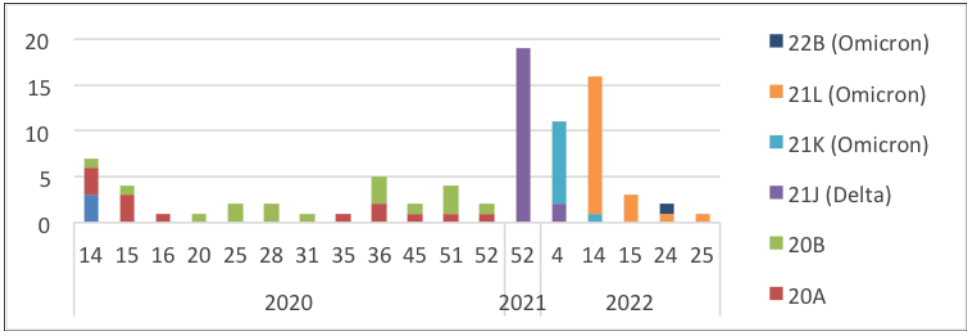
hastaların yaş ortalaması sırasıyla 38.26 ve 35.88 olarak hesaplanmıştır. Kadın ve erkek hastaların yaşları normal dağılım göstermiş ve cinsiyetler arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.56$).

Nextstrain adlandırması temel alınarak elde edilen sonuçlar sıklık sırasına göre; 21J (Delta) (%25, $n=21$), 21L (Omicron) (%23.8, $n=20$), 20B (%19, $n=16$), 20A (%15.5, $n=13$), 21K (Omicron) (%11.9, $n=10$), 19A (%3.6, $n=3$) ve 22B (Omicron) (%1.2, $n=1$) olarak saptanmıştır. Nextstrain adı, GISAID sınıfı ve Pango soylarının dağılımı Tablo I'de verilmiştir. Yıllara ve haftalara göre Nextstrain adlandırmasına göre dağılımı Şekil 1'de sunulmuştur.

En yaygın mutasyonlar (47'den fazla sekansta olmak üzere), 5' untranslated region (UTR) kodlama yapılmayan bölgedeki C241T mutasyonu ve ORF1a gen bölgelerindeki C3037T sinonim mutasyonlar ve ORF1b'deki P323L, ORF1a'daki T3255I, S gen

Tablo I. Nextstrain Adı, GISAID Sınıfı ve Pango Soylarının Dağılımı

Nextstrain Adı	GISAID Sınıfı	n (%)	Pango Soyu	n (%)
19A	O	3 (3.6)	B.4	3 (3.6)
20A	G/GH	13 (15.5)	B.1	7 (8.3)
			B.1.9	4 (4.8)
			B.1.36	1 (1.2)
			B.1.258	1 (1.2)
20B	GR	16 (19)	B.1.1	11 (13)
			B.1.1.189	2 (2.4)
			B.1.1.521	1 (1.2)
			B.1.1.159	1 (1.2)
			B.1.1.317	1 (1.2)
21J (Delta)	GK	21 (25)	AY.121	7 (8.3)
			B.1.617.2	4 (4.8)
			AY.122	3 (3.6)
			AY.46	3 (3.6)
			AY.4	2 (2.4)
			AY.4.6	1 (1.2)
			AY.36	1 (1.2)
21K (Omicron)	GRA	10 (11.9)	BA.1.1	5 (6)
			BA.1	3 (3.6)
			BA.1.1.1	1 (1.2)
			BA.1.18	1 (1.2)
21L (Omicron)	GRA	20 (23.8)	BA.2	18 (21.4)
			BA.2.3	1 (1.2)
			BA.2.9	1 (1.2)
22B (Omicron)	GRA	1 (1.2)	BA.5	1 (1.2)
Total		84 (100)		84 (100)



Şekil 1. Nextstrain adlarının yıllara ve haftalara göre dağılımı.

bölgesindeki D614G, T478K, G142D, G339D ve N gen bölgesindeki R203K, G204R missense mutasyonları olmuştur (Tablo II).

22B (Omicron) olarak tanımlanan bir hasta örneği hariç, toplam 2829 farklı mutasyon [2076 yanlış anlamlı (missense), 551 sinonim, 192 delesyon ve 10 insersiyon] ortak olarak tespit edilmiştir. Kodlama yapılmayan 5' UTR bölgesinde 100 mutasyon gözlenmiştir. Mutasyonların çoğunluğu Spike (S) gen bölgesinde (1120 mutasyon), ardından ORF1a (624 mutasyon), N (315 mutasyon) ve ORF1b (263 mutasyon) gen bölgelerinde yer almıştır.

