

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**COVID-19 TANILI HASTALARDA SARS-CoV-2 TAM GENOM
ANALİZİ VE KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FİRUZE SOYAK**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. TUĞBA SARI**

DENİZLİ-2023

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**COVID-19 TANILI HASTALARDA SARS-CoV-2 TAM GENOM
ANALİZİ VE KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. FİRUZE SOYAK**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. TUĞBA SARI**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi'nin 22.10.2021 tarih ve 2021TIPF030 no'lu kararı ile
desteklenmiştir.

DENİZLİ-2023

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xv
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. TARİHÇE.....	3
1.2. VİRÜS ÖZELLİKLERİ	4
1.2.1. Sınıflandırma.....	4
1.2.2. Yapısı.....	6
1.2.2.1. Spike (S) Proteini.....	7
1.2.2.2. Zarf (E) Proteini.....	8
1.2.2.3. Nükleokapsit (N) Proteini.....	9
1.2.2.4. Membran (M) Proteini	9
1.2.3. Epidemiyoloji.....	10
1.2.4. Patogenez	14
1.2.5. Risk Faktörleri.....	18
1.2.6. Klinik Bulgular	19
1.2.7. Tanı.....	21
1.2.7.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Testi (NAAT)	22
1.2.7.2. Viral Antijen Testleri.....	22
1.2.7.3. Antikor Testleri	23
1.2.7.4. Viral Kültür.....	23

1.2.7.5.	Genom Sekanslama.....	23
1.2.8.	Tedavi.....	25
1.2.8.1.	Antiviral Tedaviler.....	25
1.2.8.2.	Antiinflatuar Tedaviler.....	25
1.2.8.3.	Konvelasan Plazma.....	26
1.2.8.4.	Monoklonal Antikorlar.....	26
1.2.9.	Komplikasyonlar.....	27
1.2.10.	Aşılama.....	28
2.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
2.1.	ARAŞTIRMANIN TİPİ.....	30
2.2.	ARAŞTIRMANIN YERİ.....	30
2.3.	ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ.....	30
2.4.	ETİK KURUL ONAYI.....	30
2.5.	HARIÇ TUTULMA KRİTERLERİ.....	30
2.6.	ARAŞTIRMANIN YERİ VE KATILIMCI SAYISI.....	31
2.7.	NUMUNE SEÇİMİ VE VİRAL RNA İZOLASYONU.....	31
2.8.	FİLOGENETİK ANALİZ.....	31
2.9.	HASTALARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.....	32
2.10.	İSTATİKSEL ANALİZ.....	33
3.	BULGULAR.....	34
4.	TARTIŞMA.....	53
5.	SONUÇ.....	68
6.	KAYNAKLAR.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	: Aminoasit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACE-2	: Anjiotensin Converting Enzyme-2
AIDS	: Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
ALT	: Alanin Aminotransferaz
ARDS	: Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
AST	: Aspartat Aminotransferaz
B-PAP	: İki Seviyeli Pozitif Havayolu Basıncı
BUN	: Kan Üre Azotu
CDC	: Hastalık Korunma ve Kontrol Merkezleri
CLIA	: Kemilüminesans İmmünoanaliz
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı-2019
CRP	: C-Reaktif Protein
CXCL10	: C-X-C Motif Kemokin Ligand-10
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksirübönükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
E	: Zarf Proteini
ECMO	: Ekstra korporal Membran Oksijenizasyonu
ELİSA	: Enzim İşaretli ImmunoSorbent Assay
ER	: Endoplazmik Retikulum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

GISAID	: Global Tüm İnfluenza Verilerini Paylaşma Veritabanı
gRNA	: Genomik RNA
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
Hgb	: Hemoglobin
HT	: Hipertansiyon
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IP-10	: İnterferon Gama İndükleyici Protein-10
JAK	: Janus kinaz
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KOAH	: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
M	: Membran Proteini
Mab	: Monoklonal Antikor
MERS-CoV	: Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
MtDNA	: Mitokondrial DNA
MIF-1	: Makrofaj İnflamatuar Protein-1
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
nAbs	: Nötralize edici antikorlar
N	: Nükleokapsid
NF	: Nazofarengal
NFKB	: Nükleer Faktör Kappa-B
NSP	: Yapısal Olmayan Protein

NTD	: N-Terminal Domein
OF	: Orofarengeal
ORF	: Açık Okuma Bölgesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PRR	: Patern Tanıma Reseptörü
R0	: Üreme Katsayısı
RBD	: Reseptör Bağlanma alanı
RNA	: Ribonükloik Asit
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTC	: Replikasyon Transkripsiyon Kompleksleri
RNP	: Ribonükleoprotein
S	: Spike Proteini
SARS-CoV	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü
SARS-CoV-2	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü-2
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozis
TESSy	: Avrupa Sürveyans Sistemi
TLR	: Toll-benzeri Reseptör
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TMPRSS2	: Transmembran Serin Proteaz
VOC	: Endişe Verici Varyant
VOI	: Yakından İzlenmesi Gereken Varyant

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1 : Hastaların demografik özellikleri ve servis yatış durumları	34
Tablo 2 : Hastaların COVID-19'a karşı bağışıklanma durumları	35
Tablo 3 : Tam aşılanan ve aşılanmayan hastaların klinik seyirleri.....	36
Tablo 4 : Hastaların demografik ve klinik verileri, nadir görülen mutasyonlar	37
Tablo 5 : Hastaların klinik durumlarına göre demografik verileri	38
Tablo 6 : Hastaların klinik seyirleri ve semptomları	38
Tablo 7 : Hafif-orta ve ağır klinik seyirli hastaların komorbidite durumları.....	39
Tablo 8 : Klinik bulgularına göre laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması	40
Tablo 9 : Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve varyant analiz sonuçları	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Koronavirüs ailesinin sınıflandırması	4
Şekil 2: SARS-CoV-2 virüsünün küresel yapısı ve proteinlerin dizilimi.	7
Şekil 3: SARS-CoV-2 virüsünün viral replikasyon döngüsü.....	15
Şekil 4: Genom değişikliklerinin görülen bölgelere göre dağılımı	43
Şekil 5: Mutasyonların görülme yerleri dağılımına göre Heat-map grafiği	44
Şekil 6: Delta varyantının Spike Protein 3D görünümü ve aa değişiklikleri.....	48
Şekil 7: Çalışmadaki örneklerin soylara göre filogenetik analiz grafiği.....	50
Şekil 8: Çalışmadaki izolatların filogenetik ağaç yapısı.....	51
Şekil 9: İzlenen 15 olgudan elde edilen SARS-CoV-2 Spike proteinlerinin GISAID web sitesi üzerinden araştırmacı tarafından oluşturulmuş 3D görünümü	52

ÖZET

COVID-19 TANILI HASTALARDA SARS-CoV-2 TAM GENOM ANALİZİ VE KLİNİK BULGULAR İLE İLİŞKİSİ

Dr. Firuze SOYAK

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu koronavirüs hastalığı (COVID-19), Aralık 2019'un sonlarında Wuhan'da ortaya çıkarak kısa sürede tüm dünyada etkisini göstermiştir. Pandemiden kısa süre sonra ortaya çıkan SARS-CoV-2 varyantları, epidemiyolojik ve klinik bulgularda, aşı ve tedavi seçeneklerinde değişikliklere neden olarak pandeminin seyrini değiştirmiştir. SARS-CoV-2 virüsünün genomik dizilimini belirlemek için kullanılan bir teknik olan sekanslama, yeni varyantların ve mutasyonların tespiti ve karakterizasyonu için önemli bir araçtır. RNA dizisindeki değişikliklerin belirlenmesi, virüsün evrimi, yayılımı, bulaşıcılığı, hastalığın klinik bulguları ve aşıların etkililiği gibi faktörlerin anlaşılmasına katkı sağlar ve salgının kontrolünde önemli bir rol oynar.

Bu çalışmada farklı dönemlerde takip edilen belirli özelliklere sahip COVID-19 hastalarından elde edilen SARS-CoV-2 örneklerinde tam genomik sekanslama yapılarak virüsün yapısal değişikliklerinin görülme sıklıkları ve hastalığın klinik bulgularına etkisi analiz edilmiştir.

2022 Ocak ve Kasım ayları arasında Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'nde takipli 21 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. COVID-19 hastalarının nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örnekleri alınarak viral RNA'ları ekstrakte edilmiş ve tam genomik sekanslama analizi gerçekleştirilmiştir. Hastalar klinik durumlarına göre hafif, orta ve ciddi klinik seyirli olmak üzere gruplandırılmış, klinik durumları, laboratuvar sonuçları, radyolojik bulguları ve PCR pozitiflik süresi ile gen analizi sonuçları arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 21 hastanın 13'ü (%61,9) erkek ve yaş ortalamaları $65,3 \pm 20,7$ (26-97) idi. Toplamda 18 (%85,7) hastanın hastanede (servis veya yoğun bakım) takip ve tedavisi yapılırken, üç (%14,3) hasta ayaktan takip edildi. Çalışmada 12 hastada Omicron BA.2, dört hastada Omicron BA.1, dört hastada Omicron BA.5

alt varyantları ve bir hastada Delta varyantı saptandı. İncelenen tüm izolatlarda c.1841A>G (D614G), c.425G>A (G142D), c.9764C>T, NSP4 (T492I), c.14144C>T (NSP12 P323L) mutasyonları saptandı. Hastalardan izole edilen örneklerde tespit edilen mutasyonlar ile bu mutasyonların tüm dünyada aynı sekansta görülme sıklıkları Pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, bu değişkenler arasında yüksek derecede pozitif bir korelasyon bulundu. ($r(163)=0.81$, $p<0.001$). Ek olarak Türkiye'den alınan örneklerde ilk kez bulunan bazı missense mutasyonlar gözlemlendi.

