T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA SARS-CoV-2 GENOM ANALİZİ İLE SALGIN DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

DR. IRMAK GÜZEL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2023

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA SARS-CoV-2 GENOM ANALİZİ İLE SALGIN DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. IRMAK GÜZEL

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. A. ARZU SAYINER

2020.KB.MLT.008 '(2020/91)' numaralı bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER LİSTESİ I

TABLO LİSTESİ VI

ŞEKİL LİSTESİ VII

KISALTMALAR VIII

TEŞEKKÜR XII

ÖZET 1

SUMMARY 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ 5

2. GENEL BİLGİLER 7

2.1. Koronavirüslerin Tarihçesi 7

2.2. SARS-CoV-2 Ortaya Çıkışı ve Epidemiyolojisi 9

2.3 Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19) ve Sağlık Çalışanları 11

3. ETKEN SARS-CoV-2 11

3.1. Köken ve Sınıflandırma 13

3.2. Genom Yapısı 14

3.3. Viral Replikasyon ve İmmunopatogenez 17

3.3.1. Viral Replikasyon 17

3.3.2. İmmünopatogenez 18

3.4. Bulaş Yolları ve Klinik 21

3.5. Varyantlar 22

4. TANISAL YAKLAŞIM 26

4.1. Laboratuvar Tanısı 26

4.1.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri…..……..…….28

4.1.1.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi……. 28

4.1.1.2. Yeni Nesil Dizileme……..……30

4.1.1.3. Damlacık Esaslı Dijital Polimeraz Zincir Tepkimesi……..……30

4.1.1.4. İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri ……..31

4.1.1.5. Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar…....32

4.1.2. Serolojik Testler……..……33

4.1.2.1. Antikor Testleri……..……..…..……..……33

4.1.2.2. Antijen Testleri……..…..……..……36

4.2. Radyolojik Tanı ……37

5. GEREÇ VE YÖNTEM…….……..39

5.1. Etik Onay…….……..39

5.2. Epidemiyolojik Veri Toplama……..39

5.3. Örneklem Seçimi……...40

5.3.1. Retrospektif Tarama……..40

5.3.2. Nükleik Asit İzolasyonu ve SARS-CoV -2 RNA Saptama……40

5.4. SARS-CoV-2 Tüm Genom Yeni Nesil Dizileme……44

5.4.1. SARS-CoV-2 Tüm Genom Yeni Nesil Dizileme Analizi……51

5.4.1.1. Varyasyon Analizi……...…52

5.4.1.2. Dal (*clade*), Soy (*lineage*) Analizi……..…52

5.4.1.3. Filogenetik Analiz…….……...53

5.5. İstatistiksel Analiz……53

6. BULGULAR……54

7. TARTIŞMA……75.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER……86

9. KAYNAKÇA…… 88

10.EKLER……..…....112

EK 1. Örneklerin Ayrıntılı Verisi……...…..112

EK 2. Tüm Nükleotid Değişiklikleri…….....113

TABLO LİSTESİ

Tablo1. Koronavirüslerin sınıflandırılması……7

Tablo 2. İnsanları enfekte ettiği bilinen koronavirüsler ……8

Tablo 3. DSÖ tarafından ülkelere göre bildirilen vaka ve ölüm sayıları ……10

Tablo 4. SARS-CoV-2 yapısal olmayan proteinleri……...15

Tablo 5. SARS-CoV-2 yapısal proteinleri……16

Tablo 6. Geçmişten günümüze endişe verici varyantlar……....24

Tablo 7. Anahtar *Spike* protein mutasyonları……..…...25

Tablo 8. SARS-CoV-2 saptanmasında çeşitli izotermal amplifikasyon yöntemleri…….31

Tablo 9. Çalışmaya alınan 28 kümenin genel özellikleri……....42

Tablo10. cDNA sentez reaksiyonu……45

Tablo11. cDNA sentez inkübasyon koşulları……..45

Tablo12. SARS-CoV-2 zenginleştirme reakiyonu……46

Tablo13. Hedef zenginleştirme inkübasyon koşulları……46

Tablo14. Kütüphane amplifikasyon ve indeksleme reaksiyonu……49

Tablo15. Kütüphane amplifikasyon ve indeksleme inkübasyon koşulları……..…49

Tablo 16. Örneklerde saptanan çoklu nükleotid varyasyonları……61

Tablo 17. Örneklerde saptanan delesyonlar……...62

Tablo 18. Kümelerin analiz sonuçları özet……70

Tablo19. Bazı mutasyonların önemli özellikleri……..…82

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Koronavirüs elektron mikroskop görüntüsü ……...13

Şekil 2. SARS-CoV -2 genom yapısı…….. 15

Şekil 3. SARS-CoV-2 *spike* proteini……..…..17

Şekil 4. SARS-CoV-2 replikasyon döngüsü…….....18

Şekil 5. SARS-CoV -2 immünopatogenez…….. 21

Şekil 6. COVID-19 enfeksiyonunda virolojik ve serolojik biyobelirteçler……..27

Şekil 7. SARS-CoV-2 antikorlarının tespiti ELISA , CLIA ve LFIA test şemaları…..34

Şekil 8. Görüntüleme teknikleriyle COVID-19 ……..…….…….38

Şekil 9. Örneklem seçim şeması…….41

Şekil 10. Yeni nesil dizileme kütüphane protokolü ……..…44

Şekil 11. Örnek SARS-CoV-2 kütüphane görüntüleri……..…50

Şekil 12. Genom kapsam değeri ile RT PCR Ct ilişkisi……55

Şekil 13. Örneklerin zamana göre dal (*clade*) dağılımı……56

Şekil 14. Örneklerin zamana göre soy (*lineage*) dağılımı…….57

Şekil 15. Varyasyonların gen bölgesi dağılımı……..58

Şekil 16. SNV'larda nükleotid değişim paterni……..58

Şekil 17. Küresel diziler kullanılarak maximum likelihood ile filogenetik ağaç…….65

Şekil 18. 20B dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı……66

Şekil 19. 20A dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı…….. 67

Şekil 20. Alfa dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı…..….68

Şekil 21. Delta dal *(clade)* üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı…….69

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACE-2: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim ‘ *Angiotensin-Converting Enzyme-2’*

ADCC: Antikor Aracılı Hücresel Sitotoksisite ‘*Antibody-Mediated Cellular Cytotoxicity’*

ARDS: Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu ‘*Akut Respiratuar Distres Sendromu’*

BIC: Bayes Bilgi Kriteri *‘Bayesian Information Criterion’*

CCL 2: CC motif kemokin ligan 2 *‘CC motif chemokine ligand 2’*

CD: Bağlayıcı Alan *‘Connector Domain’*

CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri *‘Centers for Disease Control and Prevention*

CH: Merkezi Sarmal ‘*Central Helix’*

CLIA: *ChemiluminescenceImmunoassay*

CoV: Coronavirüs

COVID-19: Koronavirüs Hastalığı 2019

CNGBdb: Çin Ulusal Genbank Veri Tabanı

CRISPR: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar

CT: Sitoplazmik Kuyruk *‘Cytoplasmic Tail’*

Ct: Döngü eşik değeri

CTD: C-Terminal Alan *‘C-TerminalDomain’*

CXCL 10*:* CXC motif kemokin ligandı 10 *‘CXC motif chemokine ligand 10’*

DAMP: Hasarla İlişkili Patern Molekülü

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DPP4: Dipeptidil Peptidaz

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

E: Zarf Proteini ‘*Envelope*’

ECDC: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi ‘*European Centre for Disease*

Prevention and Control'

ELISA: '*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay'*

ERGIC: ER-Golgi Ara Bölmesi: *'Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment'*

EUA: Acil Kullanım Onayı '*Emergency Use Authorization'*

ExoN: Eksoribonükleaz

FP: Füzyon Peptit

FPPR: Füzyon Peptit Yakın Bölgesi '*Fusion Peptide Proximal Region'*

GCSF: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör

GISAID: Kuş Gribi Verilerini Paylaşma Küresel Girişimi '*Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data'*

HR 1: Heptad Tekrar 1 '*Heptad Repeat 1'*

HR 2: Heptad Tekrar 2 *'Heptad Repeat2'*

Ig: İmmünglobulin

IFN: İnterferon

IL: İnterlökin

IP-10: İndükleyici Protein-10

IRF 3: İnterferon düzenleme faktörü 3 *'Interferon regulatory factor 3'*

KKD: Kişisel Koruyucu Donanım

LAMP: Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon *'Loop Mediated Isothermal Amplification'*

LFIA: *Lateral Flow Immunoassay*

M: Membran Proteini

mAb: Monoklonal Antikor

MCP-1: Monosit Kemotaktik Protein-1

MERS-CoV: Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüs *'Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus'*

MIP-1α: Makrofaj İnflamatuvar Protein -1α

MNV: Çoklu nükleotid varyasyonu

MOF: Çoklu Organ Yetmezliği

Mpro: Ana Proteaz

N: Nükleokapsid Proteini

Nab: Nötralizan antikor

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi '*National Center for Biotechnology Information'*

NETs: Nötrofil hücre dışı tuzakları

NFκB: Nükleer Translokasyonu kappa B

NGS: Yeni Nesil Dizileme *'Next Generation Sequencing'*

NSP: Yapısal Olmayan Proteinler *'Nonstructural proteins'*

NTD: N-terminal Alanı '*N-Terminal Domain'*

ORF: Açık Okuma Bölgesi *'Open Reading Frame'*

PAMP: Patojenle İlişkili Patern Molekülü

PANGO: '*Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak'*

PANGOLIN: *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages'*

PLpro: Papain Benzeri Proteaz

PRR: Kalıp Tanıma Reseptörleri

PCR: Polimeraz Zincir Tepkimesi

RBM: Reseptör Bağlama Alt Alanı/Motifi

RNA: Ribonükleik asit

RPA: Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu '*Recombinase Polymerase Amplification*

RdRp: RNA Bağımlı RNA Polimeraz '*RNA-dependent RNA polymerase'*

RLR: RIG-I Benzeri Reseptörler

RTC: Repliksyon-transkripsiyon Kompleksleri *'Replication-Transcription Complexes'*

RT-PCR: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi

S: *Spike* Proteini

SARS-CoV: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs '*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus'*

SARS-CoV-2: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs- 2 '*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2'*

SARSr-CoV: Şiddetli Akut Solunum Sendromu İlişkili Koronavirüsler '*SARS-CoV-related Coronavirus'*

SNV: Tek nükleotid varyasyonu

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi

sVNT: Temsili Virüs Nötralizasyon Testi *'Surrogate virus neutralization test'*

TLR: Toll-likeReseptörler

TM: Transmembran

TMA: Transkripsiyon Aracılı Amplifikasyon

TMPRSS2: Transmembran proteaz serin 2 *'Transmembrane Serine Protease2'*

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü alfa

US-FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi '*United States Food and Drug Administration'*

UTR: Kodlanmayan Bölge '*Untranslated region'*

VOI: Dikkate Alınması Gereken Varyantlar *'Variant of Interest'*

VOC: Endişe Uyandıran Varyantlar *'Variant of Concern'*

vWF: von Willebrand Faktör

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden beri emeğini, bilgisini ve desteğini hiç esirgemeyen, eğitimci kimliğine hayranlık duyduğum, öğrencisi olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER ‘e,

Tez sürecime fikir önderliği yapan, bilgisiyle desteğini her zaman benimle paylaşan mükemmel bir yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Yusuf Hakan ABACIOĞLU’na,

Uzmanlık eğitimime olan katkıları, ilgileri ve özverilerinden dolayı değerli eğitim danışmanlarım Prof. Dr. Özlem YILMAZ ve Doç. Dr. Cem ERGUN’a,

Anabilim dalı başkanlıklarında gelişimimize çok emek veren, bilgilerini desteklerini hiç esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Nuran ESEN ve Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK başta olmak üzere gelişimime katkı sağlayarak, emek veren, zamanını ve bilgisini paylaşan Anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına,

Eğitim sürecimde bilgi ve deneyimiyle her zaman yanımda olan ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, örnek aldığım değerli ağabeyim yandal uzmanımız Dr. Özgür APPAK’a,

Yoğun emeklerle oluşturdukları filyasyon veri tabanı ve epidemiyolojik veri paylaşımları için başta Uzman Dr. Ahmet Naci EMECEN olmak üzere tüm Halk Sağlığı Anabilim Dalı ailesine,

Asistanlığım ve zorlu tez sürecim boyunca, birlikte çalışarak, eğlenerek, öğrenerek geliştiğim, daima desteklerini yanımda hissettiğim, başta Dr. Desen BÜYÜKSOY, Dr. Gamze ÖZTÜRK, Dr. Hazar GÖZGÖZ ve Dr. Ecem BAŞOĞLU olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

İlk günden itibaren desteklerini esirgemeyen, büyük bir aile hissini her zaman yaşatan kıymetli merkez laboratuvarı çalışma ekibine,

Beni yetiştiren, her anımda bana destek olan ve üzerimdeki emeğin en büyük sahipleri canım annem Aynur GÜZEL ve canım babam Saffet GÜZEL’e, hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, bilgisiyle sonsuz güven veren, sevgisini her zaman yanı başımda hissettiğim canım kardeşim Dr. Çağlar GÜZEL’e ve biricik patili can dostum Mösyö’ye, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özel bir teşekkür ise zorlu pandemi sürecinde, canla başla çalışan her zaman hastayı ön planda tutarak özveriyle emek veren tüm sağlık çalışanlarına, iyi ki varsınız. Bu uğurda hayatını kaybeden tüm sağlık çalışanlarına saygı ve minnetle.

Dr. Irmak GÜZEL

ÖZET

SAĞLIK ÇALIŞANLARINDA SARS-CoV-2 GENOM ANALİZİ İLE SALGIN DİNAMİKLERİNİN İNCELENMESİ

Giriş ve Amaç: SARS-CoV-2 insanda salgına yol açan üçüncü zoonotik betakoronavirüstür. Sağlık çalışanları arasındaki SARS-CoV-2 enfeksiyonunun yayılımını incelemek, virüsün hastane içindeki veya hastane ile toplum arasındaki bulaşını sınırlayacak yöntemleri belirlemek ve pandeminin kontrolünü sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Filyasyon çalışmaları, bulaş dinamiklerini anlamada bazı ipuçları sunmakla birlikte ilişkileri değerlendirmek için viral kanıtlar gereklidir. Çalışmamızda, Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Araştırma Uygulama Hastanesi'nde SARS-CoV-2 RNA pozitifliği saptanan sağlık çalışanları ve temaslılarından oluşan kümelerde, epidemiyolojik verinin tam viral genom sekansı ve filogenetik analizle değerlendirilerek bulaş ağlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: DEÜ Araştırma Uygulama Hastanesi'nde Mart 2020 ile Kasım 2021 arasında SARS-CoV-2 RNA pozitif sağlık çalışanları ve ilişkili olduğu düşünülen kişilerin verileri retrospektif olarak incelendi. Belirlenen 93 kişinin (28 küme) arşivlenmiş nazofaringeal sürüntü örneklerinden EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Almanya) kullanılarak nükleik asid ekstraksiyonu yapıldı. Sekans analizi öncesi, SARS-CoV-2 RNA tespiti RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR v1.0 (Altona Diagnostics) kiti ve Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak tekrarlandı. RT-PCR Ct<28 olan örnekler seçildi ve Illumina platformunda QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 (Qiagen) protokolü ile tüm genom dizileme gerçekleştirildi. Dizi analizi CLC Genomics Workbench programında (Qiagen, Almanya) WuhanH1 (GenBank:MN908947.3) dizisi referans alınarak yapıldı. Dizileme kalite kriterlerine uyan 63 örnek (20 küme) ileri analizlerle değerlendirildi. Referans dizi, çalışmadaki 63 örneğe ait diziler ve GISAID ile GenBank'tan alınan diğer diziler ile, MEGA 11 programında "bootstrap" değeri 200 olacak şekilde, "Maximum Likelihood" ağaçları oluşturuldu. Filogenetik ağaçlar FigTree (v1.4.4) programı ile düzenlendi. Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edildi.

Bulgular ve Sonuç: Çalışmaya dahil edilen 63 kişinin 40'ı sağlık çalışanıydı ve ortalama yaş 34.1 ± 9.3 yıl olarak tespit edildi. 23 kişi ise temaslı aile üyelerinden oluşmaktaydı ve ortalama yaş 33.7± 21.3 yıl idi. Gruptaki 63 kişinin 35'i (%56') kadındı. Katılımcıların çoğu enfeksiyonu hafif -orta şiddette klinik semptomlar ile geçirdi. Dizilerde, ham okuma verisi

820 bin ile 5 milyon aralığında değişmekteydi. Örneklerden elde edilen konsensus dizi uzunlukları ortalama 29.771 ± 77.3 baz idi. Referans genomun en çok %99 en az %82'ini kapsayan dizilerde, ortalama kapsam 4335 ± 1312 idi. Diziler, genomun ortalama %97.9 ± 1.9'luk bölümünü 10x derinlikte kapsamaktayd. Örneklerin RT PCR Ct değerleri düştükçe, dizileme kalitesinin arttığı belirlendi. Grupta, SARS-CoV-2'nin 4 farklı dalına (clade) ait 14 farklı soy (lineage) tespit edildi. 180'si non-sinonim, 97'si sinonim, 7'si kodlanmayan olmak üzere toplam 284 nükleotitte varyasyon saptandı. Varyasyonlar en sık ORF1ab ve S gen bölgelerinde tanımlandı. Mutasyonların arasında enfektivite, nötralizasyon ve klinik prognozu etkileyebilecek önemde olanlar değerlendirildi. Epidemiyolojik ilişkinin güçlü olduğu kümelerde, örnekler birbirinden en fazla iki varyasyon ile farklılık gösterdi. Sekans analizi ve filogenetik ağaç ile değerlendirme sonrası, virüsün, 5 kümeye tek bir kaynaktan girmediği belirlenirken, diğer 15 kümede ise temas izleme verileriyle uyumlu olarak tek odak olabileceği doğrulandı. Enfekte sağlık çalışanlarından toplanan bilgiler, sağlık çalışanlarına virüs bulaş nedenleri, aile içinde veya hastanede ortak kullanılan çalışma ve dinlenme alanlarında, kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanımındaki eksiklikler ve de mesafe kurallarına uyulmaması olarak gösterildi.

Virüsün tüm genom analizi, epidemiyolojik verilerin daha doğru değerlendirilmesini sağlayarak SARS-CoV-2'nin karmaşık bulaşma dinamiklerinin anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, Sekanslama, Sağlık çalışanları

SUMMARY

SARS-CoV-2 GENOM ANALYSIS AND INVESTIGATION OF EPIDEMIC DYMANICS IN HEALTHCARE WORKERS

Introduction and Aim: SARS-CoV-2 is the third zoonotic beta coronavirus that caused outbreak in humans. Examining SARS-CoV-2 infection among healthcare workers (HCWs) is of critical importance in controlling the pandemic by limiting the spread of the virus within hospital or between the hospital and the community. Although phylogenetic studies provide some clues for investigating transmission dynamics, viral evidence is required to establish this relationship. In our study, we aimed to investigate the transmission chains by evaluating the epidemiological data from clusters of healthcare workers and contacts who were detected with SARS-CoV-2 RNA in the DEÜ Hospital using whole genome sequencing (WGS) of the virus and phylogenetic analysis.

Materials and Methods: The SARS-CoV-2 infected HCWs and their contacts detected between March 2020 and November 2021 at Dokuz Eylul University Research and Application Hospital were retrospectively analysed. The study was carried out on a total of 93 stored nasopharyngeal swab samples. RNA was isolated using EZ1-Virus-Mini-Kit according to the manufacturer's instructions. SARS-CoV-2 RNA was detected using RealStar®SARS-CoV-2RT-PCR Kit (Altona Diagnostics) on the Rotor Gene Q system before sequencing. WGS was performed on samples with RT PCR Ct<28, using the QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 protocol (QIAGEN, Germany) on the Illumina platform. Sequence analysis and quality evaluations were performed in the CLC Genomics Workbench program by using WuhanH1 reference-genome (GenBank:MN908947.3). 63 samples (20 clusters) that met the sequencing quality criteria were evaluated with advanced analysis. The samples of the study group and external sequences selected from GISAID and GenBank were used for phylogenetic analysis. MEGA 11 software was used to perform genomic alignments, and a phylogenetic tree was constructed according to the confidence of 200 bootstrapping values using the Maximum Likelihood method. Later, the tree was edited with FigTree. Data were analysed using SPSS v.24.0.

Results and Conclusions: Of the 63 individuals, 40 were healthcare workers and the median age was 34.1 ± 9.3 years, the other 23 contacts were family members and the median age was 33.7± 21.3 years. Thirty five (56%) of the 63 individuals were women. Most of the

participants had mild to moderate clinical symptoms. In the sequences, the raw reads ranged from 820.000 to 5 million. The average consensus sequence length was 29,771 ± 77.3 base. For sequences with a coverage of up to 99% to a minimum of 82% of the reference genome, the mean coverage was 4335 ± 1312. The sequences covered an average of 97.9 ± 1.9% of the genome at 10x depth. It was determined that as the RT PCR Ct values of the samples decreased, the quality of the sequencing increased. In the group, 14 different lineages belonging to 4 different clades of SARS-CoV-2 were identified. Variations were detected in a total of 284 nucleotides, 180 of which were nonsynonymous, 97 were synonymous, and 7 were noncoding. Variations were most frequently identified in the ORF1ab and S gene regions. The most significant mutations, which could potentially impact infectivity, neutralization, and clinical prognosis, were evaluated. In clusters with a strong epidemiological relationship, the samples differed from each other with at most two different variations. Following the analysis of the sequences and the evaluation of the phylogenetic tree, it was revealed that the virus did not enter the five clusters from a single source while in the other 15 clusters, presence of a single source, in agreement with the contact tracing data was confirmed. Based on information collected from infected healthcare workers, insufficient use of personal protective equipment (PPE) and non-compliance with social distancing rules were shown to be the causes of the spread of SARS-CoV-2 among healthcare workers in family settings and shared work spaces and rest areas in the hospital.

The whole genom sequencing data of the virus has contributed to the understanding the complex transmission Dynamics of SARS-CoV-2, enabling more accurate assessment of the epidemiological data.

Keywords: SARS-CoV-2, Sequencing, Healthcare workers

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bulaşıcı hastalıklar yirmi birinci yüzyılın en büyük halk sağlığı sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanoğlu geçmişten bu yana yıkıcı etkileri olan çok sayıda salgın ile karşılaşmıştır ([1]). Yeni gelişen dünya olanakları, insanlar ile rezervuar konakçılar arasındaki etkileşimin artması, bulaşıcı etkenlerin daha kolay yayılmasına, insanlarda değişen formlarda hastalıkların görülmesine neden olur ([2]).

Koronavirüsler incelendiğinde, SARS-CoV-2'den önce, altı türün insanları enfekte ettiği biliniyordu ([3]). Bunlardan "Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü" (SARS-CoV) ve "Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü" (MERS-CoV), insanlarda ciddi solunum yolu hastalıklarına ve mortalitelere neden olmuştur ([4,5]). SARS-CoV-2 son 20 yılda insanlarda meydana geldiği bilinen zoonotik beta koronavirüslerle ilgili üçüncü salgındır. Aşılarının kullanıma sunulması ve yaygın olarak uygulanması, enfeksiyonun şiddetini azaltmakta önemli bir başarı sağlasa da yeni virüs varyantlarının ortaya çıkması ve koruyucu antikor titrelerinin değişkenliğine bağlı olarak, pandemi devam etmektedir.

Hastane ortamlarındaki salgınlar hem hastaları hem de sağlık çalışanlarını etkileyeceğinden özellikle önemlidir ([6–8]). Wuhan'daki sağlık çalışanları ile ilgili ilk rapor ([9]) ve sonrasında yayınlanan birçok araştırma, dünya çapında çok sayıda sağlık çalışanının SARS-CoV-2 ile enfekte olduğunu ve bazılarının öldüğünü göstermiştir ([10–12]). Risk sınıflandırmalarında sağlık çalışanları, çok yüksek veya yüksek riskli gruplar arasında kabul edilmektedir ([13,14]). Sağlık çalışanlarının korunması hem sağlık sisteminin sürekliliğinin sağlanmasında hem de çalışanların çevrelerine enfeksiyon bulaşını önleyerek toplumun korunmasında kritik öneme sahiptir.

Epidemiyolojik teknikleri kullanan salgın araştırmaları, olası bulaş yolları hakkında önemli mekânsal ve zamansal veriler sağladıkları ve risk faktörlerini gösterebildikleri için değerlidir ([15]). Salgın incelemelerinin gücü genetik verilerin analizi ile arttırılabilir. Tüm genom dizilimi (WGS) ile elde edilen veriler, salgın yayılımının küresel ve bölgesel modellerinin değerlendirilmesine ([16–18]), bulaş dinamiklerinin analizi ile kümeler arasında ayrım yapılmasına ve bulaş yollarının karakterize edilmesine ([19–22]) yardımcı olarak geleneksel epidemiyolojik yöntemlere ek güçlü kanıtlar sağlayabilir.

Ülkemizde SARS-CoV-2'nin sağlık kuruluşlarında yayılımı hakkında yeterli veri yoktur. Yeni nesil dizileme ile yürütülen araştırmalar, genomik, klinik ve epidemiyolojik veriler arasındaki bağlantıları güçlendirerek önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Araştırma Uygulama Hastanesindeki SARS-CoV-2 RNA pozitif saptanan sağlık çalışanları ve temaslılarından oluşan kümelerin, epidemiyolojik veri, tüm genom dizileme (WGS) ve filogenetik analizlerle incelenmesiyle salgın dinamiklerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

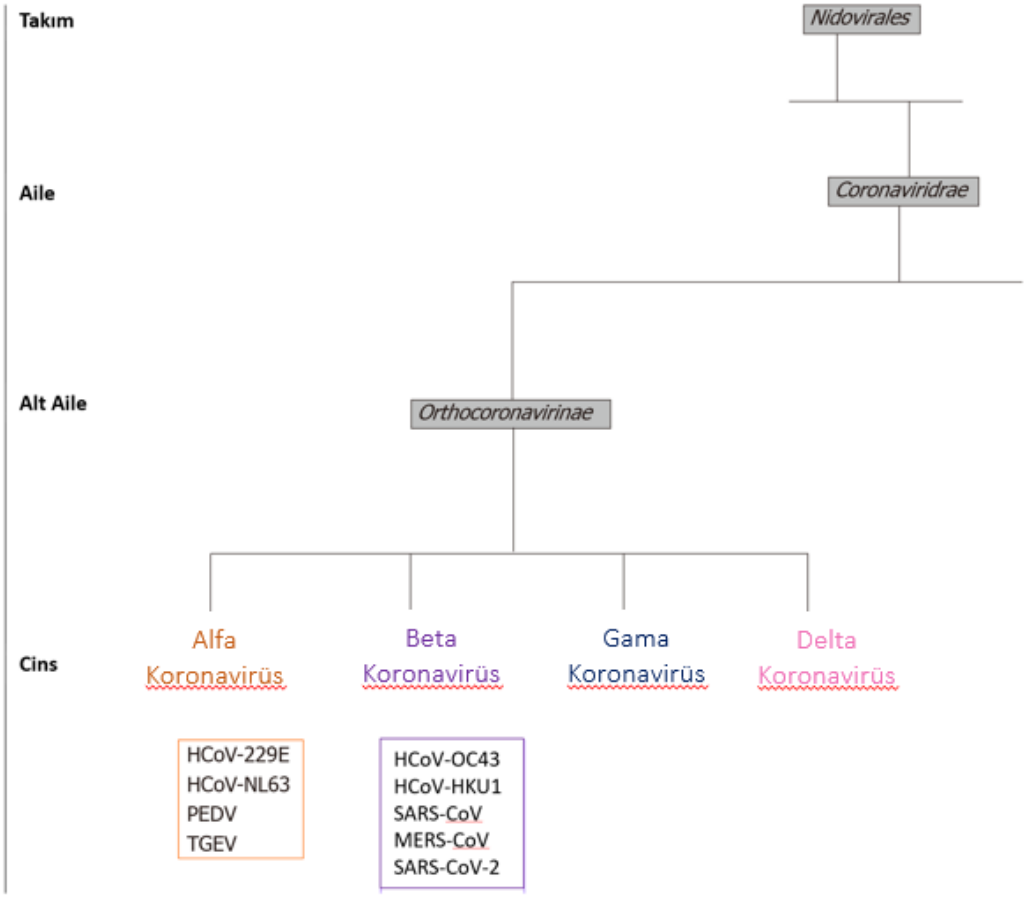
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Koronavirüslerin Tarihçesi

Koronavirüsler (CoV'ler), insanlarda ve hayvanlarda değişen patojeniteye sahip solunum ve gastrointestinal sistem hastalıklara neden olan RNA virüsleridir. Büyük viral RNA genom boyutları, sık rekombinasyonları ve yüksek genomik plastisiteleri nedeniyle türler arası kolay bulaşabilme eğiliminde olup, yeni konakçılara hızla uyum sağlayabilirler ([23,24]).

Bu virüs ailesinin insanlarla olan ilişkileri ilk olarak 1965'te Tyrell ve Bynoe tarafından solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilerek gösterilmiştir ([25])

Günümüzde *Nidovirales* takımı, *Coronaviridae* ailesi, *Orthocoronavirinae* alt ailesine ait dört cins koronavirüs tanımlanmıştır ([3]). Tablo1



Tablo1. Koronavirüslerin sınıflandırılması ([26])

Dünyanın çoğu bölgesinde tespit edilebilen bu türler arasında γ - ve δ- koronavirüsler daha sık kuşları enfekte etme eğiliminde iken, α- ve β-CoV'lar yaygın olarak yarasalar ve diğer memelileri enfekte etme eğilimindedir ([26]).

Altı koronavirüs türünün insanda hastalığına neden olduğu bilinmektedir. Dört virüs — 229E, NL63, OC43, HKU1 — dünyada endemik olarak bulunan ve bağışıklığı sağlam kişilerde tipik olarak soğuk algınlığı semptomlarına neden olmaktadır ([3]). Diğer iki tür – SARS-CoV ve MERS-CoV – ciddi klinik tablolar ve bazen ölümcül hastalıklarla bağlantılıdır ([28]). İnsanları enfekte ettiği bilinen koronavirüsler tablo 2 de özetlenmiştir.

SARS-CoV 2002'de Güney Çin'deki Guangdong eyaletinde atipik pnömoni vakasıyla takip edilen bir hastada ilk kez tanımlanmış ve salgın sırasında toplam 8 098 kişi enfekte olmuş, 774 ölüm bildirilmiştir ([29]). 2012'de ise MERS-CoV, ilk kez Suudi Arabistan'da akut pnömoni ve böbrek yetmezliği nedeniyle hastaneye yatırılan bir hastadan izole edilmiştir ([30]). Halen büyük çoğunluğu Suudi Arabistan'da olmak üzere Nisan 2012'den Ağustos 2022'ye kadar, küresel olarak doğrulanmış toplam 2591 vaka ve 894 ölüm (Vaka-ölüm oranı %34,5) rapor edilmiştir ([31]).

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), insanları enfekte eden ve son 20 yılda tanımlanan yedinci koronavirüstür ([32]).

Cins	Tür	Saptama	Reseptör	Hastalık Şiddeti
Alfa Koronavirüs	hCoV-229E	1966	Aminopeptidaz N (CD13)	Hafif
	hCoV-NL63	2004	ACE2	Hafif
Beta Koronavirüs	hCoV-OC43	1967	9-O-Asetilat sialik asit	Hafif
	hCoV-HKU1	2005	9-O-Asetilat sialik asit	Hafif
	SARS-CoV	2003	ACE2	Şiddetli
	MERS-CoV	2012	DPP4	Şiddetli
	SARS-CoV-2	2020	ACE2	Şiddetli

Tablo 2. İnsanları enfekte ettiği bilinen koronavirüsler

2.2.SARS-CoV- 2 Ortaya Çıkışı ve Epidemiyolojisi

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde etiyolojisi bilinmeyen pnömoni nedeniyle bir dizi hasta tespit edildi ([33]). SARS ve MERS hastalarına benzer şekilde, bu hastalarda ateş, öksürük gibi viral pnömoni semptomları bulunmakta ve ciddi vakalarda nefes darlığı ile bilateral akciğer infiltrasyonu eşlik etmekteydi ([32,34]). Hastanede yatan ilk vakalar incelendiğinde çoğu epidemiyolojik olarak Wuhan şehir merkezinde bulunan ve farklı türde canlı hayvan satışı olan Huanan Deniz Ürünleri Pazarı ile bağlantılı bulundu ([35,36]). Retrospektif bir araştırmaya göre, bilinen ilk vakanın başlangıcı 8 Aralık 2019'a kadar uzanıyordu ([37]).

Araştırmalar sonunda etken ajan, yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) olarak tanımlandı. Tespit edilen yeni koronavirüsün ilk genom dizisi 10 Ocak'ta Kuş Gribi Verilerini Paylaşma Küresel Girişimi (GISAID) veri tabanına yüklendi ([38]). Daha sonra, Huanan Toptan Deniz Ürünleri Pazarı'yle temas öyküsü olmayan aile kümeleri ve sağlık tesislerinde de hastane ilişkili enfeksiyonların tespit edilmesiyle yeni virüsün insandan insana bulaştığına dair kanıtlar oluştu ([39–41]). Hızla vaka sayılarının artmasıyla beraber 30 Ocak'ta Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, yeni koronavirüs salgını uluslararası öneme sahip bir halk sağlığı acil durumu olarak ilan edildi ([42]).

Tanımlanan yeni virüse ait hastalık 11 Şubat 2020 tarihinde DSÖ tarafından koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırıldı ([43]). Wu ve diğerleri ([38]) tarafından yapılan metagenomik RNA dizileme çalışması, COVID-19'a neden olan virüsün, SARS-CoV ve MERS-CoV ile yakından ilişkili yeni bir koronavirüs türü olduğunu ortaya koydu. Bu nedenle, virüs, "Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs -2 (SARS-CoV-2)" olarak isimlendirildi.

SARS- CoV-2, Çin'de ortaya çıkmasından kısa süre sonra Çin'e seyahat eden kişiler tarafından hızla dünyanın diğer bölgelerine yayıldı daha sonra yerel yayılımlar başladı ([44]). Viral yayılım ilk olarak Tayland, Güney Kore ve Japonya'da tespit edildi. Ocak ayının ikinci yarısında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa'da (İtalya, Fransa ve İspanya) ilk vakalar ortaya çıktı ([45,46]). Dünya'ya hızlı yayılım sonucu DSÖ tarafından 11 Mart 2020'de COVID -19 pandemi olarak ilan edildi ([43]). Aynı tarih de ülkemizde de ilk vaka tespit edildi. Hastalığa bağlı ilk ölüm ise 17 Mart 2020 tarihinde bildirildi ([47]).

Yaklaşık üç yıllık süre sonunda, Ekim 2022 itibariyle DSÖ tarafından 617 milyondan fazla vaka ve 6,5 milyondan fazla ölüm rapor edilmiştir. Tablo 3 'de ilk 10 ülkenin vaka ve ölüm sayıları gösterilmektedir ([48]).

Türkiye ise 16 milyonu aşkın vaka ve 100 binin üzerinde ölüm ile 11. sırada yer almaktadır ([48]). (EKIM 2022)

	Vakalar Kümülatif Toplam	Ölümler Kümülatif Toplam
KÜRESEL	617.597.680	6.532.705
1. Amerika Birleşik Devletleri	95.260.865	1.050.195
2. Hindistan	44.606.460	528.754
3. Brezilya	34.699.017	685.573
4. Fransa	34.665.044	151.793
5. Almanya	33.826.367	150.406
6. Kore Cumhuriyeti	24.933.756	28.614
7. Birleşik Krallık	23.735.377	190.888
8. İtalya	22.692.912	177.356
9. Japonya	21.460.295	45.248
10. Rusya Federasyonu	21.163.942	387.991

Tablo 3. DSÖ tarafından ülkelere göre bildirilen vaka ve ölüm sayıları ([48]) EKIM 2022

Veriler incelendiğinde insanlık tarihinde COVID-19 en çok test edilen hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Bugün tüm dünyada 1milyarı aşkın test sayısı ile ABD birinci sırayı alırken Hindistan (>890 milyon) ve UK (>520 milyon) sıralamayı takip etmektedir. Türkiye ise sıralamada 162 milyondan fazla test ile 10. sırada yer almaktadır ([49]).

2.3.Sağlık Çalışanları ve COVID-19

Sağlık çalışanları, COVID-19 ile mücadelede ön saflarda yer almakta ayrıca teşhis edilmemiş veya asemptomatik bulaştırıcı vakalara maruz kalmaları nedeniyle, önemli bir popülasyonu temsil etmektedir. Hastalığa yakalanma ve ardından çevrelerini (hastaları, meslektaşlarını ve ailelerini) maruz bırakma riski yüksek gruplardan birini oluşturmaktadır ([50–52]). Salgının başında Çin, salgından etkilenen hastalarla temas halinde olmanın bir sonucu olarak 16 sağlık çalışanına COVID-19 bulaştığını bildirmiştir ([53]). Trajik olarak SARS-CoV-2 salgınının ortaya çıkışını bildiren ilk doktor, Wuhan Merkez Hastanesinde çalışan ve bir göz doktoru olan Dr. Li Wenliang de, 7 Şubat 2020'de COVID-19 nedeniyle hayatını kaybetmiştir ([54]).

Günümüzde sağlık çalışanları arasında SARS-CoV-2 enfeksiyonunun yaygınlığı konusunda net bir bilgi yoktur. Farklı ülkelerdeki farklı test stratejileri nedeniyle -bazıları sadece semptomatik çalışanları test ederken, bazıları tüm sağlık çalışanlarını zorunlu olarak test eder- sağlık çalışanları arasında enfeksiyon insidansına ilişkin kesin rakamları belirlemek zordur.

ABD ve UK'da 2 milyondan fazla kişinin katıldığı geniş bir prospektif kohort çalışması, toplumdaki bireylere kıyasla ön saflardaki sağlık çalışanlarının SARS-CoV-2 enfeksiyon riskinde 12 kat artış, özellikle yatan hasta ile temasta riskin 24 kat artış gösterdiğini tespit etmiştir ([55]).

Avrupa, ABD ve Asya'daki 97 sağlık kuruluşunda 2020 verileri kullanılarak sağlık çalışanlarında enfeksiyon prevalansı, antikorların varlığına dayalı olarak %7 ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak %11 olarak saptanmıştır. Yüksek prevelansa rağmen COVID-19 pozitif sağlık çalışanlarının %5'inde ciddi klinik komplikasyonlar gelişirken, %0,5'inde ölüm bildirilmiştir ([56]). Sahu ve ark. ([54]) yaptığı sistematik derleme ve meta analiz çalışmasında da benzer olarak sağlık çalışanları arasında şiddetli hastalık insidansı ve ölüm oranları genel popülasyona göre anlamlı oranda düşük ($p < 0.001$) bulunmuştur.

Afrika'da 11 ülkeden 9223 sağlık çalışanına ilişkin verileri içeren bir derlemede ise sağlık çalışanlarında seroprevalansın değişken olabildiği (0- %45) saptanmıştır ([58]).

Sağlık çalışanları genellikle altta yatan tıbbi sorunları olmayan daha genç yetişkinlerdir. İlk başvuru semptomları genel popülasyona benzer olarak ateş, öksürük, yorgunluk ve nefes darlığıdır. SARS-CoV-2 pozitifliği ile kuvvetli ilişkili semptomlar olarak ise sıklıkla anosmi, ateş ve miyalji belirlenmiştir ([56,59,60]).

Risk faktörlerinin incelendiği bir meta analizde enfekte olan ve olmayan sağlık çalışanları karşılaştırıldığında kişisel koruyucu ekipmanın, işyeri ortamının, mesleğin ve maruz kalma şeklinin COVID-19 için risk faktörü oluşturacağı gösterilmiştir ([59]).

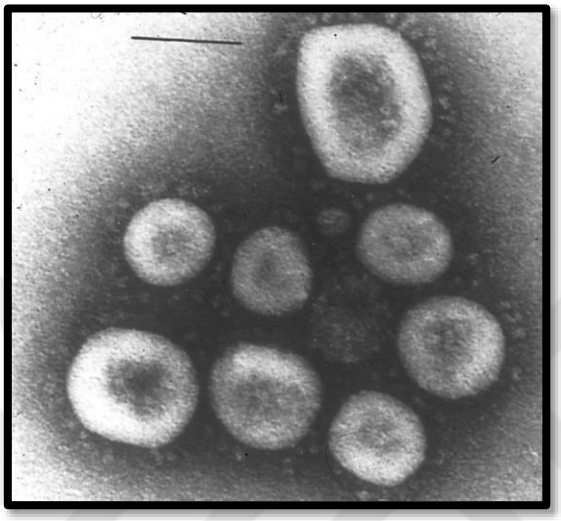
Sağlık çalışanları arasında solunum aerosolleri oluşturan girişimsel veya cerrahi prosedürler uygulayan, yoğun bakım ve cerrahi departmanlardaki doktor ve hemşirelerin daha yüksek riske sahip olduğu gösterilirmiş, uygun KKD kullanımının olmaması, sosyal mesafe kurallarına uyulmaması durumlarında ve genellikle acil veya COVID-19 dışı servislerde ya da klinik dışı servislerde çalışanlarda enfeksiyon oranlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ([65,61–64]). Çalışmalarda asemptomatik sağlık çalışanlarının yüksek sayıda olmasına dikkat çekilmiş, gizli bulaşları engellemek ve kısıtlı iş gücünü korumak için sağlık çalışanlarının rutin olarak test edilmesi önerilmiştir ([56,58]). Risk faktörleriyle ilgili en güçlü kanıtlar, KKD kullanımıyla enfeksiyon riskinin azaldığını desteklemektedir ([51,59,65]). Ayrıca Tafadzwa ve ark. yapmış olduğu meta analiz çalışmasında kadın sağlık çalışanlarının erkek meslektaşlarına göre %11 daha yüksek COVID-19 riski (RR 1.11 %95 GA 1.01-1.21) altında olduğu gösterilmiştir. Ancak kısıtlı veriyle desteklenen bu bilgi genel olarak kadın sağlık çalışanları oranının erkeklerinkinden çok daha yüksek olmasıyla açıklanmaktadır ([63]).

Sağlık çalışanları arasındaki SARS-CoV-2 enfeksiyonunu incelemek, virüsün hastane içinde veya hastane toplum arası bulaşını sınırlamak için etkili önleyici tedbirler almak, pandeminin kontrolünü sağlamak açısından kritik öneme sahiptir.

3. ETKEN- SARS-CoV-2

3.1. SARS-CoV-2 Köken ve Sınıflandırma

CoV'ler yüzeylerindeki glikoproteinler nedeniyle elektron mikroskobu altında (Şekil1) taç benzeri bir görünüme sahip 80-220 nm çapında tek sarmallı zarflı pozitif polariteli RNA virüsleridir ([66]).