Yirmi bir örnek (21J) için, S gen bölgesinde 22029-22034 (R158G) nükleotit pozisyonlarına sahip ve ORF8 gen bölgesinde 28248-28253 nükleotit pozisyonlarına sahip olmak üzere iki delesyon bölgesi bulunmuştur. On örnek (21K) için, ORF1a gen

Tablo II. Sıklık Sırasına Göre En Yaygın Mutasyonlar (47'den fazla sekansta olmak üzere)

Protein	Nükleotit Pozisyonu ve Değişimi	Aminoasit Pozisyonu ve Değişimi	Mutasyon Tipi	Örnek Sayısı (%)
5' UTR	C241T	-	Sinonim	81 (96)
ORF1a (NSP3)	C3037T	-	Sinonim	81 (96)
ORF1b (NSP12: RdRp)	C14408T	P323L	Missense	81 (96)
S	A23403G	D614G	Missense	81 (96)
ORF1a (NSP4)	C10029T	T3255I	Missense	52 (62)
S	C22995A	T478K	Missense	52 (62)
S	C21987A	G142D	Missense	52 (62)
S	G22578A	G339D	Missense	48 (57)
N	G28881A	R203K	Missense	47 (56)
N	G28882A	-	Sinonim	47 (56)
N	G28883C	G204R	Missense	47 (56)

ORF: Open reading frame, NSP: Yapısal olmayan protein, RdRp: RNA bağımlı RNA polimeraz, S: Spike, N: Nükleokapsit.

bölgesinde 6513-6515 (S2083-L2084I), 11285-11293 (L3674-S3675-G3676) nükleotit konumlarına sahip, S gen bölgesinde 21765-21770 (H69-H70), 21987-21995 (G142-V143-Y144-Y145D), 22194-22196 (N211-L212I) nükleotit konumlarına sahip ve ORF9/N gen bölgesinde 28362-28370 (E27-N28-A29-E31-R32-S33) nükleotit pozisyonlarına sahip altı delesyon bölgesi bulunmuştur. Yirmi örnek (21L) için ORF1a gen bölgesinde 11288-11296 (S3675-G3676-F3677), S gen bölgesinde 21633-21641 (L24-P25-P26-A27S) nükleotit pozisyonlarına sahip ve ORF9/N gen bölgesinde 28362-28370 (E27-N28-A29-E31-R32-S33) nükleotit pozisyonlarına sahip üç delesyon bölgesi bulunmuştur. SARS-CoV-2 gen bölgelerine göre mutasyonlar Tablo III'te gösterilmiştir.

BA.1 ve BA.2 alt varyantları, N-terminal alanında (G142D), reseptör bağlanma alanında (G339D, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y, Y505H), S1/S2 bölünme bölgesinin yakınındaki alt alanda (D614G, H655Y,

Tablo III. SARS-CoV-2 Gen Bölgelerine Göre Mutasyonlar

		ORF1a	ORF1b	S	ORF3a	E	M	ORF6	ORF7	ORF8	ORF9b	N	Toplam
19A (n= 3)	Missense	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	Sinonim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3
	Delesyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	İnserisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20A (n= 13)	Missense	-	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	26
	Sinonim	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
	Delesyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	İnserisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 B (n= 16)	Missense	-	16	16	-	-	-	-	-	-	-	32	64
	Sinonim	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	32
	Delesyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	İnserisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21J (n= 21)	Missense	126	84	160	19	-	19	-	57	-	21	84	570
	Sinonim	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63
	Delesyon	-	-	21	-	-	-	-	-	21	-	-	42
	İnserisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21K (n= 10)	Missense	50	20	280	-	10	30	-	-	-	10	30	430
	Sinonim	30	10	10	10	-	-	10	10	-	-	20	100
	Delesyon	20	-	30	-	-	-	-	-	-	10	10	70
	İnserisyon	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	10
21L (n= 20)	Missense	160	80	540	20	20	40	20	-	-	20	80	980
	Sinonim	120	40	20	20	-	20	60	20	-	20	20	340
	Delesyon	20	-	20	-	-	-	-	-	-	20	20	80
	İnserisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam		624	263	1120	69	30	109	90	87	21	101	315	2829

ORF: Open reading frame, S: Spike, E: Envelope, M: Matriks, N: Nükleokapsit.