Ağır klinik seyirli hastalarda obezite, hafif ve orta klinik seyirli hastalara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek oranda görüldü ($p=0,042$). Laboratuvar bulgularına göre incelendiğinde ağır klinik seyirli hastalarda; başvuru anındaki C-reaktif protein ($p=0,014$), aspartat aminotransferaz (AST) ($p=0,001$), BUN ve ($p=0,018$) kreatinin yüksekliği ($p=0,003$) ve hemoglobin (Hgb) değerlerinde düşüklük ($p=0,037$) diğer klinik formalara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazla tespit edildi.

Uzamış PCR pozitifliği (dört haftanın üzerinde) immunsuprese hastalarda (malignite ($p=0,016$), lenfoma ($p=0,006$)) daha sık saptandı. Aynı zamanda bu hastaların çoğunun orta ve ağır klinik seyir gösterdiği saptandı ($p=0,019$).

İmmün yetmezlik kliniği olan hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde daha fazla hastaneye yatış ($p=0,026$) ve daha ağır hastalık tablosu gözlemlendi ($p=0,018$).

Çalışmaya alınan hastalarda saptanan mutasyonlar değerlendirildiğinde ise aşılarından herhangi biriyle dört doz ve üzeri aşılanan hastalarda Spike Q493R mutasyonu daha yüksek oranlarda saptandı ($p=0,043$).

Çalışmada nadir olarak görülen mutasyonlara bakıldığında literatürle uyumlu bir şekilde Omicron BA.1 subvaryantı saptanan olgularda Spike A67V, del211 ve ins214EPE mutasyonları viral infektivitede artış ve bağışıklık yanıtına direnç ile ilişkilendirilmiştir. Spike R346K ve Türkiye'den ilk kez bildirilen Spike A263T mutasyonunun klinik etkisinin infektivite ve bulaştırıcılıktan ziyade sonucusu son üç ay içinde olan dört doz aşılama rağmen hastamızda tespit edilmesi sebebiyle bu varyantın antikor yanıtından kaçış ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Omicron

BA.2 subvaryantı hastamızda saptanan Spike R21T'nin, literatürle uyumlu olarak, virüsün insan ve bağırsak hücrelerine geçişini artırarak ağır klinik seyir ve gastrointestinal (GİS) bulgulardan sorumlu olabileceği (hastamızda GİS semptomları olması nedeniyle) ve antikor nötralizasyonunda azalmaya (hastamızın dört doz aşılama öyküsü olması nedeniyle) neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

Omicron BA.2 subvaryantı için Spike L452M değişikliğinin ORF3a'da tespit edilen D155Y ile sinerjik etki göstererek aşırı immün yanıt ve hiperinflamasyonu tetikleyebileceği (hastamızın inflamatuvar parametrelerinde belirgin artış olması nedeniyle) düşünülmüştür. NSP1 H110Y mutasyonun konakçı gen ifadesini inhibe ederek bu yolla bağışıklık sisteminden kaçma etkisinin hastamızda da görüldüğü gözlemlenmiştir. Spike A222V, T323I ve NS7a A106T değişiklikleri azalmış enfektivite, artmış bağışıklık yanıtından kaçış ve konakçı-virüs bağlanması (hastamızda hafif klinik seyir, uzamış PCR pozitifliği saptanması nedeniyle) ile ilişkilendirilmiştir. NSP4 T114I'in literatürle uyumlu olarak hastamızda da viral replikasyonda artış/viral klerenste azalış ile uzamış PCR pozitifliğine neden olduğu görülmüştür. Spike A27S, K417N, N440K, Q493R, T19I, G142D mutasyonlarının saptandığı hastalarımızda da yine literatürle uyumlu olarak, ortak etki oluşturarak aşı ile oluşan antikor yanıtına dirence neden olduğu gözlemlenmiştir. Spike G339D, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y mutasyonlarının da dört doz aşılı ve yüksek antikor titresine sahip hastamızda olması nedeniyle bağışıklık yanıtından kaçış etkisinin olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda Delta (B.1.617.2) varyantı saptanan bir olguda Spike protein NTD spesifik E156G/del157-158 ve L452R kombinasyonunun artan enfektivite, aşı ile ortaya çıkan poliklonal antikorlara direnç ve artmış hücreden hücreye füzyon etkisinin olgumuzda da gözlemlendiği düşünülmüştür. Spike P681R saptanan hastamızda olduğu gibi ağır klinik seyir ve uzamış PCR pozitifliği ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Omicron BA.5 varyantı için NSP13 A389V, NSP14 M315I, NSP16 T140I mutasyonlarının hastamızda hiperinflamasyon kliniği olması nedeniyle literatüre benzer şekilde abartılı inflamatuvar yanıt ve akciğer immünopatolojisine neden olabileceğini düşündürmüştür. N E136D mutasyonu, hastamızda olduğu gibi daha ağır

ve uzun seyreden üst solunum yolu bulgularına neden olabileceğini ve yurt dışı seyahat öyküsü olan kişiyle temas öyküsü olması nedeniyle seyahat öyküsünün epidemiyolojik ve varyantların dağılımındaki önemini olgumuzda göstermiştir.

Türkiye’de ilk kez sekanslama sonuçlarının kliniğe yansması bu çalışmada değerlendirilmiştir. Ancak sınırlı sayıda hasta grubunda ve tek merkezde yapılan bu çalışma tüm ülke verilerini temsil etmemektedir. Daha büyük bir popülasyonda, daha fazla sayıda merkezde, daha fazla sekanslama çalışmaları ile bu sonuçların klinik yansmasının araştırılmasına gereksinim vardır. Virüsün yayılımının ulusal ve global seviyelerde takibi, viral genomların karşılaştırılması ve moleküler filogenetik ağaçların oluşturulmasıyla izlenebilir. Genetik değişikliklerin tespiti, varyantların ortaya çıkması ve mutasyon oranlarının anlaşılması etkin tedavi ve aşı geliştirilmesinde olumlu bir etki yaratacaktır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, Tam Genomik Sekanslama, Varyant

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN SARS-CoV-2 FULL GENOME ANALYSIS AND CLINICAL FINDINGS IN PATIENTS DIAGNOSED WITH COVID-19

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) caused by it, emerged in Wuhan at the end of December 2019 and quickly spread worldwide. SARS-CoV-2 variants that emerged shortly after the pandemic began have changed the course of the pandemic by causing changes in epidemiological and clinical findings, as well as in vaccination and treatment options. Sequencing, a technique used to determine the genomic sequence of the SARS-CoV-2 virus, is an important tool for the detection and characterization of new variants and mutations. Determining changes in the RNA sequence contributes to understanding factors such as the virus's evolution, spread, infectivity, clinical findings of the disease, and effectiveness of vaccines, and plays an important role in controlling the epidemic.

In this study, genomic sequencing was performed on SARS-CoV-2 samples obtained from COVID-19 patients with certain characteristics followed during different periods, and the frequency of structural changes in the virus and their effects on clinical findings of the disease were analyzed.

Between January and November 2022, 21 patients from the Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology at Pamukkale University Hospital were included in the study. Nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples were obtained from COVID-19 patients, and their viral RNA was extracted and subjected to whole-genome sequencing analysis. The patients were grouped as having mild, moderate, or severe clinical courses based on their clinical status, and the relationship between their clinical status, laboratory results, radiological findings, PCR positivity duration, and genetic analysis results was investigated.

Of the 21 patients included in the study, 13 (61.9%) were male, and their mean age was 65.3 ± 20.7 (26-97). Eighteen (85.7%) patients were hospitalized, and three (14.3%) patients were followed up as outpatients. In the study, Omicron BA.2 subvariants were detected in 12 patients, Omicron BA.1 subvariants in four patients, Omicron BA.5 subvariants in four patients, and Delta variant in one patient. The

mutations c.1841A>G (D614G), c.425G>A (G142D), c.9764C>T, NSP4 (T492I), and c.14144C>T (NSP12 P323L) were detected in all isolates analyzed. When the mutations detected in the samples taken from the patients were compared with the frequencies of these mutations in other sequences worldwide, a high positive correlation was found between these variables ($r(163)=0.81$, $p<0.001$). Additionally, some missense mutations observed for the first time in samples from Turkey were identified.

Obesity was statistically significantly more common in patients with severe clinical courses than in those with mild or moderate clinical courses ($p=0.042$). When the laboratory findings were examined, significantly higher levels of C-reactive protein ($p=0.014$), aspartate aminotransferase ($p=0.001$), BUN and ($p=0.018$), creatinine ($p=0.003$), and lower hemoglobin levels ($p=0.037$) were detected in patients with severe clinical courses than in those with other clinical courses.