Şekil 1. Koronavirüs elektron mikroskop görüntüsü ([67])

CoV'ler *Nidovirales* takımı, *Coronaviridae* ailesi, *Coronavirinae* alt ailesinde yer alırlar ve alfa, beta, gama, delta coronavirus olmak üzere 4 cinse ayrılmıştır. SARS-CoV-2, betacoronavirüs cinsi içinde Sarbecovirus alt cinsinde sınıflandırılır ([68])**.**

Tüm genom için yapılan filogenetik analizler, SARS-CoV-2'nin yarasalardan ve diğer memelilerden elde edilen izolatlar ile birlikte "Severe acute respiratory syndrome–related coronavirus" (SARSr CoV) grubunda kümelendiğini göstermiştir ([69,70]).

SARS-CoV-2'nin misk kedileri ve insanlardan alınan SARS-CoV'ler ile %76,7 - %77,0, yarasa koronavirüsleri ile %75-97,7 ve pangolin koronavirüsleri ile %90,7-92,6 amino asit (aa) dizisi benzerliği olduğu gösterilmiştir ([71]).

Güney Çin ve Güneydoğu Asya'daki konakçıların coğrafi dağılımları ve örneklendikleri konumlar birleştirildiğinde, at nalı yarasaların (Rhinolophus) SARS-CoV-2 'nin olası rezervuarı olduğu belirlenmiştir ([72]). Çalışmalarda saptanan en yakın akraba, Çin'in Yunnan eyaletinden Rhinolophus affinis'te tespit edilen ve tüm uzunluktaki genom dizisi SARS-CoV-2 ile %96,2 benzer olan 'RaTG13' adlı bir yarasa koronavirüsüdür ([71]). İlgili

başka bir koronavirüs, daha yakın zamanda Yunnan'da örneklenen bir Rhinolophus malayanus yarasasında bildirilmiştir. 'RmYN02' olarak adlandırılan bu yarasa virüsünün genomu SARS-CoV-2 ile %93,3 oranında benzerdir. Hatta 1ab geninde, SARS-CoV-2 ile RaTG13'ten bile daha yüksek (%97,2) benzerlik göstermiştir ([73]). RaTG13 ve RmYN02'ye haricinde daha önce tespit edilen yarasa koronavirüsleri ZC45 ve ZXC21'in de Sarbecovirus alt türünde SARS-CoV-2 ile benzer grup içerinde yer almıştır ([74]). Son çalışmalarda ise Yunnan'da tanımlanan iki yeni virüs olan RpYN06 ve PrC31'ün genomlarının bir kısmı RmYN02 ve SARS-CoV-2 ile yakından ilişkili bulunmuştur ([72,75,76]).

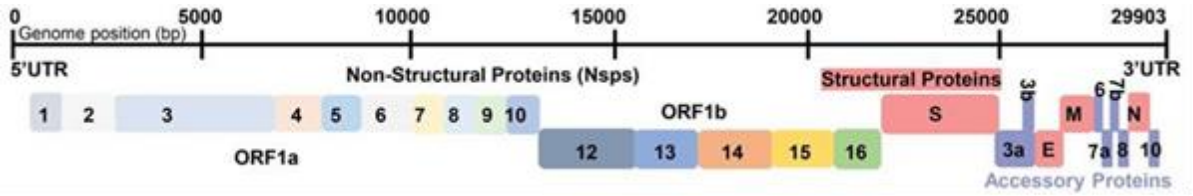
Filogenide yarasaların yanında pangolinlerin de SARS-CoV-2 ile bağlantılı diğer bir yabanıl hayvan olduğu düşünülmektedir. Özellikle Çin'de yasadışı olarak ithal edilen Malaya pangolinlerden izole edilen koronavirüs izolatlarının SARS-CoV-2 ile ~ %92 genom benzerliği ve SARS-CoV-2 ile yakın ilişkili bulunan diğer SARSr-CoV'lerin de pangolinlerden izolasyonu, olası konakçı olma ihtimallerini güçlendirir ([77]). Ancak, koronavirüsleri sağlıklı bir şekilde taşıyan yarasaların aksine, pangolinlerin enfekte olarak, çeşitli organlarda interstisyel pnömoni ve inflamatuar hücre infiltrasyonu dahil olmak üzere klinik belirtiler ve histopatolojik değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir ([78]). Bu anormallikler, pangolinlerin koronavirüslerin rezervuarı olma ihtimallerinin düşük olduğunu, ancak virüsleri doğal konakçılardan bulaştıktan sonra kapmış olma ihtimallerinin daha yüksek olduğunu gösterir.

3.1. SARS-CoV-2 Genom Yapısı

SARS-CoV-2, yaklaşık 30 kilobaz (kb) segmentsiz, zarflı, tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür ([32]). Her iki uçta iki kodlamayan bölge (UTR) ve yapısal olmayan proteinleri (NSP'ler), yardımcı proteinleri ve yapısal proteinleri kodlayan 14 fonksiyonel açık okuma çerçevesinden (ORF'ler) oluşur ([79,80]). Şekil 2 de genom yapısı gösterilmiştir.

ORF1ab, SARS-CoV-2 genomunun yaklaşık %67'sini oluşturur. Hücrede poliproteinlerin (1a, 1b) sentezini kodlar. Sentezden sonra, poliproteinler iki papain benzeri proteaz (PLpro) ve ana proteaz (Mpro)) tarafından 16 ayrı yapısal olmayan proteine (nsp1-16) parçalanır. Toplu olarak bunlar, replikasyon ve transkripsiyon komplekslerini (RTC) oluşturur ([81]).

Genomunun kalan %33 'ü ise, yapısal; *Spike* (S), zarf (E), zar (M), nükleokapsit (N) ve diğer yardımcı proteinleri (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10) kodalayan ORF'lerden oluşur ([82]).



Şekil 2. SASR-CoV-2 genom yapısı ([82]).

Yapısal olan ve olmayan proteinlerin fonksiyonları Tablo 4 ve 5 de özetlenmiştir.

Yapısal Olmayan Protein	Fonksiyon
1-3	Hücresel hasarda artış ve konakçı RNA'sının translasyonunu bloke ederek interferon sinyal inhibisyonu ve doğal bağışıklık yanıtının bloke edilmesi
2	Prohibitin1 ve prohibitin2'ye (PHB1- PHB2) bağlanır konak hücre hasarı
3-5	Sitokin ekspresyonunda artış ve Poliprotein işlenmesi
4-6	Hücre zarı ile etkileşim, çift zarlı vezikül (DMV) oluşumuna katkı
7- 8	Nsp12 ile kompleks oluşumu, RNA polimeraz aktivitesine katkı
9	Nükleik asit bağlayıcı protein
12	RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi
13	RNA 5 trifosfataz, RNA helikaz aktivitesi
14	Hata düzeltici N-terminal eksonükleaz (ExoN) aktivitesi
10-14-16	ExoN aktivitesi uyarıcı ve C-terminal guanin-N7 metil transferaz (N7-MTase) aktivitesi
15	Endoribonükleaz aktivitesi, konak immut yanıtından kaçış
16	S-adenozil metiyonin (SAM) bağımlı, 2'-O- metiltransferaz, doğal bağışıklıktan kaçış

Tablo 4. SARS-CoV-2 Yapısal olmayan proteinleri ([83,84])

Yapısal Protein	Fonksiyon
E	Viral parçaların birleştirilmesi, maturasyonu ve tomurcuklanmasında görevli, aynı zamanda konak hücre apoptozunu indükler
M	Bir zarf proteinidir ve viral morfogenezde yer alır
S	Hücre reseptörüne bağlanır, füzyonuna aracılık eder, nötraliz edici antikor yanıtını indükler
N	Viral genomik RNA'ya bağlanır, nükleokapsidi oluşturur

Tablo 5. SARS-CoV-2 Yapısal proteinleri ([83,84])

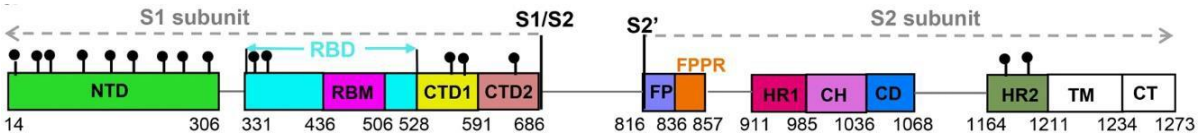
Aksesuar faktörlerin ise, bağışıklıktan kaçma ve viral replikasyon için gerekli ek işlevleri vardır. Örneğin, ORF3b, 6, 7a, 8 proteinlerinin, interferon (IFN) sinyal yolunu inhibe ederek doğal bağışıklık yanıtına müdahale ettiği rapor edilmiştir ([85]).

S proteini, virüse bağlanma ve giriş için en önemli yapıyı oluşturmaktadır. Ayrıca SARS-CoV-2 genomundaki amino asit değişikliklerine neden olan nükleotit değişiklikleri de sıklıkla (%57) bu bölgede ve ağırlıklı olarak (%38) reseptör bağlanma alanında (RBD) gerçekleşir ([86]).

S proteini S1(reseptör bağlayıcı fragman) ve S2 (füzyon fragmanı) olmak üzere iki alt birimden oluşur.S proteini alt birimleri şekil 3'te gösterilmiştir.

S1 alt birimi, bir N-terminal alan (NTD), bir RBD ve iki C-terminal alandan (CTD1 ve CTD2) oluşmaktadır. Nötralize edici antikorların belirgin hedefi olan RBD alanı, bir veya daha fazla türe özgü reseptör bağlama alt alanı/motifi (RBM'ler) içerir ve ACE-2 reseptörüne olan afinitesi çok yüksektir ([87]). Bu nedenle S1, virülans, bulaşıcılık ve immüniteden kaçış açısından yüksek klinik anlamlılığa sahip olabilen mutasyonlar için en önemli bölgedir.

S2 alt birimi, füzyon peptiti (FP) füzyon peptit yakın bölgesi (FPPR), heptad tekrar 1 (HR1), merkezi sarmal (CH), bağlayıcı alan (CD), heptad tekrar 2 (HR2), transmembran segmenti (TM), sitoplazmik kuyruk (CT) olarak bölünmüştür ([82]).



Şekil 3. SARS-CoV-2 *spike* proteini ([82])

Spike proteini, mutasyonların olduğu kadar monoklonal antikorlar (mAb'ler), aşılar ve diğer inhibitörler dahil olmak üzere birçok ajanın ana hedefidir.

3.3. Viral Replikasyon ve immunopatogenez

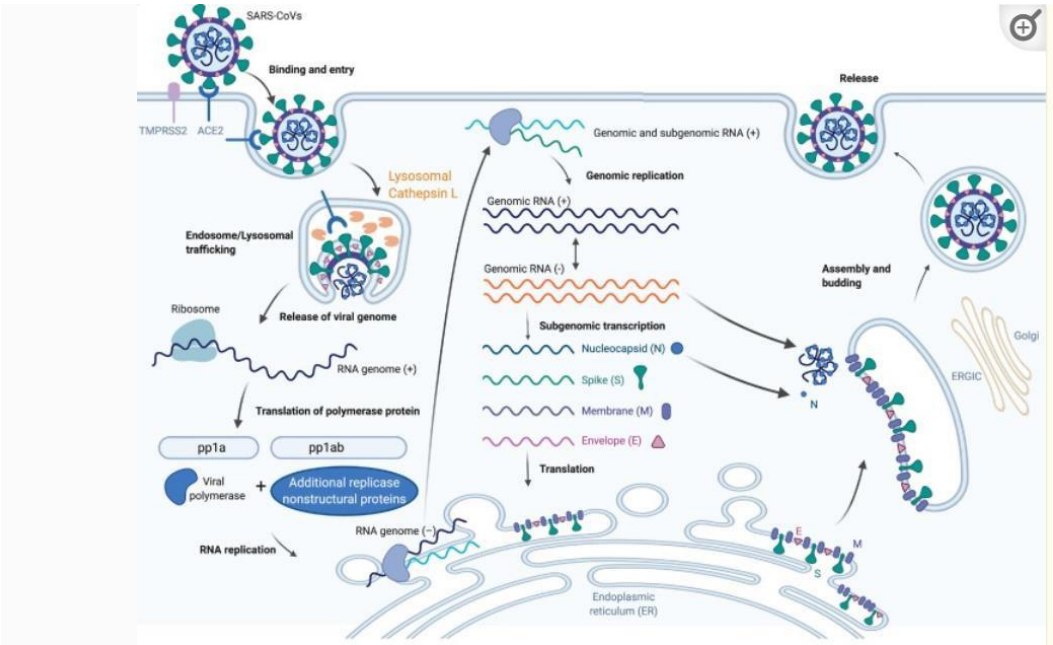
3.3.1. Viral Replikasyon

SARS-CoV-2 reseptör bağlanma alanı ile ACE-2 reseptör etkileşiminden sonra, S proteini, N-terminal S1 alt biriminde ve C-terminal S2 alt biriminde proteolitik bölünmeye uğrar. Bu kısmi proteoliz, transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) tarafından katalizlenir ve furin /furin benzeri proteazlar (örn. plazmin) ile katepsinler B/L tarafından aktive edilir. Böylece S2 alt ünitesini virüs ile konak hücre membran füzyonu için hazırlanır.

Füzyon sonrası hücre içinde serbest kalan SARS-CoV-2 RNA'sının ORF 1a 1b bölgesinden ilk olarak, poliprotein "pp1a ve pp1ab" sentezlenir. Bu poliproteinler 2 sistein proteaz (PLpro; Mpro) ile bölünerek 16 yapısal olmayan proteini oluşturur. Bu viral translasyonu viral RNA sentezi takip eder. Negatif (-) polariteli genomik RNA sentezlenir ve genomik pozitif (+) polariteli RNA'yı oluşturmak için kalıp olarak kullanılır. Viral RNA senteziyle hem genomik hem de yardımcı ve yapısal proteinleri kodlayan subgenomik RNA'lar üretilir.

Viral RNA ve N yapısal proteini sitoplazmada, S, M ve E proteini endoplazmik retikulumda (ER) transkripte edildikten sonra Golgi cisimciğine aktarılır. Olgun bir viriyon oluşturmak üzere, viral RNA ve proteinler ER-Golgi ara bölmesinde (ERGIC) birleştirilirler. Oluşturulan yeni virüs konakçı hücrelerden ekstraselüler alana ekzositoz ile salınır ([88]).

Viral replikasyon döngüsü şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. SARS-CoV-2 viral replikasyon döngüsü ([89])

3.3.2. İmmunopatogenez

SARS-CoV-2 hücreye girişte, SARS-CoV tarafından kullanılan mekanizmalara benzer şekilde, ACE-2 ile reseptör aracılı endositoz yolunu kullanır. Reseptör tanıma ve giriş, viral enfeksiyonun ilk adımıdır ve doku tropizminin temel belirleyicisidir. COVID-19'dan etkilenen ilk sistem solunum sistemidir, bunun yanında ACE-2 insan vücudunun çeşitli organ ve dokularında (solunum sistemi, kardiyovasküler sistem, endotel hücreleri, gastro intestinal sistem, böbrek vb) yoğun şekilde eksprese edilir ([90]). Bu da ekstrapulmer bulguların nedenini açıklar.

Asemptomatik ile ciddi klinik belirtilere kadar değişen çeşitli tablolarla karşımıza çıkan COVID-19 özellikle, ileri yaş, erkek cinsiyet, bazı ırklar (özellikle Siyahi, Hispanik ve Güney Asyalı) ve eşlik eden hastalıklar (hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler hastalık, kronik akciğer hastalığı, kronik böbrek hastalığı, kanser ve kronik karaciğer hastalığı) varlığında daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ([91–93]).

Girişte SARS-CoV-2 S proteini solunum yolları epitelindeki ACE-2 reseptörüyle etkileşir. Füzyon sonrası enfekte hücreye giren viral RNA, konakta sitozolik "RIG-I like" reseptörler (RLR'ler), hücre dışı ve endozomal "Toll-like" reseptörler (özellikle TLR3 ve TLR7) gibi kalıp tanıma reseptörleri (PRR), ile tanınır. PRR aktivasyonu sonrası, transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonu, kappa B (NFκB) ve interferon düzenleme fakötör 3 (IRF3) sinyal yolaklarının aktivasyonu ile doğal bağışıklığın uyarılmasına, sitokin sinyal kaskadının aktifleşmesine neden olur. Antiviral savunmada önemli tip I / III interferonların (IFN'ler) yanında diğer proinflamatuar sitokinlerden tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ve interlökin-1 (IL-1), IL-6 artışı görülür ([94]). Ayrıca alveolar epitel hücrelerinin ve makrofajların yüzeyinde bulunan farklı PRR'ler, hasarlı hücreden salınan çok sayıda patojenle ilişkili patern molekülünü (PAMP) ve hasarla ilişkili patern molekülünü (DAMP) tanıyarak fagositer hüclerin aktive olmasını sağlar ([95]). Bu süreçte TNF-α ve IL-1β, vasküler geçirgenlik artışına ve daha fazla nötrofil ile monositin inflamasyon alanına toplanmasına neden olur. Nötrofiller, serbest oksijen radikalleri, sitokinler, proteaz ve nötrofil hücre dışı tuzakları (NETs) üreterek patojenik inflamasyonun gelişiminde merkezi rol alır. Ayrıca IL-8 de nötrofil kemotaksisini arttırarak nötrofil aracılı doku hasarına katkıda bulunur ([96]).

NK hücreleri ise, virüsle enfekte hücrelerden salınan "stresle indüklenebilir ligandlar" ve "virüs kaynaklı proteinler" ile aktive olur, Fc reseptörleriyle enfeksiyon sırasında ortaya çıkan immunglobulin G1 (IgG1) ve IgG3 antikorlarıyla etkileşerek, ekstraselüler viryonlara ve enfekte hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan antijenlere bağlanarak "antikor aracılı hücresel sitotoksisite (antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC))" yolunu aktifler. Böylece sitokin üretimi ve enfekte hücrelerin lizisine katkı sağlar ([94]).

Oluşan bu inflamasyon sürecinde temel semptomlardan biri olan ateş prostaglandinler, TNFα, IL-1 ve IL-6 kaynaklıdır ([97]).

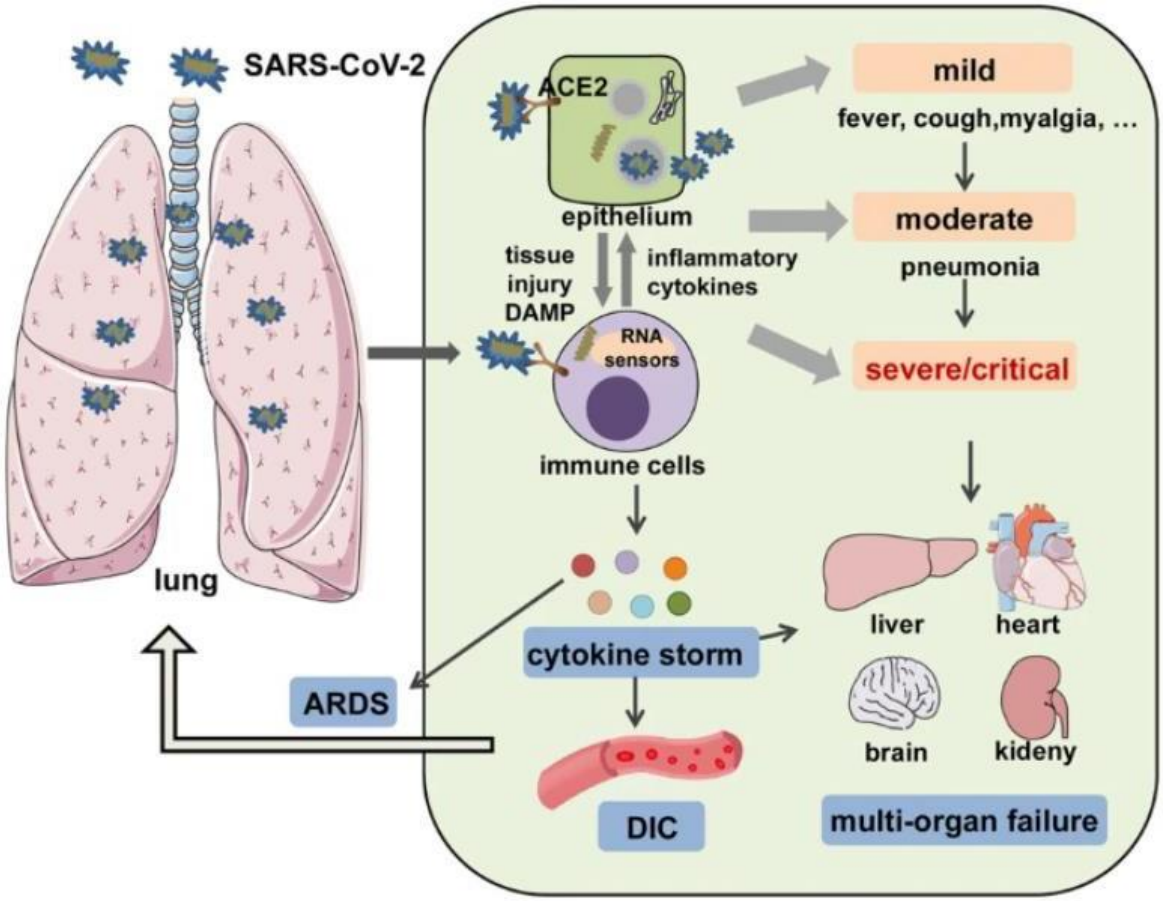
Akciğerlerdeki inflamasyon yaygın alveoler hasara, lenfosit baskınlığı ile interstisyel mononükleer inflamatuar infiltrasyona ve öksürük refleksini başlatan sinir uçlarını etkileyerek kuru öksürüğe neden olur. Salınan lökotrienlerin etkisiyle bronkokonstriksiyon, ventilasyonun bozulması ve ardından hipoksemi görülür ([98]).

ACE-2 reseptörünün virüs girişi sırasında hücre içerisine alınması ve parçalanması renin-anjiotensin-aldosteron sistemini (RAS) etkileyerek anjiotensin II artışına neden olur. RAS'deki bozulmayla birlikte aşırı sitokin salınımının vasküler dolaşımı bozması ve vasküler inflamasyonun tetiklenmesi, kardiyak aritmi, miyokardit, akut koroner sendrom ve kalp yetmezliği gibi ölümle sonuçlanan değişimlere neden olabilir ([99]). Ayrıca dolaşım bozukluğunun inflamatuvar bir tromboz kaskatını tetiklediği; makro ve mikrovasküler trombozların gelişimi sonrası, genel bir hiperkoagülabilite tablosunun geliştiği düşünülmektedir. Klinikte sıklıkla pulmoner emboli ile artmış D-dimer, fibrinojen, faktör VIII, "von Willebrand faktör" (vWF) ve azalmış antitrombin sonuçlarının birlikteliği görülür ([100]).

ACE-2 reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğu GİS'de ise karaciğer hasarı ile AST-ALT yükseklikleri dikkat çekerken ([101]), ileum ve kolondaki aşırı inflamasyon intestinal geçirgenlikte değişim ve enterositlerde malabsorpsiyon ile sonuçlanabilir ([102]).

Enfeksiyon sürecinde baş ağrısı, bilinç bozukluğu, nöbet, ensefalit, inme ve nöromuskuler bozukluklar gibi nörolojik tutulumu düşündüren çeşitli bulgular bildirilmiştir ([103]). IL-6 seviyesi artışı ile glial hücrelerin aktive olması ([104]), kan beyin bariyerinin hasarı, enterik sinir sistemi ve sempatik afferent nöronlar aracılığıyla nöronal invazyonun gerçekleşmesi ([105]), nöronal hasarı tetikleyen çeşitli mekanizmalardır.

Özellikle hastalığı şiddetli olarak geçirenlerde, yüksek miktarda proinflamatuar sitokin ve kemokin (IL-2, IL-7, IL-10, Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (GCSF), IFNγ-indükleyici protein-10 (IP-10), Monosit Kemotaktik Proteini (MCP-1), makrofaj inflamatuvar protein (MIP-1α), TNF,CXC motif kemokin ligand 10 (CXCL10) ve CCL2 gibi) salgılanmasıyla sitokin fırtınası denilen kontrolsüz sistemik inflamatuar yanıtın gelişmesinin ARDS, çoklu organ yetmezliği ve ölüm ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir ([106–108]). İmmünopatogenez şekil 5 özetlenmiştir.



Şekil 5. SARS-CoV-2 immünopatogenez ([109])

3.4. SARS-CoV-2 Bulaş Yolları ve Klinik

SARS-CoV-2 incelendiğinde, SARS-CoV veya MERS-CoV'den önemli ölçüde daha az öldürücü olduğu, ancak çok daha kolay ve daha hızlı bulaştığı gösterilmiştir ([38]). İnsandan insana bulaştığının ilk kanıtı Chan ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır ([40]).

Bulaşın genellikle, enfekte olmuş bir kişiyle yakın temasla, damlacık yoluyla, hava yoluyla, enfekte vücut sıvılarıyla temasla ve daha az yaygın olarak kontamine yüzeylerden olabileceği gösterilmiştir ([110,111]). Ayrıca SARS-CoV-2 RNA, COVID-19 hastalarının, idrarında ve tam kanında tespit edilmiştir, ancak bu tür materyalin bulaşmada rol oynayıp oynamadığı netlik kazanmamıştır ([112]).

Semptomların genellikle 1-14 günlük (ortalama 5 gün) kuluçka süresi sonrasında geliştiği görülür ([113,114]). Ancak COVID-19'u diğer viral solunum yolu enfeksiyonlarından güvenilir bir şekilde ayırt edebilecek spesifik klinik semptomlar yoktur. Hastalarda sıklıkla ateş, öksürük, kas ağrısı yorgunluk saptanırken boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı/akıntısı, bulantı, kusma ve ishal diğer sık bildirilen semptomlar arasındadır ([115,116]). Ek olarak pozitif SARS-CoV-2 testi ile en güçlü şekilde ilişkili semptomların tat ve koku kaybı olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur ([117,118]). Semptomların başlamasından kısa süre sonra nefes darlığı gelişmesi de COVID-19'u kuvvetli düşündüren belirtiler arasındadır ([119]).

Akciğer girişte birincil hedef organ olmasına rağmen kardiyovasküler sistem, beyin, böbrek, karaciğer ve bağışıklık sistemleri de enfeksiyondan etkilenebilir. COVID-19'un klinik belirtileri, temel bağışıklığa ve virüs tipine bağlı olarak hafif ile şiddetli arasında değişebilir. Ciddi hastalığın belirleyicisi olarak alt solunum yollarının tutulumu ve hematojen yayılım gösterilmektedir ([120,121]). Hastaların bir kısmında pnömoni, böbrek yetmezliği görülebilirken, ciddi vakalar da şiddetli akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), çoklu organ yetmezliği (MOF), hatta ölüm görülebilir ([122,123]).

Lenfopeni, eozinopeni, trombopeni, artmış D-dimer, laktat dehidrojenaz, C-reaktif protein, troponinler ile düşük çinko seviyeleri hastalığın şiddeti ile ilişkili biyokimyasal belirteçlerdir ([124]). Asemptomatik klinik ve spesifik olmayan klinik belirtilerinin çeşitliliği, hastalığın tanımlanması ve izlenmesini zorlaştırmakta, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek tanı testlerine olan ihtiyacın gerekliliğini göstermektedir.

3.5. SARS-CoV-2 Varyantları

Virüsler doğası gereği viral replikasyonlardan kaynaklanan mutasyonlarla sürekli değişir. Orijinal virüsten farklı bir veya daha fazla mutasyona sahip virüse varyant virüs denmektedir. Bu değişiklikler RNA virüslerinde DNA virüslerinden daha yüksek oranda meydana gelmektedir ([125]). Ancak diğer koronavirüslara benzer olarak SARS-CoV-2'de nükleotid değişikliklerinin meydana gelme hızı daha düşüktür. Çünkü nsp14 kısmen, "proofreading-hata düzeltici" etkiye sahip 3'-5' eksoribonükleaz (ExoN) aktivitesine sahiptir ([126,127]).

Çoğu mutasyonun önemli bir etkisi olmamasına rağmen, SARS-CoV-2 virüsünün yeni yüksek riskli varyantlarına yol açan bulaşma ve bağışıklıktan kaçma açısından avantaj sağlayan bazı genomik değişiklikleri tanımlanmıştır ([128]). *Spike* proteini üzerindeki D614G mutasyonu, pandeminin başlangıcından bu yana saptanan ilk büyük mutasyon olmuştur. Bu değişim gelişmiş enfektivite ve daha kolay ACE-2 reseptör bağlanmasıyla karakterizedir ([129]). Daha sonra ise çok sayıda mutasyon ve varyant tanımlanmaya başlamıştır. Bu varyantlarının isimlendirilmesinde oluşacak karışıklığın önlenmesi ve standart hale getirilmesi için DSÖ Virüs Evrimi Çalışma Grubu, Yunan alfabesi kullanılarak adlandırma yapılmasını önermiştir ([130]). 2020'nin sonlarında ise DSÖ, yeni SARS-CoV-2 varyatlarını dikkate alınması gerekenler (VOI'ler) ve endişe uyandıran varyantlar (VOC'ler) olarak sınıflandırmıştır ([131]).
VOI grubunda genel olarak, reseptör bağlanmasında değişikliklere, tedavilerin etkinliğinin azalmasına, antikorlar tarafından nötralizasyonun azalmasına ve hastalık şiddetinde ve/veya bulaşta potansiyel bir artışa neden olan mutasyonlara sahip varyantlar yer alırken, VOC grubunda, bulaşıcılıkta ve hastalık şiddetinde daha büyük bir artış, üretilen antikorlar tarafından nötralizasyonda kayda değer bir azalma ve dolayısıyla tedavilere ve aşılara yanıtta azalma olduğuna dair güçlü kanıtların bulunduğu varyantlar yer alır ([138]).

İlk olarak Aralık 2020'nin ortalarında, UK'da yeni bir varyant tanımlanmıştır. VOC soyu B.1.1.7 (alfa) olarak belirlenmiştir. Yeni mutasyonların neredeyse yarısı, proteinin temel epitoplarını etkileyen Δ69-70, N501Y ve P681H mutasyonları da dahil olmak üzere *spike* proteinde bulunmuştur ([132,133]). Alfa suşunun tanımlanmasından kısa bir süre sonra, çok sayıda mutasyona sahip diğer potansiyel olarak tehlikeli soylar Güney Afrika'da (B.1.351; beta), Brezilya'da (B.1.1.28.1/P.1; gama) ve Hindistanda (B.1.617.2; delta) gözlemlenmiştir ([134–136]). Son olarak ise tüm dünyayı etkisi altına alan Omicron (B.1.1.529) endişe verici varyantlar içinde değerlendirilmiştir. Geçmişten günümüze endişe verici varyantlar tablo 6'da özetlenmiştir.

Geçmişte Beta ve Gama varyantları, aşıdan ve doğal bağışıklıktan daha iyi bir kaçış başarısı göstermesine rağmen, Delta'nın daha hızlı ve kolay bulaşabilir olması, adaptif bağışıklıktan kaçma yeteneğiyle de birleşerek baskın varyant haline gelmesini sağlamıştır. Kasım 2021'den bu yana ise, dünya çapında hızla yayılan Omicron baskın varyant haline gelmiştir ([137]).

DSÖ İsimlendirme	PANGO Lineage	GISAID Clade	Nextrain	İlk Tespit Edilen Ülke	Belirlenme Tarihi
Alfa	B.1.1.7	GRY	20I (V1)	Birleşik Krallık	VOC: 18 Aralık 2020 9 Mart 2022
Beta	B.1.351	GH/501Y.V2	20H (V2)	Güney Afrika	VOC: 18 Aralık 2020 9 Mart 2022
Gama	P.1	GR/501Y.V3	20J (V3)	Brezilya	VOC: 11 Ocak 2021 9 Mart 2022
Delta	B.1.617.2	G/478K.V1	21A, 21I, 21J	Hindistan	VOC: 11 Mayıs 2021 7 Haziran 2022
Omicron*	B.1.1.529	GR/484A	21K, 21L, 21M,22A, 22B, 22C, 22D	Birçok ülke	VOC: 26 Kasım 2021

*BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 soylarını da içerir

Tablo 6. Geçmişten günümüze endişe verici varyantlar ([138])

Ortaya çıkan SARS-CoV-2 VOC'lar, *spike* proteininde hem ortak hem spesifik değişiklikler gösterirler. Virülansı ve bağışıklıktan kaçmayı destekleyen dört ana RBD amino asit değişikliği vardır ([139,140]).

1. N501Y: Alfa, Beta, Gamma ve Omicron varyantlarında
2. E484K/Q/A: Beta, Gamma ve Omicron varyantlarında
3. K417T/N: Beta, Gamma ve Omicron varyantlarında
4. L452R: Delta varyantında mevcuttur

Ek olarak, Omicron varyantı, S proteininde çok sayıda (>30) ve nsp12 ve nsp14 proteinlerinde de yeni mutasyonlara sahiptir.

Varyantların *spike* protein mutasyonları tablo 7 de özetlenmiştir.

Varyant	Anahtar *Spike* Protein Mutasyonları
Alfa	H69-, V70-, Y144-, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
Beta	D80A, D215G, L241-, L242-, A243-, K417T, E484K, N501Y, D614G, A701V
Gama	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F
Delta	T19R, G142D, E156-, F157-, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N
Omicron	A67V, H69-, V70-, T95I, G142-, V143-, Y144-, Y145D, N211-, L212I, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F

Tablo 7. Anahtar *spike* protein mutasyonları ([141])

Günümüzde Omicron varyantının *spike* proteininde çok sayıdaki mutasyonun FDA onaylı monoklonal antikor tedavilerinden kaçışa ve aşı ile indüklenen nötralize edici titrelerde önemli azalışa yol açtığı gösterilmiştir ([142-144]). Bunlara rağmen aşılanmış ve/veya önceden enfekte olmuş kişilerde hücresel bağışıklığın, Omicron suşuna karşı aktivitesini koruması ([145]), IFN sinyal yolunu diğer varyantlar kadar iyi antagonize edememesi ([146]) ve hayvan çalışmalarında, akciğer dokusunda daha az şiddetli inflamasyona neden olarak daha çok üst solunum epitelini tercih ettiğinin ([147,148]) gösterilmesi sağkalım üzerine avantaj sağlamaktadır.

Olası yeni ve klinik olarak önemli nükleotid varyasyonlarının, yüksek oranda mutasyona uğramış suşların yerel ve küresel aktif takibi önemlidir. Günümüzde bu amaçla GISAID, Nextstrain veya PANGO (Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak) sistemleri araştırmacılar tarafından kullanılmaktadır.

Takip sırasında olası yeni bir varyant artışının tespiti, beraberinde hızla yeni aşı ve monoklonal antikorlar (mAb) gibi bağışıklama ve tedavi stratejilerinin gelişimini sağlayarak, etkili şekilde hastalık kontrolüne olanak tanır.

4. COVID-19 TANISAL YAKLAŞIM

Küreselleşmenin hızlanmasıyla ortaya çıkan bulaşıcı hastalıkların dünya çapında hızla yayılması kaçınılmaz bir sonuçtur. COVID-19'un erken tanısı ve izolasyon, enfeksiyonun yayılmasını etkili bir şekilde kontrol etmede ve insanları mümkün olan en kısa sürede normal yaşam düzenlerine döndürmede en önemli yol olmuştur. Ayrıca tanı testleri, sağlık hizmetleri ortamında sağlık çalışanlarının işlerine dönüşü ve hastaların COVID-19 ünitesine transferi gibi ciddi kararlara da aracılık etmektedir.

Numune toplama prosedürü ve test tekniği ile ilgili birçok faktör laboratuvar tanı yöntemlerinin duyarlılığını etkiler. Hatalar, yalancı negatif sonuçlar enfeksiyonun yayılmasına neden olarak toplumu riske atar. Bu nedenle, karakteristik klinik tabloya sahip bir hastada negatif test sonucu, COVID-19 olasılığını dışlamaz.

COVID-19 tanısı, klinik ve epidemiyolojik öykü, laboratuvar tanı testleri ve enfeksiyon ve/veya komplikasyonları saptamaya yardımcı olan görüntüleme yöntemlerinin birlikte kullanımına dayanmalıdır.

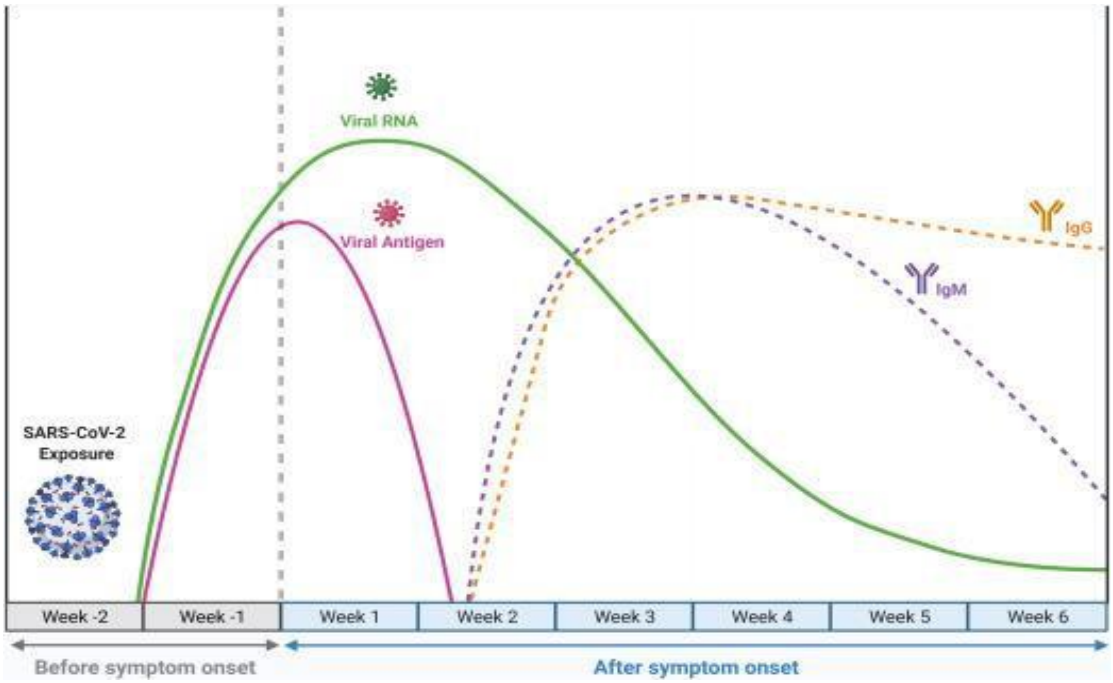
4.1. Laboratuvar Tanı

Gelişen moleküler teknolojiler ile salgının hemen başında SARS-CoV-2'nin tüm genom dizisi hızla tespit edilmiştir (GenBank:MN908947.3 [38]). Birinci basamak tanı yöntemi olarak da ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR) önerilmiştir.

Günümüzde SARS-CoV-2 genom dizi analizi verilerine dayalı olarak geliştirilen çok sayıda teste Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (US-FDA) tarafından, acil kullanım onayı (EUA) verilmiştir ([149]) (EKIM 2022). Ancak mevcut COVID-19 aşı uygulamalarına rağmen sürekli olarak farklı varyantların ortaya çıkması tanı yöntemlerinin güncelliğini korumasını zorlaştırmakta, diğer yandan testlere duyulan gereksinimin devam edeceğini de göstermektedir. Bu nedenle duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, kolay uygulanabilir, daha az maliyetli testler geliştirilmeye devam edilmektedir.

Akut enfeksiyon belirteçleri olarak viral RNA'nın (moleküler tabanlı test yoluyla) ve/veya solunum örneklerinde antijenlerin saptanması anlamlı kabul edilirken, SARS- CoV-2 immünoglobulinleri, ancak semptom başlangıcından 2 veya daha fazla hafta sonrasında

güvenle saptanabilir. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda spesifik virolojik ve serolojik biyobelirteçlerin enfeksiyonun zamanı ile olan ilişkisi şekil 6 da gösterilmiştir.



Şekil 6. COVID-19 enfeksiyonunda virolojik ve serolojik biyobelirteçler ([150])

Biyobelirteçler temel olarak aşağıda yöntemlerle saptanabilir.

1. Viral genomu saptayan nükleik asit amplifikasyon temelli yöntemler (RT- PCR, dizileme, izotermal amplifikasyon vb.)

2. Viral antijen ya da bağışıklık sistemi yanıtının göstergesi antikorları saptayabilen serolojik temelli (ELISA, CLIA, LFIA vb.) yöntemler

Enfeksiyon kontrol önlemleri ve halk sağlığıyla ilgili etkin kararlar alabilmek için farklı yöntemler ön plana çıkmaktadır. Seçimi belirleyen ana unsurlar; kaynak gücü, eğitimli personel varlığı, uygun şekilde donatılmış tanı laboratuvarları ve sağlık sisteminin altyapısı gibi özelliklerdir.

4.1.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Temelli Yöntemler

SARS-CoV-2 RNA, enfekte kişilerde tanımlanan ilk viral belirteçtir. ([151]) Kanıtlar, SARS-CoV-2 RNA'sının insanlarda semptomların başlangıcından 1-3 gün önce solunum yollarında tespit edilebileceğini, en yüksek viral yükün semptomların ilk haftası içinde saptandığını, ardından 2 ila 3 hafta içerisinde kademeli bir düşüş izlediğini göstermektedir ([152–154]). Bununla birlikte, viral RNA özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde klinik enfeksiyon düzelmesine rağmen aylarca saptanabilir seviyelerde kalabilir ([86,155]).

Viral RNA saptamada kullanılan en yaygın standart yöntem ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PCR) dir. Ayrıca damlacık esaslı dijital PCR (ddPCR), yeni nesil dizileme (NGS), izotermal amplifikasyon yöntemleri veya yeni geliştirilen düzenli aralıklı bölünmüş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) /Cas tabanlı yöntemler de COVID-19 tanısında kullanılabilmektedir.

4.1.1.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR)

Akut SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısında standart olarak önerilen RT-PCR ile viral genomun saptanmasıdır ([156]). Günümüzde sıklıkla amplikon konsantrasyonundaki değişiklikleri gerçek zamanlı olarak saptayabilen *real time* RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. Yöntem ile belirlenen döngü eşik değerleri (Ct), bir numunede bulunan viral RNA miktarıyla ters orantılıdır ve viral yükün tahmini belirteci olarak kullanılabilir ([155]). RT-PCR pozitiflik süresi genellikle asemptomatik kişilerde 1-2 hafta, hafif-orta hastalığı olanlarda ise 3 hafta veya daha uzun olabilmektedir ([158-160]). Şiddetli COVID-19 hastalığı olan hastalarda ise bu süre uzayabilir ([161]).