N679K ve P681H) ve S2 alanında (N764K, D796Y, Q954H ve N969K) olmak üzere S aminoasit mutasyonlarına (n= 21) ortak olarak sahip bulunmuştur. BA.1, BA.2 Omicron alt varyantları ve her ikisinin ortak Spike gen mutasyonları Tablo IV'te verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 72 (%85.7)'si yatış yapılmadan taburcu edilmiş, 10 (%11.9)'u hastanede yatarak tedavi görmüş ve ikisi (%2.4) hayatını kaybetmiştir. Hayatını kaybeden iki hasta ile hastaneye kaldırılan 10 hastadan dokuzunun numunelerinin 2020 yılına ait örnekler arasında olduğu, hastaneye kaldırılan bir hastanın numunesinin 2022 yılına ait Omicron alt varyant BA.5 izolatu olduğu görülmüştür. Çalışmaya dahil edilen hasta örneklemelerinden 2020 yılına ait hastaların %34.4 (32/11)'ü, 2021 ve 2022 yıllarına ait hastaların ise %3 (52/1)'ü hastaneye kaldırılmış veya ölmüş olup bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Hastaların örneklem tarihleri Mart 2020 (n= 1), Nisan2020 (n= 11), Mayıs 2020 (n= 1), Haziran 2020 (n= 2), Temmuz 2020 (n= 3), Ağustos 2020 (n= 1), Eylül 2020 (n= 5),

Tablo IV. BA.1, BA.2 Omicron Alt Varyantları ve Her İkisinde Görülen Spike Gen Mutasyonları

BA.1	BA.2	BA.1 ve BA.2
A67V	T19I	G142D (Delta varyant)
del69 (Alfa varyant)	del24	G339D
del70 (Alfa varyant)	del25	S373P
T95I (Mu varyant)	del26	S375F
del143	A27S	K417N (Beta, Gama varyant)
del144 (Alfa, Mu varyant)	V213G	N440K
del145 (Mu varyant)	S371F	S477N
ins214EPE	T376A	T478K (Delta varyant)
del211	D405N	E484A (Beta, Gama, Mu varyant)
N212I	R408S	Q493R
S371L		Q498R
G446S		N501Y (Alfa, Beta, Gama, Mu varyant)
G496S		Y505H
T547K		D614G (Alfa, Beta, Gama, Delta varyant)
N856K		H655Y (Gama varyant)
L981F		N679K
		P681H (Alfa, Mu, Delta varyant)
		N764K
		D796Y
		Q954H
		N969K

Kasım 2020 (n= 2), Aralık 2020 (n= 6), Aralık 2021 (n= 19), Ocak 2022 (n= 11), Mart 2022 (n= 16), Nisan 2022 (n= 3) ve Haziran 2022 (n= 3) şeklinde olmuştur. Türkiye, SARS-CoV-2 salgınına ait ilk dalgayı Mart 2020'de, ikinci dalgayı Kasım-Aralık 2020'de, üçüncü dalgayı Mart-Nisan 2021'de ve dördüncü dalgayı ise Ocak-Şubat 2022'de deneyimlemiştir⁷. Hastanemizdeki pozitif vaka sayılarının dağılımı, 2021 yılından (sadece Aralık 2021 olmak üzere) seçilen örnek sayısının sınırlı olması nedeniyle Mart-Nisan 2021'deki üçüncü dalga dışında ülke verileriyle benzer bulunmuştur.

Hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarının ülkemizdeki en büyük turizm bölgesine hizmet vermesi, Eylül 2021'de yüz yüze eğitime geçilme kararıyla tekrar vaka sayılarının artışı ve laboratuvar imkanlarımızın kapasite aşımı neticesinde kısıtlanması nedeniyle çalışmaya dahil edilmesi planlanmış olan 2021 yılına ait örnekler uygun koşullarda saklanamamış, neticede 2021 yılında sadece Aralık ayına ait örnekler çalışmaya dahil edilebilmiştir.