Prolonged PCR positivity (over four weeks) was detected more frequently in immunosuppressed patients (malignancy ($p=0.016$), lymphoma ($p=0.006$)). At the same time, it was found that most patients had a moderate to severe clinical course ($p=0.019$). In patients with immunodeficiency, statistically significant increased hospitalization rates ($p=0.026$) and more severe disease course were observed ($p=0.018$). When the mutations detected in the patients included in the study were evaluated, the Spike Q493R mutation was detected at higher rates in patients vaccinated with any of the vaccines with 4 doses or more ($p=0.043$). Looking at the rare mutations in our study, Spike A67V, del211, and ins214EPE mutations were found in Omicron BA.1 subvariant cases in a manner consistent with the literature, associated with increased viral infectivity and resistance to immune response. It was suggested that the clinical effect of Spike R346K and the Spike A263T mutation, which was first reported in Turkey and detected in our patient despite four doses of vaccination in the last three months, could be related to escape from the antibody response of this variant.

It has been concluded that the Spike R21T mutation detected in our patient, consistent with the literature, may be responsible for severe clinical course and gastrointestinal symptoms by increasing the virus's entry into human and intestinal cells, and may cause a decrease in antibody neutralization due to the patient's history

of four doses of vaccination. It is thought that the Spike L452M mutation for the Omicron BA.2 subvariant, in synergy with the D155Y detected in ORF3a, may trigger excessive immune response and hyperinflammation, as there was a significant increase in inflammatory parameters in our patient. The NSP1 H110Y mutation was observed to escape the immune system by inhibiting host gene expression. The Spike A222V, T323I, and NS7a A106T mutations were associated with decreased infectivity, increased immune evasion, and host-virus binding, which could explain the mild clinical course and prolonged PCR positivity detected in our patient. The NSP4 T114I mutation was observed to cause prolonged PCR positivity in our patient, consistent with the literature, by increasing viral replication or decreasing viral clearance. The Spike A27S, K417N, N440K, Q493R, T19I, and G142D mutations, detected in our patients, were observed to have a common effect by causing resistance to the antibody response generated by the vaccine, consistent with the literature. It has been suggested that the presence of Spike mutations G339D, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, and N501Y in our patient who has received four doses of vaccine and has high antibody titers may lead to immune escape.

In a case with the Delta (B.1.617.2) variant detected in our study, it was thought that the combination of Spike protein NTD-specific E156G/del157-158 and L452R may have led to increased infectivity, resistance to polyclonal antibodies generated by the vaccine, and increased cell-to-cell fusion effect, which was also observed in our patient. The presence of Spike P681R in our patient was concluded to be associated with severe clinical course and prolonged PCR positivity, as observed in our case.

For the Omicron BA.5 variant, the NSP13 A389V, NSP14 M315I, and NSP16 T140I mutations were considered to be able to cause exaggerated inflammatory response and lung immunopathology, similar to the literature, due to the hyperinflammatory clinical presentation in our patient. The N E136D mutation, as observed in our patient with a travel history and contact history with a person who had a travel history, demonstrated the importance of travel history in our case and its contribution to the epidemiology and distribution of the variants, as it may cause more severe and prolonged upper respiratory tract symptoms.

This study evaluated the clinical impact of sequencing results for the first time in Turkey. However, this study was limited to a small group of patients and a single center, and therefore does not represent all country data. There is a need for further investigation into the clinical impact of these results in a larger population, with more centers and sequencing studies. The tracking of the virus's spread at national and global levels, comparison of viral genomes, and creation of molecular phylogenetic trees can help with this investigation. The detection of genetic changes, emergence of variants, and understanding of mutation rates can have a positive impact on effective treatment and vaccine development.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Whole Genome Sequencing, Variant.

GİRİŞ

Koronavirüsler (*Coronaviridae* ailesi), insan ve hayvanlarda sık görülen patojenlerdir. Son yirmi yılda, üç zoonotik koronavirüs (Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV), Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-CoV) ve Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) hayvan rezervuarlarından bulaş sonrasında insanları enfekte etmiştir. SARS-CoV, 2002 yılında Çin’de ortaya çıkarak salgına neden olurken, MERS-CoV Orta Doğu’da aralıklı salgınlara neden olmaktadır. Bu üç virüs alt solunum yollarında çoğalarak, ölümcül akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) neden olabilmektedir [1].

Koronavirus hastalığına (COVID-19) neden olan SARS-CoV-2, *Coronaviridae* ailesinden, Betacoronavirus cinsine ait olan, segmentsiz, pozitif sarmallı zarflı bir RNA virüsüdür [2].

COVID-19’un etkeni olan SARS-CoV-2, ilk olarak 2019’un sonlarında Çin’in Wuhan kentinde tespit edildikten kısa bir süre sonra tüm kıtalarda vakalar bildirilmiştir. Tüm dünyada 605 milyonun üzerinde kişi SARS-CoV-2 ile enfekte olurken 6,4 milyon kişi hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir [3]. Türkiye’de ise ilk vakanın görüldüğü Şubat 2020’den itibaren 17 milyona yakın kişi hastalıkla karşılaşmış ve 100.000 üzerinde hasta hayatını kaybetmiştir [4].

COVID-19’da şiddetli hastalık tablosu, herhangi bir yaştaki sağlıklı bireylerde ortaya çıkabilir, ancak ağırlıklı olarak ileri yaşta veya altta yatan tıbbi komorbiditeleri olan yetişkinlerde görülmektedir [5]. Spesifik demografik özellikler ve laboratuvar anormallikleri de ciddi hastalıkla ilişkilendirilmiştir.

SARS-CoV-2 hızla yayılım göstermesine rağmen, virüsün bulaşabilirliği, patojenitesi ve kimlerde daha ağır kliniğe neden olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir [6]. Bu nedenle, virüsün evrimini izlemek için SARS-CoV-2’nin genetik dizilerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması ve izlenmesi gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) endişe verici SARS-CoV-2 varyantlarını, bulaşıcılıkta, hastaneye yatış veya ölüm oranlarında artış veya bağışıklık üzerinde önemli bir etkiye sahip varyantlar olarak tanımlamıştır. Varyantlar, virüsün reseptör bağlama bölgelerindeki

değişiklikler, önceki enfeksiyon nedeniyle veya aşılama nedeniyle oluşturulan antikorların nötralizasyonda azalma, tedavilerin etkinliğinde azalma, bulaşıcılık veya hastalık şiddetinde öngörülen artış nedeniyle sürekli izleme ve araştırma gerektirmektedir [7].

Virüsün yayılımının ulusal ve global seviyelerde takibi, viral genomların karşılaştırılması ve moleküler filogenetik ağaçların oluşturulmasıyla izlenebilir. Genetik değişikliklerin tespiti, varyantların ortaya çıkması ve mutasyon oranlarının anlaşılması, etkin tedavi ve aşı geliştirmek için kritiktir [8]. Bu çalışmada COVID-19 tanımlı hastalardan izole edilen SARS-CoV-2 örneklerinde tam genomik sekanslama yapılarak, yapısal değişikliklerin klinik bulgularla analiz edilmesi ve potansiyel farklılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1.TARİHÇE

Günümüzde SARS-CoV-2'nin dokuzuncu alt tür olarak tanımlandığı Koronavirüslere ilk olarak 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe tarafından soğuk algınlığı olan bir çocuğun solunum yolunda rastlanmıştır [9]. Virüsün organ kültürlerinden alınan sıvıların elektron mikroskobu, tavukların enfeksiyöz bronşit virüsüne benzeyen partikülleri ortaya çıkarmıştır [10]. Benzer zamanlarda Hamre ve Procknow, soğuk algınlığı olan tıp öğrencilerinden alınan örneklerin doku kültüründe sitopatik bir ajan bulup prototip virüs 229E olarak adlandırmış ve elektron mikroskobunda benzer morfolojiye sahip olduğunu görmüştür [11]. Tyrrell ve Bynoe ile benzer teknikleri kullanan McIntosh ve arkadaşları insan solunum yolundan prototipi OC43 olarak adlandırılan birkaç enfeksiyöz bronşit benzeri ajanın elde edildiğini bildirmiştir [12]. Kısa bir süre sonra, virüsün yüzey çıkıntılarının taç benzeri görünümü belirtilerek Koronavirüs adı seçilmiştir [13].