SARS-CoV-2 RNA'sının, çeşitli vücut sıvılarında ve dokularda (oküler sıvı, idrar, BOS, beyin dokusu vb.) saptanabildiği gösterilmiştir ([161–164]). Akut enfeksiyon tanısı için en sık solunum sistemi materyalleri tercih edilmektedir. Üst solunum yollarından nasal sürüntü, orofaringeal sürüntü, nazofaringeal sürüntü (NPS), nazofaringeal aspirasyon ve tükürük örnekleri kullanılabilirken, alt solunum yollarından balgam, trakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj (BAL), plevral sıvı veya akciğer biyopsisi örnekleri kullanılabilir ([165]). Ayrıca dışkı örneklerinde yüksek insidans ile uzun süre viral saçılımın devam ettiği gösterilmiştir ([166]).

Enfeksiyonun erken evrelerinde nazofaringeal/orofaringeal sürüntü örneklerinde yüksek viral yük saptanırken zaman ilerledikçe alt solunum yolu (BAL, trakeal aspirat, balgam) örneklerinde duyarlılığın arttığı gösterilmiştir ([167,168]). Diğer numune türlerinden tükrüğün, nazofaringeal sürüntüyle duyarlılığı karşılaştırıldığında karışık sonuçlar (azalmış, eşdeğer, yüksek) saptanmış olsa da kendi kendine toplanabilmesi ve kolay işlem prosedürü nedeniyle ön plana çıkmaktadır ([169]). Özellikle kişisel koruyucu ekipman ve kaynakların yetersiz olduğu ortamlarda, birinci basamak tarama için yararlı bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

SARS-CoV-2 tespitinde RT-PCR da çeşitli hedef gen bölgeleri (RdRp ORF1ab, E, N, S ve M) kullanılabilir ([170,171]). Bazı çalışmalarda N genini hedefleyen testlerin analitik duyarlılığın diğerlerinden daha kötü olduğu gösterilmiştir ([172,173]). Viral mutasyonlar ve hedef genlerin özgüllük sorunları yöntemlerin doğruluğunu potansiyel olarak değiştirebilir ([174,175]). Örneğin günümüzde Alfa ve Omicron varyantlarının çoğu S gen hedefli RT-PCR'larda negatiflik saptanabilirken, daha korunmuş bölgeler olan ORF1 ve N geni hedefli testlerde daha iyi sonuçlar elde edilmiştir ([176–178]).

RT-PCR testlerinin önemli sorunlarından biri de örneğin alım zamanına, numune çeşidine, alış tekniğine ve işlem prosedürüne bağlı olarak karşımıza çıkan yalancı negatifliklerdir ([179,180]). Çok hedef bölgeli yaklaşımlar (multipleks PCR) kullanılarak test performansını iyileştirmek ve olası hataları azaltmak mümkündür. Multipleks PCR yöntemini kullanan ve birden fazla viral ve bakteriyolojik etkenin aynı anda tespitini sağlayan sendromik paneller, özel hasta gruplarında kısa sürede etkenin belirlenmesini, doğru tedavi yaklaşımının ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin kullanılmasını sağlayabilmektedir ([181]).

Tüm PCR temelli testlerde dikkat edilecek diğer bir nokta, elde edilen pozitif sonuçların virüs canlılığı veya enfektivitesi ile doğrudan ilişkili olmaması, bu nedenle her zaman bulaştırıcılığı göstermemesidir ([182]). SARS-CoV-2'nin canlılığı ve bunun sonucunda ortaya çıkan enfektiviteyi, kültür vb. yöntemler ile doğrudan ya da dolaylı olarak test etmek gerekir ([153]).

4.1.1.2. Yeni Nesil Dizileme (NGS)

NGS dizileme teknolojileri, metagenomik yaklaşım ile yeni virüslerin tanımlanması, tüm veya tüme yakın viral genom dizilerinin eldesi ve viral evrimin analizi gibi virolojideki çeşitli amaçlar için tercih edilmektedir ([183,184]). NGS tabanlı yaklaşımların avantajlarından biri, tam uzunluktaki viral genomların, kültürle zenginleştirilmiş izolatlardan veya doğrudan klinik örneklerden elde edilebilmesi, bilinmeyen veya iyi tanımlanamamış virüslerle dahi çalışabilme imkânı sağlamasıdır.

COVID-19'un etiyolojik ajanı olan SARS-CoV-2'nin ilk tüm genomik dizileri, PCR ve Sanger dizilimi ile desteklenen metatranskriptomik yaklaşımlarla Aralık 2019'un sonlarında elde edilmiştir ([38]). NGS teknolojileri, COVID-19 tanısı yanı sıra SARS-CoV-2 varyantlarının tespit edilmesine ve bu sayede etkili önlemlerin alınmasına, aşı çalışmalarına ve tedavi yaklaşımlarına da katkı sağlamaktadır. Bu amaçla hem ikinci hem de üçüncü nesil NGS teknolojileri başarıyla uygulanmış ve farklı üreticiler tarafından birçok özel dizileme protokolü geliştirilmiştir ([185–188]). Kasım 2022 itibariyle çeşitli yöntemlerle elde edilen milyonlarca SARS-CoV-2 genomu, GISAID, GenBank ve Çin Ulusal Genbank Veri tabanı (CNGBdb) gibi farklı platformlarda yayınlanmaktadır.

Bununla birlikte NGS platformları, daha yüksek maliyetler, ekipmanlar ve uzmanlıklar gerektirmesi nedeniyle pratik uygulamada henüz yaygınlaşmamıştır.

4.1.1.3. Damlacık Esaslı Dijital PCR

Damlacık esaslı dijital PCR (ddPCR) teknolojisi ilk olarak Saiki ve ark. tarafından geliştirilmiştir (1988) ([189]). Kısaca tanımlanacak olursa, amplifikasyon öncesi örnek binlerce - milyonlarca bölüme/damlacığa ayrılır. Daha sonra primer veya primer / prob seti kullanılarak Taq polimeraz ile amplifikasyon gerçekleştirilir. Standart PCR yönteminden farklı olarak toplu tek bir amplifikasyon yerine binlerce reaksiyon gerçekleşir, böylece hem inhibitörlerin etkisi azalır hem de karmaşık arka planda düşük viral yükün tespit edilebilme duyarlılığı artar ([190]).

SARS-CoV-2 virüsünü saptamada ddPCR, yüksek analitik duyarlılık sağlayarak ([191,192]) preanalitik veya teknik nedenlerle RT-PCR'da yalancı negatif sonuç veren düşük viral yüke sahip numuneler için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. Ayrıca varyantlardaki düşük frekanslarda bulunan mutasyonlar da ddPCR ile tespit edebilmektedir

([193,194]). Ancak günümüzde yüksek maliyet ve uzun çalışma süreleri nedeniyle laboratuvarlarda rutin kullanıma uygun değildir ([195]). Gelecekte yeni mutasyon bölgeleri belirlendikten sonraki taramalarda, şu an altın standart olan dizileme yöntemlerine bir alternatif olabilir.

4.1.1.4. İzotermal Amplifikasyon Tabanlı Yöntemler

Belirlenmiş sabit bir ısıda amplifikasyonun yapıldığı izotermal amplifikasyon metotları, kullanılan enzim, primer, hedef nükleik asit ya da ürüne göre çeşitlendirilmiştir. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) ve rekombinaz polimeraz amplifikasyon (RPA) bunlardan bazılarıdır ([196]).

Özellikle LAMP, SARS-CoV-2 tanısında, geleneksel RT-PCR tabanlı tanıya güvenilir bir alternatif olarak kabul edilen, hızlı ve daha ucuz bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, bu teknik eş zamanlı çok sayıda bölgeyi tanımlamak için yaklaşık 6-8 spesifik primer dizisi kullandığından oldukça spesifiktir. SYBR Green gibi boyalar ile kolorimetrik olarak görselleştirilebilir. Ayrıca, LAMP, taşınabilir cihazlara uyarlanma potansiyeline sahip olması nedeniyle avantajlıdır ([196,197]).

Benzer olarak SARS-CoV-2 tespiti için rekombinaz-primer komplekslerini kullanıldığı RT-RPA işlemi, düşük inkübasyon sıcaklığı ve kısa süresi nedeniyle, hasta başı (point-of- care) test olarak RT-PCR ve LAMP'a tercih edilebilir ([196]).

Tanımlanan yöntemlerin RT-PCR ile korelasyonunu değerlendiren bazı çalışmalar tablo 8'de gösterilmiştir. Alt yapı eksiği olan yerlerde hızlı tarama için RT-PCR'a alternatif oluşturabilirler.

Test	Hedeflenen Gen	Tespit Sınırı	Referanslar
LAMP	N	60 kopya/µL	Deng ve ark., 2021
TMA	N	5.5 kopya/µL	Gorzalski ve ark. 2020
RT-RAA	ORF1ab	0,04 kopya/µL	Wang ve ark., 2020d
MCDA	N	100 kopya/µL	Lu ve ark., 2021
RPA	N ve S	0,05 kopya/µL	Xia ve Chen, 2020

Tablo 8. SARS-CoV-2 saptanmasında çeşitli izotermal amplifikasyon yöntemleri ([198])

4.1.1.5. CRISPR/Cas Tabanlı Yöntemler

2002 yılında, Jansen ve ark. tarafından "düzenli aralıklarla dizilmiş kısa palindromik tekrarlar", CRISPR, terimi ilk kez tanımlanmıştır. CRISPR, farklı Cas proteinleri (Cas 9, Cas 12, Cas 13 ve Cas 14) ile belirli koşullar altında spesifik DNA/RNA dizilerini tanımlayabilen yeni bir teknolojidir ([199]). Testin prensibi hastadan alınan örnekte viral RNA'nın izolasyonu sonrası uygun primerler kullanılarak amplifikasyon ile hedef gen bölgelerinin çoğaltılması, daha sonra seçilen uygun efektör Cas proteini ve hedef gen bölgesine komplementer rehber RNA ile amplifikasyon ürününün bir araya getirilerek sonucun test stripleri üzerinde değerlendirilmesine dayanır ([200]).

Daha önce Zika ve Deng virüs gibi çeşitli etkenlerin tanımlanmasında ([201]) kullanılan yöntem SARS-CoV-2 tespitinde de yüksek duyarlılık ve özgüllük göstererek başarıyla test edilmiştir ([202,203]). Örneğin Hou ve arkadaşları ([204]) tarafından geliştirilen CRISPR-COVID yönteminin saptama sınırı mikrolitre başına 3 kopyadan daha düşüktür. Yöntemin klinik duyarlılığı, RT-PCR ve metagenomik yeni nesil dizileme (mNGS) kullanılarak test edilmiş ve %100 olarak saptanmıştır. Ayrıca testin $0.7/örnek gibi az bir maliyeti olacağı tahmin edildiğinden gelecekte RT-PCR'a göre daha maliyet etkin kullanılacağı düşünülmektedir.

CRISPR–CasN tabanlı testler, başarılı çalışma sonuçlarına rağmen henüz rutin kullanıma adapte edilememiştir ancak gelecekte yeni teknolojilerle beraber kullanılarak SARS-CoV-2 de olduğu gibi birçok hastalık için büyük umut vadetmektedir.

4.1.2. Serolojik Yöntemler

COVID-19 teşhisi için serolojik yöntemler temelde iki gruba ayrılır. İnsanların virüse maruz kalıp kalmadığını gösteren SARS-CoV-2'ye özgü serum antikorlarını tespit eden yöntemler ya da doğrudan SARS CoV-2'ye özgü antijen varlığının gösteren yöntemler.

4.1.2.1. Antikor testleri

Antikor tespitine dayalı serolojik testler, temas izlemi, önceki enfeksiyon ve bağışıklığın tespiti, salgının retrospektif değerlendirilmesi, plazma donör taramaları ve aşılama etkinliğini değerlendirmek için kullanılabilir ([205]). SARS-CoV-2'ye özgü antikorlar enfeksiyonun pencere döneminden sonra oluştuğu için bu testler COVID-19'un erken teşhisi için uygun değildir. RT-PCR ile kombine edilerek, COVID-19 teşhisinde yardımcı /tamamlayıcı testler olarak kullanılmaları önerilir ([156,205]).

Tam kan, parmak ucu kanı, serum, plazma veya tükürük örnekleri kullanılarak yüksek antijenik yapıları nedeniyle virüsün *spike* proteinine (S), reseptör bağlanma bölgesine (RBD) veya nükleokapsid proteinine (N), karşı oluşan IgG-IgM-IgA antikorları tespit edilebilmektedir ([149,156]).

SARS-CoV-2 de antikor dinamikleri incelendiğinde IgM ve IgG antikorlarının enfeksiyondan hemen sonra benzer zamanlarda geliştiği tespit edilmiştir. IgM antikorları, semptom başlangıcından yaklaşık 2 hafta sonra pik yapar, daha sonra zamanla azalarak, tanısal olarak önemsiz seviyelere düşerken, IgG antikorları stabilitesini korur, iyileşmeden sonra, geçirilmiş enfeksiyonun kanıtı olarak uzun süre düşük seviyelerde kalabilir ([206]). IgA yanıtları ise enfeksiyondan 4 ila 10 gün sonra ortaya çıkar ve IgG ve IgM'nin yanısıra tanı belirteci olarak kullanılabilir ([207,208]).

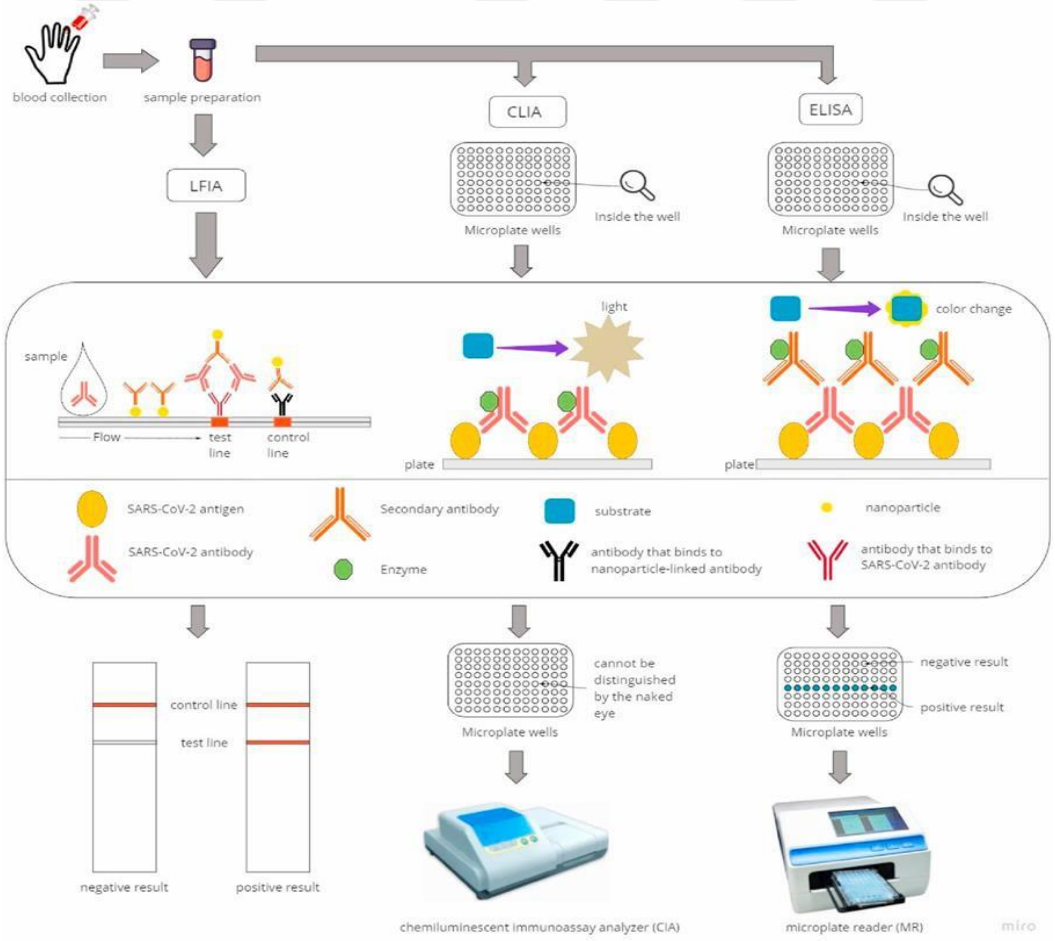
Viral klirensi takip eden haftalarda, semptomların başlamasından 7 ila 14 gün sonra kalıcı antikor titreleri ile COVID-19 hastalarında serokonversiyon meydana geldiğini göstermiştir ([209,210]). COVID-19 hastalığını ağır geçirenlerde bu antikorların seviyeleri daha yüksek saptanırken, hafif /asemptomatik geçirenlerde daha düşük seviyelerde geliştiği hatta saptanabilirlik seviyesinin altında kalabileceği bildirilmiştir ([211-213]).

SARS-CoV-2 tanısında antikor testlerinde karşılaşılan önemli bir sorun, diğer CoV ile veya otoantikorlarla çapraz reaksiyon verebilmesidir ([214]). Genel olarak antikor saptama testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü, test tekniğine, çalışılan antikorun özgüllüğüne, semptomların

başlangıç süresine ve bireyin bağışıklık yeterliliğine göre değişir ([215]). Çalışmalarda IgG tespitinin, diğer antikorlara (IgM-IgA) göre ya da kombine testlerin (IgG+IgM) tekli testlere göre daha güvenilir olduğu gösterilmiştir ([173,216]).

SARS-CoV-2'e özgü antikorlarının saptanmasında; *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *chemiluminescence immunoassay* (CLIA) ve *lateral flow immunoassay* (LFIA), yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 7). Ayrıca antikorların bir alt grubu olan nötralizan antikor (Nab) varlığının gösterilmesi de çeşitli yöntemler ile mümkündür ([217]).

LFIA, genellikle hasta başı gerçekleştirilebilen basit testler iken ELISA ve CLIA, çok sayıda numunede yüksek verimle çalışan laboratuvar tabanlı testlerdir ([218]).



Şekil 7. SARS-CoV-2 antikorlarının tespiti ELISA , CLIA ve LFIA test şemaları ([196])

ELISA, Spesifik antijenler ve antikorlar arasındaki reaksiyona dayanır ve enzimatik reaksiyon ile sonuç elde edilir. SARS-CoV-2 antikorları kolorimetrik veya floresan

yanıt yoluyla kalitatif veya kantitatif olarak tespit edilebilir. ELISA reaksiyondaki renk değişikliği mikroplak okuyucu ya da çıplak gözle değerlendirilebilir. **CLIA**, antijen-antikor kompleksi bir kemilüminesan ile birleşir ve oluşan ışık saçımı analizörde değerlendirilir. **LFIA**, özel test şeritleri, paneller veya test kasetler kullanılarak gerçekleştirilen immünokimyasal esaslı bir analiz yöntemidir.

SARS-CoV-2 tespitinde genel olarak LFIA, ELISA ve CLIA'ya göre daha az duyarlıdır ([216,219]). Ayrıca duyarlılık ve daha erken saptanabilirlik açısından S protein bazlı ELISA, N protein bazlı testlere göre tercih edilmektedir ([220]). RBD içeren S proteinine karşı antikor tespitinin nötralizasyon ile iyi korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir ([221,222]).
Ancak antikorlar tüm bağışıklığı net şekilde gösteremez, viral varyantlar, antikor tipleri ve hasta popülasyonları arasındaki farklılık nedeniyle enfekte olmuş ya da aşılanmış bireylerde bağışıklık göstergesi olarak rutin kullanılmaları önerilmez ([218,223]).

Nötralizan antikor (NAb) saptama yöntemleri, genel olarak hasta serumunda bulunan özgül antikorların virüsü bloke etmesi ve hücre kültüründe sitopatik etki oluşumunun engellenmesi prensibine dayanır. Altın standart olarak kabul edilen yöntem, virüs nötralizasyon testleri (VNT)'dir. Ancak rutin kullanım için uygun değildir. Psödovirus nötralizasyon testleri daha az biyogüvenlik önlemleri ve daha az emek ile kısa sürede sonuç veren testler olduğu için tercih edilmektedirler ([224]). Temsili virüs nötralizasyon testleri (sVNT) ise enfeksiyöz virüs varlığına veya hücre kültürüne ihtiyaç duyulmadan, ELISA mikro kuyucuklarında, kısa sürede NAb varlığını gösterebilmesi açısından diğerlerine göre avantaj sağlamaktadır ([225]).

4.1.2.2. Antijen Testleri

Viral partiküllerin ve antijenlerin tespiti için kullanılan bu testler, enfekte bireyleri hızlı bir şekilde belirlemek için yüksek riskli topluluklarda COVID-19 enfeksiyonu tanısı için nükleik asit testlerinin bulunamadığı veya kolayca erişilemediği zaman bir alternatif olarak kullanılabilir ([150]).
SARS-CoV-2 viral antijenleri, semptom başlangıcında solunum yollarında saptanabilmekle birlikte antijen seviyeleri, yaklaşık bir hafta sonra düşüşe geçer ve viral RNA ile karşılaştırıldığında düşüş daha hızlıdır ([226]). Ayrıca moleküler tanı testleriyle karşılaştırıldığında düşük duyarlılıkları nedeniyle, COVID-19 hastalarını teşhis etmek için tek başına değil, sıklıkla diğer test yöntemlerine ek olarak kullanılır ([227,228]). Duyarlılığı arttırabilmek için semptom başlangıcından sonraki 3 ila 7 gün içinde test yapılması önerilir ([229]).

Genellikle, COVID-19 tanısı için nasofarengeal veya nasal sürüntü örneklerinde yanal akışlı sandviç, mikroakışkan immünofloresan veya kromatografik dijital test yöntemleri kullanılarak nükleoprotein ve *spike* proteini gibi yapısal SARS-CoV-2 proteinleri hedef alan antijen testleri kullanılır ([149]).

Özellikle yanal akışlı testler, kolorimetrik yöntemler veya altın nanoparçacıkları ile kombine edilerek basit uygulama ve değerlendirme protokollerine sahip olduğu için rutinde sıklıkla kullanılmaktadır ([230–232]). Ucuz olmaları, bir uzman tarafından yapılması gerekmeden hastaların kendileri tarafından evde de yapılabilmeleri, laboratuvar bazlı testlere karşı avantaj sağlamaktadır.

Elektrokimyasal algılama ise, antijen-antikor bağlanmasından ortaya çıkan elektrik sinyallerini ölçen biyosensörlerin kullanılmasına dayanan nisbeten yeni bir teknolojidir. SARS-CoV-2 tanısında S ve N proteinleri için oldukça hızlı, ön işlem gerektirmeyen biyosensörler tasarlanmıştır ([233–235]). Elektrokimyasal biyosensörler, taşınabilir olması, düşük analiz maliyeti, kantitatif algılama, yüksek hassasiyet ve seçicilik açısından diğer yöntemlere göre önemli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, biyosensörleri oluşturmak genellikle hücre mühendisliği ve kültürü gerektirdiğinden oldukça zordur. Ayrıca performansları hücre canlılığına bağlı olduğundan klinik teşhiste kullanılma potansiyellerinin kısıtlı olduğu düşünülmektedir.

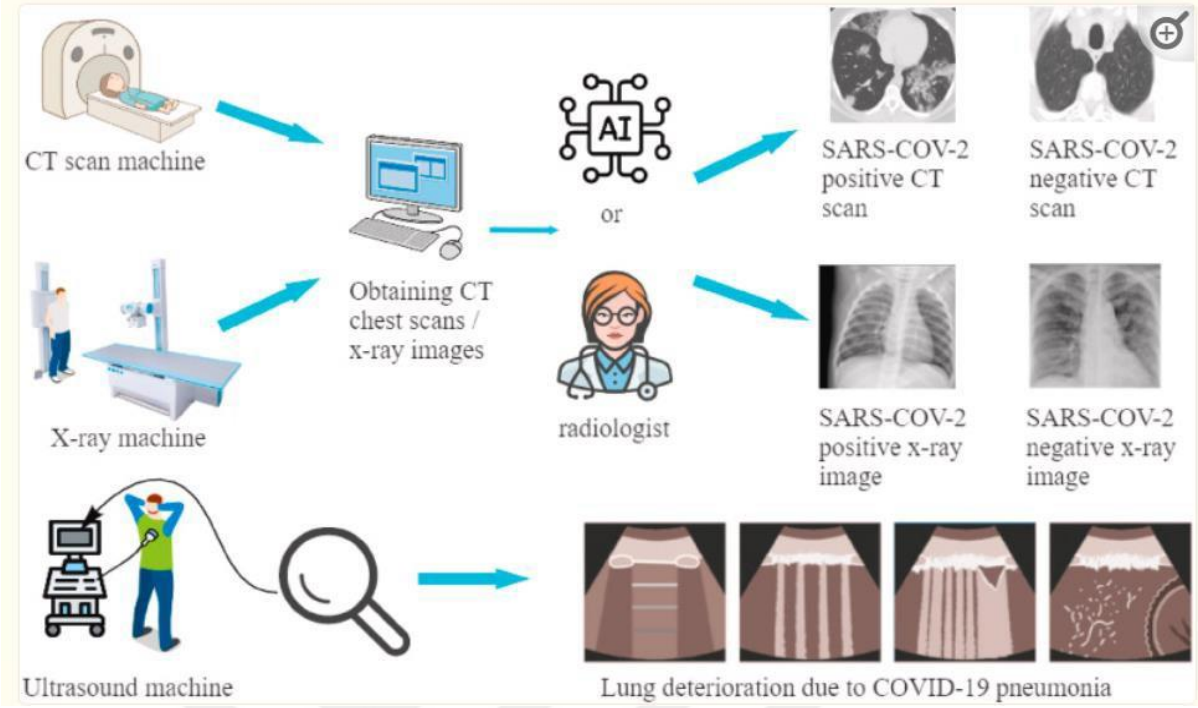
4.2. Radyolojik Tanı

SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısını akciğerler ve solunum yollarındaki değişiklikleri saptayan direkt grafi, bilgisayarlı tomografi (BT) vb. görüntüleme yöntemleri ile desteklemek mümkündür (Şekil8). Görüntülemedeki bulgular hastanın yaşı, hastalık şiddeti, süresi ve bağışıklık durumundan etkilenebilmektedir ([236,237]). Dolayısıyla laboratuvar testleriyle beraber kullanımları önerilir. Yapay zekâ (AI) teknolojileri ile, görüntüleme tabanlı yöntemlerin tanısal verimliliği arttırılarak otomatize sistemler geliştirilebilir ([238]).

PCR ile karşılaştırıldığında düşük özgüllüğüne rağmen yüksek duyarlılığı nedeniyle göğüs BT COVID-19 tanısında taramada ve hastaların durumlarının değerlendirilmesinde, COVID-19 ilişkili pnömoni teşhisinde ön plana çıkmıştır ([239]). SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ayırt edici özelliklerini belirlemek için araştırmacılar tarafından BT taramaları incelenmiş iki taraflı ve periferik buzlu cam opasitelerinin ve konsolidatif pulmoner opasitelerin en yaygın paternler olduğu bulunmuştur ([240]). Ayrıca yine lezyonda damar genişlemesi ve traksiyon bronşektazisi SARS-CoV-2 pozitifliğinde saptanan diğer özellikler arasındadır ([241]).

Direkt grafi, kolay ulaşılabilirliği ve maliyet etkin olması nedeniyle özellikle diğer tanısal testlere ulaşılmayan bölgelerde COVID-19 tanısında tercih edilebilir. COVID-19 ile uyumlu radyografik görüntüleme, periferde ve alt pulmoner alanlarda daha sık görülen, bilateral dağılıma sahip düzensiz, retiküler, yamalı akciğer opasiteleridir ([242]).

Akciğer ultrasonu yine non invaziv bir yöntem olarak hastalarda COVID-19'u tespitinde yardımcı bir yöntem olarak kabul edilir ([243–245]). İyonlaştırıcı radyasyon taşımadığı için bu yöntem hamile kadınlar, çocuklar gibi radyasyona maruz kalmaması gereken hastalar için kullanılabilir. Ayrıca, özel bir mekân gerektirmeksizin acil servisler, ameliyathaneler gibi her ortamda uygulanabilir. Diğer önemli bir avantajı da akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), plevral efüzyon veya pnömotoraks gibi komplikasyonları göstererek hastalarda aynı zamanda tedavi planlamasını desteklemesidir.



Şekil 8. Görüntüleme teknikleri ile COVID-19 ([196])

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Etik Onay

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (tarih:11.05.2020 no:2020/08-28) ve TC Sağlık Bakanlığı tarafından yetkilendirilmiştir.

5.2. Epidemiyolojik Veri Toplama

DEÜ Araştırma Uygulama Hastanesinde Halk Sağlığı Anabilim Dalı ve İş Sağlığı Güvenliği Biriminin birlikte yürüttüğü filyasyon çalışmaları çerçevesinde SARS-CoV-2 RNA pozitif olarak saptanan sağlık çalışanları ve temaslı olarak tanımladıkları kişiler günlük olarak kayıt altına alınmıştır.

Temaslılar bir hafta süreyle semptomlar açısından takip edilmiş veya süre sonunda RT-PCR ile test edilmiştir.

Epidemiyolojik olarak birbirleriyle temas (yüksek-orta riskli) tanımlayan, aynı birimde çalışan, yakın zamanda (<1ay) SARS-CoV-2 ile enfekte olan sağlık çalışanları ve enfekte sağlık çalışanlarının temas takibinde bildirdiği enfekte olan kişiler gruplandırılarak küme olarak adlandırılmıştır. Kümelerde en az iki en çok 11 kişi yer almıştır.

Temaslı takibinde, SARS-CoV-2 RT-PCR testi pozitif saptanan sağlık çalışanının semptomlarının başlamasından 48 saat önce veya asemptomatik ise pozitif RT PCR testinden yedi gün önceki zaman dilimi içinde,

i. <2 m mesafede en az 15 dakika yüz yüze zaman geçiren kişi ve aile üyesi →Yüksek riskli temaslı,
i. Uygun KKD kullanarak zaman geçiren kişi→ Orta riskli temaslı olarak tanımlanmıştır.

Klinik branşta çalışan sağlık çalışanları enfekte hastalar ile çoklu temas öyküsü bildirdiği ve net kişi bilgisi verilemediği için bu kümelere hasta örnekleri dahil edilmemiştir.

İncelenen örneklerde kişilerin demografik verileri tıbbi kayıtlardan toplanmıştır.

5.3. Örneklem Seçimi

5.3.1. Retrospektif Tarama

Mart 2020 ile Kasım 2021 tarihleri arasında kümeler retrospektif olarak incelendi. (n=271 kişi,72 küme). Dış merkezde tanı alan 16 kişi (3 küme) çalışma grubundan çıkarıldı. Kümelerdeki kişilerin SARS-CoV-2 RT PCR test sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Döngü eşik değeri (Ct) ≤ 25* olan örnekler seçildi (n = 168 kişi, 47 küme). Belirlenen kişilerin arşivde (-80 °C) yedeklenmiş nazofaringeal sürüntü örnekleri tarandı. 133 kişinin (39 küme) nazofaringeal sürüntü örneğine ulaşıldı.

Seçilen örneklerin depolanma zamanları ile çalışma zamanları arası en az üç en çok yirmi iki ay vardı.

* Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ve DSÖ önerileri ([246,247]), doğrultusunda döngü eşiği (Ct) değeri ≤25 olan numuneler, iyi kalitede tüm genom dizileri elde etmek için uygun kabul edilir, bu nedenle bu eşik belirlenmiştir.

Belirlen örnekler, tanı aldıkları dönemlerde nükleik asid ekstraksiyonu yapılmadan ve farklı RT-PCR kitleri kullanılarak çalışıldıkları için, dizi analizi basamağına geçilmeden önce standardizasyonun sağlanabilmesi amacı ile tüm örnekler aynı nükleik asit ekstraksiyonu ve amplifikasyonu kullanılarak tekrar değerlendirildi.

5.3.2. Nükleik Asit İzolasyonu ve SARS-CoV -2 RNA Saptama

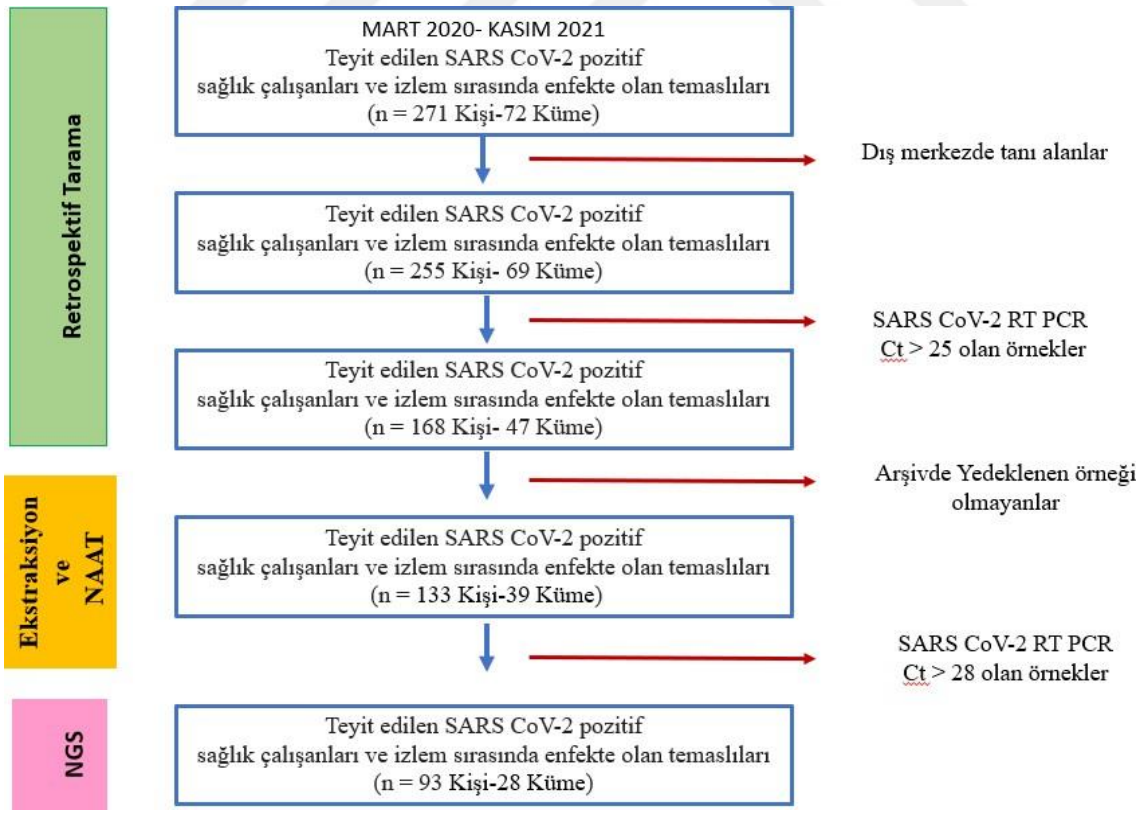
Standardizasyon sağlanabilmesi için, arşivden çıkarılan ve viral RNA pozitif olduğu bilinen tüm nazofaringeal sürüntü örnekleri üreticinin talimatlarına uygun olarak EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (QIAGEN, Almanya) kullanılarak EZ1 Advanced XL (QIAGEN) cihazında nükleik asit izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyona giren örnek miktarı 400 µL, ekstrakt 60 µL idi.

Ekstraktın10 µL'si kullanılarak SARS-CoV-2 RT-PCR testi yapıldı. Bu amaçla, iki ayrı viral gen bölgesini saptayan (E ve S genleri) RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 (Altona

Diagnostics, Hamburg, Germany) kiti, RotorGene Q cihazında ve üreticin önerilerine uygun olarak kullanıldı.
PCR inhibisyonu, insan RNase P genini hedefleyen internal kontrol ile değerlendirilirken, her çalışmaya pozitif ve negatif kontroller dahil edildi.

RT PCR testi sonucunda Ct değeri ≤ 28** olan örnekler (n = 93 kişi, 28küme), NGS ile ileri analizler gerçekleştirilmek üzere seçildi. Örneklem seçimi şekil 9 da özetlenmiştir. Seçilen örneklerin ve kümelerin bilgileri tablo 10 da belirtilmiştir.

**Altı ay ve üzerinde saklama süresi olan numuneler ile çalışılırken düşük Ct değerlerinin (yüksek viral yükün) NGS için daha başarılı olması beklendiğinden kit üreticisi firmanın önerilerine uygun olarak Ct <30 olacak şekilde bir değer belirlenmiştir.



Şekil 9. Örneklem seçim şeması

Küme	Örnek No	Cinsiyet	Durum	Yaş	Pozitiflik Tarihi
1	1	erkek	Sağlık Çalışanı	41	4.09.2020
	2	kadın	Sağlık Çalışanı	26	9.09.2020
	3	kadın	Sağlık Çalışanı	26	10.09.2020
2	4	kadın	Sağlık Çalışanı	29	9.10.2020
	5	erkek	Sağlık Çalışanı	47	16.10.2020
3	6	kadın	Sağlık Çalışanı	22	7.11.2020
	7	kadın	Sağlık Çalışanı	23	16.11.2020
4	8	kadın	Sağlık Çalışanı	36	11.11.2020
	9	kadın	Sağlık Çalışanı	38	12.11.2020
	64	kadın	Sağlık Çalışanı	25	8.11.2020
5	10	kadın	Sağlık Çalışanı	26	20.04.2021
	11	kadın	Sağlık Çalışanı	28	20.04.2021
	12	kadın	Sağlık Çalışanı	26	22.04.2021
6	13	erkek	Sağlık Çalışanı	24	17.05.2021
	14	erkek	Sağlık Çalışanı	24	20.05.2021
	15	kadın	Sağlık Çalışanı	24	25.05.2021
7	16	erkek	Sağlık Çalışanı	45	3.11.2020
	17	kadın	Aile Üyesi	20	11.11.2020
	18	kadın	Aile Üyesi	39	11.11.2020
8	19	erkek	Sağlık Çalışanı	44	22.09.2021
	20	kadın	Aile Üyesi	14	20.09.2021
	21	kadın	Aile Üyesi	8	23.09.2021
	22	kadın	Aile Üyesi	17	24.09.2021
9	23	kadın	Sağlık Çalışanı	38	25.09.2021
	24	kadın	Aile Üyesi	13	28.09.2021
	25	erkek	Aile Üyesi	42	04.10.2021
	26	kadın	Sağlık Çalışanı	47	25.09.2021
	27	kadın	Sağlık Çalışanı	22	26.09.2021
10	28	erkek	Aile Üyesi	48	11.04.2020
	29	kadın	Aile Üyesi	42	14.04.2020
	30	erkek	Sağlık Çalışanı	41	14.04.2020
	31	erkek	Sağlık Çalışanı	37	15.04.2020
	32	erkek	Aile Üyesi	76	19.04.2020
	33	erkek	Aile Üyesi	58	14.04.2020
	34	erkek	Aile Üyesi	21	15.04.2020
	35	erkek	Sağlık Çalışanı	41	16.04.2020
	65	erkek	Sağlık Çalışanı	40	9.04.2020
11	36	kadın	Sağlık Çalışanı	25	20.11.2020
	37	erkek	Sağlık Çalışanı	27	20.11.2020
	38	erkek	Sağlık Çalışanı	26	25.11.2020

12	39	kadın	Sağlık Çalışanı	26	3.12.2020
	40	kadın	Sağlık Çalışanı	27	3.12.2020
	66	kadın	Sağlık Çalışanı	25	4.12.2020
13	41	erkek	Sağlık Çalışanı	27	6.08.2021
	42	erkek	Sağlık Çalışanı	26	7.08.2021
	43	erkek	Sağlık Çalışanı	26	11.08.2021
14	44	erkek	Aile Üyesi	6	20.08.2020
	45	kadın	Aile Üyesi	26	21.08.2020
	46	erkek	Sağlık Çalışanı	34	24.08.2020
15	47	kadın	Aile Üyesi	23	29.10.2020
	48	erkek	Sağlık Çalışanı	48	1.11.2020
16	49	kadın	Sağlık Çalışanı	42	30.10.2020
	50	erkek	Aile Üyesi	45	31.10.2020
	51	kadın	Aile Üyesi	15	3.11.2020
17	52	kadın	Sağlık Çalışanı	47	10.09.2021
	53	kadın	Sağlık Çalışanı	49	17.09.2021
	54	kadın	Sağlık Çalışanı	42	20.09.2021
18	55	erkek	Aile Üyesi	81	22.10.2021
	56	kadın	Aile Üyesi	57	30.10.2021
	57	kadın	Sağlık Çalışanı	48	01.11.2021
19	58	kadın	Sağlık Çalışanı	45	01.11.2021
	59	erkek	Aile Üyesi	49	01.11.2021
	60	erkek	Aile Üyesi	23	05.11.2021
20	61	kadın	Sağlık Çalışanı	45	10.11.2021
	62	erkek	Aile Üyesi	44	10.11.2021
	63	erkek	Aile Üyesi	10	11.11.2021
21	67	erkek	Sağlık Çalışanı	55	11.11.2020
	68	erkek	Sağlık Çalışanı	55	16.11.2020
	69	erkek	Sağlık Çalışanı	28	18.11.2020
	70	kadın	Sağlık Çalışanı	53	23.11.2020
	71	erkek	Sağlık Çalışanı	26	24.11.2020
	72	erkek	Sağlık Çalışanı	26	24.11.2020
22	73	erkek	Sağlık Çalışanı	21	25.11.2020
	74	erkek	Sağlık Çalışanı	42	25.11.2020
	75	kadın	Sağlık Çalışanı	34	3.12.2020
23	76	kadın	Sağlık Çalışanı	27	28.11.2020
	77	erkek	Sağlık Çalışanı	26	30.11.2020
	78	kadın	Sağlık Çalışanı	43	2.12.2020
	79	erkek	Aile Üyesi	55	9.12.2020

24	80	kadın	Sağlık Çalışanı	25	31.03.2021
	81	kadın	Sağlık Çalışanı	23	31.03.2021
	82	kadın	Sağlık Çalışanı	24	5.04.2021
	83	kadın	Sağlık Çalışanı	23	8.04.2021
25	84	erkek	Sağlık Çalışanı	49	31.03.2021
	85	kadın	Sağlık Çalışanı	35	1.04.2021
26	86	kadın	Sağlık Çalışanı	27	2.04.2021
	87	kadın	Sağlık Çalışanı	35	6.04.2021
27	88	kadın	Sağlık Çalışanı	30	4.04.2021
	89	kadın	Sağlık Çalışanı	33	4.04.2021
28	90	erkek	Sağlık Çalışanı	47	15.11.2020
	91	erkek	Aile Üyesi	6 ay	17.11.2020
	92	erkek	Aile Üyesi	16	23.11.2020
	93	kadın	Aile Üyesi	34	23.11.2020

Tablo 9. Çalışmaya alınan 28 kümenin genel özellikleri

5.3. SARS CoV 2 Tüm Genom Yeni Nesil Dizileme

Çalışmamıza dahil edilen örneklerde SARS-CoV-2'nin tüm genom amplifikasyonu için multipleks PCR ile SARS-CoV-2 genom zenginleştirilmesi ve kütüphane hazırlığı protokolüne sahip QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 Kiti (Lot:7690687, QIAGEN, Almanya)) kullanıldı. Toplam üç çalışmada örneklerin işlemlenmesi gerçekleştirildi. Protokol özeti şekil 10'da gösterilmektedir.