TARTIŞMA

Pandeminin başlangıcından bu yana SARS-CoV-2'nin birçok farklı varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantlar, bulaşma düzeyleri ve neden oldukları bulaşıcı hastalığın ciddiye-ti gibi özelliklerle karakterize edilmektelerdir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de SARS-CoV-2'nin beş yaygın varyantı Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gama (P.1), Delta (B.1.617.2) ve Omicron (B.1.1.529) şeklinde tanımlanmıştır^{8,9}. Bu çalışmada, kullanım kolaylığı bulunan ticari EasySeq SARS-CoV-2 RC PCR kiti ile SARS-CoV-2 genomunun Illumina MiSeq sisteminde tüm genom dizilemesi ve CLC Genomics Workbench programında analizi gerçekleştirilmiş ve Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi Antalya ilindeki SARS-CoV-2 varyantlarına ait mutasyonlar ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Sunulan çalışmada GISAID isimlendirmesine göre sırasıyla GRA, GK, GR, G, GH ve O sınıfları tespit edilmiştir. Sınıf O ilk dalga sırasında bulunurken, sınıf L (referans diziyi içeren) ve V (NSP6-L37F ve NS3-G251V) çalışma grubunda tespit edilmemiştir. İkinci dalga sırasında G, GH (Beta varyantı) ve GR sınıfları bulunurken üçüncü ve dördüncü dalga sırasında sırasıyla GK (Delta) ve GRA (Omicron) sınıfı bulunmuştur. 2021 yılından (yalnızca Aralık 2021) seçilen örneklerin sınırlı sayıda olması nedeniyle çalışma grubunda GRY (Alfa varyantı) sınıfı tespit edilmemiştir. Sonuçlara göre SARS-CoV-2'nin 25 Pango soyu tanımlanmış, en yaygın soy BA.2 olmuş ve bunu B.1.1 izlemiştir. Soyların çoğu İngiltere, Avrupa ve ABD kökenli olmasına rağmen bazıları (B.1.1.189, B.1.9, B.1.1.521, AY.121, B.1.617.2, B.1, B.4, B.1.1, B.1.1.317 ve AY.4.6 soyları) Türkiye'den de rapor edilmiştir¹⁰⁻¹².

Çalışmada saptanan mutasyonların %70'den fazlası missense mutasyon, beşte bir kadarı da sinonim mutasyon şeklinde gözlenmiştir. Literatür verilerine benzer şekilde çalışmada en yüksek mutasyon oranı Omicron (21K ve 21L) ve Delta (21J) varyantlarında gözlenmiştir¹³. Gen bölgelerine göre mutasyonlar incelendiğinde, özellikle yapısal proteinlerden S glikoprotein ve yapısal olmayan proteinlerden ORF1ab'deki aminoasit

mutasyonlarının pandeminin ilerleyen dönemlerinde arttığı görülmüştür¹⁴. Bu çalışmada da genel pandemi verilerine ve Türkiye verilerine benzer şekilde, S ve ORF1ab gen bölgeleri en yüksek mutasyon oranlarına sahip bulunmuş ve çoğunluğu missense mutasyonlar şeklinde olmuştur¹⁵⁻¹⁷. SARS-CoV-2 mutasyon çalışmalarının çoğunda protein dizisinde bir değişikliğe neden olan missense mutasyonlar gözlenmektedir. Ancak mRNA translasyonundaki ilişkili protein dizisini etkilemeden kodon değişikliğine neden olan sinonim mutasyonların da insan aminoasil-tRNA setini kullanma etkinliğini arttırarak viral parçacıkların çevirisini daha verimli hale getirebileceği öne sürülmekle birlikte, bu konuda sınırlı klinik verinin varlığı vurgulanmıştır¹⁸.

Çalışma verilerine göre, genomun kodlama yapılmayan bölgesinde (C241T) ve ORF1a bölgesinde (C3037T) sinonim mutasyonlar ile G sınıfı ve versiyonlarından %96.4 (81/84) dizide S glikoproteininde D614G mutasyonu tespit edilmiştir¹⁹. ORF1b bölgesindeki (NSP12/RdRp) P323L mutasyonu da bu örneklerde mevcut olup D614G mutasyonu ile neredeyse aynı anda ortaya çıkmıştır²⁰. Farklı coğrafik bölgeler ve ülkemiz mutasyon verilerinin incelendiği Eskier ve arkadaşlarının çalışmalarında ülkemizde Avrupa ile benzer şekilde ağırlıklı olarak görülen mutasyonlar ORF1ab, S, N, ORF3a, M, ORF7a olmuştur. ORF6 ve ORF7b mutasyonlarının çoğunlukla Güney ve Kuzey Amerika'da, E ve ORF7b'nin Asya'da, ORF8'in Kuzey Amerika'da, ORF10'un Afrika ülkelerinde daha yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir²¹.