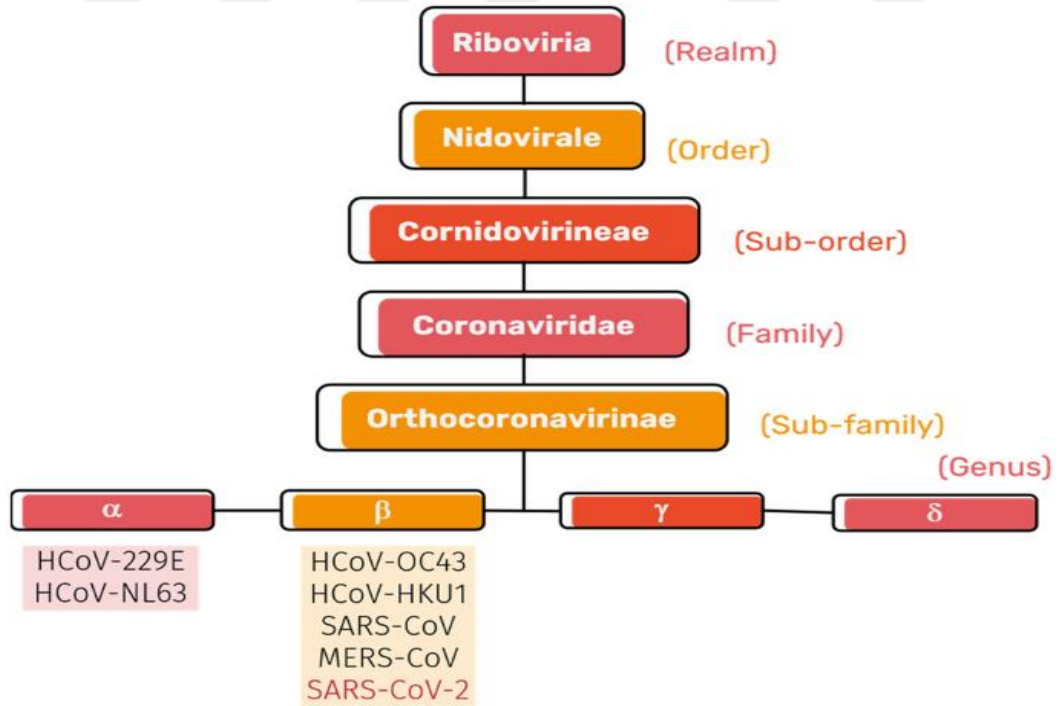
Koronavirüslerin çeşitliliğinin artması sonrası sekanslama ve antijenite çalışmaları sonucu ile insan ve hayvan koronavirüsleri ilk olarak üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup HCoV-229E prototipini ve çok sayıda hayvan koronavirüsü içermektedir. Grup 2 HCoV-OC43 ile birlikte bu suşla yakından ilişkili sığır koronavirüsünü ve fare hepatit virüsünü içerir. Grup 3 ise sadece enfeksiyöz bronşit virüsü ile ilgili kuş virüslerinden oluşur. Günümüzde ise taksonomi sınıflandırması ile *Coronavirinae* alt ailesini dört gruba ayrılmaktadır: Alphacoronavirus önceki grup 1'deki virüsleri içermektedir; Betacoronavirus grup 2'de yer alan virüsleri, özellikle de SARS-CoV, SARS-CoV-2 ve MERS-CoV'yi içerir; Gammacoronavirus, önceden grup 3'te bulunan virüsleri içerir ve Deltacoronavirus yeni tanımlanmış birkaç kuş ve domuz virüsünü içerir.

SARS ilk olarak 2002 yılının Kasım ayında Çin Halk Cumhuriyeti'nin Guangdong Eyaletinde, Orta Doğu Solunum Sendromu Korona Virüsü (MERS-CoV) 2012 yılının Haziran ayında Suudi Arabistan'da akut pnömoni ile başvuran bir hastada, SARS-CoV-2 virüsü ise 2019 yılının Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde tanımlanmıştır.

1.2. VİRÜS ÖZELLİKLERİ

1.2.1. Sınıflandırma

Koronavirüsler, Nidovirales takımının *Cornidovirineae* alt takımındaki *Coronaviridae* familyasından *Orthocoronavirinae* alt ailesi üyesidir ve bu alt aile dört ayrı sınıf içerir: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve Deltacoronavirus [15]. 2003 yılındaki SARS salgınından sonra, eskiden sınıflandırılmamış, yüksek genetik çeşitliliğe sahip çok sayıda CoV, kuş ve memeli konaklarında tanımlanmıştır. Nidovirales takımının 8 alt takımının tamamı arasında en yaygın görülen virüsleri, *Cornidovirineae* alt takımı barındırır. Şu anda, *Cornidovirineae* alt takımı tek viral aile olarak *Coronaviridae* familyasını içermektedir ve bu aile ayrıca *Letovirinae* ve *Orthocoronavirinae* olmak üzere iki alt aileye ayrılır [16]. *Orthocoronavirinae* alt familyasında bulunan Alphacoronavirus 14 alt cins ve 19 tür, Betacoronavirus 5 alt cins ve 14 tür, Deltacoronavirus 3 alt cins ve 7 tür ve Gammacoronavirus 3 alt cins ve 5 tür içerir (Şekil 1).



Şekil 1: Koronavirüs ailesinin sınıflandırması [17]

Genetik analiz çalışmaları ve tüm genom dizilimi sonuçları SARS-CoV-2'nin 2003 salgınındaki SARS-CoV ile genetik olarak ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [15]. SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 *Coronaviridae* ailesindeki Betakoronavirüs genusuna aittir. İnsanlarda hastalık yapma özelliğine sahip betakoronavirüsler olan OC43 ve HKU1 betakoronavirüsün A soyundan, SARS CoV ve SARS CoV-2 B soyundan, MERS CoV ise C soyundan gelmektedir [18, 19]. SARS-CoV-2'nin filogenetik evrimi ve moleküler epidemiyoloji daha yakından analiz edilmesi SARS-CoV-2 ile mücadele için önemli rol oynamaktadır.

Mutasyonlar tüm virüslerin ortak özelliği olmakla birlikte; RNA virüslerinde, DNA virüslerinden daha yüksek mutasyon oranları görülmektedir. Genel olarak, Nidovirüsler hariç RNA virüslerin RNA polimerazlarında, ekzonükleaz düzeltme aktivitesinin olmaması nedeniyle replikasyon döngüsünün her adımında virüs genomunda mutasyonlar birikim gösterir [20]. Koronavirüslerin de dahil olduğu Nidovirüsler, RNA polimerazlar tarafından eklenen hatalı ve mutajenik nükleotitleri kesip çıkarmak için bir enzime sahiptir ve bu nedenle virüs replikasyonu ve transkripsiyonu sonunda nispeten yüksek bir doğruluk sağlanır [21].

Genetik proof-reading mekanizması sayesinde SARS-CoV-2 yüksek mutasyon oranına sahip olmasa bile, kısa replikasyon süresi ve enfeksiyonun popülasyon boyutu göz önünde bulundurulduğunda bu virüsün hızla evrimleşmesi ve bulaşma sırasında mutasyona uğraması kolaylaşmıştır [22].

Mutasyonların büyük bir kısmının virülans, bulaştırıcılık ve dolayısıyla hastalığın seyri üzerinde kayda değer bir etkisi yoktur. Ancak artan mutasyonların doğal sonucu olarak yeni varyantlar da giderek daha fazla gözlemlenmektedir. SARS-CoV-2 viryonların genomlarında gözlemlenen mutasyonlar, patojenite, enfektivite, bulaşıcılık gibi virüs biyolojisinin çeşitli yönlerini değiştirebilmektedir.

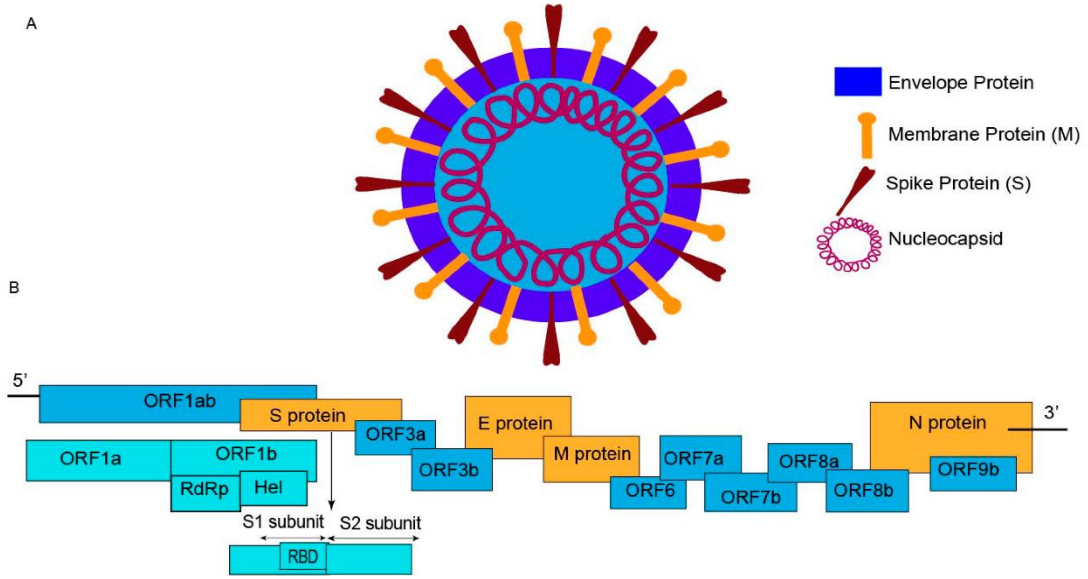
Birden fazla varyantın ortaya çıkmasıyla birlikte, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) ve DSÖ, SARS-CoV-2'nin ortaya çıkan varyantlarını endişe oluşturan varyantlar (VOC) ve dikkate alınması gereken varyantlar (VOI) olarak bir sınıflandırma sistemi oluşturmuştur. VOI'ler, bulaşıcılık veya virülans artışına, doğal enfeksiyon veya aşılama yoluyla elde edilen antikorlar tarafından nötralizasyonun azalmasına, terapötik ilaçlar veya aşılardan saklanma kabiliyetine sahip varyantlardır.