Şekil 10. Yeni nesil dizileme kütüphane protokolü

cDNA Sentezi

QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 iş akışı, ekstrakte edilen SARS-CoV-2 RNA ‘sının cDNA’ya dönüştürülmesiyle başlar.

cDNA sentezi için reaktif hazırlığı ;

1) Viral RNA ekstraktı buz üzerinde çözdürüldü.
2) RP Primer, multimodal RT buffer ve nükleaz içermeyen su oda sıcaklığına getirildi.
3) RNase inhibitörü ve EZ reverse transkriptaz, buzda çözdürüldü.

Ct değerlerinden bağımsız olarak çözdürülen her ekstrakttan 5 µl alınarak buz üzerinde, Tablo 10 'a göre cDNA sentez reaksiyonu hazırlandı. Tablo 11’e göre kapak ısıtmalı bir termal cycler ile cDNA sentezi koşulları ayarlandı.

Tablo 10. cDNA sentez reaksiyonu

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Ekstrakte RNA	5
RP Primer(1/11)	1
Multimodal RT buffer, 5x	4
Nükleaz içermeyen su	8
RNase inhibitörü	1
EZ reverse transkriptaz	1
Toplam hacim	**20**

Tablo 11. cDNA sentez inkübasyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
1	42	30 dk
2	85	5 dk
3	4	∞

- Çalışma 2 ve 3’te cDNA sentez protokolünde 42 °C‘de inkübasyon 50 dk olarak değiştirilmiş, 1. basamak olarak da 25 °C 10 dk inkübasyon eklenmiştir.

Tepkime sonunda elde edilen cDNA'nın 5 µl'si ikiye ayrılarak (2.5 µl x 2) hedef zenginleştirme için başlangıç materyali olarak kullanıldı.

SARS-CoV-2 Zenginleştirme

cDNA'ların 2,5 µl'lik 2 alikotu, yaklaşık 225-275 bp'lik amplikonları üretmek için iki ayrı primer havuzunda multipleks bir hedef zenginleştirme stratejisi ile amplifiye edildi.

Zenginleştirme için reaktif hazırlığı;

1. DIRECT SARS-CoV-2 primer 1 ve primer 2' oda sıcaklığına getirildi.
2. QIAseq 2X HiFi MM buz üzerinde çözdürüldü.

Numune başına iki havuz (havuz 1 ve havuz 2) oluşturulmak üzere buz üzerinde reaksiyon karışımları tablo 12'ye ve inkübasyon koşulları tablo 13'e göre ayarlandı.

Tablo 12. SARS-CoV-2 zenginleştirme reaksiyonu

Bileşen	Havuz 1: Hacim/reaksiyon (µl)	Havuz 2: Hacim/reaksiyon (µl)
cDNA	2,5	2,5
Primer 1	2	x
Primer 2	x	2
QIAseq 2X HiFi MM	12,5	12,5
Nükleaz içermeyen su	8	8
Toplam hacim	**25**	**25**

Tablo13. Hedef zenginleştirme inkübasyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Isı aktivasyonu	98	2 dk	1
Denatürasyon	98	20 sn	31*
Bağlanma/uzama	63	3 dk	
	4	∞	∞

ï Çalışma2 ve 3'te döngü sayısı 31 yerine 35 olarak ve bağlanma/uzama basamağında inkübasyon süresi 3 dk yerine 5 dk olarak değiştirilmiştir

Amplifikasyondan sonra, her numune için hazırlanmış "havuz 1" ve "havuz 2" içeriklerinin tümü (50 µl) tek bir plak kuyusunda birleştirildi.

Saflaştırma- Yıkama

Zenginleştirilmiş amplifikasyon ürününü saflaştırmak için yıkama basamağı uygulandı. Saflaştırma işlemi için reaktif hazırlığı;

1. Manyetik boncuklar (QIAseq Beads) kullanmadan 20-30 dakika önce oda sıcaklığına getirildi. Vortekslenerek çözeltinin homojen kahverengi bir renk aldığı görüldü.
2. Günlük taze %80'lik etanol hazırlandı.

- ✓ Plakta her 50 µl örneğe 50 µl süspanse edilmiş manyetik boncuk eklendi. Manyetik bocukların amplikon DNA'a iyice bağlanması için pipetlenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda plak manyetik bloğa yerleştirildi. Amplikonlara bağlı olan boncuklar, manyetik etkiden dolayı plak çukurlarının bir köşesinde toplandı. Böylece ayrılan süpernatan, 2 dk berraklaşması beklendikten sonrasında özenle uzaklaştırıldı.
- ✓ Plak hala manyetik blok üzerindeyken her kuyuya 200 µl %80 etanol eklendi. Bir dakika beklendikten sonra manyetik boncuklara değmeden etanol uzaklaştırıldı. Toplam iki kez etanol yıkaması yapıldı.
- ✓ Etanolün tamamen uzaklaştırılması için, 4-8 dakika boyunca oda sıcaklığında boncukların üzerindeki etanolünde uçması, boncukların çatlamaya başlayıp, parlaklıklarını kaybedene kadar kuruması beklendi.
- ✓ Kuruma görüldüğünde plak manyetik bloktan çekildi ve 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi, pipetleme-santrifüj yapılarak karıştırıldı ve 2 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda plak tekrar manyetik bloğa alındı. Manyetik boncuklardan ayrılmış olan zenginleştirilmiş SARS-CoV-2 içeren süpernatant berraklaşana kadar inkübasyona devam edildi. Son olarak 28 µl süpernatan temiz bir plağa aktarıldı.

Ölçüm ve Normalizasyon

Saflaştırmadan sonra "zenginleştirilmiş SARS-CoV-2" den alınan 1–2 µl ile miktar tayini yapıldı ve normallizasyon için başlangıç materyali olarak kullanıldı. Ölçüm için Qubit™ 4 florometre cihazı ve Qubit High Sensitivity dsDNA kiti üreticinin önerileri doğrultusunda kullanıldı.

Ölçüm için,

1. QUBIT reagent ve buffer karışımı 1/200 oranında hazırlandı (karışım x (örnek sayısı+ 2 standart)). Her standart ve örnek için karışım sırasıyla 190 ve 198 µl ependorflara dağıtıldı. Dağıtılan miksin üzerine standartlar (1-2) 10 µl ve her örnekte 2 µl olacak şekilde eklendi.
2. Öncelikle standart1 ve standart2 için hazırlanan karışım vortekslenip 2 dk inkübe edildikten sonra ölçülerek cihaz kalibre edildi.
3. Her örnek (2 µl) hazırlanan karışım üzerine eklenip vortekslenip 2 dk inkübasyon süresi sonunda cihazda ölçüldü ve değer (ng/ µl) kaydedildi.

Ölçümden sonra, her bir "zenginleştirilmiş SARS-CoV-2" örneği aşağıdaki formülle ortak bir konsantrasyona seyreltildi. Amaç, kütüphane amplifikasyonu ve indeksleme sırasında ve daha sonra dizileme için ortak havuzda her örneğin benzer konsantrasyonlarda (ideal 100 ng), yer almasını sağlamaktır.

$$100\ ng / \text{Qubit ölçüm}\ ng/\mu l + \text{nükleaz içermeyen su} = 23\ \mu l^*$$

*23 µl : kütüphane aplifikasyonu için kullanılacak 50 µl total hacim içinde ki örnek ve nükleaz içermeyen suyun total hacmidir (Tablo 14).

Kütüphane Amplifikasyonu ve İndeksleme

Ortak konsantrasyona getirilen zenginleştirilmiş her bir numune, dizileme sırasında kopya oluştururken hatalı eşleşme riskini azaltmak, yüksek doğrulukta veri üretimi sağlamak için "benzersiz ikili indeksler" (UDI) ile bağlanarak kütüphane oluşturmak için amplifiye edildi.

Kütüphane amplifikasyonu ve indeksleme için gerekli reaktif hazırlığı;

1) QIAseq DIRECT UDI Dizin Seti A (RUDI- 96 AA Lot no: NC12-R1) oda sıcaklığına getirildi.
2) QIAseq 2X HiFi MM buz üzerinde çözdürüldü.

Kütüphane amplifikasyonu ve indeksleme reaksiyonu buz üzerinde tablo 14'e göre hazırlandı ve inkübasyon koşulları tablo 15'e göre ayarlandı.

Tablo 14: Kütüphane amplifikasyonu ve indeksleme reaksiyonu

Bileşen	Hacim/reaksiyon (µl)
Dilue "zenginleştirilmiş SARS-CoV-2"örneği	Değişken (100 ng*)
QIAseq DIRECT UDI indeks	2
QIAseq 2X HiFi MM	25
Nükleaz içermeyen su	Değişken
Toplam hacim	**50**

Tablo15. Kütüphane amplifikasyonu ve indeksleme inkübasyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	98	2 dk	1
3 basamaklı döngü			
Denatürasyon	98	20 sn	8
Bağlanma	60	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	1 dk	
	4	∞	∞

Saflaştırma- Yıkama

Oluşturulan kütüphanelere saflaştırma işlemi uygulandı.

Saflaştırma işlemi için reaktif hazırlığı;

1. Manyetik boncuk (QIAseq Beads) kullanılmdan 20-30 dakika önce oda sıcaklığına getirildi. Vortekslenerek çözeltinin homojen kahverengi bir renk aldığı görüldü.
2. Günlük taze %80'lik etanol hazırlandı.

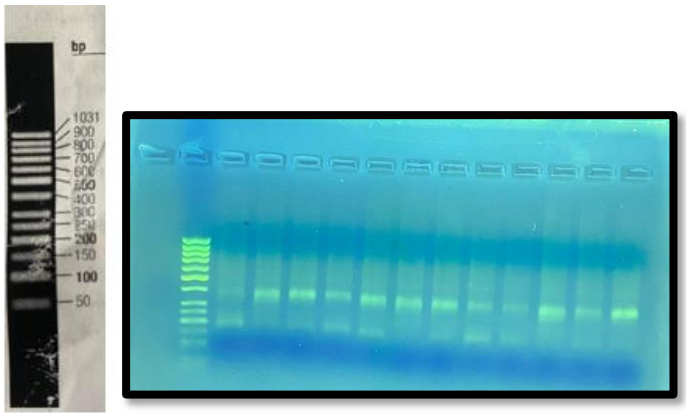
- ✓ Plakta her 50 µl kütüphanenin üzerine 55 µl süspanse edilmiş manyetik boncuk eklendi. Manyetik bocukların PCR ürününe iyice bağlanması için pipetlenerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda plak manyetik bloğa yerleştirildi. Manyetik etkiden dolayı ürün bağlı olan manyetik bocuklar plak çukurlarının bir köşesinde toplandı. Böylece ayrılmış olan süpernatantın 2 dk berraklaşması beklendikten sonra özenle uzaklaştırıldı.

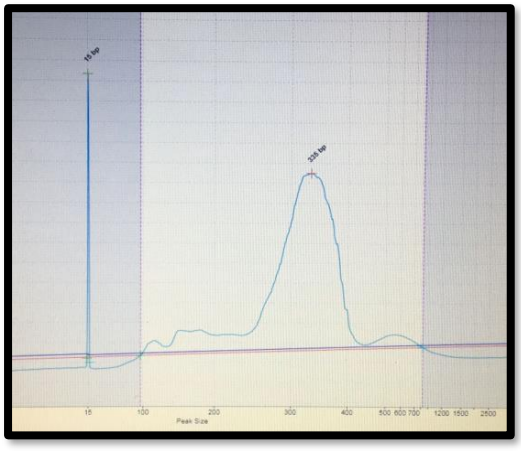
- ✓ Plak hala manyetik blok üzerindeyken her kuyuya 200 µl %80'lik etanol eklendi. Bir dakika beklendikten sonra manyetik boncuklara değmeden etanol dikkatlice uzaklaştırıldı. Toplam 2 kez etanol yıkaması yapıldı.
- ✓ Etanolün tamamen uzaklaşması için, 4-8 dakika boyunca oda sıcaklığında boncukların üzerindeki etanolünde uçması, boncukların çatlamaya başlayıp, parlaklıklarını kaybedene kadar kuruması beklendi.
- ✓ Kuruma görüldüğünde plak manyetik bloktan çekildi ve 25 µl nükleaz içermeyen su eklenerek pipetleme-santrifüj yapılarak iyice karıştırıldı ve 2 dakika inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonunda plak manyetik bloğa alındı. Manyetik boncuklardan ayrılmış olan süpernatant berraklaşana kadar inkübasyona devam edildi. Son olarak saflaştırılmış kütüphane içeren süpernatandan 23 µl temiz bir plağa aktarıldı.

Kalite Kontrol ve Normalizasyon

Elde edilmiş saf kütüphanelerden alınan 2-3 µl ile, ürün varlığını – amplikon boyutunu değerlendirmek için QIAxcel ScreenGel yazılım sistemi yada agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı. Kütüphanelerin ortalama boyutu için yaklaşık 300-400 bp'de pik varlığı ya da bant görüntüsü arandı.

Yeterli ürün elde edilemeyen kütüphaneler işlem basamaklarının başına dönülerek tekrarlandı. Dimer ya da arka planda kirlilik görülen numuneler tekrar saflaştırma ve yıkama işlemine tabi tutuldu. Örnek kütüphaneler Şekil 11 'de gösterilmektedir.

a) 

b) 

Şekil 11. Örnek SARS-CoV-2 kütüphane görüntüleri

a) Agoroz jel elektroforezde 300-400 bp amplikon ve 200 bp dimer bantları

b) QIAxcel ScreenGel yazılım sisteminde 300-400 bp amplikon piki

Cihaza yükleme öncesi kütüphaneler, önce Qubit™ 4 florometre cihazı ve Qubit High Sensitivity dsDNA kiti ile tekrar ölçüldü. Belirlenen örnek konsantrasyonları [Qubit ile belirlenen konsantrasyon (ng/µl) x 10^6 ÷ 112450] formülü kullanılarak "nM" cinsinden hesaplandı. Her örnek hesaplanan değerlerine uygun olarak normalizasyon için belirleten protokollere uyularak nükleaz içermeyen su ile "50 nM-10nM" konsatrasyon olacak şekilde dilue edildi.

Son olarak dizileme cihazına yüklenecek havuzu hazırlamak için seyreltilen numunelerin her birinden 2-2,5 µl alınarak tek bir ependorf içinde toplandı. Çalışma 1'de (33 örnek) oluşturulan havuz MiniSeq®(Illumina), çalışma 2 ve 3'te (60 örnek) oluşturulan havuz NextSeq® 500/550 (Illumina) cihazlarına üreticinin talimatlarına uygun olarak yüklendi.

5.4.1. SARS-COV-2 Tüm Genom Yeni Nesil Dizileme Analizi

93 nazofaringeal örnekten QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 (Qiagen) protokolü ile oluşturulan havuzlanmış "SARS-CoV-2 kitaplıkları" MiniSeq®(n=35) ve NextSeq® 500/550 (Illumina)(n=58) cihazlarına yüklendi. Illumina sisteminde köprü amplifikasyonu ve çift-uçlu (paired-end) 2 × 150-bp okumalarla dizileme işlemi gerçekleştirildi ([248]).

Dizileme sonrası sistem tarafından her numune için fastq formatında dosyalar elde edildi. Fastq dosyaları Wuhan-H1 dizisi referans ([249]) (GenBank:MN908947.3) alınarak, CLC Genomics Workbench sürüm 22.0 (Qiagen, Almanya) üzerinde analiz edildi. Program üzerinde bilinmeyen bazlar, "N" olarak adlandırıldı ve uzunluğu> 28.500 baz olan diziler tüm genom olarak kabul edilerek konsensus diziler oluşturuldu.

CLC Genomics Workbench üzerinde analiz edilen 93 örneğin 63'ü (20 küme) ileri analizlere dahil edildi. Kalan 30 örnekten 22'si Miniseq cihazında, 3'ü Nextseq cihazında dizilendikten sonra veri kalitesi düşük olduğu için çalışma dışı bırakıldı. Diğer 5 örnek (2 Miniseq- 3 Nextseq), dışlama kriterleri sonrası sağlık çalışanı örneği bulundurmayan kümelerde tek kalan örnekler olduğu için çalışma dışında bırakıldı.

- MiniSeq' de dizilenen 22 örnek için dışlama kriteri; hedef genom kapsamı <%80, N baz>%20 ve 10x derinliğinde <%90 kapsam
- Nextseq' de dizilenen 3 örnek için dışlama kriteri; hedef genom kapsamı <%95, N baz>%7 ve 10x derinliğinde <%95 kapsam

Ayrıca 13 örnek hem MiniSeq hem Nextseq platformlarına yüklenerek değerlendirildi. Hepsinde Nextseq platformunun dizi kalite değerlendirmeleri sonuçları daha iyi olduğu için, bu platformdan sağlanan veriler analize alındı.

5.4.1.1. Varyasyon Analizi

Her örneğe ait elde edilen konsensus dizideki varyasyonlar, SARS-CoV-2 Wuhan- H1 dizisi (GenBank:MN908947.3) referans alınarak, DSÖ rehberi ([247]) önerisi doğrultusunda ortalama kalite skoru (*average quality*) >20, frekans> %80 belirlenerek CLC Genomics Workbench programı üzerinde belirlendi.

Nükleotid varyasyonlarının özellikleri, amino asit değişiklikleri üzerindeki etkileri CLC Genomics Workbench programı ve "fasta" dosyaları Nexclade web sistemine yüklenerek değerlendirildi. Ayrıca dizilerin MAFFT v7 ([250]) ile çoklu hizalama sonrası referansa göre eksik, benzer ve farklı olan bölgelerinin varlığı manuel olarak doğrulandı. Nükleotid sıralaması viral sekansın 5' UTR'sinden başlayarak belirtilirken, belirlenen nükleotid ve amino asit farklılıklarıda, karşılık gelen her kodlama bölgesi için ayrı ayrı belirtildi.

Aynı kümedeki izolatların tüm genom analizleri arasında ≤2 tek nükleotid değişimi (SNV) var ise küme ile ilişkili >2 SNV veya çoklu nükleotid değişimi (MNV) var ise küme ile ilişkisiz olarak değerlendirildi.

5.4.1.2. Dal (*clade)*- Soy (*lineag*e) Analizi

Çalışmaya dahil edilen her örnek için oluşturulan "fasta." dosyaları Nexclade web sistemine yüklenerek, biriken mutasyonların kombinasyonuna dayalı olarak Nextstrain üzerinde soy(*lineage*) ve PANGOLIN üzerinde ilgili dal (*clade)* belirlendi..

Aynı kümedeki izolatlarda farklı dal ve/veya soy tanımlanması durumunda bu izolatların küme ile ilişkili olmadığına karar verildi.

5.4.1.3. Filogenetik Analiz

Küresel filogeni için çalışmaya dahil edilen 63 örneğin konsensusları, GISAID (https://www.gisaid.org/) ve GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 'tan rasgele seçilen 46 dış sekans dizisi ve referans SARS-CoV-2 Wuhan-H1(GenBank:MN908947.3) dizileriyle birleştirilip, "faşta." formatında veri seti oluşturuldu. Ayrıca *cladelerin* kendi içinde kümelenme durumlarını görebilmek adına, tanımlanan her *clade* için sadece Türkiye'den benzer tarihlerde izole edilmiş dış sekans dizileri rasgele seçilerek aynı referans ve bu çalışmada elde edilen ilgili *clade* örnekleriyle cladelere özgü veri setleri oluşturuldu.

Veri setleri MAFFT v7 ile hizalandıktan sonra filogenetik analiz öncesi AliView programı üzerinde eşit uzunlukta konsensus dizileri elde etmek için 5' ve 3' ucundaki kodlanmayan bölgelerde manuel düzeltmeler gerçekleştirildi.

Filogenetik ağaç oluşturulmasında en uygun model, MEGA 11.0 yazılımında bulunan "en iyi DNA/Protein modelini bul" özelliği kullanılarak belirlendi. En düşük "Bayesian Information Criterion" (BIC) değerine sahip olan küresel ağaç için **"**GTR+G+I" modeli, clade ağaçları için "G+I" modeli kullanılarak bootstrap değeri 200 olacak şekilde, "maximum likelihood" ağaçları oluşturuldu. "Ağaçlar üzerine bootstrap" destek değerleri eklendi. Bu değerler ≥ %95 ise çok güçlü, %95-75 güçlü, <%75 zayıf olarak tanımlandı. Ağaç, FigTree (versiyon 1.4.4) programı ile düzenlenerek görsel hale getirildi.
Başlangıçta aynı kümede bildirilen ancak ağaç üzerinde farklı bölgelerde konumlandığı belirlenen genom sekanslarının küme ile ilişkili olmadığına karar verildi.

5.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS 24.0 paket programı aracılığıyla yapıldı. Sayısal verilerin normal dağılıma uygunluğu "Kolmogorov-Smirnov" testleriyle değerlendirildi. Sayısal verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama, standart sapma, kategorik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ise sayı ve yüzde olarak ifade edildi. İki grup arasında sayısal değişkenlerin karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.
Sayısal değişkenlerin korelasyonunda normal dağılım kriterlerine uymayanlar Spearman korelasyon testi ile incelendi. Korelasyon katsayısı (r) eşik değerleri, (+) olumlu, (-) olumsuz yönde ve 0.75-1.00 çok güçlü, 0.50-0.74 güçlü, 0.25-0.49 orta, 0.24 ve altı zayıf,olarak alındı.

6.BULGULAR

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversite Araştırma Uygulama Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarında Mart 2020 - Kasım 2021 tarihleri arasında nazofaringeal sürüntü örneklerinde SARS-CoV-2 RNA tespit edilen sağlık çalışanları ve filyasyon verileri ile desteklenmiş temaslılarından oluşan, 28 kümede yer alan 93 kişinin virus sekans analizi, yeni nesil sekanslama yöntemi ile incelendi

Analizler, "Genomics Workbench" programında yapıldı. Belirlenen dizileme kalitesi kriterlere uyan 63 örnek (20 küme) ileri analizler için değerlendirmeye alındı.

Epidemiyolojik, Demografik ve Klinik Özellikler

20 küme içerisinde;

- 10 kümede enfekte sağlık çalışanlarının temaslısı bir diğer sağlık çalışanıydı. Bu kümelerden 3'ünde klinik dışı, 7'sinde klinik bölümlerde çalışan sağlık çalışanları yer almaktaydı.
- 2 kümede enfekte sağlık çalışanlarının temaslısı hem en az bir aile üyesi, hem de diğer bir sağlık çalışanı idi. Sağlık çalışanları bir kümede klinik branşta, diğerinde klinik dışı branşta çalışmaktaydı.
- 8 kümede ise enfekte sağlık çalışanlarının temaslıları aile üyelerinden oluşmaktaydı. Bunlarda sağlık çalışanları 3 kümede klinik dışı, 5 kümede klinik bölümlerde hizmet vermekteydi.

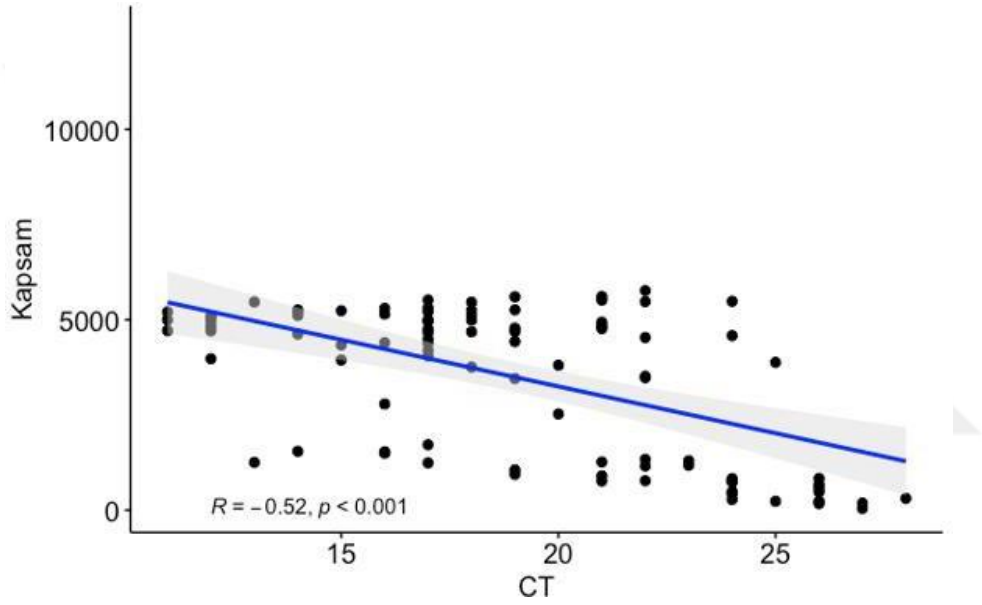
Temas durumu incelendiğinde, sağlık çalışanları iş yerinde ortak çalışma alanında yüksek ve orta riskli temaslar tanımlarken, yeme içme faaliyetleri, soyunma odaları, sosyal etkinlikler ve aile içi temasta yüksek risk tanımladı.

Toplamda 63 kişiden, 40'ı sağlık çalışanı ve ortalama yaşı 34.1 ± 9.3 yıl, 23 aile üyesinin ortalama yaşı 33.7± 21.3 yıl idi. 63 kişinin 35 (%56)'i kadındı. Kişilerin yurtdışına seyahat ya da yurt dışından gelen kişi ile temas öyküsü yoktu.

Sağlık çalışanları hastalığı asemptomatik ya da hafif-orta semptomlarla (n:39) geçirmişti. Semptomlar halsizlik, yorgunluk, hafif ateş, kas ağrısı, baş ağrısı, boğaz ağrısı, burun tıkanıklığı, öksürük, tat ve koku alamama idi. Hiçbirinde hastaneye yatış ya da yoğum bakım ihtiyacı gelişmemişti.

Numunelerin Ct Değeri ve Dizileme Kalitesi İlişkisi

Doksan üç örnek için sekans sonuçları 10x derinlikte ve genom kapsam (coverage) değeri < %90 olanlarda ortalama Ct değeri 24.5 ± 2.8 iken , ≥ %90 olanlarda ortalama Ct değeri 17.9 ± 3.7 idi. İki grup arasındaki fark anlamlıydı (p<0.001). Hedef genom kapsamı <%80 olan örneklerde ise ortalama Ct 24.2 ± 3.2 iken, ≥%80 olanlarda ise ortalama Ct 18.3± 4 idi. İki grup arasındaki fark anlamlıydı (p<0.001). Genom kapsam (coverage) değerlerinin, Ct değeriyle ters yönde kuvvetli ilişkili olması, viral yük arttıkça genom kapsamının da daha iyi olduğunu göstermekte idi (Şekil 12).

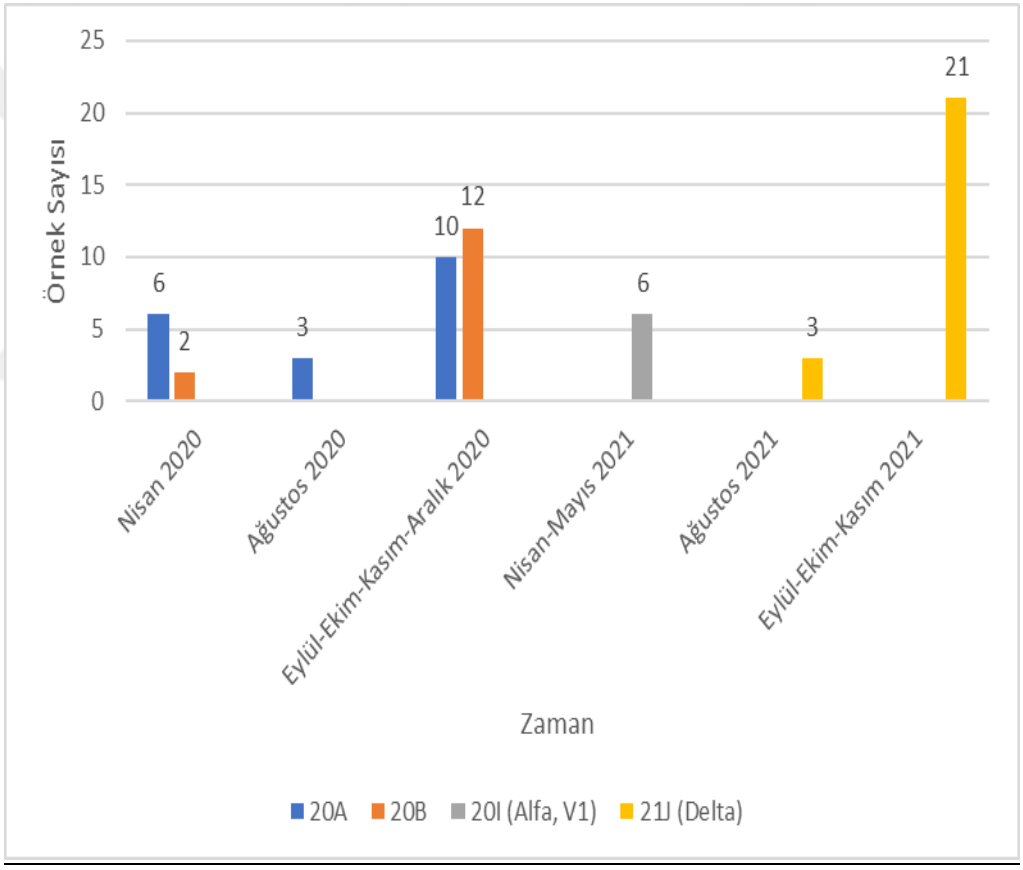


Şekil 12. Genom kapsam değeri ile RT PCR Ct ilişkisi (Spearman korelasyon katsayısı r = 0.52; p < 0.001)

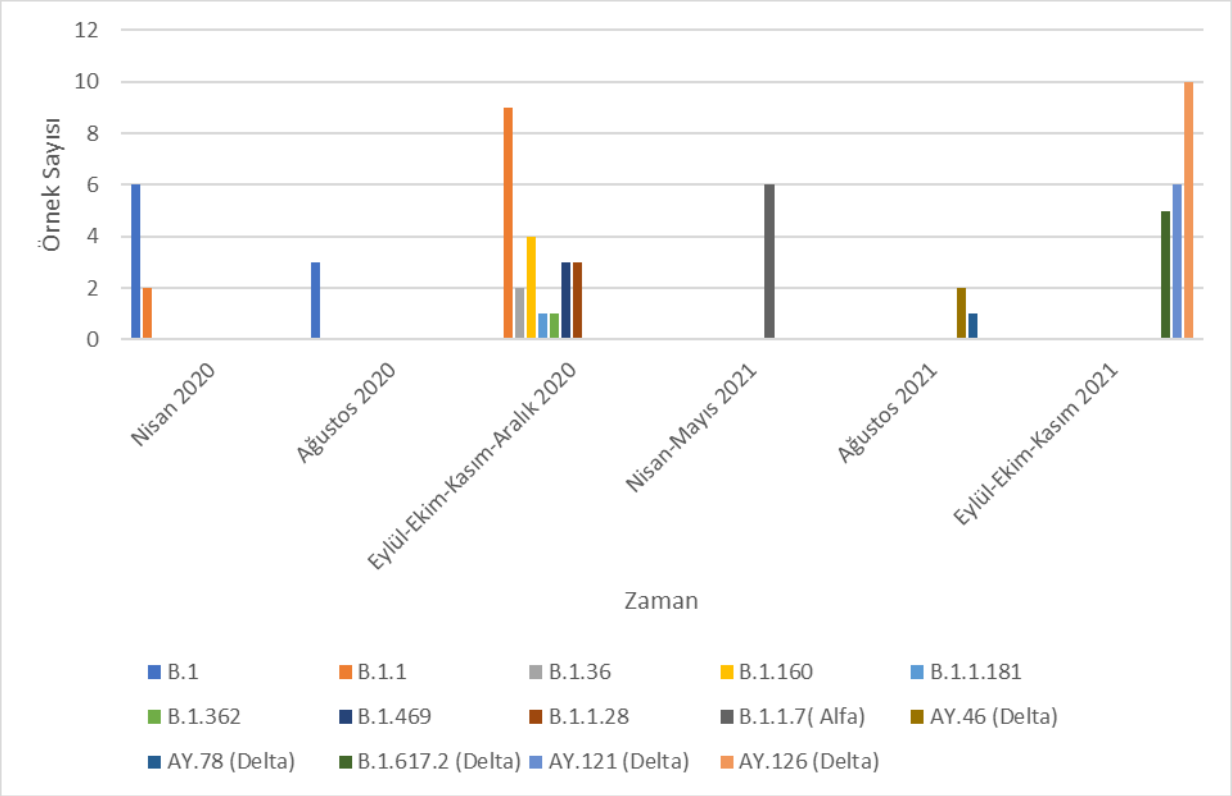
İleri analizlere uygun kalitede olan 63 dizide ham veri sayısı 820 bin ile 5 milyon okuma aralığında değişmekte olup, konsensus dizi uzunlukları ortalama 29.771 ± 77.3 baz idi. Referans genomun en çok %99 en az %82'ini kapsayan dizilerde, ortalama kapsam 4335 ± 1312 idi. Diziler, 10x derinliğinde, genomun ortalama %97.9 ± 1.9'unu kapsamaktaydı. Kullanılan kitin virus genomunu amplifiye edecek şekilde özelleştirilmiş yapısı sonucu virüs genomu konakçı genomundan yüksek düzeyde ayırd edilebildi ve dizileme sonrası özel bir saflaştırma işlemine gerek duyulmadı. Örneklerin ayrıntılı veri tablosu Ek 1' de tablo olarak gösterilmiştir.

Dizilerin Dal (*clade*) ve Soy (*lineage*) Sınıflandırması

İncelenen kümelerde yer alan viral izolatlarda SARS-CoV-2'nin 4 farklı dalına (clade) ait, 14 farklı soy (lineage) tespit edildi. Sırası ile 24 örnek 21J (Delta), 19 örnek 20A, 14 örnek 20B, 6 örnek 20I (Alfa) varyantı olarak belirlendi. Varyantların dal ve soy dağılımları Şekil 13 ve Şekil 14'te gösterildi. İncelenen izolatlar arasında, en çok delta varyantının, AY.126 alt soyu tanımlandı (n:10).



Şekil 13. Örneklerin zamana göre dal (clade) dağılımı

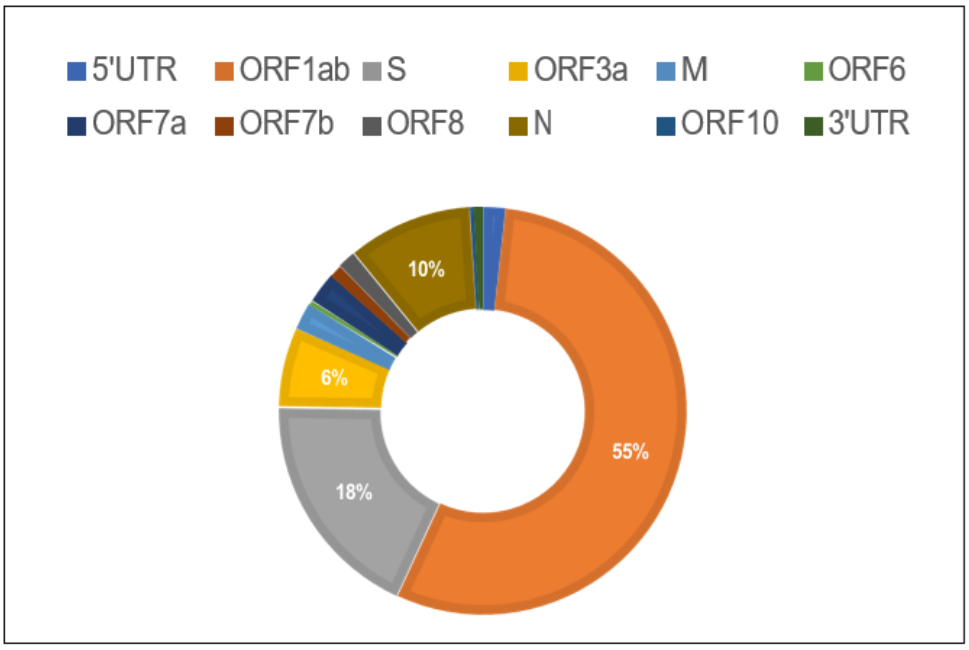


Şekil 14. Örneklerin zamana göre soy (lineage) dağılımı

Dizilerdeki Nükleotid Varyasyonlarının Analizi

SARS-CoV-2 Wuhan-H1 dizisi (GenBank:MN908947.3) referans alınarak yapılan analizlerde viral izolatların, referans diziye kıyasla toplamda 284 nükleotidde varyasyon barındırdığı bulundu. Bunlardan 180'i non-sinonim, 97'si sinonim, 7'si kodlanmayan bölge değişiklikleriydi.

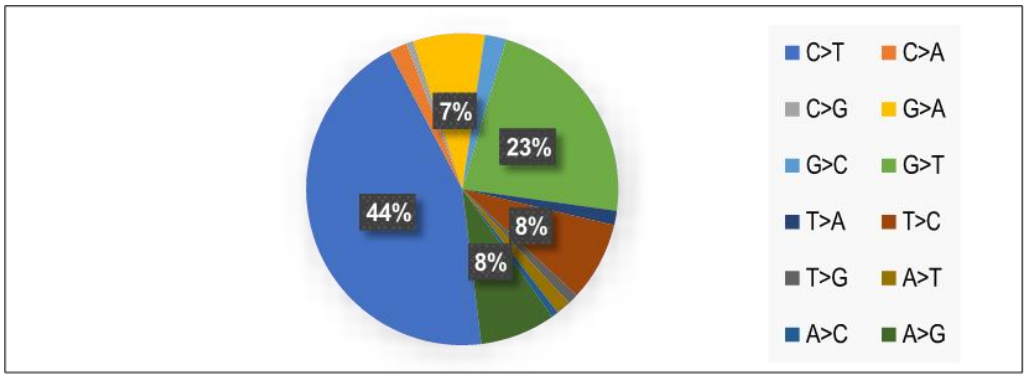
Bu varyasyonların 157 (%55)'si virüsün genomun üçte ikisini kaplayan ORF1ab bölgesinde bulundu. Bunu sırasıyla S bölgesi (n: 52), N bölgesi (n:28), ORF3a (n:18), M (n:6), ORF7a (n:7), 5'UTR (n:5), ORF8 (n:4), ORF7b (n:2), 3'UTR (n:2) ORF6 (n:1), N-ORF8 (n:1) ve ORF10 (n:1) izlemekteydi.



Şekil 15. Nükleotid varyasyonlarının gen bölgesi dağılımı

Varyasyonlar incelendiğinde en sık (n:275) tekli nükleotid değişiklikleri (SNV) tespit edildi. Protein yapısını etkilemeyen sinonim mutasyonlardan, 5'UTR bölgesinde 241C>T, nsp3'te 3037C>T ile non-sinonim mutasyonlardan bir amino asitlik değişiklik yaratan, RNA-bağımlı RNA polimeraz kodlama bölgesinde 14408C>T ve S gen bölgesinde 23403A>G değişimi tüm örneklerde (n: 63) ortak olarak saptandı.

Ayrıca nükleotid varyasyon paterninde en sık, sitozinin timin (C>T) ile değişikliği görüldü (n= 120) (Şekil 16).



Şekil 16. SNV'larda nükeotid değişim paterni

SNV'lara ek olarak, genomun N, ORF3a ve ORF7b bölgelerinde toplam 4 adet çoklu nükleotid varyasyonu (MNV) ve ORF1ab, S, ORF7a, N-ORF8 ve ORF8 bölgelerinde 7 adet delesyon tespit edildi. İzolatlardaki nükleotid varyasyonlarının ayrıntıları Ek-2 de tablo ile gösterilmiştir.

Dizilerdeki Amino Asit Değişikliklerinin Analizi

Çalışmamızda izolat başına 3 ila 38 arasında değişen toplam 180 bölgede amino asit değişikliği saptandı. Bunlardan 170'i SNV, 4'ü MNV, 6'sı delesyon kaynaklı değişimlerdi. Değişimlerin en sık görüldüğü gen bölgesi, nükleotid değişikliklerine de paralel olarak ORF1ab (n: 89) bölgesi iken, ardından sırasıyla S (n: 33), N (n:19), ORF3a (n:14), ORF7a (n: 6), M (n: 3), ORF8 (n: 3), ORF7b (n: 2), OFR6 (n: 1) ve ORF10 (n: 1) gen bölgeleri yer aldı.

A. Tekli Nükleotid Değişiklikleri Kaynaklı Amino Asit Değişiklikleri

ORF1b'nin RNA-bağımlı RNA polimeraz kodlama bölgesinde görülen C14408T mutasyonu prolinden lösin (P4715L) değişimine, S kodlama bölgesinde A23403G mutasyonu ise Aspartik asitten Glisine (D614G) değişime neden olan non-sinonim mutasyonlardır. Çalışmamız da bu her iki aa değişikliği tüm örneklerde saptandı (n: 63). Ayrıca Aspartik asitin Tirozine (D377Y) dönüşe neden olan N gen bölgesinde G29402T mutasyonu da çalışma örneklerinde ikinci en sık saptanan varyasyondu (n: 26).