D614G (n= 81) mutasyonundan sonra T478K (n= 52), G142D (n= 52) ve G339D (n= 48) mutasyonları görülmüştür. Omicron varyantlarının ve alt varyantlarının ortaya çıkmasıyla birlikte farklı S gen mutasyonları da gözlenmiştir. GRA sınıfına ait 31 hastanın örneğinde (10 örnek 21K, 21 örnek 21L) S477N mutasyonu görülmüştür. S477N, insan nötralize edici antikorlar tarafından tanınan, S proteininin RBD'sindeki bir epitopun parçasıdır. GK kanadındaki tüm numunelerin (21 numune 21J) S proteininde T19R, 156del, 157del, R158G, L452R ve D950N aminoasit değişiklikleri bulunmuştur. T19R ve L452R mutasyonlarına sahip varyantların bazı nötralizan antikorlara dirençli olduğu rapor edilmiştir. Özellikle L452R, S protein stabilitesini ve ACE-2 bağlanma afinitesini arttırarak viral replikasyonu desteklemektedir²². L452R, K417N, N501Y ve E484K aşından kaçan mutantlar olarak bilinmektedir²³. Dokuz yaşında bir hastada S proteininde enfektivitenin artmasına neden olduğu rapor edilmiş L5F mutasyonu gözlemlenmiştir¹⁵.

Türkiye'deki dördüncü dalganın ardından Omicron'un BA.1, BA.2 ve BA.5 alt varyantları nedeniyle pikler görülmüştür. Omicron alt varyantlarının, diğer "variant of concern" olarak tanımlanan varyantlarda birlikte bulunan yüksek sayıda S mutasyonuna sahip olduğu gözlenmiştir. Omicron BA.1 alt varyant mutasyonları olan G142D, T478K, D614G ve P681R'nin çalışma grubumuzun Delta varyant örneklerinde de bulunduğu tespit edilmiştir. Omicron BA.5 alt varyantı olan bir örneğin, Delta varyantında da bulunan L452R mutasyonuna sahip olduğu görülmüştür. BA.1 örneklerinde tespit edilen S glikoproteinindeki del69-70 (H69/V70), del144, N501Y, D614G ve P681H mutasyonlarının, Alfa varyantlarında da birlikte bulunabildiği tespit edilmiştir. Çalışmada Mu varyantlarında

bulunan R346K gibi yeni mutasyonlar, altı Omicron BA.1 alt varyantında (BA.1.1) bulunmuştur. Omicron varyantlarının bu yeni mutasyonlarının, hayvan kökenlerinden zoonotik aktarımdan (Q493R ve Q498R farelerde rapor edilmiştir ancak insanlarda nadirdir) ya da bağışıklığı olan popülasyondaki seçilen türlerden kaynaklanabileceği ve viral adaptasyonu arttırabileceği düşünülmektedir²³. Tüm Omicron BA.1 örneklerinde (n= 10) S proteininin RBD bölgesinde başka bir mutasyon olan G446S gözlenmiştir. Bu mutasyon, aşı nedenli T hücrelerinin antiviral aktivitesini arttırmakta ve T hücrelerinin yeni varyantları tanımasını kolaylaştırmaktadır²⁴.

Viral genomun en büyük kısmı olan ve ilk üçte ikisinde yer alan ORF1ab, replikasyon ve transkripsiyon kompleksini oluşturan toplam 16 yapısal olmayan proteini (NSP) kodlar. ORF1ab'deki SARS-CoV-2'nin 16 NSP'si (replikaz, proteaz, metiltransferaz ve transkripsiyon faktörleri gibi enzimleri içerir) birbirinden farklı değildir ve viral replikasyon, translasyon, post-translasyonel modifikasyon, birleşme, konakçı immünitesinden kaçınma ve bu tür temel işlevlere aracılık etmektedir. Bu NSP'ler arasında NSP4 ve NSP6 gibi transmembran proteinlerinden biri olan NSP3, konakçı immün yanıtını baskılayabildiği için önemlidir²⁵. Sunulan çalışmada gözlenen ORF1ab mutasyonlarının çoğunluğu NSP3, NSP12 ve NSP4'de bulunmuştur. Bu çalışmada Avrupa'dan ve Türkiye'den sıklıkla bildirilen NSP12 bölgesindeki P323L (C14408T) mutasyonu tüm varyantlar içinde ortak olan ORF1ab mutasyonu olarak tespit edilmiştir³.