VOC ise bulaşıcılıkta artış, daha ciddi hastalık tablosu (örneğin, hastaneye yatışlarda veya ölümlerde artış), önceki enfeksiyon veya aşılama sırasında üretilen antikorlar tarafından nötralizasyonda belirgin azalma, tedavilerin veya aşıların etkinliğinin azalması veya tanısal yöntemlerin başarısızlıklarının kanıtlandığı bir varyant olarak tanımlanmıştır [23, 24]. Pandeminin başlangıcından bu yana, DSÖ sekiz VOI tanımlamıştır: Epsilon (B.1.427 ve B.1.429); Zeta (S.2); Eta (B.1.525); Teta (S.3); Iota (B.1.526); Kappa (B.1.617.1); Lambda (C.37) ve Mu (B.1.621). Epidemiyolojik güncellemeye göre pandeminin başlangıcından bu yana beş SARS-CoV-2 VOC tespit edilmiştir: Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529). Potansiyel olarak yeni biyolojik özelliklere sahip varyantların tanımlanması, pandeminin kontrolünde önemli olan genomik süreyans çalışmaları ile mümkündür.

1.2.2. Yapısı

Betakoronavirüs ailesine ait olan SARS-CoV-2 zarflı, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Virüsün genomu, yaklaşık 30 kb uzunluğunda, non-segmente büyük pozitif polariteli bir RNA'dır ve 5' ucunda şapka ve 3' poli-A kuyruk yapısı içerir [26]. Viral genom 29 proteini kodlar, bunlardan 25'i yapısal olmayan protein (NSP) ve yardımcı proteinler dördü ise yapısal proteindir. Yapısal olmayan proteinler viral RNA replikasyonunda ve bağışıklık yanıtından kaçmada rol alırken, yardımcı proteinler konakçı hücrede viral enfeksiyon kliniği oluşturma, konak hücrede hayatta kalma ve bulaştırıcılık gibi diğer işlevleri yürütür [27].

SARS-CoV-2 genomu, 14 açık okuma bölgesi (ORF) içerir. Genomun 3' ucunda yer alan dört ORF, nükleokapsid (N), spike (S), membran (M) ve zarf (E) proteini gibi bir dizi yapısal proteini kodlar. Viral genom, nükleokapsid proteini tarafından stabilize edilir ve membran, spike ve zarf proteini içeren bir lipid yapısı içinde sarılır [28]. **Şekil 2**'de gösterildiği üzere 5' 3' e doğru genlerin sıralaması, ORF1ab Replikaz, Spike (S), Zarf (E), Membran (M) ve Nükleokapsit (N) şeklindedir [26].



Şekil 2: SARS-CoV-2 virüsünün küresel yapısı ve proteinlerin dizilimi [25].

1.2.2.1. Spike (S) Proteini

SARS-CoV-2 Spike (S) proteini, bir proteaz aracılığıyla konak hücrelere bağlanan ve membran füzyonuna aracılık eden S1 ve S2 olmak üzere iki fonksiyonel alt birime bölünebilen bir proteindir. S proteinin S1 ünitesine ait olan reseptör bağlama alanı (RBD) ile konakçydaki Anjiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2) reseptörüne bağlanır. S proteininin hayati işlevlere sahip olması nedeniyle, nötralize edici antikolar (nAbs) tarafından inhibisyon için önemli bir hedeftir [28]. S proteinindeki mutasyonlar, özellikle nAb bağlanma epitoplarındakiler, nAb'lerin inhibisyon gücünü azaltabilmektedir. Nisan 2020'de sıklığı artan, S protein amino asit değişikliği ile sonuçlanan D614G mutasyonu, S proteininde en sık bildirilen mutasyondur ve SARS-CoV-2 popülasyonunda enfektivite ve morbiditeyi artırdığı gösterilmiştir [29, 30].

Spike N501Y, mutasyon bölgesi RBD-ACE2 arayüzünde bulunan, RBD'nin artmış ekspresyonu ve ACE-2 afinitesinde artışla sonuçlanan ilk olarak Birleşik Krallık, Brezilya ve Afrika'dan ortaya çıkmış olan bir mutasyon çeşididir [27, 31]. Yine S proteininin E484, F490, Q493 veya S494'ünde meydana gelen mutasyonlar virüsün monoklonal antikora veya konvelasan plazmaya direnç göstermesinde rol oynamaktadır [32].

1.2.2.2.Zarf (E) Proteini

Zarf (E) proteini, virüsün yapısal proteinlerinin içinde yapısal olarak en küçük proteindir. Zarf oluşumu, viral bağlanma, tomurcuklanma ve patogenez ile ilişkilidir [33]. Bu protein fonksiyonlarını Membran proteini (M), konakçı hücre proteinleri ve diğer yardımcı proteinler -ORF3a, ORF7a- ile etkileşime girerek gerçekleştirmektedir [34].

Virüsün konak hücreye giriş sonrası, zarf proteini ile viral liziz ve ardından viral genomun salınımı gerçekleşir. E proteini, endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi cisimciğinin zarlarında virüsün lokalize şekilde toplanma ve tomurcuklanmasında görev alır [35]. E proteini ER'den kalsiyum salınımında yer alır, bunun sonucunda konak hücrede inflamasyonu tetikleyerek hücrel aktivasyona yol açar ve konakçının antiviral yanıtını tetikler. E proteininin nükleotid ve aminoasit mutasyonları ile ilgili literatür verileri kısıtlıdır. Spike, Membran ve Nükleokapsit proteinlerinin mutant suşların oranlarıyla karşılaştırıldığında, E proteininde mutasyon gelişimi daha yavaştır [36]. Mutasyonlardan göreceli olarak korunan yapısı nedeniyle COVID-19 pandemisinin kontrolünde, aşı ve terapötik ajanlar için hedef olarak tercih edilmesinde potansiyel bir protein olma özelliğindedir [37].

Real time RT-PCR testi COVID-19 tanısı sırasında, SARS-CoV-2 genomunun korunmuş zarf proteini gibi yapısal proteinleri hedef alınarak mümkün olduğunca hassas bir şekilde tasarlanmaya çalışılmaktadır. Ancak primer ve prob hedef bölgelerindeki mutasyonlar uyumsuzluklara neden olarak tanı testlerinde olası yanlış negatif sonuçlara yol açabilmektedir [38]. Çalışmalarda SARS-CoV-2'nin zarf proteini genini baz alarak PCR tabanlı test yöntemleri sonucunu etkileyebilecek olan primer problemlerin bağlanma bölgelerini hedef alan 74 nükleotidi kapsayan mutasyon gösterilmiştir [39]. Yine Zarf proteinin C-terminalinde tespit edilen mutasyonlar Ser68Phe, Pro71Ser, Leu73Phe zarf proteinin yapısı üzerinde stabilize edici bir etki sergilemektedir. S55F (128), V62F (129) ve R69I (159) mutasyonları E proteininin

konak epitel hücreesindeki tight-junction noktalarına bağlanmasını değiştirerek virüs patogenezi etkileyebileceği gösterilmiştir [40].

1.2.2.3.Nükleokapsit (N) Proteini

Nükleokapsit proteini, viral yaşam döngüsünün birçok yerinde kritik bir rol oynayan multi-domain RNA-binding proteindir. SARS-CoV-2 virüs partiküllerinin merkezinde ve infekte hücrelerde RNA sentez bölgeleri olan replikasyon transkripsiyon komplekslerinde (RTC) bulunur. N proteininin temel görevi, viral genom RNA'sını uzun bir sarmal ribonükleoprotein (RNP) kompleksi halinde paketlemek ve viral genom ve membran proteini M ile etkileşimleri yoluyla virionun montajına katılmaktır [41]. Bununla birlikte virüsün yaşam döngüsünde interferon (IFN) inhibisyonu ile düzenleyici bir rol oynar, RNA etkileşimi ve apoptoz gibi rollerde konakçı hücrelerinde görev aldığı gösterilmiştir [42, 43].

R203K/G204R, N-proteininde görülen ve sıklığı hızla artan ve virüsün enfektivitesi ile potansiyel bir ilişki gösteren mutasyonlardır [44]. R203K/G204R mutasyonların, B.1.1.7'nin (Alfa varyantı) ortaya çıkışına eşlik ettiği ve artan bulaştırıcılık ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir [45].

2021'de önceki tüm varyantlardan daha virülan olan, daha kısa inkübasyon süreli ve enfekte hastalarda daha yüksek viral yük gösteren B.1.617.2 (Delta) varyantında N-proteini, sırasıyla D63G, R203M, D377Y ve farklı sınıflardan ek olarak R385K ve G215C mutasyonlarını içermektedir. Bunlar arasında R203M mutasyonunun viral replikasyonu önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir [47].

1.2.2.4.Membran (M) Proteini

Membran proteini (M), en fazla bulunan viral yapısal proteindir ve virüs montajı ve morfogenezinde rol oynar. M proteini diğer tüm yapısal proteinlere bağlanabilir. M proteini ile bağlanma, N proteinlerinin stabilizasyonuna yardımcı olur ve virion içindeki N protein-RNA kompleksini stabilize ederek viral montajın tamamlanmasını destekler [46].