Bunlar dışında SNV nedenli saptanan diğer aa değişiklikleri:

ORF1ab gen bölgesinde, P2046L (n :25), A1306S (n:24), P2287S (n:24), V2930L (n:24), T3255I (n:24), G5063S (n:24), P5401L (n:24), A6319V (n:24), T3646A (n:23), K6958R (n:16), A1708D (n:6), I2230T (n:6), T1001I (n:5), T4083M (n:5), A6429S (n:5), S40L (n:4), D1229G (n:4), L2146F (n:4), M3087I (n:4), M3129I (n:4), A4577S (n:4), M4993I (n:4), V5168L (n:4), E5585D (n:4), V6490F (n:4), P927L (n:3), D992N (n:3), H1610Y (n:3), S2030L (n:3), T2181I (n:3), M2347I (n:3), P2483S (n:3), N2628K (n:3), L3027F (n:3), P3395S (n:3), A3518V (n:3),V3524I (n:3), L3606F (n:3), V4864I (n:3), M5058V (n:3), T5131I (n:3), P5402S (n:3), A5432S (n:3), V5511L (n:3), K5784R (n:3), A5829V (n:3), A7024S (n:3), N7083S (n:3), H110Y (n:2), K120N (n:2), L533F (n:2), T727I (n:2), T1168I (n:2), I1667V (n:2), D2043G (n:2), E2050K (n:2), H2125Y (n:2), M2259I (n:2), V2975L (n:2), V3107I (n:2), A3357V (n:2), A3571V (n:2), M3780I (n:2), N3937S (n:2), K3979N

(n:2), T4685I (n:2), T5102I (n:2), T265I (n:1), P309L (n:1), G618S (n:1), T999I (n:1), E1340D (n:1), A1809V (n:1), K3353R (n:1), D3355N (n:1), I4308T (n:1), M4375V (n:1), N4795S (n:1), A4835V (n:1), K4870N (n:1), H5488Y (n:1), A5591S (n:1), L5649F (n:1), T5805M (n:1), A6532V (n:1), A6623V (n:1), S6713L (n:1), L6924F (n:1), T6938A (n:1), T6949I (n:1),

S gen bölgesinde, T19R (n:24), G142D (n:24), L452R (n:24), P681R (n:24), D950N (n:24), T478K(n:22), I850L (n:10), N501Y (n:6), A570D (n:6), T716I (n:6), S982A (n:6), D1118H (n:6), P681H (n:4), L176F (n:3), D178N (n:3), E281Q (n:3), F490S (n:3), H655Y (n:3), A846V (n:3), K854N (n:3), S929I (n:3), V1176F (n:3), S477N (n:2), K947I (n:2), M1050I (n:2), L1063F (n:2), V1104L (n:2), L5F (n:1), T22I (n:1), R246K (n:1), S494P (n:1), S813I (n:1),

N gen bölgesinde, D63G (n:24), R203M (n:24), G215C (n:24), S235F (n:6), M234I (n:4), A376T (n:4), G25C (n:3), D128N (n:3), S194L (n:3), T198I (n:3), R203K (n:3), Q418H (n:3), G178V (n:2), D399H (n:2), P13L (n:1), L139F (n:1),

ORF3a gen bölgesinde, S26L (n:24), K16T (n:10), Q57H (n:10), V202L (n:6), W128L (n:4), T151I (n:3), D155Y (n:3), E226A (n:3), K16N (n:2), V55F (n:2), S74F (n:2), P267S (n:24), L46F (n:1), L52F (n:1),

ORF7a gen bölgesinde, T120I (n:22), V82A (n:11), V24F (n:3), A105V (n:2), P34L (n:1), V74F (n:1),

M gen bölgesinde, I82T (n:24), A2V (n:2), H155Y (n:2),

ORF8 gen bölgesinde, Q27* (n:6), R52I (n:6), K68* (n:2),

ORF6 gen bölgesinde, Y49H (n:2),

ORF7b gen bölgesinde, T40I (n:24),

ORF10 gen bölgesinde, I13M (n:3)'dir.

B. Çoklu Nükleotid Değişiklikleri Kaynaklı Amino Asit Değişiklikleri

Çalışmamızdaki MNV'ların hepsi protein yapısı değişikliklerine sebep olan non-sinonim mutasyonlardı (Tablo 16).

N genindeki 28881G>A 28882G>A 28883G>C üçlü nükleotid varyasyonları, R203K ve G204R amino asit değişikliklerine yol açar. Çalışmamızda en sık bu aa değişiklikleri ile karşılaşıldı (n: 20). Ayrıca N gen bölgesinde 28280..28282 GAT> CTA pozisyonunda aspatik asitten lösine (D3L) değişim 6 örnekte (tüm Alfa varyantları), ORF7b de 27876..27877

TG>GT de 2li nükleotid değişiminden kaynaklı sisteinden valin (C41V) dönüşümü aynı kümede birlikte yer alan 3 örnekte (Alfa varyantları) ortak olarak saptandı. ORF3a bölgesinde 25970.25971 GG>TA triptofandan lösin değişimi (W193L) ise çalışmada sadece B.1.362 varyantı olan bir örnekte saptandı.

Bölge	Tip	Referans	Allel	Gen	Aminoasit Değişikliği	Görülen Örnek Sayısı	Toplam Örnek Sayısı
28881..28883	MNV	GGG	AAC	N	R203_G204delinsKR (R230K, G204R)	20	63
28280..28282	MNV	GAT	CTA	N	D3L	6	63
27876..27877	MNV	TG	GT	ORF7b	C41V*(C41-)	3	63
25970..25971	MNV	GG	TA	ORF3a	W193L	1	63

Tablo 16. Örneklerde saptanan çoklu nükleotid varyasyonları

*Nextclade sistemi üzerinde C41 delesyonu şeklinde tanımlanmıştır. Genomics Workbench üzerinde MNV olarak belirtilmiştir.

C. Delesyon Kaynaklı Amino Asit Değişiklikleri

Protein yapı değişikliğine sebep olan 6 delesyon arasında en sık saptanan (n:24), delta varyantlarında ortak olarak görülen, S gen bölgesinde 22029..22034 de AGTTCA >- (E156_R158delinsG) delesyonu ve ORF8 gen bölgesinde 28248..28253 de GATTTC > - (D119_F120del) delesyonu idi. Ayrıca Alfa varyantlarının tümünde (n: 6) ortak olarak ORF1ab gen bölgesinde 11288..11296 ‘da TCTGGTTTT>- (S3675_F3677del) deleyonu ile S gen bölgesinde 21765..21770’de TACATG>- (H69_V70del) ve 21991..21993’te TTA>- (Y145del) delesyonları saptandı. Bir kümede birlikte yer alan 3 Delta varyantı örneğinde ise ORF7a bölgesinde 27692..27697’da TTTTTC >- (F101_L102del) delesyonu tespit edildi.

İncelenen örneklerde karşılaşılan en sık delesyon, ORF8 ve N gen bölgesi arasında kodlanmayan ve dolayısı ile protein yapıyı etkilemeyen, bir nükleotitlik (28271A > -) değişime neden olan delesyon idi. Bu delesyon Alfa ve Delta varyantlarının tamamında (n:30) saptandı. Tüm delesyonlar tablo 17’de özetlendi.

Bölge	Tip	Referans	Allel	Gen	Aminoasit Değişikliği	Görülen Örnek Sayısı	Toplam Örnek Sayısı
28271	Delesyon	A	-	N-ORF8		30	63
22029..22034	Delesyon	AGTTCA	-	S	E156_R158delinsG (E156-, F157-, E158G)	24	63
28248..28253	Delesyon	GATTTC	-	ORF8	D119_F120del (D119-, F120-)	24	63
11288..11296	Delesyon	TCTGGTTTT	-	ORF1ab	S3675_F3677del (S3675-,G3676-,F3677-)	6	63
21765..21770	Delesyon	TACATG	-	S	H69_V70del (H69-, V70-)	6	63
21991..21993	Delesyon	TTA	-	S	Y145del (Y144-)	6	63
27692..27697	Delesyon	TTTTTC	-	ORF7a	F101_L102del (F101-, L102-)	3	63

Tablo 17. Örneklerde saptanan delesyonlar

Tanımlayıcı Mutasyonlar Dışında Kalan Özel Mutasyonlar

Dizilerdeki nükleotid değişiklikleri Nexclade sistemi ile incelendiğinde, soylarda tanımlayıcı mutasyonların yanı sıra henüz etiketlenmemiş özel bazı mutasyonlar saptandı.

- ✓ B.1 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C313T, G683T, T17142A, T17688C, C20946T, C25156T sinonim, G3239 (D992N), G7042T (M2259I), A21137G (K6958R), G21334T (A7024S) G28655A (D128N), G28690 (L139F), G29468C (D399H) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.1 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C313T, A3058G, G7675T, G8017T, C11704T, C11812A, C15654T, G17721T, C19524T, T22981C, C23059T, C23191T, A28594G, C29119T, C29149T sinonim, C1862T (L533F), C2445T (T727I), C3768T (T1168I), A5264G (I1667V), C6807T (T2181I), C10335 (A3357V), C10818T (A3518V), G11605A (M3780I), G 12202T (K3979N), C14318T (T4685I), A14648G (N4795S), C14768T (A4835V), G15243 (M4993I), A15436G (M5058V) C21034 (L6924F), G24000T (S813I), A24402T (K947I), G25440C (K16N), C25528T (L46F), G25555T (V55F), G25855T (D155Y), G26527T (A2V), G27613T (V74F), C27707T (A105V), G28806T (G178V) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.1.28 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C11455T, G28321T sinonim, G15243T (M4993I), C15656T (T5131I), G16558T (A5432S), C25844T (T151I), A26069C (E226A) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.1.181 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; T3268C, C5512T, C10834T, C22624T, G29744T sinonim, C3261T (T999I), G4285T (E1340D), C5691T (A1809V), C20132T (A6623V), C20402T (S6723L), A21076G (T6938A), T23042C (S494P), G25855T (D155Y), C27494T (P34L) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.36 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C6982T, T7148C, C10156T, T22543A, G22801T, C24616T, T25902G sinonim, C593T (H110Y), A63936 (D2043G), G6413A (E2050K), G24751 (L1063F) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.160 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; A21712T sinonim, G19732T (V6490F) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.362 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; G7393T, C16362T, T20037C sinonim, G2117A (G618S), C17211T (L5649F), C21627T (T22I), C25546 (L52F), G25970T & G25971A (W193L) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.469 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C25413T sinonim, A13388G (M4375V), G16795T (V5511L), C24099T (A846V), G24348T (S929I), G28346T (G25S) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.1.7 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C823T, C5002T, C7732T, A9826G, C11173T, C16260T, T16353C, C18084T, T18690C C24109T sinonim, C3045T (P927L), C6354T (S2030L), C16468T (P5402S), C22088T (L176F), G22094A (D178N), G22299A (R246K), C26191T(P267S) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ AY.46 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; G625T (K12N), C15569T (T5102I), G17035T (A5591S) non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ AY.78 soyu için etiketlenmemiş mutasyonu; C21110T (T6949I) non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

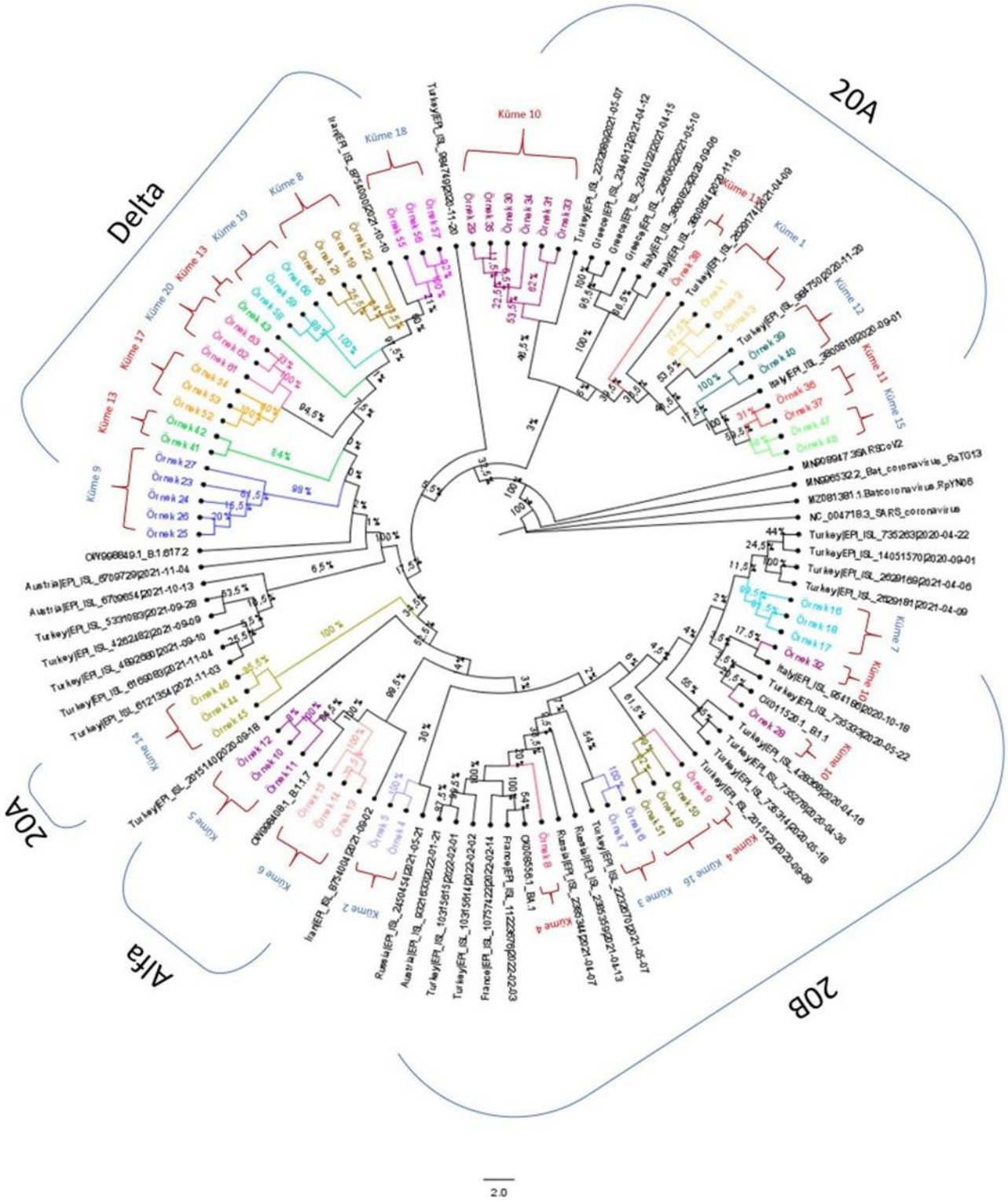
- ✓ AY.126 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C4540T, C6196T, A10657G, T23950C, T24274C, C27131T sinonim, C384T (S40L), A3951G (D1229G), C6701T (L2146F), G7306T (M2347I), C7712T (P2483S), T8149A (N2628K), G9652T (M3129I), C10448T (P3395S), G10835A (V3524I), C17750T (A5829V), G22403C (E281Q), G24124T (K854N), C25613T (SS74F), G25775T (W128L), G27463T (V24F), G29527T (Q418H) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ B.1.617.2 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; G219C, G10138T, C11653T, T12139C, G2445T sinonim, C12513T (T4083M), G19549T (A6429S) ise non sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

- ✓ AY.121 soyu için etiketlenmemiş mutasyonlar; C4999T, T14445A, G16221T, G20469A, G24124A, G28396T, T29164C sinonim, C5093T (H1610Y), G9188T (V2975L), G9584A (V3107I), G10328A (D3355N), G14854A (V4864I), C19859T (A6532V), A21512G (N7083S), G24712T (M1050I), G24872T (V1104L), A29596G (I13M) ise non-sinonim özellikte olup aa değişikliği oluşturmaktaydı.

FİLOGENETİK ANALİZ

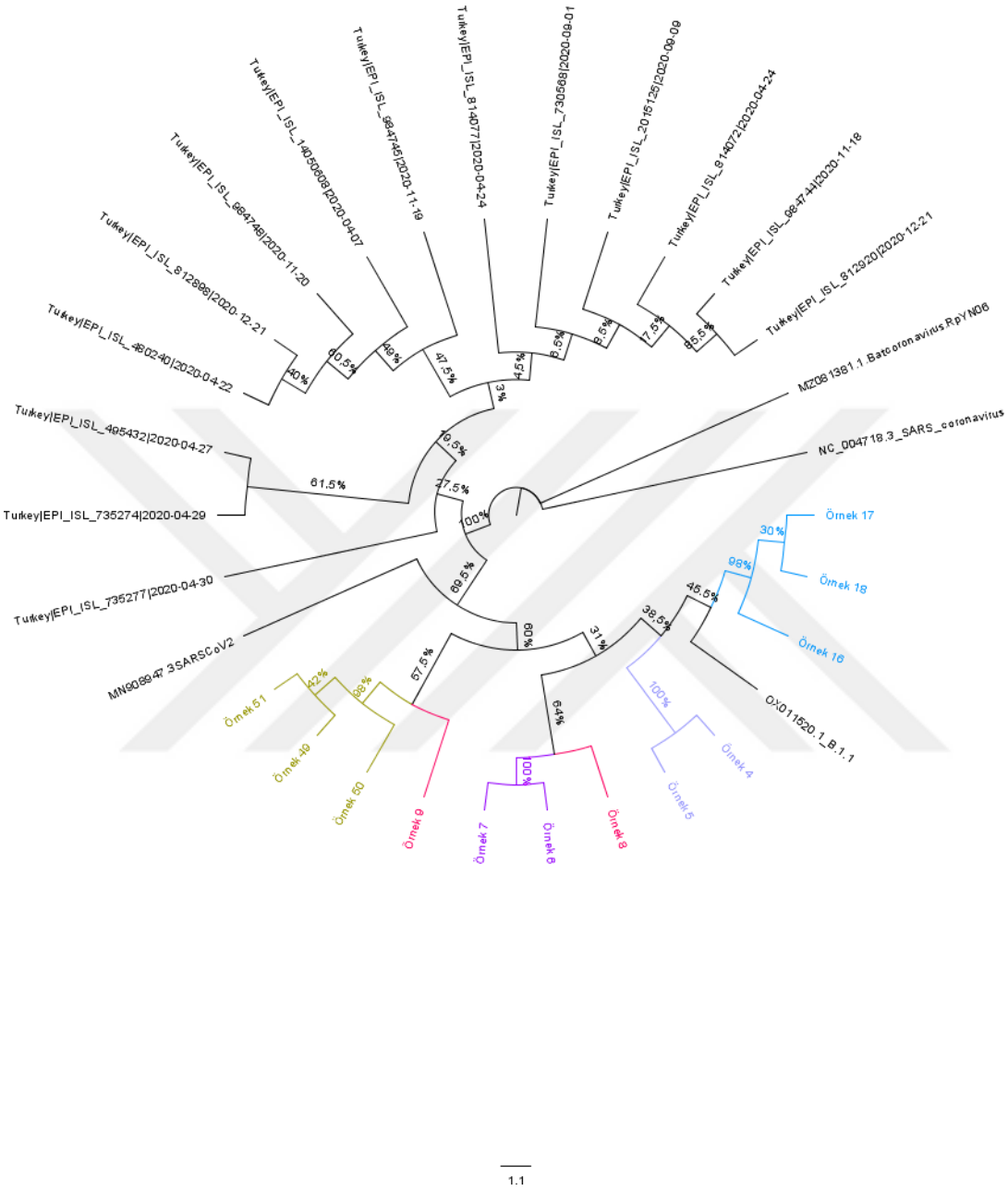
Çalışmaya dahil edilen 63 örneğin konsensus dizileri, GISAID ve GENBANK'tan elde edilen referans ve dış dizilerle hazırlanan küresel dizilerle (Şekil 17) ve sadece Türkiye'den çalışmamız ile uyumlu zaman dilimlerinden seçilen örneklerle hazırlanan dallara (clade) özgü veri setleri kullanılarak "Maximum Likelihood" (ML) metodu ile filogenetik ağaçlar oluşturuldu (Şekil 18-21). Ağaçlar üzerine diziler arasındaki genetik mesafeyi belirten istatistik veriler yüzde olarak gösterildi. Olguların yer aldığı kümeler farklı renklerle temsil edildi.



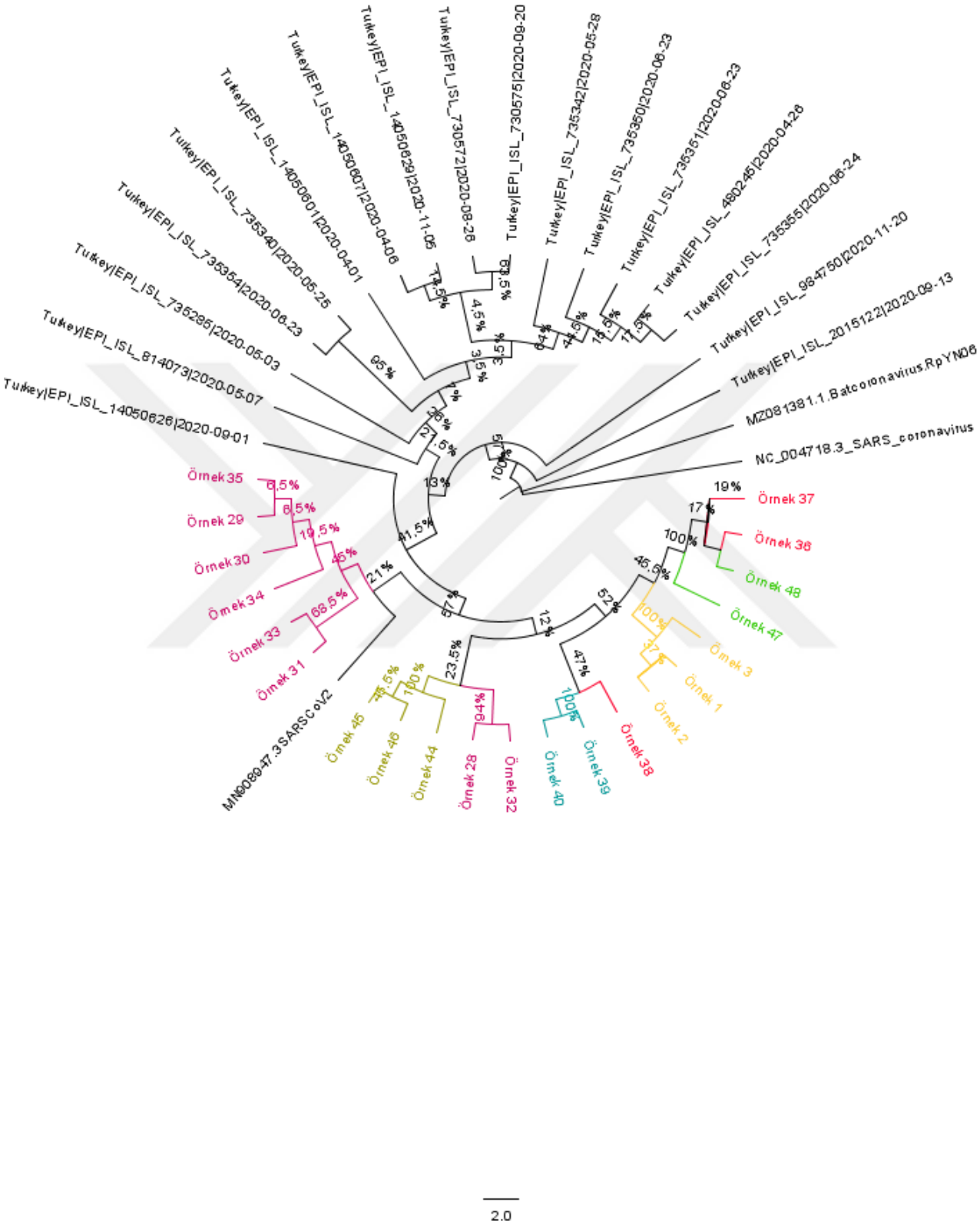
Şekil 17. Küresel diziler kullanılarak maximum likelihood ile filogenetik ağaç

I. Mavi renkli kümeler; örneklerin küme bilgileriyle uyumlu sonuç paylaşanlar

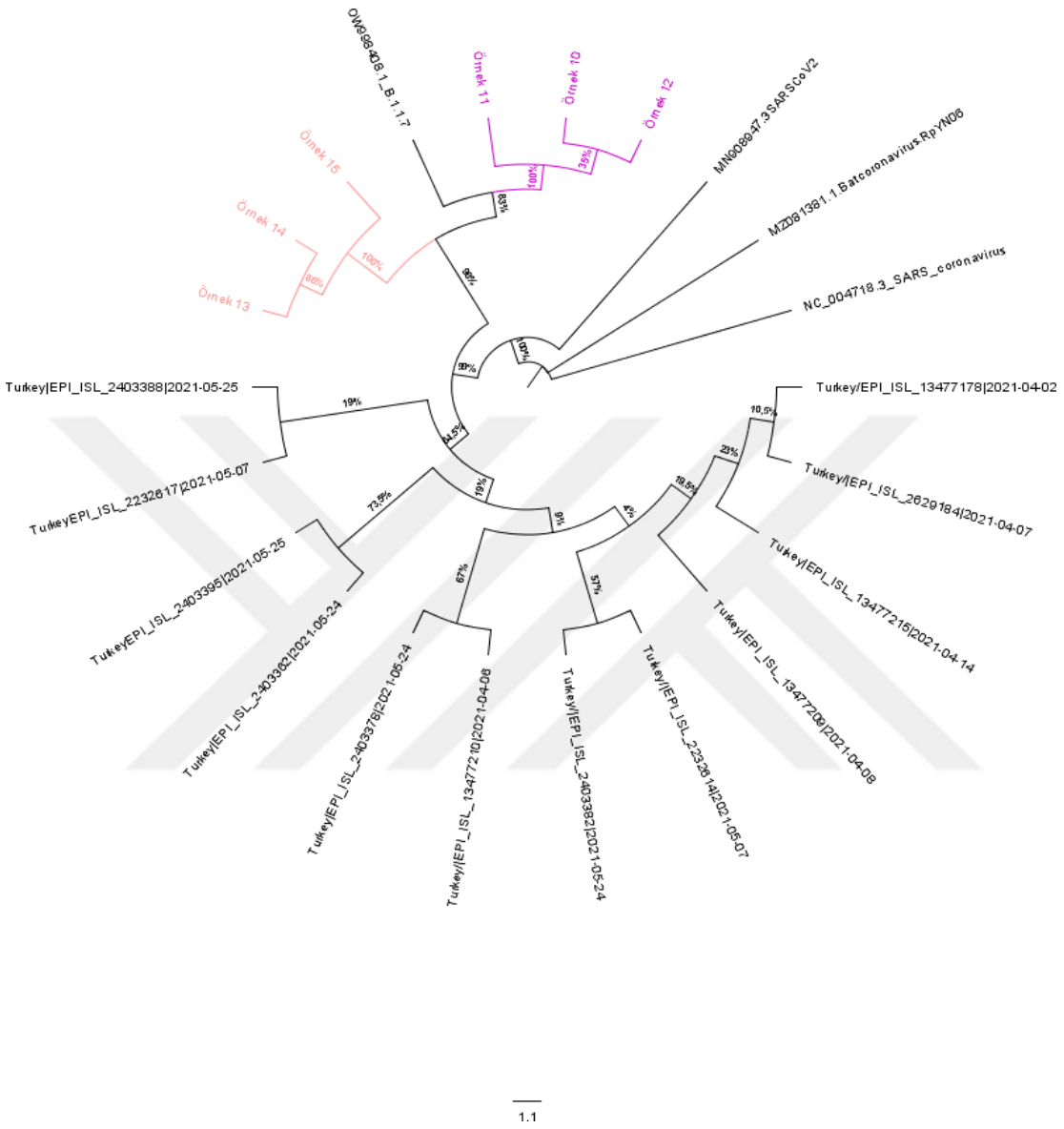
II. Kırmızı renkli kümeler; örneklerinden en az 1'i küme bilgileriyle uyumsuz sonuç paylaşanlar



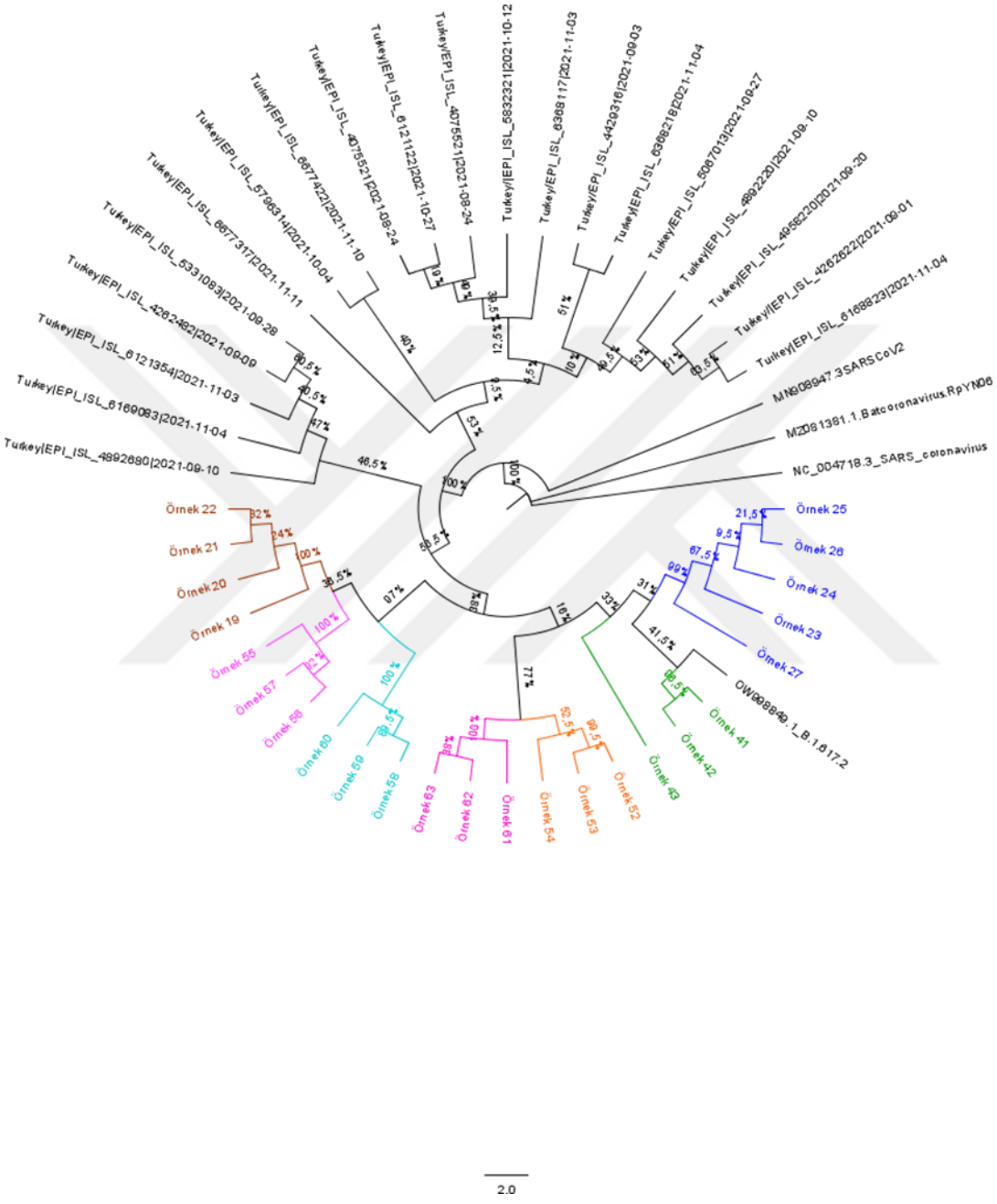
Şekil 18. 20B dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı



Şekil 19. 20A dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı



Şekil 20. Alfa dal (*clade*) üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı



Şekil 21. Delta dal *(clade)* üyelerinin maximum likelihood ile filogenetik ağacı

Kümelerin Analiz Sonuçlarının Bütünü

Küme	Örnek No	Pozitiflik Tarihi	Durum	Tam Genom Analizi	Dal ve Soy Atanmaları	ML Ağaç İlişki-Konum
1	1	4.09.2020	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	2	9.09.2020	Sağlık Çalışanı	2 SNV ?		
	3	10.09.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?		
2	4	9.10.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	5	16.10.2020	Sağlık Çalışanı			
3	6	7.11.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	7	16.11.2020	Sağlık Çalışanı			
4	8	11.11.2020	Sağlık Çalışanı	>2 SNV Fark	Dal ortak, Soy farklı	Farklı konum
	9	12.11.2020	Sağlık Çalışanı			
5	10	20.04.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	11	20.04.2021	Sağlık Çalışanı	3 SNV ?		
	12	22.04.2021	Sağlık Çalışanı	3 SNV ?		
6	13	17.05.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	14	20.05.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	15	25.05.2021	Sağlık Çalışanı	2 SNV Fark		
7	16	3.11.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	17	11.11.2020	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	18	11.11.2020	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
8	19	22.09.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	20	20.09.2021	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	21	23.09.2021	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	22	24.09.2021	Aile Üyesi	1 SNV Fark		
9	23	25.09.2021	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	24	28.09.2021	Aile Üyesi	1 SNV ?		
	25	04.10.2021	Aile Üyesi	1 SNV ?		
	26	25.09.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	27	26.09.2021	Sağlık Çalışanı	1 SNV Fark		
10	28	11.04.2020	Aile Üyesi	1 MNV Fark	Dal ve Soy farklı	Farklı konum
	29	14.04.2020	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	< %75 zayıf
	30	14.04.2020	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri		< %75 zayıf
	31	15.04.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV Fark		< %75 zayıf
	32	19.04.2020	Aile Üyesi	1 MNV Fark	Dal ve Soy farklı	Farklı konum
	33	14.04.2020	Aile Üyesi	1 SNV Fark	Dal ve Soy ortak	< %75 zayıf
	34	15.04.2020	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		< %75 zayıf
	35	16.04.2020	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri		< %75 zayıf
11	36	20.11.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	37	20.11.2020	Sağlık Çalışanı			
	38	25.11.2020	Sağlık Çalışanı	>2 SNV Fark	Dal ortak, Soy farklı	Farklı konum
12	39	3.12.2020	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	>%95 çok güçlü
	40	3.12.2020	Sağlık Çalışanı			
13	41	6.08.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	%75-95 güçlü
	42	7.08.2021	Sağlık Çalışanı	1 SNV Fark		
	43	11.08.2021	Sağlık Çalışanı	>2 SNV Fark	Dal ortak, Soy farklı	Farklı konum
14	44	20.08.2020	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	45	21.08.2020	Aile Üyesi	1 SNV ?		
	46	24.08.2020	Sağlık Çalışanı	1 SNV Fark		
15	47	29.10.2020	Aile Üyesi	1 SNV ?	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	48	1.11.2020	Sağlık Çalışanı			
16	49	30.10.2020	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	50	31.10.2020	Aile Üyesi			
	51	3.11.2020	Aile Üyesi			
17	52	10.09.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	>%95 çok güçlü
	53	17.09.2021	Sağlık Çalışanı			
	54	20.09.2021	Sağlık Çalışanı	>2 SNV Fark		< %75 zayıf
18	55	22.10.2021	Aile Üyesi	1 SNV Fark	Dal ve Soy ortak	>%95 çok güçlü
	56	30.10.2021	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
	57	01.11.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri		
19	58	01.11.2021	Sağlık Çalışanı	2 SNV Fark	Dal ve Soy ortak	> %95 çok güçlü
	59	01.11.2021	Aile Üyesi	2 SNV Fark		
	60	05.11.2021	Aile Üyesi	Ortak nükleotid değişiklikleri		
20	61	10.11.2021	Sağlık Çalışanı	Ortak nükleotid değişiklikleri	Dal ve Soy ortak	>%95 çok güçlü
	62	10.11.2021	Aile Üyesi			
	63	11.11.2021	Aile Üyesi			

Tablo 18. Kümelerin analiz sonuçları özet

Çalışmadaki 20 küme kendi içinde incelendiğinde;

A. Kümesi ile Uyumlu Sonuç Paylaşanlar

1. Tüm Elamanları Ortak Değişiklik Gösteren Kümeler

Sağlık çalışanı ve yüksek riskli temaslılarından oluşan üç kümedeki örneklerin tüm genom analizinde, referans genom esas alındığında, birbirleriyle tamamen benzer nükleotid değişikleri olduğu saptandı. Örnekler kendi kümelerinde aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu kümelerdeki örneklerin çok güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle, kümelerine uygun olarak gruplandığı görüldü (Küme 12, 16, 20).

2. En Az Bir ElEmanı Bir SNV Fark Gösteren Kümeler

Sağlık çalışanı ve yüksek riskli temaslılarından oluşan iki kümedeki örneklerin tüm genom analizinde ortak paylaşılan nükleotid değişikliklerinin yanı sıra birer örnekte diğer küme elamanlarında olmayan bir farklı SNV saptandı. Örnekler kendi kümelerinde aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu iki kümedeki örneklerin çok güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle kendi kümelerine uygun olarak birlikte gruplandığı görüldü. (Küme 8, 18)

3. En Az bir Elemanı İki SNV Farkı Gösteren Kümeler

Sağlık çalışanı ve yüksek-orta riskli temaslılarından oluşan iki kümedeki örneklerin tüm genom analizinde küme içlerinde ortak paylaşılan nükleotid değişikliklerinin yanı sıra bir kümede 2 örnekte ortak olup diğer örnekte olmayan 2 SNV, diğer kümede 1 örnekte olup diğer küme elamanlarında olmayan 2 SNV saptandı. Örnekler kendi kümelerinde aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu iki kümedeki örneklerin çok güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle kendi kümelerine uygun olarak birlikte gruplandığı görüldü. (Küme 6, 19)

4. En Az Bir Elemanı Değerlendirilemeyen SNV'a Sahip Kümeler

a) Ortak Değişiklikler Gösteren Kümeler

- Sağlık çalışanı ve yüksek riskli temaslılarından oluşan dört kümede tüm genom analizinde kümelerdeki örneklerin ortak paylaştığı nükleotid değişikliklerinin yanı sıra

birer örnekte nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için ortak SNV varlığı bulunup bulunmadığı değerlendirilemedi. Örnekler kendi kümelerinde aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu dört kümedeki örneklerin çok güçlü (>%95) bootstrap değerleriyle kendi kümelerine uygun bir arada gruplandığı görüldü. (Küme 2, 3, 7, 15)

- Sağlık çalışanı ve yüksek-orta riskli temaslılarından oluşan kümede tüm genom analizinde kümedeki örneklerin ortak paylaştığı nükleotid değişikliklerinin yanı sıra bir örnekte iki nükleotid değişikliği, başka bir örnekte bir nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için 2 SNV'nun ortak paylaşılıp paylaşılmadığı değerlendirilemedi. Örnekler aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında örneklerin güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplandığı görüldü. (Küme 1)

- Sağlık çalışanı ve yüksek riskli temaslılarından oluşan kümede tüm genom analizinde kümedeki örneklerin ortak paylaştığı nükleotid değişikliklerinin yanı sıra iki örnekte üçer nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için toplamda 4 SNV'nun ortak paylaşılıp paylaşılmadığı net değerlendirilemedi. Örnekler birbirleriyle ortak dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında örneklerin güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplandığı görüldü. (Küme5)

b) En Az Bir Elemanı Bir SNV Farkı Gösteren Kümeler

- Sağlık çalışanı ve yüksek riskli temaslılarından oluşan bir kümede yer alan bir adet örnek, kümedeki ortak nükleotid değişikliklerinin yanı sıra diğerler üyelerden bir SNV fark gösterdi. Ayrıca örneklerin birinin genom analizinde bir nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için söz konusu SNV'nun ortak paylaşılıp paylaşılmadığı değerlendirilemedi. Örnekler aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında tüm örneklerin güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplandığı görüldü. (Küme 14)

- Sağlık çalışanı ve yüksek-orta riskli temaslılarından oluşan bir kümede ortak paylaşılan nükleotid değişikliklerinin yanı sıra bir örnek, diğerlerinden bir SNV fark gösterdi. Üç

örneğin genom analizinde ise birer nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için birer SNV'nun kümede ortak olup olmadığı değerlendirilemedi. Örnekler aynı dal ve soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında örneklerin güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplandığı görüldü. (Küme 9)

5.2 Kümesi ile Uyumsuz Sonuç Verenler

- Sağlık çalışanı ve yüksek-orta riskli temaslılarından oluşan sekiz kişilik bir kümede ortak paylaşılan nükleotid değişiklerinin yanı sıra iki örnek diğer küme elemanlarında olmayan bir SNV farkı ortak olarak paylaşırken, farklı iki örnek diğer küme elemanlarında olmayan bir MNV farkı ortak olarak paylaşmaktaydı. MNV taşıyan örnekler diğer altı örnekten farklı soy ve dala atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu küme iki gruba ayrıldı, altı örnek zayıf (<%75) "bootstrap" değeriyle bir arada gruplanırken, diğer iki örnek uzak yerde konumlandı. (Küme 10)

- Aynı yerde çalışan birbirleriyle ve aynı ortak hasta ile orta riskli teması olan çoklu temas öyküsü bildiren iki sağlık çalışanından oluşan bir kümede genom analizinde örnekler ortak nükleotid değişikliklerinin yanı sıra birbirilerinden >2 SNV fark gösterdi. Örnekler birbirleriyle aynı dala fakat farklı soylara atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında birbirlerinden uzak yerlerde konumlandılar. (Küme 4)

- Aynı yerde çalışan birbirleriyle yüksek-orta riskli, ortak hastalarla orta riskli temas öyküsü olan üç sağlık çalışanından oluşan kümede örneklerin genom analizinde bir örneğin diğerleriyle ortak nükleotid değişikliklerinin yanı sıra >2 SNV farkı taşıdığı tespit edildi. Diğer iki örnek arasında nükleotid değişiklikleri neredeyse tamamen aynıydı, sadece bir nükleotid belirlenemediği (N, bilinmeyen baz) için bir adet SNV'nun ortak paylaşılıp paylaşılmadığı değerlendirilemedi. Örnekler birbirleriyle ortak dala atanırken, >2 SNV farkı taşıyan örnek farklı soya atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu küme iki gruba ayrıldı. >2 SNV farkı taşıyan örnek farklı konumda yer alırken, diğer iki örnek çok güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplandı. (Küme 11)

- Birbirleriyle orta riskli temas öyküsü olan üç sağlık çalışanından oluşan kümede, genom analizinde iki örnek ortak nükleotid değişiklikleri paylaşırken, bir örnekte diğerleriyle ortak nükleotid değişikliklerinin yanı sıra >2 SNV fark saptandı. Örnekler birbirleriyle aynı dal ve soya atandı. ML filogenetik ağacında tamamen ortak değişiklikleri paylaşan iki örnek çok güçlü (>%95) "bootstrap" değerleriyle birlikte gruplanırken, >2 SNV farkı taşıyan örnek diğerlerinin yanında zayıf (<%75) bootstrap değeriyle yer aldı. (Küme 17)

- Aynı yerde çalışan birbirleriyle yüksek-orta riskli temas öyküsü olan üç sağlık çalışanından oluşan kümede bir örnek diğerleriyle ortak nükleotid değişikliklerinin yanı sıra >2 SNV farkı taşırken diğer iki örnek arasında sadece bir SNV fark vardı. Örnekler birbirleriyle aynı dala atanırken, >2 SNV taşıyan örnek diğerlerinde farklı bir soya atandı. Ayrıca ML filogenetik ağacında bu küme iki gruba ayrıldı. Sadece bir SNV fark taşıyan örnekler güçlü (%75-95) "bootstrap" değerleriyle bir arada gruplanırken, >2 SNV taşıyan örnek diğerinden farklı yerde konumladı. (Küme 13)

7.TARTIŞMA

SARS-CoV-2 virüsünün yayılımını sınırlamak için alınan önlemler, KKD kullanımı ve aşı çalışmalarıyla vaka sayıları bir miktar düşürülse de hastaneler, enfekte hastaların yoğun bulunması nedeniyle risk kaynağı olmaktadır. Hastane ve toplum arasındaki arayüzü temsil eden sağlık çalışanlarında bulaşların incelenmesi, potansiyel önleme stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu amaçla virüsün genom verirleri epidemiyolojik verilerle birleştirilerek bulaş dinamiklerini ortaya koymada güçlü kanıtlar elde edilebilir. Bu çalışmada, hastanemizdeki SARS-CoV-2 ile enfekte sağlık çalışanlarının yer aldığı bulaş kümelerinin epidemiyolojik ve genomik araştırmalarla aydınlatılması amaçlanmıştır.

a) Dizi Analizi ve Mutasyonların Değerlendirilmesi

Epidemiyolojik olarak birbirleriyle ilişkili olduğu düşünülen enfekte sağlık çalışanı ve temaslılarından oluşan 28 farklı kümede toplamda 93 nazofaringeal örneğe SARS-CoV-2 tüm genom dizileme uygulandı. Bu örneklerden 63'ünde kaliteli sekans verisi elde edildi. Dışlanan örneklerin çoğu (n:22) Miniseq cihazında dizilenmişti. İki ayrı platformda da analiz edilen örnekler (n:13) ve saklanma süresi üç aydan uzun olan örnekler değerlendirildiğinde Miniseq'e göre Nextseq platformunun baz belirleyememe sorunu yüzdesinin daha düşük olduğu, viral genomun daha büyük bir yüzdesinin daha iyi bir kapsam (coverage) değeriyle okunabildiği görüldü. Bu nedenle uzun saklama süresi sonunda değerlendirilecek örnekler için Nextseq gibi derin okuma yapabilen dizileme cihazlarının tercih edilmesinin analiz kalitesini olumlu yönde etkileybileceği düşünüldü.