ORF1ab gen bölgesi için daha önce, Omicron varyantlarında (Alfa, Beta, Gama ve Delta varyantlarında bulunmayan) temsil edilen mutasyonlar ve Omicron'un her bir alt varyantında (BA.1, BA.2, BA.5) gözlenen mutasyonlar bu çalışmada da gözlemlenmiştir²⁶. NSP1, SARS-CoV-2'de korunmuş bir bölgedir. NSP1'de en sık görülen mutasyon olan E87D, virüsün istikrarsızlaşmasına etki etmektedir. Konakçı mRNA translasyonu, NSP1 bölgesindeki mutasyonlardan etkilenmektedir. NSP-1'in konakçı mRNA translasyonundaki önemli rolü nedeniyle bu proteine karşı ilaç tasarımının geliştirilmesinin tedavi açısından umut verici olabileceği bildirilmiştir²⁷. Farklı olarak bu çalışmada NSP1 E87D mutasyonu saptanmamıştır. Hossain ve arkadaşlarının çalışmalarında²⁶ bildirilen S135R NSP1 mutasyonu bu çalışmada da BA.2 ve BA.5 Omicron alt varyantlarında gözlenmiştir.

SARS-CoV-2 ORF3a, konakçıdaki iyon kanalı aktivitelere müdahale eden en büyük aksesuar protein ve bir viroporindir. En fazla bulunan ORF3a missense mutasyonları arasında Q57H ve G251V yer almaktadır. Bu ORF3a mutantlarının S proteinine yaban tip ORF3a'dan daha güçlü bağlandığı tahmin edilmektedir. Epsilon varyantında Q57 mutasyonu, Beta varyantında Q57H, S171L mutasyonları, Delta varyantında S26L mutasyonu, BA.2 ve BA.3 Omicron varyantlarında tek T223I mutasyonu bulunmakta ve BA.1 Omicron varyantında ORF3a mutasyonu bulunmamaktadır. Bu çalışmada GH sınıfında bulunan yedi örnekte Q57H mutasyonları, GK sınıfının 19 örneğinde S26L mutasyonları, 21L sınıfının (BA.2) tüm örneklerinde ve 22B sınıfı olan (BA.5) bir örnekte T223I mutasyonları tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Omicron varyantlarında ORF3a mutasyonunun

bulunmaması veya T223I mutasyonunun ortaya çıkması ile viral bulaşta azalma arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir²⁸.

Bu çalışmadaki tüm BA.1, BA.2 ve BA.5 soylarında (n= 31) E geninde T9I mutasyonu ve M geninde Q19E, A63T mutasyonları tespit edilmiştir. 21J (Delta) örneklerinin 19'unda M geninde I82T mutasyonu, 21K (BA.1) örneklerinin tamamında M geninde D3G mutasyonu gözlenmiş ve D3N mutasyonu yalnızca 22B (BA.5) örneğinde bulunmuştur. Yeni Omicron alt varyantlarının ortaya çıkmasıyla birlikte birden fazla viral proteinin patojenitede yer alabileceği belirtilmiş ve dolayısıyla E ve M mutasyonlarının olası potansiyel patojenite belirteçleri olduğu öne sürülmüştür^{26,29}.