M-proteini yapısında birtakım genetik değişiklikler tespit edilmiştir. Bazı suşlarda I82T ve V70L mutasyonlarının prevalansının arttığı ve muhtemelen artan glikoz alımını kolaylaştırarak virüs için faydalı olduğu düşünülmektedir. M-

proteininin N-terminal bölgesinde meydana gelen mutasyonların konak-hücre etkileşiminde anahtar bir rol oynayabileceğini tahmin edilmektedir. N-terminal alanında tespit edilen yaygın mutasyonlar, viral etkinliği etkileyebilen V5F, E8D, V5I ve Y2H'dir. Bu mutasyonların IgM yanıtı ve patojenite üzerindeki etkileri olduğu düşünülmektedir [48].

1.2.3. Epidemiyoloji

SARS ilk olarak 2002 yılının Kasım ayında Çin Halk Cumhuriyeti'nin Guangdong Eyaletinde tespit edilmiş ve oradan Hong Kong'a ve ardından tüm dünyaya yayılmıştır. DSÖ tarafından salgın ilan edilmesi sonrası Temmuz 2003'e kadar tüm dünyada bulaşma durmuştur. Bu çabalara rağmen, 29 ülkede toplam 774 ölüm ve 8096 olası vaka meydana gelmiştir [49]. SARS hastalarından alınan örneklerden aynı anda ve bağımsız bölgelerde yapılan laboratuvar testleri ve genom çalışmaları sonucu daha öncesinde tespit edilen koronavirüs ailesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiş ve SARS-CoV olarak isimlendirilmiştir [14].

2012 yılının Haziran ayında ise Suudi Arabistan'da ilk kez akut pnömoni ile başvuran bir hastanın balgam örneğinde Betakoronavirüs sınıfından ve daha önceki yarasa koronavirüsleri olan HKU4 ve HKU5 ile ilişkili olan yeni bir koronavirüs tanımlanmıştır [50]. Orta Doğu'da ciddi bir solunum yolu hastalığı salgınına neden olan ve 2012'den beri Asya, Avrupa, Afrika ve Kuzey Amerika'da sekonder yayılım gösteren bu virüs Orta Doğu Solunum Sendromu Korona Virüsü (MERS-CoV) olarak isimlendirilmiştir [51]. MERS, salgının başlangıcında "SARS benzeri" bir hastalık olarak adlandırılmıştır, çünkü her ikisi de yüksek vaka ölüm oranları ile seyreden ciddi alt solunum yolu enfeksiyonu gösteren insan Koronavirüs enfeksiyonlarıdır [52]. Bununla birlikte erken sonlanan SARS salgınının aksine, MERS salgını azalma gösterse de ara ara vaka tanımlamaları devam etmektedir.

İnsan enfeksiyonlarına neden olan diğer dört koronavirüs HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-HKU1 ve HCoV-NL63, çoğunlukla soğuk algınlığı gibi hafif, kendi kendini sınırlayan üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [52]. 2019 yılının Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde oldukça bulaştırıcı yeni bir koronavirüs SARS-CoV-2 tanımlanmıştır. Metagenomik RNA dizilimi ve virüs izolasyonu yoluyla, ortaya çıkan bu hastalığın etkeninin yeni bir Betakoronavirüs olduğu belirlenmiştir

[53]. Tüm genom için yapılan filogenetik analiz sonucu, SARS-CoV-2'nin SARS ile ilgili koronavirüslerle benzerliği görülmüş olup, sınıflamada Betacoronavirus alt cinsi olarak yer almıştır. SARS-CoV-2'nin erken dönemde bulaşıcılığı, Huanan Deniz Ürünleri Toptan Satış Pazarı ile bağlantılı olarak görülmüş ve salgının kaynağı olarak burası belirlenmiştir [54]. Daha sonra insandan insana bulaş ile salgın tüm dünya üzerinde yayılarak Ocak 2020'de COVID-19 pandemisi ilan edilmiştir. SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV'dan daha bulaşıcı olduğu kabul edilmektedir [55].

Virüsün genom yapısındaki mutasyonlar sonrası bulaştırıcılıkta, hastalık şiddetinde değişim yaratan ve antikorlardan kaçma yeteneği kazanabilen, pandemik yönetim stratejilerini olumsuz etkileme potansiyeline sahip yeni varyantlar- Alfa, Beta, Gama, Delta, Epsilon, Eta, Iota, Kappa, N/A, Mu, Omicron, Zeta, Lambda ve Q-tanımlandı. SARS-CoV-2 genomunda tespit edilen ilk mutasyon Şubat 2020'de Spike (S) proteininin D614G alt ünitesinde saptanmıştır. Artan bulaştırıcılıkla ilişkili olan yeni B.1 varyantları kısa sürede dünya çapında en prevalan SARS-CoV-2 formu haline gelmiştir [56]. Daha önemli ölçüde etkileri görülen sonraki varyantlardan Birleşik Krallık'ta Eylül 2020'de B.1.1.7 (Alfa), Aralık 2020'de Güney Afrika'da Nelson Mandela Körfezi çevresindeki yerleşim yerinde B.1.351 (Beta) ve Brezilya'nın Alagoas Eyaletinde 16 Şubat 2021'de P.1 (Gama) ortaya çıkmıştır. B.1.617.2 (Delta) varyantı ise ilk olarak 2020 Aralık ayında Maharashtra eyaletinde tanımlanmış ve Hindistan'a yayılmıştır. Kasım 2021'de ise Güney Afrika Gauteng Eyaletinde vaka sayılarının hızla artış göstermesi sonrası yeni bir SARS-CoV-2 varyantı B.1.1.529 (Omicron) belirlenmiştir [57, 58, 59]. SARS-CoV-2 küresel olarak dolaşırken, viral genom bazıları yaygınlaşan yeni mutasyonlar edinmeye devam etmektedir [60].

2019'un sonunda bildirilen ilk COVID-19 vaka raporlarından kısa süre sonra tüm kıtalarda vakalar bildirilmiştir. Tüm dünyada 640 milyondan fazla doğrulanmış COVID-19 vakası, 6,5 milyondan fazla ölüm gerçekleşmiştir. Türkiye'de ise 17 milyondan fazla vaka ve 100 binden fazla ölüm görülmüştür [61]. Hastalığın insidans ve mortalite oranları ülkelere, bölgelere, yaş, cinsiyet ve etnik faktörlerine göre belirgin farklılıklar göstermektedir. Dünya genelinde hastalığın mortalite oranı %1 iken, Türkiye'de ise %0.6 a yakın saptanmıştır [62]. Pandeminin erken dönemlerinde görülen hastaların Çin'de hayvan pazarı ile temas öyküsü olması nedeniyle öncelikle

zoonotik bir enfeksiyon olarak değerlendirilmiştir. Ancak sonraki dönemde hastalığın öncelikle temas ve solunum damlacıkları ile bulaştığı gözlemlenmiştir [63].

SARS-CoV-2, hasta bir kişinin öksürmesi, hapşırması veya konuşması sırasında solunum salgıları ile havaya salınan virüs partiküllerinin solunması veya mukoza zarlarıyla doğrudan temas etmesi halinde başka bir kişiye bulaş olabilmektedir. SARS-CoV-2 ayrıca zaman ve mesafe içinde havada kalan parçacıkların solunması ile hava yoluyla da bulaş gösterebilmektedir [64].

SARS-CoV-2'nin bazı varyantları, infektivite özellikleri nedeniyle halk sağlığı açısından belirgin önem taşımaktadır. Bunlar arasında, Pango soyu B.1.1.7 altındaki alfa varyantı ilk olarak Eylül 2020'de Birleşik Krallık'ta belgelenmiştir [65]. Pango soyu B.1.351 altındaki beta varyantı ilk olarak Mayıs 2020'de Güney Afrika'da tespit edilmiştir. Öte yandan, P.1 soyu ve GR clade/501Y.V3 altındaki Gama Brezilya'da izole edilmiştir. Bir diğer önemli VOC, Aralık 2020'de Hindistan'da ortaya çıkan ve B.1.617.2 soyuna ait olan Delta'dır. Delta, Ekim 2021'e kadar GISAID'de sunulan tüm viral dizilerin neredeyse yüzde 90'ına oluşturmuştur [66, 67, 68]. Şu anda küresel olarak dolaşan baskın varyant olan Omicron Şubat 2022'den sonra GISAID'de paylaşılan viral dizilerin yüzde 98'ini oluşturmaktadır [69].

Orijinal Omicron varyantı Omicron BA.1 ilk olarak Kasım 2021'in sonlarında tanımlanmış olup bir ay içerisinde baskın varyant haline gelmiş ve Delta'yı geride bırakmıştır. Önceki varyantlara göre bulaştırıcılığının daha yüksek olduğu bilinmekle birlikte, daha hafif enfeksiyon kliniği ile seyrettiği ve daha düşük hastanede yatış oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir [70]. Omicron ikinci alt varyantı BA.2 ilk olarak Mart 2022 tarihinde kuzeydoğu ABD'de yaygınlığı artmaya başlamıştır.