Dışlama kriterleri olarak 10x derinlikte kapsam yüzdesi, hedef genom kapsam yüzdesi ve okunamayan baz yüzdesi kullanıldı. Çalışma grubu incelendiğinde 10x derinlikte kapsam değeri olarak %90 ve hedef genom kapsam yüzdesi olarak %80 değerinin altındaki ve üstündeki örneklerin ortalama Ct değerleri, dolayısı ile viral yükleri, birbirinden anlamlı olarak farklı idi ($p<0.001$). Bunlara ek olarak genom kapsam (coverage) değeri de örnekteki viral yükü temsil eden Ct değeriyle kuvvetli ilişkiliydi. (Spearman korelasyon katsayısı $r = 0.52$; $p < 0.001$). Çalışmamızdaki bu bulgular tüm genom dizileme yaklaşımları kullanılırken, Ct değerinin bir ön tarama olarak kullanılabileceği ve düşük Ct değerlerinin (yüksek viral yükün) daha iyi analiz kalitesi göstereceği görüşünü desteklemektedir ([251,252]).

Örneklerden elde edilen sekans bilgisi çalışma sürecindeki genomik çeşitliği ortaya çıkardı. Mutasyonlar, reseptör bağlanma afinitesindeki ve enfektivitedeki değişikleri, kliniğe yansıyacak etkileri ve nötralizasyona direnci tanımlarken, bulaşma olaylarının lehinde veya aleyhinde kanıtlar ortaya çıkararak bulaş ağlarının belirlenmesine katkı sağladı.

İncelenen 63 örnekte, SARS-CoV-2'nin dört farklı dalına ait 14 farklı soy tespit edildi. Zamansal olarak Türkiye'deki SARS-CoV-2 varyantlarının değişimi ile birlikte değerlendirildiğinde, çalışmamızda tespit edilen, Nisan-Aralık 2020'de 20A/B, Nisan-Mayıs 2021'de Alfa, Ağustos-Aralık 2021'de Delta izolatlarının saptanmış olmasının, ülkemizde ilgili tarihlerdeki baskın varyant ile uyumlu olduğu görüldü ([253]).

Örneklerde 180 amino asit değişimine yol açan, 97 eş anlamlı ve 7 kodlamayan nükleotid değişimi saptandı. Tespit edilen mutasyonlardaki baz değişikliklerinin frekansı asimetri göstermekteydi. En sık C>T dönüşüm paterni hakimdi. Bu bulgu, enfekte konakçı hücrede RNA düzenleme işlemlerinin bir sonucu olarak SARS-CoV-2 genomundaki C>T mutasyonlarının daha sık olduğunu bildiren önceki çalışmalar ile uyumluydu ([254,255]).

Mutasyonlar incelendiğinde en sık SNV (n:271) tespit edilirken, dört farklı MNV ve yedi farklı delesyon tanımlandı. Küresel izolatlardaki bilgilere paralel olarak ([256,257]), izolatlarımızda da bu değişiklikler en sık ORF1ab ve *spike* proteinlerinde saptandı. Zarf proteinde (E) ise diğer bölgelerin aksine hiçbir nükleotid değişikliği saptanmadı. Yapılan farklı araştırmalarda SARS-CoV-2 de E gen bölgesinin mutasyonların daha yavaş evrimselleşerek daha az sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir ([258,259]). N gen bölgesi ise ORF 1ab ve S geninden sonra en sık nükleotid değişikliği ile karşılaştığımız gen bölgesiydi. Bu yapısal proteinde, farklı çalışmalarda, bizimle benzer olarak mutasyon oranlarının yüksek olduğu saptanmıştır ([259-261]). Başta S proteini olmak üzere, yapısal proteinler, tanı testleri, ilaçlar ve aşı formülasyonları için önemli hedefler olarak kabul edildiğinden ([262–266]) mutasyonların tanımlanması önemlidir.

Çalışmamızdaki izolatlarda yapısal proteinler içerisinde en sık tespit edilen ve aa değişimine yol açan mutasyonlar, S gen bölgesinde D614G (n:63), E156_R158 del, R158G, T19R, G142D, L452R, P681R, D950N (n:24), M gen bölgesinde I82T (n:24), N gen bölgesinde D377Y (n:26), D63G, R203M, G215C (n:24), R203K, G204R (N:20) idi. Abavisani ve ark.'nın yapısal proteinlerdeki değişimleri inceledikleri analizde ([258]) benzer zaman

dilimlerinde Avrupa'daki nükleotid mutasyonlarının çeşidi ve sıklığı çalışmamızdakiler ile benzerdir.

SARS-CoV-2, GISAID konsorsiyumu tarafından genomlardaki baskın mutasyonlarına göre sekiz ana sınıfa (G, GH, GR, GV, S, V, L ve O) ayrılmıştır. C241T(5'UTR), C3037T(ORF1ab), C14408T (P4715L, ORF1ab), A23403G (D614G, S) kombinasyon mutasyonları G sınıfına, N proteinde ek 28 881–28 883'te (R203K ve G204R) mutasyonu taşıyan örnekler GR sınıfına, ORF3a'da ek Q57H mutasyonu taşıyanlar GH sınıfına karakterize tanımlanır ([267]) Çalışmadaki tüm örneklerde, C241T(5'UTR), C3037T(ORF1ab), C14408T(P4715L, ORF1ab), A23403G (D614G, S) mutasyonlarının kombinasyonu gözlenirken, taşıdıkları ek mutasyonlarla 20 örnek GR, 10 örnek GH sınıfı içinde tanımlanmıştır. En sık görülen dörlü kombinasyon ise Avrupa ve Türkiye izolatlarında sık karşılaşılan mutasyonlar arasındadır ([268–272]).

Çalışmada dikkat çekici sıklığı (çok sık /nadir) olanlar, virusun enfektivitesine, protein yapısı üzerine, nötralizasyona, konak immun yanıt ve kliniğine etkili olabileceği gösterilmiş başta S gen bölgesi olmak üzere yapısal ve yapısal olmayan gen bölgelerinde tanımlanan bazı dikkat çekici mutasyonlar aşağıda detaylı olarak incelenmiş, önemli özellikleri tablo 19 'da özetlenmiştir Ayrıca önemli olabilecek lieteratürde fonksiyonuna rastlanmayan mutasyonalar belirtilmiştir.

Her örnekte gözlemlediğimiz mutasyonlardan biri olan C14408T (P4715L) viral RNA'nın replikasyonundan sorumlu ORF1ab'nin RdRp gen bölgesinde görülen en yaygın mutasyonlardan biridir ([273]). P4715L değişiminin artan sayıda nokta mutasyonuyla ilişkisi gösterilmiş ve bunun bulunduğu genom bölgesinde RNA polimerazın hata düzeltme aktivitesini etkilemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür ([274]). A23403G (D614G) ise, aspartik asidin glisine değişimiyle ACE-2 bağlanmasını kolaylaştırarak artan bulaştırıcılık ve nötralizasyona karşı azalmış duyarlılığa yol açtığı gösterilen küresel olarak en yaygın S proteini mutasyonudur ([129,275,276]). Eskier ve ark.'nın çalışmasında C14408T ve A 23403G mutasyonları ile nsp14'teki hata düzeltme bölgesinde (3'-5' eksonükleaz) saptadığımız C18877T mutasyonunun Türkiye'deki viral sekanslarda artan mutasyon yoğunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ([277,278]).

S glikoproteini incelendiğinde şimdiye kadar tanımlanmış 12 farklı varyantta (Alpha, Beta,

Eta, Epsilon, Iota, Kappa, Delta, Lambda, Gamma, Zeta, Theta ve Omicron) 84 benzersiz mutasyon ve K417N, L452R, S477N, T478K, E484K/Q, N501Y, D614G, P681H/R, Y144-, H69- ve V70- gibi bazı dikkate değer mutasyonlar tanımlanmıştır ([279]). Örneklerimizde *spike* gen bölgesinde 52 varyasyon tespit edilmiş ve 36 'sının aa değişikliği oluşturduğu görülmüştür.

- Alfa varyantında görülen N501Y'nin *spike* ve ACE-2 arasındaki bağlanmayı arttırdığı, H69/V70 delesyonun, sinsityum oluşumunda artışa yol açtığı ve birlikteliklerinin patojenite artışı ile bulaşıcılıkta %43-90 oranında artış yarattığı tespit edilmiştir ([129,280,281]). Y145 delesyonunun ise virüsün antikor bağlanma afinitesini azalttığı ([282]), bir dizi nötralize edici antikora karşı direnç gelişimine neden olduğu ([283]) ortaya konmuştur. Ayrıca yine bu varyantta tanımlanan A570D, T716I, P681H, S982A, D1118H, N501Y mutasyonlarının da yüksek viral yük ile ilişkisi dikkat çekmiştir ([284]).

- Delta varyantında tanımlanan T19R, T478K, P681R ve D950N, reseptöre bağlanma ve replikasyonu artıran, aynı zamanda bağışık yanıttan kaçışa yardımcı olan mutasyonlardır ([285,286]). L452R, S proteininin RBD'ninde yer alan bir mutasyondur ve virüsun HLA ile ilişkili hücresel bağışıklıktan kaçmasını sağlayarak viral enfektivite ve replikasyonun artışına yol açar ([287]). T478K ise L452R mutasyonuyla birlikte viral tutunmayı etkileyerek bulaşı artırabileceği gösterilmiştir ([288]). Aynı zamanda bu iki mutasyon Liu ve ark. 'ının çalışmasında monoklonal ve serum antikor nötralizasyonunu zayıflatan spike mutasyonları arasında gösterilmiştir ([289]). 156-158 delesyonu ise, RBD- ACE-2 etkileşimi arttırırken, E158G ile L452R'nin birlikteliği daha yüksek enfektivite ve nötralizasyondan kaçışı sağlayan önemli mutasyonlar arasında gösterilmiştir ([290,291]).

- Delta ve Alfa varyantlarında tanımlanan P681R/H mutasyonları da furin enzimi tarafından S1/S2 bölgesi bölünmesini etkileyerek füzyonu kolaylaştırdığı, enfektivite ve virülansını arttırdığı gösterilen önemli varyasyonlardır ([292,293]).

- 20A varyantlarında rastladığımız RBD'deki S477N mutasyonunu ise, SARS-CoV-2'nin ACE-2 reseptörüne bağlanma afinitesini artırarak enfektiviteyi arttırdığı,

ayrıca monoklonal antikor direnci yarattığı gösterilen önemli bir mutasyondur. ([289,294])

Çalışmamızda N proteini 28 değişiklik ile, S proteinden sonra 2. en sık varyasyon gösteren yapısal protein idi.

- N proteininde görülen 28 881–28 883'te (GGG>AAC) trinükleotid mutasyonları iki ardışık amino asit değişikliğine R203K ve G204R yol açar. Bu modifikasyonlar Alfa varyantında yüksek yaygınlıkta gözlemlenirken ([295]), viral replikasyonu ve enfektiviteyi artırdığı, düzensiz interferon yanıtına yol açarak konak immün yanıtını etkilediği gösterilmiştir ([296,297]). Alfa varyantında 28280..28282 de D3L (GAT>CTA) MNV ise birçok mutasyonun aksine proteinin stabilitesini arttırarak viral enfektivite üzerinde etkilidir ([298]).

- Delta varyantlarında görülen R203M mutasyonunu ise enfektiviteyi arttırdığı gösterilen önemli N protein varyasyonları arasında yer alır ([299]).

Hem M hem de E proteinleri, düşük mutasyon oranlarıyla yüksek oranda korunmuş bölgelerdir ve bu nedenle COVID-19 enfeksiyonu için önemli tarama testi belirteçleri olarak kullanılır ([300]). Çalışmamızda da E protein bölgesinde hiç varyasyon tespit edilmezken, M bölgesinde aa değişikliği oluşturan sadece üç mutasyon saptanmıştır (A2V, I82T, H155Y). M proteini ayrıca tip I ve III interferon üretimini belirgin şekilde inhibe ettiği için mutasyonların, konakçı hücre ile etkileşimi ve doğal bağışıklık yanıtını etkileyebileceği de düşünülmektedir ([301]).

- 20B varyantında görülen A2V ilk olarak İspanya'dan, Mart 2020'de bildirilmiştir ([302])
- Delta varyantlarında tanımlanan H155Y ilk ABD'de Mart 2020, I82T ise Hindistan'da Haziran 2020 de bildirilmiştir. (55) I82T sıklığı artarak Delta varyantı için baskın tanımlayıcı mutasyonlardan biri haline gelmiş ve viral patojeniteyi artırabileceği gösterilmiştir ([303]).

Yardımcı proteinlerdeki mutasyonların proteinin işlevini olumsuz yönde etkilediği, özellikle ORF3 ve ORF8'de sık mutasyon saptanırken, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF10'un

daha düşük mutasyon oranlarıyla korunduğu gözlemlenmiştir ([304]). Çalışmamızda yardımcı proteinler içinde en sık ORF3a'da en az ORF6 ve ORF10 bölgelerinde mutasyon saptanmıştır.

- ✓ ORF3a konakçı inflamatuar yanıtlarını ortaya çıkaran SARS-CoV-2'deki en büyük yardımcı proteindir ([305]). Buradan kodlanan proteinlerin S proteiniyle etkileşim içinde olması, apoptozu tetiklemesi, TLR, T hücreler üzerinden bağışıklık sistemi sinyal yollarını etkilemesi, virülansı ve muhtemel bağışıklıktan kaçma mekanizmalarını değiştirebilmesi önemli özellikleridir ([306,307]). Bu bölgede yüksek frekansla saptadığımız S26L ve K16N mutasyonlarının protein fonksiyonuna etkisi nötr iken, Q57H ile D155H ve L46F'nin protein yapı üzerinde fonksiyon kaybına yol açabileceği ve virülansı arttırabileceği bildirilmiştir ([306,308]). Saptadığımız MNV'larında biri olan W193L (25970..25971 GG>TA) mutasyonu da bu bölgede yer alır. Ağustos 2020'de ilk İsrailden, bildirilen bu mutasyon ve günümüzde 41 ülkede %0,03 sıklık ile bildirilmiştir ([302]) ancak literatürde fonksiyonuna dair çalışmaya rastlanmamıştır.

- ✓ ORF8 proteini genomda küçük bir bölgeye sahip olsa da enfeksiyon sırasında MHC-I'in baskılanmasına yol açtığı, dolayısıyla antijen sunumunu bozarak immün kaçışa yardım ettiği bildirilmiştir ([309]). İki farklı erken stop kodonu yaratan "Q27*, K68*" mutasyonlarının tüm genomda sadece bu bölgede tanımlanması dikkat çekmektedir. Alfa varyantlarında tanımlanan Q27*, yabanil tip virüse göre sıklıkla daha hafif enfeksiyon tablosuna neden olmakla birlikte enfektivitede artış yaratan yüksek prevalansa sahip bir mutasyon olarak gösterilmiştir ([310-312]). Delta varyantlarında tanımlanan K68* de Q27*'e benzer olarak virüsün enfektivitesinde artışla ilişkilendirilmiştir ([312]). Bu bölgede tanımlanan R52I, Q27* gibi Alfa varyantının baskın tanımlayıcı mutasyonları arasında yer alır ve enfektiviteyi arttıran bir mutasyondur ([302,312]). Delta varyantlarında saptanan D119_F120 delesyonunun ise farklı olarak, ORF8 dimerizasyon yapısını zayıflatarak MHC-1 üzerindeki etkisini azalttığı ve konağın adaptif immun yanıtını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu bölgedeki delesyonların olumlu etkiler yaratabileceği düşünülmüştür ([313])

- ✓ ORF7a proteini, lenfosit antijeni için varsayılan bir bağlanma bölgesi ve bir endoplazmik lokalizasyon sinyali içerir. Bu bölgede en sık saptadığımız T120I mutasyonu ise, proteinlerin endoplazmik retikulum lokalizasyonu için önemli bir yapı

olan ORF7a'nın di-lizin motifi içinde tanımlanmıştır ([314]). 27692..27697 pozisyonunda saptanan F101_L102del (F101-, L102-) delesyonu ise aynı kümede yer alan sadece üç delta örneğinde ortak paylaşılan bir varyasyon olduğu için dikkat çekmektedir. İlk olarak Mart 2020'de İngiltere'den bildirilen ([302]) bu delesyonlar için literatürde henüz fonksiyon tanımlanmamıştır. Benzer olarak ORF7b'de 27876..27877 pozisyonunda TG>GT (C41V) çoklu nükleotid varyasyonları aynı kümede yer alan üç alfa varyantında ortak paylaşılmış ancak bu MNV için de literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Genom üzerinde daha önce tanımlanan delesyonların ve MNV'ların etkileri göz önüne alınırsa bu varyasyonlar üzerinde ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

- ✓ En az varyasyon saptadığımız yardımcı proteinler ise ORF6 ve ORF10'dur. ORF6 proteininin SARS-CoV-2 de güçlü bir interferon antagonisti olarak fonksiyon gösterdiği belirlenmiştir ([85,315]). Bu bölgede saptadığımız tek mutasyon T27346C (Y49H)'dir. GISAID verilerine göre ([316]) bu aa değişikliği Mayıs 2020'de İngiltere'den bildirilmiş, en son Türkiye'nin de dahil olduğu 81 ülkede % 0,04 sıklıkla görülmüş, ancak henüz net bir fonksiyon tanımlanmamıştır. ORF10 bölgesinde saptadığımız tek mutasyon ise 20. kümedeki örneklerde ortak olarak paylaşılan A29596G (I13M)'dir. ORF10 proteinindeki çoğu varyasyon ilk olarak Kuzey Amerika'da rapor edilmiştir. I13M mutasyonuna ise daha önce Yunanistan izolatlarında rastlanmış ve patojenite üzerinde nötr etki gösterdiği ortaya konmuştur. Ancak bu bölgedeki çeşitli tek nokta değişimleri ve birlikte meydana gelen mutasyonların farklı kıtalarda yükselen bir trend haline geldiği ve patojeniteyi etkileyen olumsuz mutasyonları barındırabileceği gösterilmiştir ([317]).

Mutasyonlar aynı zamanda enfeksiyon dinamiğinde klinik tablo ile yakından ilişkili olup prognozu belirleyebilmektedir ([294,318-321]). Özellikle immun yetmezlikli, komorbiditesi olan riskli hasta gruplarıyla çalışan klinik branştaki enfekte sağlık çalışanları ve temaslıları açısından, herhangi bir olumsuz sonuç gelişmeden önce tanı konması ve gerekli tedavilerle sağlık çalışanlarının desteklenmesi önemlidir. Çalışmamızda saptanan ve küresel olarak yüksek frekansta seyreden "C241T, P4715L, D614G, Q57H" mutasyonları ciddi klinik ile ilişkili bulunmuştur ([319,322]). Ancak D614G mutasyonun hastalık şiddeti üzerinde etkili olmadığına dair çelişkili yayınlar da mevcuttur ([323,324]). Bu mutasyonların VOC'lerin bir parçası haline gelmesi, mutasyonların seçilimde önemli rol oynadıklarını ortaya koymaktadır.

Sık görülen mutasyonların yanı sıra örneklerimizde nadir de olsa tanımlanan V1176F (G25088T) mutasyonunun, S glikoprotein afinitesini değiştirerek, hastalık şiddetinde rol oynaması, S194L (C28854T) mutasyonunun enfeksiyon şiddeti ve artmış mortalite oranları ile pozitif korelasyon göstermesi ([294,319,325]), bu varyasyonların hematoloji onkoloji, FTR, ortopedi gibi riskli hasta gruplarıyla çalışan sağlık çalışanlarımızda tanımlanması sebebiyle önemlidir.

COVID-19 da antikor aracılı bağışık yanıta ek olarak, hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinin SARS-CoV-2 proteomu boyunca birden fazla epitopu tanıyarak oluşturdukları bağışık yanıtın SARS-CoV-2 varyantlarına karşı korunma sağlayabileceği gösterilmiştir ([326-328]). Özellikle yapısal proteinler (S, M ve N), T hücre yanıtlarının önemli hedefleridir, ancak ORF3, ORF8, nsp3, nsp4 ve nsp12 de sıklıkla hedeflenir ([57]). Çalışma popülasyonunda HLA tiplendirilmeleriyle beraber bu bölgelerdeki mutasyonların tekrar değerlendirilmesi de önemli katkılar sağlayabilir.

Ayrıca çalışmamızda sekans analizlerinde baskın mutasyonlar arasında olmayan, henüz etiketlenmemiş ve fonksiyonu belirsiz bazı mutasyonlar da tanımlanmıştır. Bunların gelecekte ortaya çıkacak varyantların gelişimine katkıda bulunabilecekleri düşünüldüğünden ileri çalışmalar gereklidir.

Bölge	Aa Değişimi	Özellikler
ORF1ab	P4715L	Genomda mutasyonları tetikleme [277,278],viral enfektivitede artış[329],ciddi hastalık ile ilişki[319,322]
S	T19R	Viral replikasyonu arttışına yardım, bağışıklık sisteminden kaçış [285,286]
	69-70del	Sinsityum oluşumunda artış ,patojenite ve bulaştırıcılıkta artış [178,280,281]
	Y145del	Anikora bağlanma afinetisinde azalma ,nötralize edici antikora karşı direnç [282,283]
	156-158del +E158G	RBD ACE-2 etkileşiminde artma, L452R'i birlikte enfektivitede artış, nötralizasyondan kaçış [290,291]
	L452R	Replikasyon ve enfektivite artış, hücresel bağışıklıktan ve nötralizasyondan kaçış 287[290,291] mAb'a direnç[289], ciddi hastalık ilişkisi[321]
	S477N	ACE2 bağlanmasını kolaylaştırma, enfektivite artış,ciddi hastalık ilişkisi[294], geniş mAB direnci, serum antikor nötralizasyonunda zayıflama[289]
	T478K	Viral replikasyon ile bulaştırıcıkta artış, bağışıklık sisteminden kaçış [285,286,288] mAb'a direnç[289]
	N501Y	ACE-2 bağlanmasını kolaylaştırma, patojenite ve bulaştırıcılıkta artış [178,280,281] yüksek viral yük ilişkisi[284], ciddi hastlık ilişkisi[321]
	A570D	Yüksek viral yük ilişkisi[284]
	D614G	ACE-2 bağlanmasını kolaylaştırma, artan bulaştırıcılık, nötralizasyona karşı azalmış duyarlılık [129,275,276] ,genomda mutasyonları tetikleme [277,278] ,ciddi hastalık ile ilişki [319,320,322]
	P681H	Yüksek viral yük ilişkisi[284], S1-S2 Fürin bölgesine etkiyle füzyonu kolaylaştırma, enfektivite ve virülans arttışı[292,293]
	P681R	Viral replikasyonu arttışına yardım, bağışıklık sisteminden kaçış [285,286]
	T716I	Yüksek viral yük ilişkisi[284]
	D950N	Viral replikasyonu arttışına yardım, bağışıklık sisteminden kaçış[285,286]
	S982A	Yüksek viral yük ilişkisi [284]
	D1118H	Yüksek viral yük ilişkisi [284]
	V1176F	Ciddi hastalık ile ilişki[294,319,320,324]

Bölge	Aa Değişimi	Özellikler
N	D3L	Enfektivite artışına katkı[298]
	P13L	Ciddi hastalık ile ilişkisi[320]
	S194L	Ciddi hastalık ile ilişki[294,319,320,324]
	R203M	Enfektivite artışına katkı[299]
	R203K-G204R	Replikasyon , enfektivite artışı, düzensiz interferon yanıtı ile konak immun yanıtında modülasyon[296,297] ciddi hastalık ile ilişkisi[320]
M	I82T	Viral patojenite artışına katkı[303]
ORF3a	L46F	Protein yapıda fonksiyon kaybı[306-308]
	Q57H	Virülansın artışına katkı, protein yapıda fonksiyon kaybı306-308,ciddi hastalık ile ilişki[319,322]
	D155H	Protein yapıda fonksiyon kaybı[306-308]
ORF8	Q27*	Hafif hastalık ilşikisi, enfektivite artışı [310-312]
	R52I	Enfektivite artışı[312]
	K68*	Enfektivite artışı[312]
	D119-F120del	ORF8 'in MHC-1 üzerinde etkisinin azalması,konağın adaptif immun yanıtının artış[313]

Tablo19. Bazı mutasyonların önemli özellikleri

b. Sağlık Çalışanları ve Bulaş Kümelerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda, enfekte sağlık çalışanlarının yaş ortalaması 34.1 ± 9.3 yıl idi ve büyük kısmı hafif-orta semptomlar bildirdi. Sahu ve ark. sağlık çalışanlarında COVID-19 enfeksiyonu özelliklerini inceleyen 11 çalışmadan derledikleri meta analizde, ciddi veya kritik hastalık insidansının, sağlık çalışanlarında topluma göre önemli ölçüde daha düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu durum tıbbi uzmanlıkları, genç yaşları ve altta yatan önemli hastalıklarının olmaması ile açıklanmıştır ([329]). Çalışmamızda semptomatik olan sağlık çalışanı sayısı daha fazla olsa da Türkiye'den ve farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda sağlık çalışanlarında asemptomatik enfeksiyonların ön planda olduğu bulunmuştur ([330-333]). Bu nedenle sadece semptom temelli önerilerin, asemptomatik bireyleri ve onlardan meydana gelebilecek bulaşı gözden kaçırılabileceği unutulmamalıdır.

Dolaşımdaki SARS-CoV-2 soyunun evrimsel hızı, virüsün bulaşma süresi boyunca biriktirebileceği mutasyon olasılığının belirlenmesinde bir temel olarak düşünülebilir. 2020'den bu yana farklı çalışmalarda SARS-CoV-2'nin Wuhan suşu ve farklı varyantların genel evrim oranının yaklaşık yıllık 24-34, aylık 2-3 bazlık değişikliğe denk geldiği öne sürülmüştür. ([334-336]). Özellikle nazokomiyal sorunları çözmede tek nükleotid polimorfizmi (SNP) düzeyinde analizler yardımcı olmuş, kümeler içindeki bağlantıyı tanımlamak için yaklaşık iki SNP farklılığı varsa birkaç gün veya hafta içinde bağlantılı bulaşı gösterebileceği bildirilmiştir ([337-342]).

Çalışmamızda ilişkili olduğu düşünülen örneklerle oluşturulan 20 küme incelendi. On beş kümenin dizi analizi ile ilişkisi desteklendi. Beş kümede örnekler arasında çok sayıda nükleotid polimorfizim farkı (> 2 SNP) olması, kümede enfeksiyonun farklı kaynaklardan edinilmiş olma olasılığının daha yüksek olduğunu, küme üyeleri arasında doğrudan bulaşın olmadığını düşündürdü. Ayrıca ilişkili düşünülen 15 kümede örneklerin bir arada gruplanmaları, çok sayıda nükleotid polimorfizim farkı (>2 SNV) gösteren örneklerin ise diğer küme elemanlarından farklı dal/soya atanarak filogenetik ağaç üzerinde uzak konumlanmaları bu bulguyu destekledi. Epidemiyolojik analize geri dönüldüğünde ise başlangıçta beş küme içerisinde yer almasına rağmen, analiz sonrası küme dışı kalan sağlık çalışanlarının, hastalarla çoklu temas ya da diğer sağlık çalışanları ile orta riskli temas tanımladığı görüldü.

Dikkat çeken bir diğer bulgu, yaklaşık üç haftalık dönemde enfekte olan, küme 11 ve küme 15'deki ikişer sağlık çalışanının örneklerinin viral genom analizlerinde tamamen ortak mutasyonlar göstermesi ve filogenetik ağaçta birlikte gruplanması idi. Bu bulgu, iki küme arasındaki epidemiyolojik analizin detaylandırılmasının gerekliliğini, olası ortak bir kaynak barındırabilecekleri şüphesini ortaya çıkardı.

Çalışmamıza benzer olarak, salgının başından bu yana epidemiyojik veri ve NGS analizleri, hastane içi kümeleri doğrulamak veya dışlamak için başarıyla kullanmıştır ([343–347]). Ancak bulaşı doğrulamak veya tanımlamak için tüm genom dizileme kullanırken karşılaşılan en büyük zorluk, o anda topluluktaki baskın viral soydaki düşük genetik çeşitliliktir. Bu düşük genetik çeşitlilik ve yüksek enfeksiyon oranları, salgın vakalarını sporadik vakalardan ayırmayı zorlaştırır. Örneğin Meredith ve ark ([340]) yaptığı çalışmada sıfır SNP farklılığına sahip genetik kümelerin %22'si arasında tanımlanabilir bir bağlantı bulunamamıştır. Braun ve ark. da özellikle salgının başlarında SARS-CoV-2 genomunda biriken mutasyonların sayısı düşükken, bulaş ağında iletimi doğrulamak yerine dışlamak için tüm genom analizi kullanımının daha faydalı olacağını bildirmiştir ([348]). Çalışmamızda kümelerin güçlü epidemiyolojik analiz verileri kullanılarak oluşturulması ve küresel ağaç yanında benzer zamanlarda Türkiye'de dolaşımdaki baskın dala (*clade*) ait rastgele diziler ile de çizilen filogenetik ağaçlarda benzer gruplanmalarının görülmesi oluşabilecek bu yanlılığı azaltmaktadır.

Hastane içi salgınlarda primer vakaların yaklaşık %40 oranında belirlenemediği ve belirlenen çoğu primer vakanın ise COVID-19'lu hasta ile teması olmadığı gösterilmiştir ([349]). Bu nedenle SARS-CoV-2 bulaşında ters bulaş olarak tanımlanan topluluk bulaşları öne çıkmaktadır. Farklı çalışmalarda topluluk olarak özellikle hane halkı, olası enfeksiyon kaynağı olarak tanımlanmıştır ([61,348,350,351]). Çalışmamızda sağlık çalışanı ile hane halkı üyelerinin yer aldığı kümelerde örneklerin benzer mutasyonlar göstermeleri ve filogenetik ağaçta birlikte gruplanmaları bulaş ağını desteklemiş ve sağlık çalışanları için hanelerin kaynak olabileceği görüşüyle uyuşmuştur. Bu nedenle aile içi enfekte vaka tespitinin sonrasında takibin dikkatle sürdürülmesi, gerekli izolasyon kurallarına uyulması önemlidir. Ev içinde maskelerin ve dezenfektanların etkili bir şekilde kullanılması, ya da sağlık çalışanları için geçici barınma tesislerinde izolasyon imkânlarının sağlanması bulaşları etkili şekilde azaltabilecek önlemler olarak gösterilmiştir. ([352,353])

Sağlık çalışanları için enfeksiyon bulaşında önemli bir başka kaynak, diğer bir sağlık çalışanıdır ([354,355]). Başta KKD olmak üzere farmasötik olmayan önlemlere uyumdaki eksikliklerin bu tür bulaşmaların nedeni olduğu vurgulanmaktadır ([56,63,356,357]). Çalışmamızda yüksek riski temaslar, sosyal alanlarda, yeme/içme ve soyunma alanlarında gerçekleşmiştir. Uygun KKD'ye rağmen gerçekleşen bulaşlar ise yüksek viral yük ya da ekipmanın çıkarılması sırasında fomitler yoluyla gerçekleşmiş olabilir.

Çalışmamızda kümelenmelerde enfekte olan sağlık çalışanları sıklıkla klinik branşta çalışanlar olsa da bu durum dışlama kriterleri nedeniyle oluşmuş olabilir. Klinik dışı sağlık çalışanlarında diğer personellere göre seroprevelansın yüksek olduğunu söyleyen yayınlar da mecvuttur ([358,359]). Vietnam'daki bir raporda, klinik dışı personel arasında kümelenmelerde farmasötik olmayan önlemlere uyulmamasının nedeni, kişisel koruyucu malzemelerde eğitim eksikliği ve virüs bulaşmasının hafife alınması ([360]) olarak gösterilirken, Türkiye'den bir çalışmada, klinik dışı sağlık çalışanları arasında el hijyenine uyum oranlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir ([361]). Bu açıklamaların tümü klinik dışı sağlık çalışanlarında olası bulaşlar için neden olabilir.

Çalışmamızda genel olarak sağlık çalışanlarının KKD uyumu eksikliklerinin ve fiziksel mesafe kuralına uyulmamasının nedeninin fiziki koşulların uygun olmaması, yetersiz bilgi veya çalışanlardaki yıpranmışlık olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları vardır. İlk olarak, belirlenen kümelerdeki tüm sağlık çalışanları için bulaş ağlarının, viral sekans kalitesi filtrelemeleri nedeniyle incelenememiş olması bir kısıtlılık oluşturmuştur. Hastalar ile sağlık çalışanları arasında çoklu temas olması ve temas bilgilerinin net verilememesi nedeniyle hastalar çalışmaya dahil edilememiştir. Ayrıca temas bildirilenler hariç ilgili birimlerdeki asemptomatik sağlık çalışanları incelenememiş olup, bu nedenle olası küme ile ilgili farklı vakalar gözden kaçmış olabilir. İkinci olarak, incelediğimiz kümelerde sağlık çalışanlarının çok büyük bir kısmı semptom geliştirmiş olsa da bu durum çalışmanın dışlama kriterleri nedeniyle oluşmuş olabilir. Son olarak, vakalar arasında güçlü epidemiyolojik ve genomik ilişkiler olmasına, semptom ve PCR pozitiflik tarihleri ile bulaşların yönüne dayalı tahmin yürütülse de kesinlikten söz edilemez, epidemiyolojik verinin detaylandırılması gereklidir.

Çalışmamız retrospektif bir değerlendirme olduğu için hastanemizde belirlenen süreçte olası bulaşlar için enfeksiyon kontrol önlemleri viral sekans verileri olmadan alınmıştır. Mevcut kanıtlar, hastane içi sağlık çalışanı ilişkili kümelerinin araştırılması için tüm genom analizinin önemini gösterirken, gerçek zamanlı sekans analizi kullanımının rutin işleyişe uydurulamayacağı ve maliyet olarak etkin olamayacağı bildirilmektedir ([98,121]). Ancak bütüncül çalışmalar ile sağlık çalışanlarının dahil olduğu olası bağlantıları doğrulamak, enfeksiyon kontrol önlemlerine kanıt sağlayarak yön verebilir ve bulaşları sınırlandırabilir. Bağlantıları dışlamak ise hastane içi bulaşmayı önlemek için gereksiz karantina uygulanmasını ya da maliyetli kontrol yöntemlerine ilişkin kararları önleyebilir.

8.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, DEÜ Hastanesi'ndeki sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2 bulaş olaylarını anlamada 20 kümede yer alan bireyler, tüm viral genom analizi ile filogenetik ve epidemiyolojik verilerin birlikte kullanılması sayesinde değerlendirildi, olası risk kümeleri belirlendi, bütünsel verinin önemi vurgulandı.

Dolaşan SARS-CoV-2 çeşitliliği ve genomundaki mutasyonlar belirlenerek, bulaş, nötralizasyon ve prognoz açısından kliniğe etkileri değerlendirildi. Korunmuş genom bölgeleri ve varyasyon dağılımı belirlenerek "tanı, aşı-ilaç tasarımı ve tedavi" seçenekleri alanında yerel çalışmalara yararlı olabilecek bilgiler sağlandı.

Sağlık çalışanlarının yer aldığı 15 kümede veriler ile tek kaynak bulaşı desteklenirken, beş kümede çoklu kaynak olabileceği belirlendi. Bulaşların aile içinde, ortak çalışma ve dinlenme alanlarında uygun olmayan KKD kullanımı ve mesafe kurallarına uyulmaması nedeniyle meydana gelebileceği gösterildi. Sağlık çalışanlarında kurallara uyumu arttırmak için eğitimlerin aralıklı tekrarlanmasının ve enfeksiyonun öneminin hatırlatılmasının gerekliliği belirlendi.

- Birden çok kaynaktan eşzamanlı enfeksiyon aktarımı olan durumlarda, bunu önlemek için tasarlanmış kontrol önlemleri alınabilir. Bu amaçla daha sıkı hasta takibi, ziyaretçi kontrolü, enfekte aile üyeleri olan sağlık çalışanları için daha yakın izlem, çalışma kısıtlamaları, vb önlemler kullanılabilir.

- Toplum prevelansı göz önüne alınarak prevelans sürveyansı, olası kümelerde erken izolasyonu kolaylaştırmak için hızlı antijen testleri veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri kullanılarak rutin dışı periyodik sürveyans uygulanabilir.

- Bu periyodik sürveyansa ek olarak genomik sürveyansın da yapılması, hastane ortamında sağlık çalışanlarında hangi virüs soylarının dolaştığını, bulaşı ve nötralizasyonu etkileyebilecek hangi genomik özellikleri taşıdığını, bunların zaman içinde nasıl değiştiğini ortaya koyacak, olası bulaş kümelerinin doğrulanması/dışlanması sağlanacak ve yerinde izolasyon tedbirleriyle hastanede kontrolsüz yayılımların önüne geçilmesine yardımcı olacaktır.

9.KAYNAKÇA

1. Grubaugh ND, Ladner JT, Lemey P, et al. Tracking virus outbreaks in the twenty-first century. Nat Microbiol. 2019;4(1):10-19. doi:10.1038/s41564-018-0296-2

2. Roberts M, Dobson A, Restif O, Wells K. Challenges in modelling the dynamics of infectious diseases at the wildlife–human interface. Epidemics. 2021;37. doi:10.1016/j.epidem.2021.100523

3. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. Trends Microbiol. 2016;24(6):490-502. doi:10.1016/j.tim.2016.03.003

4. Moh Zaki A, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. NEJM.org N Engl J Med. 2012;367:1814-1834. doi:10.1056/NEJMoa1211721

5. Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome. Nat Med. 2004;10(12S):S88-S97. doi:10.1038/nm1143

6. Wang X, Zhou Q, He Y, et al. Nosocomial outbreak of COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. doi:10.1183/13993003.00544-2020

7. Meredith LW, Hamilton WL, Warne B, et al. Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study. Lancet Infect Dis. 2020;20(11):1263-1272. doi:10.1016/S1473-3099(20)30562-4

8. Abbas M, Robalo Nunes T, Martischang R, et al. Nosocomial transmission and outbreaks of coronavirus disease 2019: the need to protect both patients and healthcare workers. Antimicrob Resist Infect Control. 2021;10(1):7. doi:10.1186/s13756-020-00875-7

9. Zheng L, Wang X, Zhou C, et al. Analysis of the Infection Status of Healthcare Workers in Wuhan during the COVID-19 Outbreak: A Cross-sectional Study. Clinical Infectious Diseases. 2020;71(16):2109-2113. doi:10.1093/cid/ciaa588

10. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China JAMA | Original Investigation | CARING FOR THE CRITICALLY ILL PATIENT. JAMA. 2020;323(11):1061-1069. doi:10.1001/jama.2020.1585

11. MMWR. MMWR - Characteristics of Health Care Personnel with COVID-19 — United States, February 12–April 9, 2020.; 2019. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/reporting-pui.html.

12. Livingston E, Bucher K. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Italy. JAMA 2020 Apr 14;323(14):1335. Published online 2020. doi:10.1001/jama.2020.4344

13. Classifying Risk of Worker Exposure to SARS-CoV-2. Accessed April 28, 2022. https://www.osha.gov/coronavirus/hazards

14. Interim Guidance for Managing Healthcare Personnel with SARS-CoV-2 Infection or Exposure to SARS-CoV-2. Accessed April 28, 2022. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/guidance-risk-assesment-hcp.html

15. Reingold A. Outbreak Investigations—A Perspective. Emerg Infect Dis. 1998;4(1):21-27. doi:10.3201/eid0401.980104

16. Alm E, Broberg EK, Connor T, et al. Rapid communication Geographical and temporal distribution of SARS-CoV-2 clades in the. :1. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001410

17. Schaffer K, Lucey M, Macori G, et al. Clinical Infectious Diseases Whole-genome Sequencing to Track Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Transmission in Nosocomial Outbreaks. Clinical Infectious Diseases ®. 2021;72(11):727-762. doi:10.1093/cid/ciaa1433

18. Hodcroft EB, Zuber M, Nadeau S, et al. Spread of a SARS-CoV-2 variant through Europe in the summer of 2020. Nature. 2021;595:707. doi:10.1038/s41586-021-03677-y

19. Lu J, du Plessis L, Liu Z, et al. Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China. Cell. 2020;181(5):997-1003.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.04.023

20. Geoghegan JL, Ren X, Storey M, et al. Genomic epidemiology reveals transmission patterns and dynamics of SARS-CoV-2 in Aotearoa New Zealand. doi:10.1038/s41467-020-20235-8

21. Bashir M, Rockett RJ, Arnott A✉. Revealing COVID-19 transmission in Australia by SARS-CoV-2 genome sequencing and agent-based modeling. Nat Med. doi:10.1038/s41591-020-1000-7

22. Alteri C, Cento V, Piralla A, et al. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 reveals multiple lineages and early spread of SARS-CoV-2 infections in Lombardy, Italy. doi:10.1038/s41467-020-20688-x

23. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. Trends Microbiol. 2017;25(1):35-48. doi:10.1016/j.tim.2016.09.001

24. Graham RL, Baric RS. Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. J Virol. 2010;84(7):3134-3146. doi:10.1128/JVI.01394-09

25. Tyrrell DAJ, Bynoe ML. CULTIVATION OF VIRUSES FROM A HIGH PROPORTION OF PATIENTS WITH COLDS. The Lancet. 1966;287(7428):76-77. doi:10.1016/S0140-6736(66)92364-6

26. Galanopoulos M, Gkeros F, Doukatas A, et al. COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. World J Gastroenterol. 2020;26(31):4579-4588. doi:10.3748/wjg.v26.i31.4579

27. Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. J Virol. 2012;86(7):3995-4008. doi:10.1128/JVI.06540-11

28. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol. 2019;17(3):181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9

29. Ye ZW, Yuan S, Yuen KS, Fung SY, Chan CP, Jin DY. Zoonotic origins of human coronaviruses. Int J Biol Sci. 2020;16(10):1686-1697. doi:10.7150/ijbs.45472

30. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. New England Journal of Medicine. 2012;367(19):1814-1820. doi:10.1056/NEJMoa1211721

31. WHO Eastern Mediterranean Region-MERS situation update, August 2022. Accessed October 7, 2022. https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html

32. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020;382(8):727-733. doi:10.1056/NEJMoa2001017

33. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. J Med Virol. Published online 2020:92. doi:10.1002/jmv.25678

34. Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. doi:10.3390/v12020135

35. Jiang S, Du L, Shi Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. Published online 2020. doi:10.1080/22221751.2020.1723441

36. Deng SQ, Peng HJ. Clinical Medicine Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. J Clin Med. 2020;9(575). doi:10.3390/jcm9020575

37. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020;323(13):1239-1242. doi:10.1001/jama.2020.2648

38. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020;579(7798):265-269. doi:10.1038/S41586-020-2008-3

39. Tang JW, Tambyah PA, Hui DSC. Emergence of a novel coronavirus causing respiratory illness from Wuhan, China. Journal of Infection. 2020;80(3):350-371. doi:10.1016/j.jinf.2020.01.014

40. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. The Lancet. 2020;395(10223):514-523. doi:10.1016/S0140-6736(20)30154-9

41. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. www.thelancet.com. 2020;395:507. doi:10.1016/S0140-6736(20)30211-7

42. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. Eurosurveillance. 2020;25(5). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.200131e

43. World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. Accessed April 28, 2022. https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020.