Toplam 47 (%55.9) dizide G28881A, G28882A, G28883C pozisyonlarında üç nükleotit değişikliği bulunmuştur. Bu değişiklikler N proteininde R203K ve G204R olmak üzere iki amino asit değişikliğine neden olmuştur. GR (20B, n= 16) ve GRA (21K, n= 10; 21L, n= 20; 22B, n= 1) numuneleri bu iki mutasyona sahip bulunmuştur. Önceki çalışmalar, N proteini üzerinde birlikte ortaya çıkan bu iki mutasyonun, COVID-19 hastalarında artan hastalık şiddetiyle ilişkili olduğunu bildirmiştir. Özellikle bu mutasyonlara sahip hastalarda proenflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonunun (sitokin fırtınası), sürü bağışıklığının oluşmadığı pandeminin erken dönemlerindeki şiddetli hastalık ve ölümleri açıkladığı bildirilmiştir³⁰. Çalışma verilerine göre de hastaneye yatış oranlarının pandeminin erken dönemlerinde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, sunulan bu çalışmada Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi, Antalya ilindeki SARS-CoV-2 varyantları ve mutasyonları ayrıntılı olarak analiz edilmiştir. Çalışma, 27 aylık süreçte örnek dağılımı açısından dengeli olmamak ve sürveyans verisi yansıtmamakla birlikte, belli tarihler arasında dolaşan varyantların değişimi ve mutasyonlar hakkında bölgesel veri sağlamaktadır. Bulunduğumuz ilde pandemi dönemine ait herhangi bir SARS-CoV-2 genom analizi çalışması ulaşılabildiği kadarıyla bildirilmemiştir. Yoğun turizm endüstrisi ve seyahat destinasyonu olarak popülerliği nedeniyle ilimiz verileri, SARS-CoV-2'nin global evrimsel sürecini bölgemizde de benzer şekilde yansıtmaktadır. GISAID Instant Audacity sistemine yüklenen çalışmaya ait sekanslar ile EpiCoV veri tabanı metadatasındaki farklı ülkelerden elde edilen ilişkili genomlar incelendiğinde benzerlik açısından ilk iki sırada yer alan ve virüsün Türkiye'ye ana giriş yolu ile ilişkilendirilebilecek ülkeler Almanya ve Birleşik Krallık olmuştur. EpiCoV veri tabanı gibi genomik veri tabanları, çeşitli ülkelerden elde edilen virüslerin genetik dizilerini takip etmekte ve bu sisteme yüklenen sekanslarla elde edilecek bilgi, virüslerin dünya çapındaki hareketini anlamaya ve halk sağlığı yetkililerinin salgın izlem ve yönetimine katkı sağlamaktadır. COVID-19 salgını temel alarak olası yeni salgınlara hazırlıklı olmak için neler yapılabileceğinin tartışıldığı günümüz dünyasında, moleküler sürveyans çalışmalarında proaktif olmanın önemi tartışılmazdır. Pandemi kontrolünde bilinen varyantların yanı sıra yeni varyantların da araştırılması ve verilerin paylaşılması açısından gelişmekte olan ülkeler desteklenmeli ve teşvik edilmelidir. Bu noktada farklı coğrafi bölgelerden bildirilen geçmiş pandemi

verilerinin de dolaşım ağının tahmin edilmesi ve olası yeni bir pandemide önlem alınması açısından değerli olacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından 16.04.2022 tarih ve 2022-04-12T15_53_46 sayılı karar ile onaylanmıştır. Çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 02.06.2022 ve Karar No: 11/9).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nat* 2020; 579: 265-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
2. T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Bilgilendirme Platformu. Günlük COVID-19 aşı tablosu. Erişim adresi: <https://covid19.saglik.gov.tr/> (Erişim tarihi: 12.07.2022).
3. Demir AB, Benvenuto D, Abacioğlu H, Angeletti S, Ciccozzi M. Identification of the nucleotide substitutions in 62 SARS-CoV-2 sequences from Turkey. *Turkish J Biol* 2020; 44(3): 178. <https://doi.org/10.3906/biy-2005-69>
4. Karacan I, Akgun TK, Agaoglu NB, Irvem A, Alkurt G, Yıldız J, et al. The origin of SARS-CoV-2 in Istanbul: Sequencing findings from the epicenter of the pandemic in Turkey. *Turkey North Clin Istanbul* 2020; 7(3): 203-9. <https://doi.org/10.14744/nci.2020.90532>
5. GISAID. Initiative. Erişim adresi: <https://www.gisaid.org/> (Erişim tarihi: 12.07.2022).
6. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
7. Worldometer. Turkey COVID-Coronavirus statistics. Erişim adresi: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/turkey/> (Erişim tarihi: 03.04.2023).
8. Duong D. Alpha, beta, delta, gamma: What's important to know about SARS-CoV-2 variants of concern? *Can Med Assoc J* 2021; 193(27): E1059-E60. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1095949>
9. Arslan H. Classification of SARS-CoV-2 variants in Turkey. *J Turkish Operations Manag* 2022; 1(6): 1092-101.
10. GISAID. Current GISAID data on the phylogenetic tree and geographical and temporal distribution of these clades. Erişim adresi: <https://gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>.
11. Cov-lineages. Lineage list. Erişim adresi: https://cov-lineages.org/lineage_list.html.
12. 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. *Euro Surveill* 2020; 25(32): 2001410. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410>
13. Saldivar-Espinoza B, Garcia-Segura P, Novau-Ferré N, Macip G, Martínez R, Puigbò P, et al. The mutational landscape of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci* 2023; 24(10): 9072. <https://doi.org/10.3390/ijms24109072>
14. Cosar B, Karagülleoglu ZY, Unal S, Ince AT, Uncuoglu DB, Tuncer G, et al. Mini review SARS-CoV-2 mutations and their viral variants. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022; 63: 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>
15. Farhud DD, Mojahed N. SARS-COV-2 notable mutations and variants: A review article. *Iran J Public Heal* 2022; 51(7): 1494-501. <https://doi.org/10.18502/ijph.v51i7.10083>