Omicron BA.2'nin bir ürünü olan BA.2.12.21 varyantı, Mayıs 2022 tarihine kadar kuzeydoğu ABD'deki yeni vakaların çoğundan sorumlu varyanttır. Omicron BA.4 ve BA.5 ise Mayıs 2022'de ABD'de ortaya çıkmış olup kısa sürede yayılım göstermiştir. Ocak 2023 itibariyle dünya genelinde en sık izole edilen ilk üç varyant BQ.1.1 (%28,2), BQ.1 (%14,1) ve XBB.1.5 (%11,5) 'dir. BQ.1.1 ve BQ.1, BA.5 soyundan gelen, XBB.1.5 ise BA.2 soyundan gelen subvaryantlardır. Cerberus olarak da bilinen Omicron BA.5'in alt varyantları olan B.Q.1 ve B.Q.1.1, bilim adamları tarafından ilk olarak Eylül 2022'nin başlarında, ABD ve diğer birkaç ülkede tespit

edilmiştir [71]. BQ.1 ve BQ.1.1 subvaryantlarında N460K mutasyonu sonucu ortaya çıkan güçlü bir nötralizan antikor direnci gözlemlenmiştir. BA.2.75.2 subvaryantında görülen F486S mutasyonu da benzer şekilde virüsün önemli bir nötralizasyon direnci göstermesinde neden olmuştur [71].

BQ.1.1, kısa sürede dünya genelinde yaygın hale geldikten sonra kısa bir sürede yerini yeni bir alt varyant olan XBB.1.5 ile değiştirmiştir. XBB soyu ilk olarak Hindistan'da 2022 yılının Ağustos ayında BA.2.10.1.1 ve BA.2.75 adlı iki BA.2 soyu arasındaki bir rekombinasyon sonucunda keşfedilmiştir [72]. Bu subvaryantın ortaya çıkışı, R346T, G446S ve F486 dahil olmak üzere bağışıklık sisteminden kaçma işlevlerine sahip Spike proteininde 66 mutasyonu bir arada bulundurduğu için oldukça dikkat çekmiştir [73]. XBB varyant hem monovalan hem de bivalan aşılamlarına, monoklonal antikor tedavilere ve enfeksiyon tarafından uyarılan bağışıklığa karşı daha az yanıt vermektedir [72]. XBB.1.5'in ABD ve dünyanın diğer bölgelerinde dolaşımdaki hızlı büyümesi göz önüne alındığında, bunun mevcut halk sağlığı önlemleri üzerindeki etkisini anlamak çok önemlidir.

B.1.617 türünün içerdiği alt türlerden biri olan Delta varyantı orjinal suşa göre daha yüksek bulaşıcılık ve daha yüksek bir hastaneye yatış oranları göstermiştir. Delta varyantı için R0 katsayısı (reproduktif number) 5,08 iken orjinal SARS-CoV-2 orjinal suşu için 2,79 olarak bildirilmiştir [74]. Bununla birlikte B.1.617.2 ve diğer suşlarla enfekte hastalar arasında ortanca yaş ve hastalık süresi açısından fark gözlenmemiştir [75]. Mart ve Temmuz 2021 tarihleri arasında pediatrik popülasyonda endişe yaratan varyantlar arasında ortaya çıkan P.1 (Gama varyantı) ve B.1.1.7 (Alfa varyantı) öncekilerine göre artmış bulaştırıcılıkla ilişkilendirilmiştir [76]. Küresel genomik süveyansın geliştirilmesi ve varyantların epidemiyolojik verilerin analizi, artmış bulaştırıcılık veya bağışıklık yanıtından kaçış potansiyeli olan varyantların tespiti ve COVID-19'un kontrolü için önemli olacaktır.

SARS-CoV-2'nin sürekli evrimi ve varyantların etkilerine ilişkin verilerdeki sürekli gelişmeler sonucunda, varyantların epidemiyolojik ve klinik özelliklerindeki farklılıklar daha detaylı ele alınabilmektedir.

1.2.4. Patogenez

COVID-19'un patogenezini, ilk ortaya çıktığı Aralık 2019 tarihinden itibaren karmaşıklığını korumakta olup enfeksiyon kliniği üç ana patolojik süreç için tipik modelleme yapılarak kavramsal olarak açıklanabilmektedir. Klasik enflamasyonun lokal belirtileri, akut sistemik enflamasyon ve düşük yoğunluklu kronik sistemik enflamasyon patogenezinin temelini oluşturmaktadır [77].

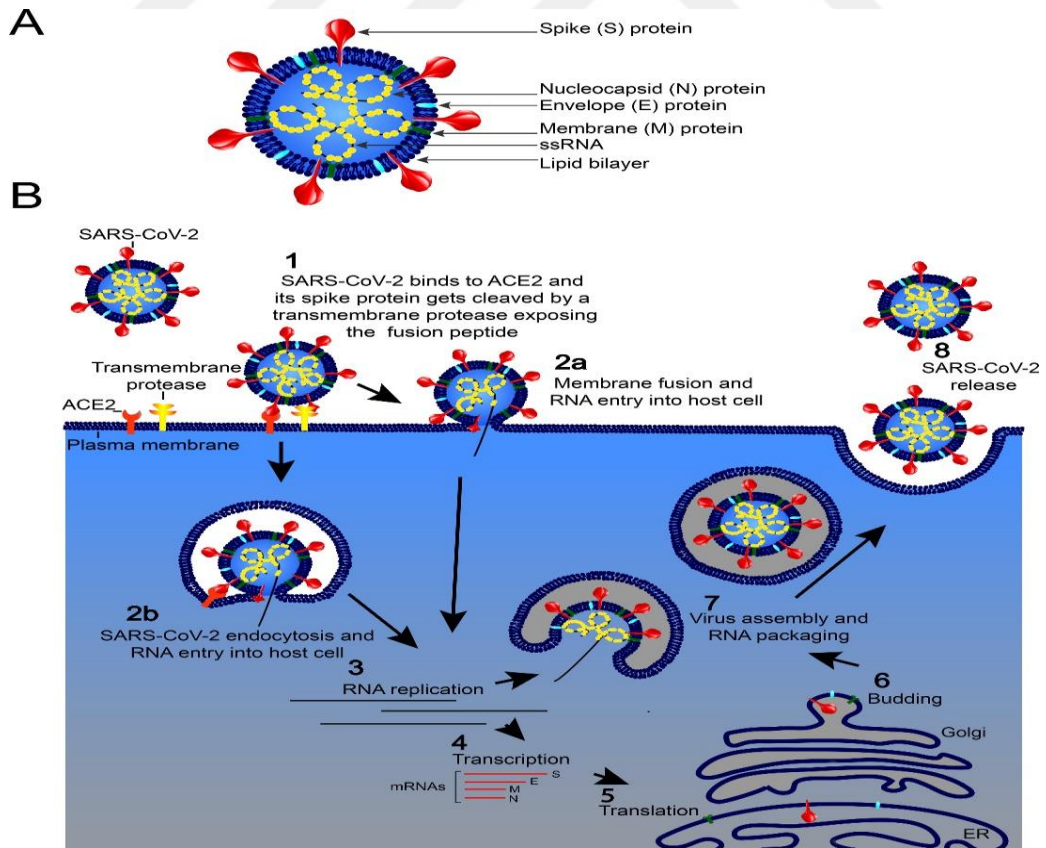
SARS-CoV-2'ye özgü seçici virülans ve patojenite faktörleri hastalığın özgülüğünü belirler. Bu faktörler SARS-CoV-2'e bağlı hastalık tablosu oluştururken, ilk olarak hücre reseptörlerinin virüs tarafından tanınması, hücreye girdikten sonra hem enfekte olmuş hedef hücrelerden hem de konakçı organizmanın bağışıklık sisteminden kaynaklanan antiviral yanıtın baskılanması ve virüsün, bir otoimmün ve otoinflamatuar süreci tetikleyerek konakçı dokularına karşı bağışıklık sistemi saldırısını kışkırtma yeteneği ve bu yolla hayatta kalma stratejisidir [78].

Spike (S) glikoprotein, Zarf glikoproteini (E), Membran glikoproteini (M) ve Nükleokapsid proteini (N) viral replikasyon ve yapılanmadan, virüsün hücre reseptörleri (S) ile bağlanmasından ve ayrıca virüsün patojenitesinden sorumludur [80]. SARS-CoV-2, S proteininin bir konak hücre yüzey reseptörü olan ACE-2'ye bağlanması yoluyla konakçı hücreleri enfekte eder. TMPRSS2 konak proteaz enzimi aracılığıyla proteolitik bir bölünme meydana gelir, S proteini konformasyonel değişikliğe uğrar ve konakçı hücre zarı ile virüs zarı füzyonu tetiklenir, sonrasında virüs nükleokapsiti sitoplazmaya salınır [81].

Virüs konakçı hücreye girdikten sonra, iki ORF1a ve ORF1b poliprotein üretmek üzere translasyona uğrar. Yapısal ve aksesuar proteinler, viral replikasyonu yönlendiren Replikasyon Transkripsiyon Kompleksi (RTC) tarafından üretilir [82]. Viral genom replikasyonu sırasında, RTC'deki pozitif yönelimli genomik RNA (+gRNA), negatif yönelimli gRNA'lar (-gRNA) oluşturmak için bir şablon olarak kullanılır. Oluşturulan -gRNA yeniden +gRNA oluşturmak için kullanılarak tam uzunlukta ve pozitif anlamda genomik RNA oluşturulur [83].