44. Pinotti F, Domenico L di, Ortega E, et al. Lessons learnt from 288 COVID-19 international cases: importations over time, effect of interventions, underdetection of imported cases. doi:10.1101/2020.02.24.20027326

45. Li J, Lai S, Gao GF, Shi W. The emergence, genomic diversity and global spread of SARS-CoV-2. Nature. 2021;600(7889):408-418. doi:10.1038/s41586-021-04188-6

46. Nadeau SA, Vaughan TG, Scire J, Huisman JS, Stadler T. The origin and early spread of SARS-CoV-2 in Europe. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021;118(9). doi:10.1073/pnas.2012008118

47. T.C. Sağlık Bakanlığı. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü- COVID-19 (SARS-CoV-2 Enfeksiyonu) Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı [İnternet]. Accessed October 10, 2022. https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66337/genel-bilgiler-epidemiyoloji-ve-tani.html

48. WHO-Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Accessed October 3, 2022. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019

49. Worldometer Coronavirüs . Published 2022. Accessed June 9, 2022. https://www.worldometers.info/coronavirus/

50. Kursumovic E, Lennane S, Cook TM. Deaths in healthcare workers due to COVID-19: the need for robust data and analysis. Anaesthesia. 2020;75(8):989-992. doi:10.1111/anae.15116

51. Chou R, Dana T, Buckley DI, Selph S, Fu R, Totten AM. Epidemiology of and Risk Factors for Coronavirus Infection in Health Care Workers. Ann Intern Med. 2020;173(2):120-136. doi:10.7326/M20-1632

52. Shah AS v, Wood R, Gribben C, et al. Risk of hospital admission with coronavirus disease 2019 in healthcare workers and their households: nationwide linkage cohort study. BMJ. Published online October 28, 2020:m3582. doi:10.1136/bmj.m3582

53. The-nCoV Outbreak Joint Field Epidemiology Investigation Team, Li Q. An Outbreak of NCIP (2019-nCoV) Infection in China - Wuhan, Hubei Province, 2019-2020. China CDC Wkly. 2020;2(5):79-80.

54. Petersen E, Hui D, Hamer DH, et al. Li Wenliang, a face to the frontline healthcare worker. The first doctor to notify the emergence of the SARS-CoV-2, (COVID-19), outbreak. International Journal of Infectious Diseases. 2020;93:205-207. doi:10.1016/j.ijid.2020.02.052

55. Nguyen LH, Drew DA, Graham MS, et al. Risk of COVID-19 among front-line health-care workers and the general community: a prospective cohort study. Lancet Public Health. 2020;5(9):e475-e483. doi:10.1016/S2468-2667(20)30164-X

56. Gómez-Ochoa SA, Franco OH, Rojas LZ, et al. COVID-19 in Health-Care Workers: A Living Systematic Review and Meta-Analysis of Prevalence, Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcomes. Am J Epidemiol. 2021;190(1):161-175. doi:10.1093/aje/kwaa191

57. Sahu AK, Amrithanand VT, Mathew R, Aggarwal P, Nayer J, Bhoi S. COVID-19 in health care workers – A systematic review and meta-analysis. Am J Emerg Med. 2020;38(9):1727-1731. doi:10.1016/j.ajem.2020.05.113

58. Müller SA, Wood RR, Hanefeld J, El-Bcheraoui C. Seroprevalence and risk factors of COVID-19 in healthcare workers from 11 African countries: a scoping review and appraisal of existing evidence. Health Policy Plan. 2022;37(4):505-513. doi:10.1093/heapol/czab133

59. Gholami M, Fawad I, Shadan S, et al. COVID-19 and healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Infectious Diseases. 2021;104:335-346. doi:10.1016/j.ijid.2021.01.013

60. Kambhampati AK, O'Halloran AC, Whitaker M, et al. COVID-19–Associated Hospitalizations Among Health Care Personnel — COVID-NET, 13 States, March 1–May 31, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69(43):1576-1583. doi:10.15585/mmwr.mm6943e3

61. Ran L, Chen X, Wang Y, Wu W, Zhang L, Tan X. Risk Factors of Healthcare Workers With Coronavirus Disease 2019: A Retrospective Cohort Study in a Designated Hospital of Wuhan in China. Clinical Infectious Diseases. 2020;71(16):2218-2221. doi:10.1093/cid/ciaa287

62. Victorian Government Victorian Healthcare Worker (Clinical and Non-Clinical) COVID-19 Data: COVID-19 Information and Data Specific to Healthcare Workers. 2021. Accessed September 24,

2022. https://www.coronavirus.vic.gov.au/healthcare-worker-covid-19-data

63. Dzinamarira T, Nkambule SJ, Hlongwa M, et al. Risk Factors for COVID-19 Infection Among Healthcare Workers. A First Report From a Living Systematic Review and meta-Analysis. Saf Health Work. 2022;13(3):263-268. doi:10.1016/j.shaw.2022.04.001

64. Çelebi G, Pişkin N, Çelik Bekleviç A, et al. Specific risk factors for SARS-CoV-2 transmission among health care workers in a university hospital. Am J Infect Control. 2020;48(10):1225-1230. doi:10.1016/j.ajic.2020.07.039

65. Perra N. Non-pharmaceutical interventions during the COVID-19 pandemic: A review. Phys Rep. 2021;913:1-52. doi:10.1016/j.physrep.2021.02.001

66. Richman DD, Whitley RJ, Hayden FJ. Clinical Virology. ASM Press; 2016. doi:10.1128/9781555819439

67. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1967;57(4):933-940. doi:10.1073/pnas.57.4.933

68. Rehman S ur, Shafique L, Ihsan A, Liu Q. Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2. Pathogens. 2020;9(3):240. doi:10.3390/pathogens9030240

69. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol. doi:10.1038/s41564-020-0695-z

70. Andersen KG, Rambaut A, Ian Lipkin W, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med. doi:10.1038/s41591-020-0820-9

71. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7

72. Lytras S, Hughes J, Martin D, et al. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination. Genome Biol Evol. 2022;14(2). doi:10.1093/gbe/evac018

73. Zhou H, Chen X, Hu T, et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein. Current Biology. 2020;30(11):2196-2203.e3. doi:10.1016/j.cub.2020.05.023

74. Hu D, Zhu C, Ai L, et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):1-10. doi:10.1038/s41426-018-0155-5

75. Zhou H, Ji J, Chen X, et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. Cell. 2021;184(17):4380-4391.e14. doi:10.1016/j.cell.2021.06.008

76. Li L li, Wang J lin, Ma X hua, et al. A novel SARS-CoV-2 related coronavirus with complex recombination isolated from bats in Yunnan province, China. Emerg Microbes Infect. 2021;10(1):1683-1690. doi:10.1080/22221751.2021.1964925

77. Zhao J, Cui W, Tian B ping. The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2. Front Microbiol. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.580137

78. Xiao K, Zhai J, Feng Y, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan

pangolins. Nature. 2020;583(7815):286-289. doi:10.1038/s41586-020-2313-x

79. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. Infection, Genetics and Evolution. 2020;85. doi:10.1016/j.meegid.2020.104502

80. Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. The Lancet. 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8

81. Kumar R, Verma H, Singhvi N, et al. Comparative Genomic Analysis of Rapidly Evolving SARS-CoV-2 Reveals Mosaic Pattern of Phylogeographical Distribution. mSystems. 2020;5(4). doi:10.1128/mSystems.00505-20

82. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):26. doi:10.1038/s41392-022-00884-5

83. Yadav R, Chaudhary JK, Jain N, et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. Cells. 2021;10(4):821. doi:10.3390/cells10040821

84. Bai C, Zhong Q, Gao GF. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. Sci China Life Sci. 2022;65(2):280-294. doi:10.1007/s11427-021-1964-4

85. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. Front Immunol. 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.708264

86. Choi B, Choudhary MC, Regan J, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. New England Journal of Medicine. 2020;383(23):2291-2293. doi:10.1056/NEJMc2031364

87. Mistry P, Barmania F, Mellet J, et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. Front Immunol. 2022;12. doi:10.3389/fimmu.2021.809244

88. Bakhshandeh B, Jahanafrooz Z, Abbasi A, et al. Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. Microb Pathog. 2021;154:104831. doi:10.1016/j.micpath.2021.104831

89. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends Immunol. 2020;41(12):1100-1115. doi:10.1016/j.it.2020.10.004

90. Beyerstedt S, Casaro EB, Rangel ÉB. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2021;40(5):905-919. doi:10.1007/s10096-020-04138-6

91. Torres Acosta MA, Singer BD. Pathogenesis of COVID-19-induced ARDS: implications for an ageing population. European Respiratory Journal. 2020;56(3):2002049. doi:10.1183/13993003.02049-2020

92. Garg S, Kim L, Whitaker M, et al. Hospitalization Rates and Characteristics of Patients Hospitalized with Laboratory-Confirmed Coronavirus Disease 2019 — COVID-NET, 14 States, March 1–30, 2020. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69(15):458-464. doi:10.15585/mmwr.mm6915e3

93. Deng Y, Liu W, Liu K, et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. Chin Med J (Engl). 2020;133(11):1261-1267.

doi:10.1097/CM9.0000000000000824

94. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. Immunity. 2020;52(6):910-941. doi:10.1016/j.immuni.2020.05.002

95. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. Nat Rev Immunol. 2020;20(6):363-374. doi:10.1038/s41577-020-0311-8

96. Darif D, Hammi I, Kihel A, el Idrissi Saik I, Guessous F, Akarid K. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? Microb Pathog. 2021;153:104799. doi:10.1016/j.micpath.2021.104799

97. Costela-Ruiz VJ, Illescas-Montes R, Puerta-Puerta JM, Ruiz C, Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2020;54:62-75. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.06.001

98. Hu G, Christman JW. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. Front Immunol. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.02275

99. Liu PP, Blet A, Smyth D, Li H. The Science Underlying COVID-19. Circulation. 2020;142(1):68-78. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549

100. Abou-Ismail MY, Diamond A, Kapoor S, Arafah Y, Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. Thromb Res. 2020;194:101-115. doi:10.1016/j.thromres.2020.06.029

101. Xu L, Liu J, Lu M, Yang D, Zheng X. Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. Liver International. 2020;40(5):998-1004. doi:10.1111/liv.14435

102. Natassia Vianna B, Noele Gurgel D, Maria Beatriz Maia R, et al. Covid-19: Gastroenterology Perspectives. Journal of Clinical Gastroenterology and Treatment. 2020;6(1). doi:10.23937/2469-584X/1510075

103. Asadi-Pooya AA, Simani L. Central nervous system manifestations of COVID-19: A systematic review. J Neurol Sci. 2020;413:116832. doi:10.1016/j.jns.2020.116832

104. Wu Y, Xu X, Chen Z, et al. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. Brain Behav Immun. 2020;87:18-22. doi:10.1016/J.BBI.2020.03.031

105. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host–Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. ACS Chem Neurosci. 2020;11(7):995-998. doi:10.1021/acschemneuro.0c00122

106. Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: a storm is raging. Journal of Clinical Investigation. 2020;130(5):2202-2205. doi:10.1172/JCI137647

107. Yuen KS, Ye ZW, Fung SY, Chan CP, Jin DY. SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions. Cell Biosci. 2020;10(1):40. doi:10.1186/s13578-020-00404-4

108. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. Clin Rheumatol. 2020;39(7):2085-2094. doi:10.1007/s10067-020-05190-5

109. Yang L, Xie X, Tu Z, Fu J, Xu D, Zhou Y. The signal pathways and treatment of cytokine storm

in COVID-19. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):255. doi:10.1038/s41392-021-00679-0

110. World Health Organisation. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions [Internet]. . Accessed September 24, 2022. https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions.

111. Mondelli MU, Colaneri M, Seminari EM, Baldanti F, Bruno R. Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. Lancet Infect Dis. 2021;21(5):e112. doi:10.1016/S1473-3099(20)30678-2

112. Young BE, Ong SWX, Kalimuddin S, et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. JAMA. 2020;323(15):1488. doi:10.1001/jama.2020.3204

113. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. Ann Intern Med. 2020;172(9):577-582. doi:10.7326/M20-0504

114. Linton N, Kobayashi T, Yang Y, et al. Incubation Period and Other Epidemiological Characteristics of 2019 Novel Coronavirus Infections with Right Truncation: A Statistical Analysis of Publicly Available Case Data. J Clin Med. 2020;9(2):538. doi:10.3390/jcm9020538

115. Centers for Disease Control and Prevention Symptoms of coronavirus. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Accessed October 7, 2022. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html

116. Sun P, Qie S, Liu Z, Ren J, Li K, Xi J. Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: A single arm meta-analysis. J Med Virol. 2020;92(6):612-617. doi:10.1002/jmv.25735

117. Dawson P, Rabold EM, Laws RL, et al. Loss of Taste and Smell as Distinguishing Symptoms of Coronavirus Disease 2019. Clinical Infectious Diseases. 2021;72(4):682-685. doi:10.1093/cid/ciaa799

118. Akinbami LJ, Petersen LR, Sami S, et al. Coronavirus Disease 2019 Symptoms and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antibody Positivity in a Large Survey of First Responders and Healthcare Personnel, May–July 2020. Clinical Infectious Diseases. 2021;73(3):e822-e825. doi:10.1093/cid/ciab080

119. Cohen PA, Hall LE, John JN, Rapoport AB. The Early Natural History of SARS-CoV-2 Infection. Mayo Clin Proc. 2020;95(6):1124-1126. doi:10.1016/j.mayocp.2020.04.010

120. Eberhardt KA, Meyer-Schwickerath C, Heger E, et al. RNAemia Corresponds to Disease Severity and Antibody Response in Hospitalized COVID-19 Patients. Viruses. 2020;12(9):1045. doi:10.3390/v12091045

121. Li Y, Schneider AM, Mehta A, et al. SARS-CoV-2 viremia is associated with distinct proteomic pathways and predicts COVID-19 outcomes. Journal of Clinical Investigation. 2021;131(13). doi:10.1172/JCI148635

122. Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. Lancet Respir Med. 2020;8(5):475-481. doi:10.1016/S2213-2600(20)30079-5

123. Cevik M, Bamford CGG, Ho A. COVID-19 pandemic—a focused review for clinicians. Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(7):842-847. doi:10.1016/j.cmi.2020.04.023

124. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. Postgrad Med J. 2021;97(1147):312-320. doi:10.1136/postgradmedj-2020-138577

125. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2—What Do They Mean? JAMA. 2021;325(6):529. doi:10.1001/jama.2020.27124

126. Moeller NH, Shi K, Demir Ö, et al. Structure and dynamics of SARS-CoV-2 proofreading exoribonuclease ExoN. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022;119(9). doi:10.1073/pnas.2106379119

127. Yan L, Yang Y, Li M, et al. Coupling of N7-methyltransferase and 3'-5' exoribonuclease with SARS-CoV-2 polymerase reveals mechanisms for capping and proofreading. Cell. 2021;184(13):3474-3485.e11. doi:10.1016/j.cell.2021.05.033

128. Fernandes Q, Inchakalody VP, Merhi M, et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. Ann Med. 2022;54(1):524-540. doi:10.1080/07853890.2022.2031274

129. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. Cell. 2020;182(4):812-827.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.06.043

130. Tracking SARS-CoV-2 variants; WHO. Published 2021. https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/.

131. COVID-19: SARS-CoV-2 variant classifications and definitions; CDC. Published 2021. Accessed June 6, 2022. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html

132. Mahase E. Covid-19: What have we learnt about the new variant in the UK? BMJ. Published online December 23, 2020:m4944. doi:10.1136/bmj.m4944

133. Wise J. Covid-19: New coronavirus variant is identified in UK. BMJ. Published online December 16, 2020:m4857. doi:10.1136/bmj.m4857

134. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. Science (1979). 2021;372(6544):815-821. doi:10.1126/science.abh2644

135. Singh J, Rahman SA, Ehtesham NZ, Hira S, Hasnain SE. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. Nat Med. 2021;27(7):1131-1133. doi:10.1038/s41591-021-01397-4

136. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. Nature. 2021;592(7854):438-443. doi:10.1038/s41586-021-03402-9

137. del Rio C, Omer SB, Malani PN. Winter of Omicron—The Evolving COVID-19 Pandemic. JAMA. 2022;327(4):319. doi:10.1001/jama.2021.24315

138. WHO-Tracking SARS-CoV-2 variants. Accessed September 26, 2022. https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants

139. GISAID . CoVariants Shared Mutations. Accessed October 1, 2022. https://covariants.org/shared-mutations

140. Kandeel M, Mohamed MEM, Abd El-Lateef HM, Venugopala KN, El-Beltagi HS. Omicron variant genome evolution and phylogenetics. J Med Virol. 2022;94(4):1627-1632. doi:10.1002/jmv.27515

141. Overview of Variants/Mutations. Accessed January 23, 2023. https://covariants.org/variants

142. Cao Y, Wang J, Jian F, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. Nature. 2022;602(7898):657-663. doi:10.1038/s41586-021-04385-3

143. Dejnirattisai W, Shaw RH, Supasa P, et al. Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B.1.1.529 variant by post-immunisation serum. The Lancet. 2022;399(10321):234-236. doi:10.1016/S0140-6736(21)02844-0

144. Burki TK. Omicron variant and booster COVID-19 vaccines. Lancet Respir Med. 2022;10(2):e17. doi:10.1016/S2213-2600(21)00559-2

145. Liu J, Chandrashekar A, Sellers D, et al. Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. Nature. 2022;603(7901):493-496. doi:10.1038/s41586-022-04465-y

146. Bojkova D, Widera M, Ciesek S, Wass MN, Michaelis M, Cinatl J. Reduced interferon antagonism but similar drug sensitivity in Omicron variant compared to Delta variant of SARS-CoV-2 isolates. Cell Res. 2022;32(3):319-321. doi:10.1038/s41422-022-00619-9

147. McMahan K, Giffin V, Tostanoski LH, et al. Reduced pathogenicity of the SARS-CoV-2 omicron variant in hamsters. Med. 2022;3(4):262-268.e4. doi:10.1016/j.medj.2022.03.004

148. Meng B, Abdullahi A, Ferreira IATM, et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. Nature. 2022;603(7902):706-714. doi:10.1038/s41586-022-04474-x

149. Us-FDA. Vitro diagnostics EUAs. US Food & Drug Administration; 2021. Accessed May 12, 2022. https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas

150. Christensen BB, Azar MM, Turbett SE. Laboratory Diagnosis for SARS-CoV-2 Infection. Infect Dis Clin North Am. 2022;36(2):327-347. doi:10.1016/j.idc.2022.02.002

151. van den Borst B, Peters JB, Brink M, et al. Comprehensive Health Assessment 3 Months After Recovery From Acute Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Infectious Diseases. 2021;73(5):e1089-e1098. doi:10.1093/cid/ciaa1750

152. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. New England Journal of Medicine. 2020;382(12):1177-1179. doi:10.1056/NEJMc2001737

153. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature. 2020;581(7809):465-469. doi:10.1038/s41586-020-2196-x

154. Wang Q jing, Yao Y zhen, Song J shuai, et al. Kinetic changes in virology, specific antibody response and imaging during the clinical course of COVID-19: a descriptive study. BMC Infect Dis. 2020;20(1):818. doi:10.1186/s12879-020-05549-8

155. Nussenblatt V, Roder AE, Das S, et al. Yearlong COVID-19 Infection Reveals Within-Host

Evolution of SARS-CoV-2 in a Patient With B-Cell Depletion. J Infect Dis. 2022;225(7):1118-1123. doi:10.1093/infdis/jiab622

156. WHO. Interim Guidance “Diagnostic Testing for SARS-CoV-2.” Accessed October 14, 2022. https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2

157. Zacharioudakis IM, Prasad PJ, Zervou FN, et al. Association of SARS-CoV-2 Genomic Load with Outcomes in Patients with COVID-19. Ann Am Thorac Soc. 2021;18(5):900-903. doi:10.1513/AnnalsATS.202008-931RL

158. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nat Med. 2020;26(5):672-675. doi:10.1038/s41591-020-0869-5

159. Zhou R, Li F, Chen F, et al. Viral dynamics in asymptomatic patients with COVID-19. International Journal of Infectious Diseases. 2020;96:288-290. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.030

160. Xu K, Chen Y, Yuan J, et al. Factors Associated With Prolonged Viral RNA Shedding in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Clinical Infectious Diseases. 2020;71(15):799-806. doi:10.1093/cid/ciaa351

161. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. Lancet Infect Dis. 2020;20(4):411-412. doi:10.1016/S1473-3099(20)30113-4

162. Wang W, Xu Y, Gao R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. Published online March 11, 2020. doi:10.1001/jama.2020.3786

163. Colavita F, Lapa D, Carletti F, et al. SARS-CoV-2 Isolation From Ocular Secretions of a Patient With COVID-19 in Italy With Prolonged Viral RNA Detection. Ann Intern Med. 2020;173(3):242-243. doi:10.7326/M20-1176

164. Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). J Med Virol. 2020;92(7):699-702. doi:10.1002/jmv.25915

165. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing. CDC. Published July 15, 2022. Accessed October 11, 2022. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html

166. Smyrlaki I, Ekman M, Lentini A, et al. Massive and rapid COVID-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR. Nat Commun. 2020;11(1):4812. doi:10.1038/s41467-020-18611-5

167. Yang Y, Yang M, Yuan J, et al. Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of SARS-CoV-2 Infection. The Innovation. 2020;1(3):100061. doi:10.1016/j.xinn.2020.100061

168. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2021;21(9):1233-1245. doi:10.1016/S1473-3099(21)00146-8

169. Sakanashi D, Asai N, Nakamura A, et al. Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. Journal of Infection and Chemotherapy. 2021;27(1):126-129. doi:10.1016/j.jiac.2020.09.027

170. la Marca A, Capuzzo M, Paglia T, Roli L, Trenti T, Nelson SM. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays.

Reprod Biomed Online. 2020;41(3):483-499. doi:10.1016/j.rbmo.2020.06.001

171. Mardian Y, Kosasih H, Karyana M, Neal A, Lau CY. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. Front Med (Lausanne). 2021;8. doi:10.3389/fmed.2021.615099

172. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Eurosurveillance. 2020;25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045

173. Böger B, Fachi MM, Vilhena RO, Cobre AF, Tonin FS, Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. Am J Infect Control. 2021;49(1):21-29. doi:10.1016/j.ajic.2020.07.011

174. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). JAMA. 2020;324(8):782. doi:10.1001/jama.2020.12839

175. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. Expert Rev Mol Diagn. 2020;20(5):453-454. doi:10.1080/14737159.2020.1757437

176. Genetic Variants of SARS-CoV-2 May Lead to False Negative Results with Molecular Tests for Detection of SARS-CoV-2 - Letter to Clinical Laboratory Staff and Healthcare Providers. US Food and Drug Administration. Published 2021. Accessed October 17, 2022. : https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/genetic-variants-sars-cov-2-may-lead-false-negativeresults-molecular-tests-detection-sars-cov-2

177. Erster O, Beth-Din A, Asraf H, et al. SPECIFIC DETECTION OF SARS-COV-2 B.1.1.529 (OMICRON) VARIANT BY FOUR RT-qPCR DIFFERENTIAL ASSAYS. medRxiv. Published online 2021. doi:10.1101/2021.12.07.21267293

178. Volz E, Mishra S, Chand M, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. Nature. 2021;593(7858):266-269. doi:10.1038/s41586-021-03470-x

179. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. J Med Virol. 2020;92(10):1755-1756. doi:10.1002/jmv.25855

180. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. Ann Intern Med. 2020;173(4):262-267. doi:10.7326/M20-1495

181. Visseaux B, le Hingrat Q, Collin G, et al. Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, the First Rapid Multiplex PCR Commercial Assay for SARS-CoV-2 Detection. J Clin Microbiol. 2020;58(8). doi:10.1128/JCM.00630-20

182. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020;323(22):2249. doi:10.1001/jama.2020.8259

183. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. Nat Rev Genet. 2019;20(6):341-355. doi:10.1038/s41576-019-0113-7

184. Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral Quasispecies Evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2012;76(2):159-216. doi:10.1128/MMBR.05023-11

185. Pacific Biosciencies. COVID-19 sequencing tools and resources. Published 2020. Accessed

May 26, 2022. https://www.pacb.com/research-focus/microbiology/public-health/covid-19-sequencing-tools-and-resources/

186. Campos GS, Sardi SI, Falcao MB, et al. Ion torrent-based nasopharyngeal swab metatranscriptomics in COVID-19. J Virol Methods. 2020;282:113888. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113888

187. Oxford Nanopore Technologies. Nanopore sequencing the SARS-CoV-2 genome: introduction to protocol. March 8 2020. Published March 8, 2020. Accessed May 26, 2022. https://nanoporetech.com/resource-centre/nanopore-sequencing-sars-cov-2-genome-introduction-protocol

188. Pillay S, Giandhari J, Tegally H, et al. Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. Genes (Basel). 2020;11(8):949. doi:10.3390/genes11080949

189. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science (1979). 1988;239(4839):487-491. doi:10.1126/science.2448875

190. Chen B, Jiang Y, Cao X, Liu C, Zhang N, Shi D. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. Clinica Chimica Acta. 2021;517:156-161. doi:10.1016/j.cca.2021.02.008

191. Suo T, Liu X, Feng J, et al. ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1259-1268. doi:10.1080/22221751.2020.1772678

192. Tan SYH, Kwek SYM, Low H, Pang YLJ. Absolute quantification of SARS-CoV-2 with Clarity PlusTM digital PCR. Methods. 2022;201:26-33. doi:10.1016/j.ymeth.2021.07.005

193. Perchetti GA, Zhu H, Mills MG, et al. Specific allelic discrimination of N501Y and other SARS-CoV-2 mutations by ddPCR detects B.1.1.7 lineage in Washington State. J Med Virol. 2021;93(10):5931-5941. doi:10.1002/jmv.27155

194. Heijnen L, Elsinga G, de Graaf M, Molenkamp R, Koopmans MPG, Medema G. Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater. Science of The Total Environment. 2021;799:149456. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.149456

195. Nyaruaba R, Mwaliko C, Dobnik D, et al. Digital PCR Applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 Era: a Roadmap for Future Outbreaks. Clin Microbiol Rev. 2022;35(3). doi:10.1128/cmr.00168-21

196. Filchakova O, Dossym D, Ilyas A, Kuanysheva T, Abdizhamil A, Bukasov R. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. Talanta. 2022;244:123409. doi:10.1016/j.talanta.2022.123409

197. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. Med Hypotheses. 2020;141:109786. doi:10.1016/j.mehy.2020.109786

198. Wu X, Chen Q, Li J, Liu Z. Diagnostic techniques for COVID-19: A mini-review. J Virol Methods. 2022;301:114437. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114437

199. Wang M, Zhang R, Li J. CRISPR/cas systems redefine nucleic acid detection: Principles and methods. Biosens Bioelectron. 2020;165:112430. doi:10.1016/j.bios.2020.112430

200. Temel A, Ateş A, Eraç B. Microbiological Diagnostic Methods in COVID-19 Pandemic. Turk

Mikrobiyol Cemiy Derg. Published online 2021. doi:10.5222/TMCD.2021.47550

201. Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science (1979). 2017;356(6336):438-442. doi:10.1126/science.aam9321

202. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. Nat Biotechnol. 2020;38(7):870-874. doi:10.1038/s41587-020-0513-4

203. Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. Cell. 2021;184(2):323-333.e9. doi:10.1016/j.cell.2020.12.001

204. Hou T, Zeng W, Yang M, et al. Development and evaluation of a rapid CRISPR-based diagnostic for COVID-19. PLoS Pathog. 2020;16(8):e1008705. doi:10.1371/journal.ppat.1008705

205. Centers for Disease Control and Prevention. Overview of testing for SARS-CoV-2 (COVID-19) 2020. Accessed September 26, 2022. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html

206. Li K, Huang B, Wu M, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. Nat Commun. 2020;11(1):6044. doi:10.1038/s41467-020-19943-y

207. Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. Clinica Chimica Acta. 2020;507:164-166. doi:10.1016/j.cca.2020.04.026

208. Roda A, Cavalera S, di Nardo F, et al. Dual lateral flow optical/chemiluminescence immunosensors for the rapid detection of salivary and serum IgA in patients with COVID-19 disease. Biosens Bioelectron. 2021;172:112765. doi:10.1016/j.bios.2020.112765

209. Lou B, Li TD, Zheng SF, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection after exposure and post-symptom onset. European Respiratory Journal. 2020;56(2):2000763. doi:10.1183/13993003.00763-2020

210. Wu YC, Chen CS, Chan YJ. The outbreak of COVID-19: An overview. Journal of the Chinese Medical Association. 2020;83(3):217-220. doi:10.1097/JCMA.0000000000000270

211. Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Nat Med. 2020;26(8):1200-1204. doi:10.1038/s41591-020-0965-6

212. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. Nat Microbiol. 2020;5:1598-1607. doi:10.1038/s41564-020-00813-8

213. Kellam P, Barclay W. The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. Journal of General Virology. 2020;101(8):791-797. doi:10.1099/jgv.0.001439

214. Zhu Y, Yu D, Han Y, et al. Cross-reactive neutralization of SARS-CoV-2 by serum antibodies from recovered SARS patients and immunized animals. Sci Adv. 2020;6(45). doi:10.1126/sciadv.abc9999

215. Murray PR. The Clinician and the Microbiology Laboratory. In: Mandell, Douglas, and

Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier; 2015:191-223. doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00016-3

216. Kontou PI, Braliou GG, Dimou NL, Nikolopoulos G, Bagos PG. Antibody Tests in Detecting SARS-CoV-2 Infection: A Meta-Analysis. Diagnostics. 2020;10(5):319. doi:10.3390/diagnostics10050319

217. Nguyen NNT, McCarthy C, Lantigua D, Camci-Unal G. Development of Diagnostic Tests for Detection of SARS-CoV-2. Diagnostics. 2020;10(11):905. doi:10.3390/diagnostics10110905

218. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Serologic Testing. Clinical Infectious Diseases. Published online September 12, 2020. doi:10.1093/cid/ciaa1343

219. Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. BMJ. Published online July 1, 2020:m2516. doi:10.1136/bmj.m2516

220. Liu W, Liu L, Kou G, et al. Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. J Clin Microbiol. 2020;58(6). doi:10.1128/JCM.00461-20

221. F Alvim RG, Lima TM, S Rodrigues DA, et al. An Affordable Anti-SARS-COV-2 Spike Protein ELISA Test for Early Detection of IgG Seroconversion Suited for Large-Scale Surveillance Studies in Low-Income Countries.; 2020. doi:10.1101/2020.07.13.20152884

222. Oliveira BA, Oliveira LC de, Sabino EC, Okay TS. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2020;62. doi:10.1590/s1678-9946202062044

223. Khoury DS, Cromer D, Reynaldi A, et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. Nat Med. 2021;27(7):1205-1211. doi:10.1038/s41591-021-01377-8

224. Bewley KR, Coombes NS, Gagnon L, et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. Nat Protoc. 2021;16(6):3114-3140. doi:10.1038/s41596-021-00536-y

225. Embregts CWE, Verstrepen B, Langermans JAM, et al. Evaluation of a multi-species SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test. One Health. 2021;13:100313. doi:10.1016/j.onehlt.2021.100313

226. Greninger AL, Dien Bard J, Colgrove RC, et al. Clinical and Infection Prevention Applications of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genotyping: An Infectious Diseases Society of America/American Society for Microbiology Consensus Review Document. Clinical Infectious Diseases. 2022;74(8):1496-1502. doi:10.1093/cid/ciab761

227. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. Journal of Clinical Virology. 2020;129:104500. doi:10.1016/j.jcv.2020.104500

228. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Cochrane Database of Systematic Reviews. Published online August 26, 2020. doi:10.1002/14651858.CD013705

229. Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. Biochem Biophys Res

Commun. 2021;538:226-230. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.069

230. Liotti FM, Menchinelli G, Lalle E, et al. Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. Clinical Microbiology and Infection. 2021;27(3):487-488. doi:10.1016/j.cmi.2020.09.030

231. Lin Q, Wen D, Wu J, et al. Microfluidic Immunoassays for Sensitive and Simultaneous Detection of IgG/IgM/Antigen of SARS-CoV-2 within 15 min. Anal Chem. 2020;92(14):9454-9458. doi:10.1021/acs.analchem.0c01635

232. Ventura B della, Cennamo M, Minopoli A, et al. Colorimetric Test for Fast Detection of SARS-CoV-2 in Nasal and Throat Swabs. ACS Sens. 2020;5(10):3043-3048. doi:10.1021/acssensors.0c01742

233. Mavrikou S, Moschopoulou G, Tsekouras V, Kintzios S. Development of a Portable, Ultra-Rapid and Ultra-Sensitive Cell-Based Biosensor for the Direct Detection of the SARS-CoV-2 S1 Spike Protein Antigen. Sensors. 2020;20(11):3121. doi:10.3390/s20113121

234. Seo G, Lee G, Kim MJ, et al. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. ACS Nano. 2020;14(4):5135-5142. doi:10.1021/acsnano.0c02823

235. Eissa S, Zourob M. Development of a Low-Cost Cotton-Tipped Electrochemical Immunosensor for the Detection of SARS-CoV-2. Anal Chem. 2021;93(3):1826-1833. doi:10.1021/acs.analchem.0c04719

236. Adhikari SP, Meng S, Wu YJ, et al. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. Infect Dis Poverty. 2020;9(1):29. doi:10.1186/s40249-020-00646-x

237. Jin YH, Cai L, Cheng ZS, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). Mil Med Res. 2020;7(1):4. doi:10.1186/s40779-020-0233-6

238. Pandit MK, Banday SA, Naaz R, Chishti MA. Automatic detection of COVID-19 from chest radiographs using deep learning. Radiography. 2021;27(2):483-489. doi:10.1016/j.radi.2020.10.018

239. Ai T, Yang Z, Hou H, et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. Radiology. 2020;296(2):E32-E40. doi:10.1148/radiol.2020200642

240. Bernheim A, Mei X, Huang M, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. Radiology. 2020;295(3):200463. doi:10.1148/radiol.2020200463

241. Zhao W, Zhong Z, Xie X, Yu Q, Liu J. Relation Between Chest CT Findings and Clinical Conditions of Coronavirus Disease (COVID-19) Pneumonia: A Multicenter Study. American Journal of Roentgenology. 2020;214(5):1072-1077. doi:10.2214/AJR.20.22976

242. Wong HYF, Lam HYS, Fong AHT, et al. Frequency and Distribution of Chest Radiographic Findings in Patients Positive for COVID-19. Radiology. 2020;296(2):E72-E78. doi:10.1148/radiol.2020201160

243. Cho YJ, Song KH, Lee Y, et al. Lung ultrasound for early diagnosis and severity assessment of pneumonia in patients with coronavirus disease 2019. Korean J Intern Med. 2020;35(4):771-781.

doi:10.3904/kjim.2020.180

244. Yadav S, Singh A, Manisha K, Khanna P. Point of care ultrasound in Coronavirus Disease 2019 pandemic: One modality helping multiple specialties. J Med Ultrasound. 2021;29(1):9. doi:10.4103/JMU.JMU_114_20

245. Bosso G, Allegorico E, Pagano A, et al. Lung ultrasound as diagnostic tool for SARS-CoV-2 infection. Intern Emerg Med. 2021;16(2):471-476. doi:10.1007/s11739-020-02512-y

246. Methods for the Detection and Characterisation of SARS-CoV-2 Variants-Second Update.; 2022.

247. Genomic Sequencing of SARS-CoV-2 A Guide to Implementation for Maximum Impact on Public Health.; 2021.

248. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. Curr Protoc Mol Biol. 2018;122(1). doi:10.1002/cpmb.59

249. GeneBank Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. Accessed December 7, 2022. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1798174254

250. Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences [online]. Accessed December 7, 2022. https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/

251. Charre C, Ginevra C, Sabatier M, et al. Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. Virus Evol. 2020;6(2). doi:10.1093/ve/veaa075

252. Goswami C, Sheldon M, Bixby C, et al. Identification of SARS-CoV-2 variants using viral sequencing for the Centers for Disease Control and Prevention genomic surveillance program. BMC Infect Dis. 2022;22(1):404. doi:10.1186/s12879-022-07374-7

253. Overview of Variants in Countries. CoVariants-GISAID. Accessed December 8, 2022. https://covariants.org/per-country?country=Turkey

254. Simmonds P. Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: Causes and Consequences for Their Short- and Long-Term Evolutionary Trajectories. mSphere. 2020;5(3). doi:10.1128/mSphere.00408-20

255. Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. Bull World Health Organ. 2020;98(7):495-504. doi:10.2471/BLT.20.253591

256. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations. Front Microbiol. 2020;11. doi:10.3389/fmicb.2020.01800

257. Flores-Alanis A, Cruz-Rangel A, Rodríguez-Gómez F, et al. Molecular Epidemiology Surveillance of SARS-CoV-2: Mutations and Genetic Diversity One Year after Emerging. Pathogens. 2021;10(2):184. doi:10.3390/pathogens10020184

258. Abavisani M, Rahimian K, Mahdavi B, et al. Mutations in SARS-CoV-2 structural proteins: a global analysis. Virol J. 2022;19(1):220. doi:10.1186/s12985-022-01951-7

259. Badua CLDC, Baldo KAT, Medina PMB. Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2. J Med Virol. 2021;93(3):1702-1721. doi:10.1002/jmv.26548

260. Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Mutations on COVID-19 diagnostic targets. Genomics. 2020;112(6):5204-5213. doi:10.1016/j.ygeno.2020.09.028

261. Troyano-Hernáez P, Reinosa R, Holguín Á. Evolution of SARS-CoV-2 Envelope, Membrane, Nucleocapsid, and Spike Structural Proteins from the Beginning of the Pandemic to September 2020: A Global and Regional Approach by Epidemiological Week. Viruses. 2021;13(2):243. doi:10.3390/v13020243

262. Peng Y, Du N, Lei Y, et al. Structures of the <scp>SARS</scp> -CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. EMBO J. 2020;39(20). doi:10.15252/embj.2020105938

263. Shi R, Shan C, Duan X, et al. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. Nature. 2020;584(7819):120-124. doi:10.1038/s41586-020-2381-y

264. León G, Herrera M, Vargas M, et al. Development and characterization of two equine formulations towards SARS-CoV-2 proteins for the potential treatment of COVID-19. Sci Rep. 2021;11(1):9825. doi:10.1038/s41598-021-89242-z

265. Chan WKB, Olson KM, Wotring JW, Sexton JZ, Carlson HA, Traynor JR. In silico analysis of SARS-CoV-2 proteins as targets for clinically available drugs. Sci Rep. 2022;12(1):5320. doi:10.1038/s41598-022-08320-y

266. Berguer PM, Blaustein M, Bredeston LM, et al. Covalent coupling of Spike's receptor binding domain to a multimeric carrier produces a high immune response against SARS-CoV-2. Sci Rep. 2022;12(1):692. doi:10.1038/s41598-021-03675-0

267. GISAID. Accessed January 30, 2023. https://gisaid.org/

268. Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. Genomics. 2020;112(5):3588-3596. doi:10.1016/j.ygeno.2020.04.016

269. ESKİER D, AKALP E, DALAN Ö, KARAKÜLAH G, OKTAY Y. Current mutatome of SARS-CoV-2 in Turkey reveals mutations of interest. TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY. 2021;45(1):104-113. doi:10.3906/biy-2008-56

270. Ergünay K, Kaya M, Serdar M, Akyön Y, Yılmaz E. A cross-sectional overview of SARS-CoV-2 genome variations in Turkey. Turkish Journal of Biochemistry. 2021;46(5):491-498. doi:10.1515/tjb-2021-0119

271. DEMİR AB, BENVENUTO D, ABACIOĞLU H, ANGELETTI S, CICCOZZI M. Identification of the nucleotide substitutions in 62 SARS-CoV-2 sequences from Turkey. TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY. 2020;44(3):178-184. doi:10.3906/biy-2005-69

272. Bai Y, Jiang D, Lon JR, et al. Comprehensive evolution and molecular characteristics of a large number of SARS-CoV-2 genomes reveal its epidemic trends. International Journal of Infectious Diseases. 2020;100:164-173. doi:10.1016/j.ijid.2020.08.066

273. Kim JS, Jang JH, Kim JM, Chung YS, Yoo CK, Han MG. Genome-Wide Identification and Characterization of Point Mutations in the SARS-CoV-2 Genome. Osong Public Health Res Perspect. 2020;11(3):101-111. doi:10.24171/j.phrp.2020.11.3.05

274. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. J Transl Med. 2020;18(1):179. doi:10.1186/s12967-020-02344-6

275. Volz E, Hill V, McCrone JT, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. Cell. 2021;184(1):64-75.e11. doi:10.1016/j.cell.2020.11.020