16. Hatirnaz Ng O, Akyoney S, Sahin I, Soykam HO, Bayram Akcapinar G, Ozdemir O, et al. Mutational Landscape of SARS-CoV-2 genome in Turkey and impact of mutations on spike protein structure. *PLoS One* 2021; 16(12): e0260438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260438>
17. Koçhan N, Eskier D, Suner A, Karakulah G, Oktay Y. Different selection dynamics of S and RdRp between SARS-CoV-2 genomes with and without the dominant mutations Surface glycoprotein RNA-dependent RNA polymerase RdRp Mutation rates. *Genet Evol* 2021; 91: 104796. <https://doi.org/10.1016/j.mee-gid.2021.104796>
18. Ramazzotti D, Angaroni F, Maspero D, Mauri M, D'Aliberti D, Fontana D, et al. Large-scale analysis of SARS-CoV-2 synonymous mutations reveals the adaptation to the human codon usage during the virus evolution. *Virus Evolution* 2022; 8(1): 1-5. <https://doi.org/10.1093/ve/veac026>
19. GISAID. Clade and lineage nomenclature. Erişim adresi: <https://gisaid.org/resources/statements-clarifications/clade-and-lineage-nomenclature-aids-in-genomic-epidemiology-of-active-hcov-19-viruses/>
20. Ogawa J, Zhu W, Tonnu N, Singer O, Hunter T, Ryan AL, Pao GM. The D614G mutation in the SARS-CoV2 Spike protein increases infectivity in an ACE2 receptor dependent manner. *bioRxiv* 2020; 2020.07.21.214932. <https://doi.org/10.1101/2020.07.21.214932>
21. Eskier D, Akalp E, Dalan O, Karakulah G, Oktay Y. Current mutafome of SARS-CoV-2 in Turkey reveals mutations of interest. *Turk J Biol* 2021; 45(1): 104-13. <https://doi.org/10.3906/biy-2008-56>
22. Yavarian J, Nejati A, Salimi V, Shafiei Jandaghi NZ, Sadeghi K, Abedi A, et al. Whole genome sequencing of SARS-CoV2 strains circulating in Iran during five waves of pandemic. *PLoS One* 2022; 17(5): e0267847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267847>
23. Ou J, Lan W, Wu X, Zhao T, Duan B, Yang P, et al. Tracking SARS-CoV-2 Omikron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Sig Transduct Target Ther* 2022; 7: 138. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00992-2>
24. Motozono C, Toyoda M, Tan TS, Hamana H, Goto Y, Aritsu Y, et al. The SARS-CoV-2 Omikron BA.1 spike G446S mutation potentiates antiviral T-cell recognition. *Nat Commun* 2022; 13: 5440. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33068-4>
25. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: Open the door for novel therapies. *Sig Transduct Target Ther* 2022; 7: 26. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00884-5>
26. Hossain A, Akter S, Rashid AA, Khair S, Rubayet ASM, Alam U. Unique mutations in SARS-CoV-2 Omikron subvariants' non-spike proteins: Potential impacts on viral pathogenesis and host immune evasion. *Microb Pathog* 2022; 170: 105699. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105699>
27. Ghaleh SS, Rahimian K, Mahmanzar M, Mahdavi B, Tokhanbigli S, Sisakht MM, et al. SARS-CoV-2 Non-structural protein 1(NSP1) mutation virulence and natural selection: Evolutionary trends in the six continents. *Virus Res* 2023; 323. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199016>
28. Zhang J, Ejikemuewa A, Gerzanich V, Nasr M, Tang Q, Simard JM, et al. Understanding the role of SARS-CoV-2 ORF3a in viral pathogenesis and COVID-19. *Front Microbiol* 2022; 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854567>
29. Wang Y, Pan X, Ji H, Zuo X, Xiao GF, Li J, et al. Impact of SARS-CoV-2 envelope protein mutations on the pathogenicity of Omicron XBB. *Cell Discov* 2023; 9: 80. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00575-7>
30. Shuaib M, Adroub S, Mourier T, Mfarrej S, Zhang H, Esau L, et al. Impact of the SARS-CoV-2 nucleocapsid 203K/204R mutations on the inflammatory immune response in COVID-19 severity. *Genome Med* 2023; 15: 54. <https://doi.org/10.1186/s13073-023-01208-0>