276. Chen RE, Zhang X, Case JB, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. Nat Med. 2021;27(4):717-726. doi:10.1038/s41591-021-01294-w

277. Eskier D, Suner A, Oktay Y, Karakülah G. Mutations of SARS-CoV-2 nsp14 exhibit strong association with increased genome-wide mutation load. PeerJ. 2020;8:e10181. doi:10.7717/peerj.10181

278. Eskier D, Suner A, Karakülah G, Oktay Y. Mutation density changes in SARS-CoV-2 are related to the pandemic stage but to a lesser extent in the dominant strain with mutations in spike and RdRp. PeerJ. 2020;8:e9703. doi:10.7717/peerj.9703

279. Ghosh N, Nandi S, Saha I. A review on evolution of emerging SARS-CoV-2 variants based on spike glycoprotein. Int Immunopharmacol. 2022;105:108565. doi:10.1016/j.intimp.2022.108565

280. Liu Y, Liu J, Plante KS, et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. Nature. 2022;602(7896):294-299. doi:10.1038/s41586-021-04245-0

281. Mittal A, Khattri A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. PLoS Pathog. 2022;18(2):e1010260. doi:10.1371/journal.ppat.1010260

282. McCarthy KR, Rennick LJ, Nambulli S, et al. Recurrent deletions in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein drive antibody escape. Science (1979). 2021;371(6534):1139-1142. doi:10.1126/science.abf6950

283. McCallum M, de Marco A, Lempp FA, et al. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. Cell. 2021;184(9):2332-2347.e16. doi:10.1016/j.cell.2021.03.028

284. Moradi J, Moradi P, Alvandi AH, Abiri R, Moghoofei M. Variation analysis of SARS-CoV-2 complete sequences from Iran. Future Virol. 2022;17(12):863-872. doi:10.2217/fvl-2021-0056

285. Allen H, Vusirikala A, Flannagan J, et al. Household transmission of COVID-19 cases associated with SARS-CoV-2 delta variant (B.1.617.2): national case-control study. The Lancet Regional Health - Europe. 2022;12:100252. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100252

286. Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. Nature. 2021;599(7883):114-119. doi:10.1038/s41586-021-03944-y

287. Motozono C, Toyoda M, Zahradnik J, et al. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. Cell Host Microbe. 2021;29(7):1124-1136.e11. doi:10.1016/j.chom.2021.06.006

288. Sinha S, Tam B, Wang SM. RBD Double Mutations of SARS-CoV-2 Strains Increase Transmissibility through Enhanced Interaction between RBD and ACE2 Receptor. Viruses. 2021;14(1):1. doi:10.3390/v14010001

289. Liu Z, VanBlargan LA, Bloyet LM, et al. Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. Cell Host Microbe. 2021;29(3):477-488.e4. doi:10.1016/j.chom.2021.01.014

290. Mishra T, Dalavi R, Joshi G, et al. SARS-CoV-2 spike E156G/Δ157-158 mutations contribute to increased infectivity and immune escape. Life Sci Alliance. 2022;5(7):e202201415. doi:10.26508/lsa.202201415

291. Kannan SR, Spratt AN, Cohen AR, et al. Evolutionary analysis of the Delta and Delta Plus variants of the SARS-CoV-2 viruses. J Autoimmun. 2021;124:102715. doi:10.1016/j.jaut.2021.102715

292. Sohail A, Tunc S, Nutini A, Arif R. Furin and the adaptive mutation of SARS-COV2: a computational framework. Model Earth Syst Environ. 2022;8(2):2827-2836. doi:10.1007/s40808-021-01260-y

293. Saito A, Irie T, Suzuki R, et al. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. Nature. 2022;602(7896):300-306. doi:10.1038/s41586-021-04266-9

294. Al-Qahtani AA. Mutations in the genome of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: implications for COVID-19 severity and progression. Journal of International Medical Research. 2022;50(3):030006052210864. doi:10.1177/03000605221086433

295. Collier DA, de Marco A, Ferreira IATM, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B.1.1.7 to mRNA vaccine-elicited antibodies. Nature. 2021;593(7857):136-141. doi:10.1038/s41586-021-03412-7

296. Wu H, Xing N, Meng K, et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. Cell Host Microbe. 2021;29(12):1788-1801.e6. doi:10.1016/j.chom.2021.11.005

297. Mourier T, Shuaib M, Hala S, et al. SARS-CoV-2 genomes from Saudi Arabia implicate nucleocapsid mutations in host response and increased viral load. Nat Commun. 2022;13(1):601. doi:10.1038/s41467-022-28287-8

298. Hossain MS, Pathan AQMSU, Islam MN, et al. Genome-wide identification and prediction of SARS-CoV-2 mutations show an abundance of variants: Integrated study of bioinformatics and deep neural learning. Inform Med Unlocked. 2021;27:100798. doi:10.1016/j.imu.2021.100798

299. Johnson BA, Zhou Y, Lokugamage KG, et al. Nucleocapsid mutations in SARS-CoV-2 augment replication and pathogenesis. PLoS Pathog. 2022;18(6):e1010627. doi:10.1371/journal.ppat.1010627

300. Thakur S, Sasi S, Pillai SG, et al. SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. Front Med (Lausanne). 2022;9. doi:10.3389/fmed.2022.815389

301. Zheng Y, Zhuang MW, Han L, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):299. doi:10.1038/s41392-020-00438-7

302. Overview of Variants/Mutations. CoVariants-GISAID. Accessed February 6, 2023. https://covariants.org/variants

303. Shen L, Bard JD, Triche TJ, Judkins AR, Biegel JA, Gai X. Emerging variants of concern in SARS-CoV-2 membrane protein: a highly conserved target with potential pathological and therapeutic implications. Emerg Microbes Infect. 2021;10(1):885-893. doi:10.1080/22221751.2021.1922097

304. Omotoso OE, Babalola AD, Matareek A. Mutational hotspots and conserved domains of SARS-CoV-2 genome in African population. Beni Suef Univ J Basic Appl Sci. 2021;10(1):11. doi:10.1186/s43088-021-00102-1

305. Majumdar P, Niyogi S. SARS-CoV-2 mutations: the biological trackway towards viral fitness. Epidemiol Infect. 2021;149:e110. doi:10.1017/S0950268821001060

306. Yuliawuri H, Christian JE, Steven N. Non-Synonymous Mutation Analysis of SARS-CoV-2 ORF3a in Indonesia. Molecular and Cellular Biomedical Sciences. 2022;6(1):20. doi:10.21705/mcbs.v6i1.221

307. Wang R, Chen J, Gao K, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Analysis of SARS-CoV-2 mutations in the United States suggests presence of four substrains and novel variants. Commun Biol. 2021;4(1):228. doi:10.1038/s42003-021-01754-6

308. Issa E, Merhi G, Panossian B, Salloum T, Tokajian S. SARS-CoV-2 and ORF3a: Nonsynonymous Mutations, Functional Domains, and Viral Pathogenesis. mSystems. 2020;5(3). doi:10.1128/mSystems.00266-20

309. Zhang Y, Chen Y, Li Y, et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021;118(23). doi:10.1073/pnas.2024202118

310. Pereira F. SARS-CoV-2 variants combining spike mutations and the absence of ORF8 may be more transmissible and require close monitoring. Biochem Biophys Res Commun. 2021;550:8-14. doi:10.1016/j.bbrc.2021.02.080

311. Young BE, Fong SW, Chan YH, et al. Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: an observational cohort study. The Lancet. 2020;396(10251):603-611. doi:10.1016/S0140-6736(20)31757-8

312. Farkas C, Mella A, Turgeon M, Haigh JJ. A Novel SARS-CoV-2 Viral Sequence Bioinformatic Pipeline Has Found Genetic Evidence That the Viral 3' Untranslated Region (UTR) Is Evolving and Generating Increased Viral Diversity. Front Microbiol. 2021;12. doi:10.3389/fmicb.2021.665041

313. Chaudhari AM, Singh I, Joshi M, Patel A, Joshi C. Defective ORF8 dimerization in SARS-CoV-2 delta variant leads to a better adaptive immune response due to abrogation of ORF8-MHC1 interaction. Mol Divers. Published online March 3, 2022. doi:10.1007/s11030-022-10405-9

314. Cruz CAK, Medina PMB. Temporal changes in the accessory protein mutations of SARS-CoV-2 variants and their predicted structural and functional effects. J Med Virol. 2022;94(11):5189-5200. doi:10.1002/jmv.27964

315. Yuen CK, Lam JY, Wong WM, et al. SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):1418-1428. doi:10.1080/22221751.2020.1780953

316. CoVsurver: Mutation Analysis of hCoV-19. GISAID. Accessed February 6, 2023. https://gisaid.org/database-features/covsurver-mutations-app/

317. Hassan SkS, Lundstrom K, Serrano-Aroca Á, et al. Emergence of unique SARS-CoV-2 ORF10 variants and their impact on protein structure and function. Int J Biol Macromol. 2022;194:128-143. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.11.151

318. Loucera C, Perez-Florido J, Casimiro-Soriguer C, et al. Assessing the Impact of SARS-CoV-2 Lineages and Mutations on Patient Survival. Viruses. 2022;14(9):1893. doi:10.3390/v14091893

319. Maurya R, Mishra P, Swaminathan A, et al. SARS-CoV-2 Mutations and COVID-19 Clinical Outcome: Mutation Global Frequency Dynamics and Structural Modulation Hold the Key. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12. doi:10.3389/fcimb.2022.868414

320. Nagy Á, Pongor S, Győrffy B. Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. Int J Antimicrob Agents. 2021;57(2):106272. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106272

321. Lin L, Liu Y, Tang X, He D. The Disease Severity and Clinical Outcomes of the SARS-CoV-2 Variants of Concern. Front Public Health. 2021;9. doi:10.3389/fpubh.2021.775224

322. Biswas SK, Mudi SR. Spike protein D614G and RdRp P323L: the SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19. Genomics Inform. 2020;18(4):e44. doi:10.5808/GI.2020.18.4.e44

323. Groves DC, Rowland-Jones SL, Angyal A. The D614G mutations in the SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, disease severity and vaccine design. Biochem Biophys Res Commun. 2021;538:104-107. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.109

324. Mehta P, Alle S, Chaturvedi A, et al. Clinico-Genomic Analysis Reveals Mutations Associated with COVID-19 Disease Severity: Possible Modulation by RNA Structure. Pathogens. 2021;10(9):1109. doi:10.3390/pathogens10091109

325. Tarke A, Sidney J, Kidd CK, et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. Cell Rep Med. 2021;2(2):100204. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100204

326. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. Cell. 2020;183(4):996-1012.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.09.038

327. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. Nat Immunol. 2020;21(11):1336-1345. doi:10.1038/s41590-020-0782-6

328. Grifoni A, Sidney J, Vita R, et al. SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19. Cell Host Microbe. 2021;29(7):1076-1092. doi:10.1016/j.chom.2021.05.010

329. Garcia-Basteiro AL, Moncunill G, Tortajada M, et al. Seroprevalence of antibodies against SARS-CoV-2 among health care workers in a large Spanish reference hospital. Nat Commun. 2020;11(1):3500. doi:10.1038/s41467-020-17318-x

330. Rudberg AS, Havervall S, Månberg A, et al. SARS-CoV-2 exposure, symptoms and seroprevalence in healthcare workers in Sweden. Nat Commun. 2020;11(1):5064. doi:10.1038/s41467-020-18848-0

331. Moscola J, Sembajwe G, Jarrett M, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 Antibodies in Health Care Personnel in the New York City Area. JAMA. 2020;324(9):893. doi:10.1001/jama.2020.14765

332. Alkurt G, Murt A, Aydin Z, et al. Seroprevalence of coronavirus disease 2019 (COVID-19) among health care workers from three pandemic hospitals of Turkey. PLoS One. 2021;16(3):e0247865. doi:10.1371/journal.pone.0247865

333. Gularte JS, da Silva MS, Mosena ACS, et al. Early introduction, dispersal and evolution of Delta SARS-CoV-2 in Southern Brazil, late predominance of AY.99.2 and AY.101 related lineages. Virus Res. 2022;311:198702. doi:10.1016/j.virusres.2022.198702

334. Duchene S, Featherstone L, Haritopoulou-Sinanidou M, Rambaut A, Lemey P, Baele G.

Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. Virus Evol. 2020;6(2). doi:10.1093/ve/veaa061

335. Snell LB, Fisher CL, Taj U, et al. Combined epidemiological and genomic analysis of nosocomial SARS-CoV-2 infection early in the pandemic and the role of unidentified cases in transmission. Clinical Microbiology and Infection. 2022;28(1):93-100. doi:10.1016/j.cmi.2021.07.040

336. Lucey M, Macori G, Mullane N, et al. Whole-genome Sequencing to Track Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Transmission in Nosocomial Outbreaks. Clinical Infectious Diseases. 2021;72(11):e727-e735. doi:10.1093/cid/ciaa1433

337. Lumley SF, Constantinides B, Sanderson N, et al. Epidemiological data and genome sequencing reveals that nosocomial transmission of SARS-CoV-2 is underestimated and mostly mediated by a small number of highly infectious individuals. Journal of Infection. 2021;83(4):473-482. doi:10.1016/j.jinf.2021.07.034

338. Francis R v., Billam H, Clarke M, et al. The Impact of Real-Time Whole-Genome Sequencing in Controlling Healthcare-Associated SARS-CoV-2 Outbreaks. J Infect Dis. 2022;225(1):10-18. doi:10.1093/INFDIS/JIAB483

339. Hare D, Meaney C, Powell J, et al. Repeated transmission of SARS-CoV-2 in an overcrowded Irish emergency department elucidated by whole-genome sequencing. Journal of Hospital Infection. 2022;126:1-9. doi:10.1016/j.jhin.2022.04.015

340. Klompas M, Baker MA, Rhee C, et al. A SARS-CoV-2 Cluster in an Acute Care Hospital. Ann Intern Med. 2021;174(6):794-802. doi:10.7326/M20-7567

341. Stirrup O, Hughes J, Parker M, et al. Rapid feedback on hospital onset SARS-CoV-2 infections combining epidemiological and sequencing data. Elife. 2021;10. doi:10.7554/eLife.65828

342. Wee LE, Ko KKK, Conceicao EP, et al. Linking sporadic hospital clusters during a community surge of the severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2) B.1.617.2 delta variant: The utility of whole-genome sequencing. Infect Control Hosp Epidemiol. Published online April 27, 2022:1-5. doi:10.1017/ice.2022.106

343. Abbas M, Cori A, Cordey S, et al. Reconstruction of transmission chains of SARS-CoV-2 amidst multiple outbreaks in a geriatric acute-care hospital: a combined retrospective epidemiological and genomic study. Elife. 2022;11. doi:10.7554/eLife.76854

344. Løvestad AH, Jørgensen SB, Handal N, Ambur OH, Aamot H v. Investigation of intra-hospital SARS-CoV-2 transmission using nanopore whole-genome sequencing. Journal of Hospital Infection. 2021;111:107-116. doi:10.1016/j.jhin.2021.02.022

345. Paltansing S, Sikkema RS, de Man SJ, Koopmans MPG, Oude Munnink BB, de Man P. Transmission of SARS-CoV-2 among healthcare workers and patients in a teaching hospital in the Netherlands confirmed by whole-genome sequencing. Journal of Hospital Infection. 2021;110:178-183. doi:10.1016/j.jhin.2021.02.005

346. Yuan Y, He J, Gong L, et al. Molecular epidemiology of SARS-CoV-2 clusters caused by asymptomatic cases in Anhui Province, China. BMC Infect Dis. 2020;20(1). doi:10.1186/s12879-020-05612-4

347. Braun KM, Moreno GK, Buys A, et al. Viral Sequencing to Investigate Sources of SARS-

CoV-2 Infection in US Healthcare Personnel. Clinical Infectious Diseases. 2021;73(6):e1329-e1336. doi:10.1093/cid/ciab281

348. Ng CYH, Lim NA, Bao LXY, Quek AML, Seet RCS. Mitigating SARS-CoV-2 Transmission in Hospitals: A Systematic Literature Review. Public Health Rev. 2022;43. doi:10.3389/phrs.2022.1604572

349. Höring S, Fussen R, Neusser J, et al. Management of a Hospital-Wide COVID-19 Outbreak Affecting Patients and Healthcare Workers. SN Compr Clin Med. 2020;2(12):2540-2545. doi:10.1007/s42399-020-00597-2

350. Madewell ZJ, Yang Y, Longini IM, Halloran ME, Dean NE. Household Transmission of SARS-CoV-2. JAMA Netw Open. 2020;3(12):e2031756. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.31756

351. Vimercati L, Tafuri S, Chironna M, et al. The COVID-19 hotel for healthcare workers: an Italian best practice. Journal of Hospital Infection. 2020;105(3):387-388. doi:10.1016/j.jhin.2020.05.018

352. Wang Y, Tian H, Zhang L, et al. Reduction of secondary transmission of SARS-CoV-2 in households by face mask use, disinfection and social distancing: a cohort study in Beijing, China. BMJ Glob Health. 2020;5(5):e002794. doi:10.1136/bmjgh-2020-002794

353. Schneider S, Piening B, Nouri-Pasovsky PA, Krüger AC, Gastmeier P, Aghdassi SJS. SARS-Coronavirus-2 cases in healthcare workers may not regularly originate from patient care: lessons from a university hospital on the underestimated risk of healthcare worker to healthcare worker transmission. Antimicrob Resist Infect Control. 2020;9(1):192. doi:10.1186/s13756-020-00848-w

354. Kluytmans-van den Bergh MFQ, Buiting AGM, Pas SD, et al. Prevalence and Clinical Presentation of Health Care Workers With Symptoms of Coronavirus Disease 2019 in 2 Dutch Hospitals During an Early Phase of the Pandemic. JAMA Netw Open. 2020;3(5):e209673. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.9673

355. Hale M, Dayot A. Outbreak investigation of COVID-19 in hospital food service workers. Am J Infect Control. 2021;49(3):396-397. doi:10.1016/j.ajic.2020.08.011

356. Brandt MP, Jäger W, Epple S, Haferkamp A, Schröder A. SARS-CoV-2 outbreak in medical employees in a large urologic department: Spread, containment and outcome. Am J Infect Control. 2021;49(6):674-677. doi:10.1016/j.ajic.2021.02.011

357. KATARIA S, PHOGAT R, SHARMA P, et al. Seroprevalence of Covid-19 infection among healthcare workers: A study from a tertiary care hospital in the National Capital Region of India. Natl Med J India. 2023;35:219. doi:10.25259/NMJI_345_21

358. Alishaq M, Jeremijenko A, Al-Kanaani Z, et al. Prevalence and risk factors for SARS-CoV-2 infection and seroprevalence among clinical and non-clinical staff in a national healthcare system. PLoS One. 2021;16(9):e0257845. doi:10.1371/journal.pone.0257845

359. Duy C, Nong VM, van Ngo A, et al. Nosocomial Coronavirus Disease Outbreak Containment, Hanoi, Vietnam, March–April 2020. Emerg Infect Dis. 2021;27(1):10-17. doi:10.3201/eid2701.202656

360. Pirincci E, Altun B. An analysis of hospital cleaning staff's attitudes and conduct regarding hand hygiene and cleaning. International Journal of Occupational Safety and Ergonomics.

2016;22(2):241-245. doi:10.1080/10803548.2015.1100906

361. Stirrup O, Blackstone J, Mapp F, et al. Effectiveness of rapid SARS-CoV-2 genome sequencing in supporting infection control for hospital-onset COVID-19 infection: Multicentre, prospective study. Elife. 2022;11. doi:10.7554/eLife.78427

10.EKLER

EK 1. Örneklerin Ayrıntılı Verisi

Küme	Örnek No	Durum	Cinsiyet	Yaş	Pozitiflik Tarihi	CT	Ham Veri Okuması	Konsensus Uzunluk	Ortalama Kapsam	Kapsam 10x %	Referans Genom Kapsam %	N %
1	1	Sağlık Çalışanı	erkek	41	4.09.2020	13	820.654	29903	1252	94,7	88	12
	2	Sağlık Çalışanı	kadın	26	9.09.2020	21	1.250.628	29903	1264	96,4	89	10,6
	3	Sağlık Çalışanı	kadın	26	10.09.2020	20	1.523.388	29903	2525	92,2	86	14,5
2	4	Sağlık Çalışanı	kadın	29	9.10.2020	23	866.546	29903	1177	91,9	84	16,2
	5	Sağlık Çalışanı	erkek	47	16.10.2020	23	1.328.638	29903	1297	96,6	88	11,6
3	6	Sağlık Çalışanı "	kadın	22	7.11.2020	22	2.101.492	29906	1333	96,9	92	8,3
	7	Sağlık Çalışanı "	kadın	23	16.11.2020	16	1.113.026	29906	1496	91,4	85	15,3
4	8	Sağlık Çalışanı "	kadın	36	11.11.2020	16	1.218.552	29903	1531	89,8	82	17,8
	9	Sağlık Çalışanı "	kadın	38	12.11.2020	17	1.525.896	29903	1716	98,7	95	5,3
5	10	Sağlık Çalışanı "	kadın	26	20.04.2021	16	3.149.940	29755	4397	99,1	98	1,5
	11	Sağlık Çalışanı "	kadın	28	20.04.2021	18	4.179.316	29785	3757	96,8	95	5
	12	Sağlık Çalışanı "	kadın	26	22.04.2021	22	5.291.092	29766	3476	97,4	95	4,8
6	13	Sağlık Çalışanı "	erkek	24	17.05.2021	22	5.065.556	29763	4534	98,9	99	0.9
	14	Sağlık Çalışanı "	erkek	24	20.05.2021	22	5.052.330	29763	3516	99,0	99	0,9
	15	Sağlık Çalışanı "	kadın	24	25.05.2021	19	4.363.864	29763	4428	98,9	98	1,6
7	16	Sağlık Çalışanı "	erkek	45	3.11.2020	17	4.786.490	29803	4757	98,1	96	3,6
	17	Aile Üyesi	kadın	20	11.11.2020	17	2.943.182	29803	4987	98,7	98	1,7
	18	Aile Üyesi	kadın	39	11.11.2020	15	2.613.528	29803	4336	99,0	98	1,4
8	19	Sağlık Çalışanı	erkek	44	22.09.2021	15	2.430.494	29627	3943	97,6	97	1,9
	20	Aile Üyesi	kadın	14	20.09.2021	18	3.595.010	29772	4990	98,4	98	2
	21	Aile Üyesi	kadın	8	23.09.2021	22	5.042.792	29772	5476	98,4	98	1,5
	22	Aile Üyesi	kadın	17	24.09.2021	11	2.867.088	29627	5205	98,6	97	1,8
9	23	Sağlık Çalışanı "	kadın	38	25.09.2021	12	2.360.518	29627	3977	98,1	98	1,5
	24	Aile Üyesi	kadın	13	28.09.2021	14	3.028.716	29761	5113	99,2	98	1,1
	25	Aile Üyesi	erkek	42	04.10.2021	17	3.166.680	29761	4198	98,2	97	2,2
	26	Sağlık Çalışanı "	kadın	47	25.09.2021	16	3.225.044	29761	5300	99,4	98	1,5
	27	Sağlık Çalışanı "	kadın	22	26.09.2021	13	2.985.714	29772	5468	99,2	98	1,1
10	28*	Aile Üyesi	erkek	48	11.04.2020	14	2.658.792	29639	4623 (904)	97,47 (91,9)	96 (82)	3,6 (18,4)
	29*	Aile Üyesi	kadın	42	14.04.2020	19	3.400.074	29639	5601 (1545)	99,34 (97,1)	98 (91)	1 (9,4)
	30*	Sağlık Çalışanı	erkek	41	14.04.2020	22	4.981.294	29639	5766 (1541)	99,34 (97,4)	99 (94)	0,3 (6,5)
	31*	Sağlık Çalışanı	erkek	37	15.04.2020	21	3.291.478	29773	5608 (1524)	98,39 (94,8)	97 (88)	2,6 (11,6)
	32*	Aile Üyesi	erkek	76	19.04.2020	12	2.547.472	29639	4965 (1888)	98,01 (95,2)	96 (91)	3,2 (9,4)
	33*	Aile Üyesi	erkek	58	14.04.2020	21	2.969.896	29639	5516 (1550)	99,15 (96,8)	98 (91)	1,1 (9,5)
	34*	Aile Üyesi	erkek	21	15.04.2020	24	4.176.364	29784	5483 (1290)	99,34 (97,4)	99 (92)	0,7 (8,2)
	35*	Sağlık Çalışanı	erkek	41	16.04.2020	24	4.596.718	29784	4584 (1210)	99,45 (96,8)	99 (90)	0,7 (10)
11	36*	Sağlık Çalışanı "	kadın	25	20.11.2020	17	3.184.440	29792	4665,5 (1030)	97,37 (85,9)	93 (74)	6 (25,7)
	37*	Sağlık Çalışanı "	erkek	27	20.11.2020	18	3.388.956	29639	4684,3 (882)	98,57 (94)	97 (85)	1,9 (15,2)
	38*	Sağlık Çalışanı "	erkek	26	25.11.2020	16	3.927.786	29792	5152,2 (1428)	98,75 (94,3)	97 (86)	2,4 (13,8)
12	39*	Sağlık Çalışanı "	kadın	26	3.12.2020	17	3.433.976	29639	5313,3 (1674)	98,47 (97,3)	97 (93)	1,2 (6,8)
	40*	Sağlık Çalışanı "	kadın	27	3.12.2020	14	2.901.262	29639	5259,6 (1213)	98,7 (97)	97 (93)	1,2 (7,3)
13	41	Sağlık Çalışanı "	erkek	27	6.08.2021	12	3.419.644	29772	5078	99,1	98	1
	42	Sağlık Çalışanı "	erkek	26	7.08.2021	20	4.724.222	29772	3806	98,6	98	1,1
	43	Sağlık Çalışanı "	erkek	26	11.08.2021	17	2.709.048	29772	4969	99,0	98	1
14	44	Aile Üyesi	erkek	6	20.08.2020	15	3.146.318	29795	5238	99,4	99	0,6
	45	Aile Üyesi	kadın	26	21.08.2020	19	3.967.828	29803	4779	96,5	93	6,3
	46	Sağlık Çalışanı "	erkek	34	24.08.2020	18	3.412.210	29784	5249	99,4	99	0,3
15	47	Aile Üyesi	kadın	23	29.10.2020	11	2.465.844	29803	4715	98,9	98	0,8
	48	Sağlık Çalışanı	erkek	48	1.11.2020	18	3.494.262	29803	5119	98,8	98	1,9
16	49	Sağlık Çalışanı "	kadın	42	30.10.2020	17	4.002.096	29803	5208	98,4	98	2,2
	50	Aile Üyesi	erkek	45	31.10.2020	19	3.461.920	29784	3455	99,8	99	0,5
	51	Aile Üyesi	kadın	15	3.11.2020	16	2.565.260	29784	2788	96,6	93	6,7
17	52	Sağlık Çalışanı	kadın	47	10.09.2021	18	4.214.778	29772	5464	98,9	98	1,2
	53	Sağlık Çalışanı	kadın	49	17.09.2021	17	3.175.508	29772	5520	98,7	98	1,5
	54	Sağlık Çalışanı	kadın	42	20.09.2021	19	3.561.906	29772	4689	98,3	98	1,5
18	55	Aile Üyesi	erkek	81	22.10.2021	11	2.587.798	29766	4996	98,7	97	1,7
	56	Aile Üyesi	kadın	57	30.10.2021	12	2.437.418	29766	4709	98,2	97	1,6
	57	Sağlık Çalışanı	kadın	48	01.11.2021	14	3.233.574	29766	5218	98,4	97	1,7
19	58	Sağlık Çalışanı "	kadın	45	01.11.2021	21	4.031.386	29772	4834	98,0	97	2,2
	59	Aile Üyesi	erkek	49	01.11.2021	12	4.196.716	29772	5086	98,7	97	1,9
	60	Aile Üyesi	erkek	23	05.11.2021	17	2.569.736	29772	4494	98,0	97	2
20	61	Sağlık Çalışanı "	kadın	45	10.11.2021	19	5.548.376	29772	5260	98,9	98	1
	62	Aile Üyesi	erkek	44	10.11.2021	17	3.280.812	29772	4975	98,8	98	1
	63	Aile Üyesi	erkek	10	11.11.2021	12	2.861.662	29772	4832	99,1	98	1

Sarı renk Miniseq, yeşil renk Nextseq'e yüklenen örnekleri temsil etmektedir.

": Klinik branşlarda çalışan sağlık çalışanları

***:** Hem Miniseq hem Nextseq de dizilenen örnekler; kırmızı veriler Miniseq sonuçları

Ct değeri: Cy5 kanalı S gen bölgesi hedef Ct değeri

N: Bilinmeye Baz

EK 2. Tüm Nükleotid Değişiklikleri

Gen	Bölge	Tip	Referans	Allel	Amino Asit	Non-sinonim	Görülen Örnek Sayısı
5'UTR	241	SNV	C	T		-	63
	210	SNV	G	T		-	24
	174	SNV	G	T		-	4
	219	SNV	G	C		-	4
	61	SNV	G	A		-	1
ORF1ab	3037	SNV	C	T		-	63
	14408	SNV	C	T	P4715L (P314L)	+	63
	6402	SNV	C	T	P2046L	+	25
	8986	SNV	C	T		-	24
	11332	SNV	A	G		-	24
	4181	SNV	G	T	A1306S	+	24
	7124	SNV	C	T	P2287S	+	24
	9053	SNV	G	T	V2930L	+	24
	10029	SNV	C	T	T3255I	+	24
	15451	SNV	G	A	G5063S (G662S)	+	24
	16466	SNV	C	T	P5401L (P1000L)	+	24
	19220	SNV	C	T	A6319V (A1918V)	+	24
	11201	SNV	A	G	T3646A	+	23
	21137	SNV	A	G	K6958R (K2557R)	+	16
	313	SNV	C	T		-	11
	14925	SNV	C	T		-	10
	18877	SNV	C	T		-	9
	913	SNV	C	T		-	6
	5986	SNV	C	T		-	6
	11288..11296	Delesyon	TCTGGTTTT	-	S3675_F3677del (S3675-,G3676-,F3677-)	+	6
	13168	SNV	C	T		-	6
	14676	SNV	C	T		-	6
	15279	SNV	C	T		-	6
	16176	SNV	T	C		-	6
	5388	SNV	C	A	A1708D	+	6
	6954	SNV	T	C	I2230T	+	6
	10138	SNV	C	T		-	5
	11653	SNV	C	T		-	5
	12139	SNV	T	C		-	5
	3267	SNV	C	T	T1001I	+	5
	12513	SNV	C	T	T4083M	+	5
	19549	SNV	G	T	A6429S (A2028S)	+	5
	683	SNV	C	T		-	4
	5629	SNV	G	T		-	4
	6196	SNV	C	T		-	4
	11497	SNV	C	T		-	4
	384	SNV	C	T	S40L	+	4
	3951	SNV	A	G	D1229G	+	4

ORF1ab	6701	SNV	C	T	L2146F	+	4
	9526	SNV	G	T	M3087I	+	4
	9652	SNV	G	T	M3129I	+	4
	13993	SNV	G	T	A4577S (A176S)	+	4
	15243	SNV	G	T	M4993I (M592I)	+	4
	15766	SNV	G	T	V5168L (V767L)	+	4
	17019	SNV	G	T	E5585D (E1184D)	+	4
	19732	SNV	G	T	V6490F (V2089F)	+	4
	4540	SNV	C	T		-	3
	4999	SNV	C	T		-	3
	5002	SNV	C	T		-	3
	6037	SNV	C	T		-	3
	7675	SNV	G	T		-	3
	7732	SNV	C	T		-	3
	10657	SNV	A	G		-	3
	11455	SNV	C	T		-	3
	14445	SNV	T	A		-	3
	15096	SNV	T	C		-	3
	15324	SNV	C	T		-	3
	16260	SNV	C	T		-	3
	3045	SNV	C	T	P927L	+	3
	3239	SNV	G	A	D992N	+	3
	5093	SNV	C	T	H1610Y	+	3
	6354	SNV	C	T	S2030L	+	3
	6807	SNV	C	T	T2181I	+	3
	7306	SNV	G	T	M2347I	+	3
	7712	SNV	C	T	P2483S	+	3
	17142	SNV	T	A		-	3
	8149	SNV	T	A	N2628K	+	3
	9344	SNV	C	T	L3027F	+	3
	10448	SNV	C	T	P3395S	+	3
	17688	SNV	T	C		-	3
	17721	SNV	G	T		-	3
	10818	SNV	C	T	A3518V	+	3
	18084	SNV	C	T		-	3
	10835	SNV	G	A	V3524I	+	3
	11083	SNV	G	T	L3606F	+	3
	14854	SNV	G	A	V4864I (V463I)	+	3
	15436	SNV	A	G	M5058V (M657V)	+	3
	20946	SNV	C	T		-	3
	15656	SNV	C	T	T5131I (T720I)	+	3
	16468	SNV	C	T	P5402S (P1001S)	+	3
	16558	SNV	G	T	A5432S (A1031S)	+	3
	16795	SNV	G	T	V5511L (V1110L)	+	3
	17615	SNV	A	G	K5784R (K1383R)	+	3
	17750	SNV	C	T	A5829V (A1428V)	+	3
	21334	SNV	G	T	A7024S (A2623S)	+	3
	21512	SNV	A	G	N7083S (N2682S)	+	3
	823	SNV	C	T		-	2
	4543	SNV	C	T		-	2
	6982	SNV	C	T		-	2
	7148	SNV	T	C		-	2
	8017	SNV	G	T		-	2
	593	SNV	C	T	H110Y	+	2
	625	SNV	G	T	K120N	+	2
	1862	SNV	C	T	L533F	+	2
	2445	SNV	C	T	T727I	+	2

ORF1ab	3768	SNV	C	T	T1168I	+	2
	9826	SNV	A	G		-	2
	5264	SNV	A	G	I1667V	+	2
	10156	SNV	C	T		-	2
	6393	SNV	A	G	D2043G	+	2
	6413	SNV	G	A	E2050K	+	2
	6638	SNV	C	T	H2125Y	+	2
	7042	SNV	G	T	M2259I	+	2
	9188	SNV	G	T	V2975L	+	2
	9584	SNV	G	A	V3107I	+	2
	10335	SNV	C	T	A3357V	+	2
	10977	SNV	C	T	A3571V	+	2
	11605	SNV	G	A	M3780I	+	2
	12075	SNV	A	G	N3937S	+	2
	11704	SNV	C	T		-	2
	11812	SNV	C	A		-	2
	12202	SNV	G	T	K3979N	+	2
	14318	SNV	C	T	T4685I (T284I)	+	2
	15569	SNV	C	T	T5102I (T701I)	+	2
	15654	SNV	C	T		-	2
	19186	SNV	C	T		-	2
	19524	SNV	C	T		-	2
	20469	SNV	G	A		-	2
	1059	SNV	C	T	T265I	+	1
	1191	SNV	C	T	P309L	+	1
	2117	SNV	G	A	G618S	+	1
	3261	SNV	C	T	T999I	+	1
	4285	SNV	G	T	E1340D	+	1
	5691	SNV	C	T	A1809V	+	1
	10323	SNV	A	G	K3353R	+	1
	10328	SNV	G	A	D3355N	+	1
	13188	SNV	T	C	I4308T	+	1
	3058	SNV	A	G		-	1
	13388	SNV	A	G	M4375V	+	1
	14648	SNV	A	G	N4795S (N394S)	+	1
	14768	SNV	C	T	A4835V (A434V)	+	1
	3268	SNV	T	C		-	1
	14874	SNV	G	T	K4870N (K469N)	+	1
	16726	SNV	C	T	H5488Y (H1087Y)	+	1
	17035	SNV	G	T	A5591S (A1190S)	+	1
	17211	SNV	G	T	L5649F (L1248F)	+	1
	17678	SNV	C	T	T5805M (T1404M)	+	1
	19859	SNV	C	T	A6532V (A2131V)	+	1
	20132	SNV	C	T	A6623V (A2222V)	+	1
	20402	SNV	C	T	S6723L (S2312L)	+	1
	21034	SNV	C	T	L6924F (L2523F)	+	1
	5512	SNV	C	T		-	1
	21076	SNV	A	G	T6938A (T2537A)	+	1
	21110	SNV	C	T	T6949I (T2548I)	+	1
	7393	SNV	G	T		-	1
	10834	SNV	C	T		-	1
	11173	SNV	C	T		-	1
	15372	SNV	G	T		-	1
	15738	SNV	C	T		-	1
	16221	SNV	G	T		-	1
	16353	SNV	T	C		-	1
	16362	SNV	C	T		-	1
	17427	SNV	G	T		-	1
	18690	SNV	T	C		-	1
	18744	SNV	C	T		-	1
	19839	SNV	T	C		-	1
	20037	SNV	T	C		-	1

S	23403	SNV	A	G	D614G	+	63
	22029..22034	Delesyon	AGTTCA	-	E156_R158delinsG (E158G)	+	24
	21618	SNV	C	G	T19R	+	24
	21987	SNV	G	A	G142D	+	24
	22917	SNV	T	G	L452R	+	24
	23604	SNV	C	G	P681R	+	24
	24410	SNV	G	A	D950N	+	24
	22995	SNV	C	A	T478K	+	22
	24110	SNV	A	C	I850L	+	10
	21765..21770	Delesyon	TACATG	-	H69_V70del (H69-, V70-)	+	6
	21991..21993	Delesyon	TTA	-	Y145del (Y144-)	+	6
	23557	SNV	C	T		-	6
	23063	SNV	A	T	N501Y	+	6
	23271	SNV	C	A	A570D	+	6
	23709	SNV	C	T	T716I	+	6
	24506	SNV	T	G	S982A	+	6
	24914	SNV	G	C	D1118H	+	6
	24445	SNV	G	T		-	5
	21712	SNV	A	T		-	4
	24274	SNV	T	C		-	4
	23604	SNV	C	A	P681H	+	4
	22088	SNV	C	T	L176F	+	3
	22094	SNV	G	A	D178N	+	3
	22403	SNV	G	C	E281Q	+	3
	23031	SNV	T	C	F490S	+	3
	23525	SNV	C	T	H655Y	+	3
	24099	SNV	C	T	A846V	+	3
	24124	SNV	G	T	K854N	+	3
	24348	SNV	G	T	S929I	+	3
	25088	SNV	G	T	V1176F	+	3
	23950	SNV	T	C		-	3
	24109	SNV	C	T		-	3
	22992	SNV	G	A	S477N	+	2
	24402	SNV	A	T	K947I	+	2
	24712	SNV	G	T	M1050I	+	2
	24751	SNV	G	T	L1063F	+	2
	24872	SNV	G	T	V1104L	+	2
	22444	SNV	C	T		-	2
	22543	SNV	T	A		-	2
	22801	SNV	G	T		-	2
	23059	SNV	C	T		-	2
	23191	SNV	C	T		-	2
	24616	SNV	C	T		-	2
	21575	SNV	C	T	L5F	+	1
	21627	SNV	C	T	T22I	+	1
	22299	SNV	G	A	R246K	+	1
	23042	SNV	T	C	S494P	+	1
	24000	SNV	G	T	S813I	+	1
	22624	SNV	C	T		-	1
	22981	SNV	T	C		-	1
	24124	SNV	G	A		-	1
	25156	SNV	C	T		-	1
ORF3a	25469	SNV	C	T	S26L	+	24
	25439	SNV	A	C	K16T	+	10
	25563	SNV	G	T	Q57H	+	10
	25996	SNV	G	T	V202L	+	6
	25775	SNV	G	T	W128L	+	4
	25710	SNV	C	T		-	4
	25844	SNV	C	T	T151I	+	3
	25855	SNV	G	T	D155Y	+	3
	26069	SNV	A	C	E226A	+	3
	25413	SNV	C	T		-	3
	25440	SNV	G	C	K16N	+	2
	25555	SNV	G	T	V55F	+	2
	25613	SNV	C	T	S74F	+	2
	26191	SNV	C	T	P267S	+	2
	25902	SNV	T	G		-	2
	25528	SNV	C	T	L46F	+	2
	25546	SNV	C	T	L52F	+	1
	25970..25971	MNV	GG	TA	W193L	+	1

ORF7a	27752	SNV	C	T	T120I	+	22
	27638	SNV	T	C	V82A	+	10
	27463	SNV	G	T	V24F	+	3
	27692..27697	Delesyon	TTTTTC	-	F101_L102del (F101-, L102-)	+	3
	27707	SNV	C	T	A105V	+	2
	27494	SNV	C	T	P34L	+	1
	27613	SNV	G	T	V74F	+	1
ORF7b	27874	SNV	C	T	T40I	+	24
	27876..27877	MNV	TG	GT	C41V (C41-)	+	3
M	26767	SNV	T	C	I82T	+	24
	26735	SNV	C	T		-	9
	26876	SNV	T	C		-	4
	27131	SNV	C	T		-	3
	26527	SNV	C	T	A2V	+	2
	26985	SNV	C	T	H155Y	+	1
ORF6	27346	SNV	T	C	Y49H	+	2
N	29402	SNV	G	T	D377Y	+	26
	28461	SNV	A	G	D63G	+	24
	28881	SNV	G	T	R203M	+	24
	28916	SNV	G	T	G215C	+	24
	28881..28883	MNV	GGG	AAC	R203_G204delinsKR (R203K, G204R)	+	20
	28280..28282	MNV	GAT	CTA	D3L	+	6
	28977	SNV	C	T	S235F	+	6
	28975	SNV	G	C	M234I	+	4
	29399	SNV	G	A	A376T	+	4
	28346	SNV	G	T	G25C	+	3
	28655	SNV	G	A	D128N	+	3
	28854	SNV	C	T	S194L	+	3
	28866	SNV	C	T	T198I	+	3
	28881	SNV	G	A	R203K	+	3
	29527	SNV	G	T	Q418H	+	3
	28396	SNV	G	A		-	3
	28396	SNV	G	T		-	3
	28594	SNV	A	G		-	3
	29164	SNV	T	C		-	3
	28806	SNV	G	T	G178V	+	2
	29468	SNV	G	C	D399H	+	2
	28321	SNV	G	T		-	2
	29119	SNV	C	T		-	2
	29149	SNV	C	T		-	2
	28311	SNV	C	T	P13L	+	1
	28690	SNV	G	T	L139F	+	1
	29200	SNV	C	T		-	1
	29227	SNV	G	A		-	1

N-ORF8	28271	Delesyon	A	-		-	30
ORF8	28248..28253	Delesyon	GATTTC	-	D119_F120del (D119-, F120-)	+	23
	27972	SNV	C	T	Q27*	+	6
	28048	SNV	G	T	R52I	+	6
	28095	SNV	A	T	K68*	+	2
ORF10	29596	SNV	A	G	I13M	+	3
3'UTR	29742	SNV	G	T		-	17
	29744	SNV	G	T		-	1

Aa değişikliklerinin Nexclade sistemindeki isimlernedirilme farklılıkları parantez içinde gösterilmiştir.