Yapısal proteinlerin üretimini takiben, nükleokapsidler sitoplazmada toplanarak ER-Golgi ara bölmesinin lümenine tomurcuklanır. Yeni üretilen virionlar,

veziküllerde olgunlaştırılır ve daha sonra ekzositoz yoluyla enfekte hücreden salınır (Şekil 3). SARS-CoV-2 S proteininin, TLR'ler, özellikle TLR4 dahil olmak üzere membranda yer alan Patern Tanıma Reseptörüne (PRR) bağlanma yeteneği olduğuna dair kanıtlar vardır. S proteininin TLR4'e bağlandığı ve hücre yüzeyinde ACE2 ekspresyonunu artırmak için TLR4 sinyal yolağını aktifleştirdiği böylece SARS-CoV-2'nin tip II alveolositlere penetrasyonunu kolaylaştırdığı varsayılmaktadır [84]. Bu durum hücre yıkımına, sürfaktan üretiminin bozulmasına ve ARDS gelişimine katkıda bulunur. SARS-CoV-2 proteinlerinin tamamına yakını, çeşitli antiviral bağışıklık mekanizmaları üzerinde etkili olan patojenik faktörlerdir. Bununla birlikte en yaygın etkileri, IFN yanıtının başlatılması ve uygulanmasının hemen hemen tüm aşamalarının bloke edilmesiyle ilişkilidir [78]. Baskılanan IFN yanıtı hastalığın ilk döneminde virüsün deri dokularının bariyer fonksiyonlarını aşmasına ve sürecin sonraki aşamalarında IFN- γ ile ilişkili bağışıklık tepkisinin işlev bozukluğuna katkıda bulunmasına izin verir [85].



Şekil 3: SARS-CoV-2 virüsünün viral replikasyon döngüsü [79].

SARS CoV-2'nin patojenite faktörlerinin bir diğer özelliği ise oksidatif stres oluşumu, otofaji, proinflamatuvar hücrel stres gelişiminin ana süreçlerinde yer alan transkripsiyon faktörlerinin (NF-KB gibi) uyarımı, sitokin ağları ile bağlantılı sekresyon fenotipi oluşumu gibi çeşitli hücre türlerinde proinflamatuvar hücrel stres gelişiminin hemen hemen tüm ana süreçlerini yönetebilmesidir [86, 87]. Bu mekanizmalar, çeşitli konakçı hücrelerinde çoğalma, bağışıklık yanıtı bozukluğunu indüklemeye ve hiperinflamasyon modelleri oluşturma gibi fırsatlar sağlamaktadır. Sonuçta şiddetli bir COVID-19 kliniğinde ARDS gelişimi ve plazmada IL-1 β , IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1) ve CCL3 (MIP-1 α) gibi kemokinlerin artışı, hastalığın erken evrelerinde kanda düşük IFN-I seviyeleri ve geç evrelerinde artmış IFN-I yanıtında artış gözlemlenmektedir.

SARS-CoV-2 yeni varyantlarının ortaya çıkışı, artan bulaştırıcılık ve patojenite konusunda küresel endişelere neden olmuştur. S proteindeki D614G mutasyonu, duyarlı hücrelerin viral enfektivitesini 8-10 kat artırarak virüse seçici avantajlar sağlamıştır [88]. 14 Aralık 2020'de Birleşik Krallık'ta ortaya çıkan, yeni bir koronavirüs varyantı olan B.1.1.7 (Alfa) 'nin S proteinin RBD N501Y mutasyonu virüsün insan ACE2 reseptörlerine bağlanma afinitesini arttırmıştır [89]. Alfa varyantının Furin bölünme bölgesinin P681H mutasyonu patojenitesini, Spike proteinde DH69/DV70 delesyonları in vitro enfektivitesini etkilemiştir [90]. Yine DH69/DV70 delesyonu, tanısal testlerde S geninin tespit edilememesine neden olmuştur [91]. Tüm genom analizi çalışmaları sonucunda B.1.1.7 varyantının orijinal suştan %56 daha fazla bulaşıcı olduğu ve efektif Reprodüktif üreme sayısının R0 1,4-1,8 kat arttığı tespit edilmiştir [92].

2020'nin sonunda Güney Afrika'nın Eastern Cape Eyaletinde ortaya çıkan B.1.351 (Beta) varyantının S proteinindeki önemli mutasyonlar D80A, D215G, 241del, 242del, 243del, D614G ve A701V iken ek olarak, RBD bölgesindeki mutasyonlar K417N, E484K ve N501Y'dir. K417, RBD ile yeni koronavirüsün ACE-2'e bağlanma afinitesini artırmaya yardımcı etkileşimi oluşturan bir rezidü dokudur ve mutasyon sonucu reseptör bağlanmasında değişikliğe neden olmuştur. N501Y ve E484K mutasyonlarının artmış patojenite ile ilişkili olduğu fare deneylerinde gösterilmiştir [93].

B.1.1.28 soyundan evrimleşen N501Y.V3 olarak da bilinen P.1 (Gama), ilk olarak 2 Ocak 2021'de Brezilya tespit edilmiştir [94]. Genel olarak, P.1 Spike proteininin yapısı, D614G 'e ek olarak RBD'de K417T, E484K ve N501Y; N terminal alanında (NTD) L18F, T20N, P26S, D138Y ve R190S, furin bölünme bölgesinin yakınında ve H655Y dahil olmak üzere 10 farklı mutasyon içermektedir. RBD'deki üç mutasyon, N501Y, K417T ve E484K, B.1.1.7 ve B.1.351 varyantlarında da yaygın olarak görülmüş olup artan bulaştırıcılık, immün sistemden kaçış ve artmış patojenite ile ilişkilidir [95, 96]. E484K mutasyonunun ise azalmış antikor nötralizasyon yanıtı ile sonuçlandığı düşünülmektedir.

Ekim 2020'de Batı Hindistan'da ortaya çıkan ve Hindistan'ın çeşitli bölgelerinde ve daha sonra dünyanın geri kalanına yayılım gösteren B.1.617 varyantı, B.1 soyunun (D614G) üç ana alt türünü içermektedir: B.1.617.1, B.1.617.2 ve B.1.617.3 [97]. D614G varyantı ile karşılaştırıldığında, B.1.617.2 (Delta) varyantının Spike proteini, beş NTD mutasyonu (T19R, G142D, δ 156, δ 157, R158G), RBD'de iki mutasyon (L452R, T478K), Furin bölünme bölgesine yakın bir mutasyon (P681R) ve S2 bölgesinde bir mutasyon (D950N) dahil olmak üzere dokuz mutasyon içermektedir [98]. RBD'deki mutasyonlar, Spike proteininin konakçı hücreye bağlanma ve giriş yeteneğini değiştirebilmektedir.

Kasım 2021'de Güney Afrika'dan Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) bildirilen B.1.1.529 (Omicron) varyantı yüksek bulaştırıcılık oranları nedeniyle kısa sürede dominant SARS-CoV-2 varyantı olarak Delta varyantının yerini almıştır [99]. Omicron varyantı orjinal SARS-CoV-2 suşuna göre, Spike proteinindeki çok sayıda mutasyon, 30 amino asitte yer değişikliği, üç delesyon ve bir insersiyon içermektedir [100].

Spike proteinin S2 bölgesinde altı önemli mutasyon taşımaktadır. Yine furin bölünme bölgesi bölgesindeki üç mutasyon (P681H, H655Y, N679K), patojenez ile ilişkili olarak S1/S2 bölünmesini, füzojeniteyi ve sinsitya oluşumunu ve varyantın patojenitesini azaltmaktadır [101]. Q493R, Q489R ve S477N gibi çoklu amino asit değişiklikleri Omicron'un S proteininde ACE2 bağlanma afinitesinde artışa neden olmaktadır. Omicron'un RBD, Wuhan-HU-1 ve Delta suşlarına kıyasla ACE2 için üç kat daha yüksek bağlanma afinitesi göstermektedir [102].

1.2.5. Risk Faktörleri

COVID-19 için ileri yaş (> 65 yaş) ve kanser, diyabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, kardiyovasküler ve solunum yolu hastalıkları gibi altta yatan ek komorbiditeler, şiddetli hastalık gelişimi ile ilgili olarak risk oluşturmaktadır [103].

Hastalık şiddetinin en önemli belirleyicisi yaş olup 65 yaş üstü bireyler, yoğun bakım gereksinimi açısından en büyük riske sahiptir ve yine erkek popülasyon kadınlardan daha duyarlıdır [104].

Aşılama durumuna veya ciddi hastalık için diğer risk faktörlerine bakılmaksızın >65 yaş yetişkinler,

1. Orta veya şiddetli immün yetmezlik durumu olan her yaştan erişkin hastalar (solid organ tümörü ve hematolojik maligniteler için aktif tedavi alanlar, solid organ nakli öyküsü olan immünsüpresif tedavi alanlar, ileri evre veya tedavi edilmemiş HIV enfeksiyonu olanlar),
2. Şiddetli hastalığa ilerleme için birden fazla risk faktörü olan her yaştan yetişkinler (kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve diğer kronik akciğer hastalıkları, kanser, kronik böbrek yetersizliği (KBY), kronik karaciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalık, hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM), demans, Alzheimer hastalığı, Down sendromu, orak hücreli anemi, talasemi, serebrovasküler hastalık, mental sağlık sorunları (şizofreni vb) gibi komorbiditesi olanlar,
3. Obezite, sigara içiciliği ve madde bağımlılığı,
4. Gebeler,
5. Risk faktörlerine bakılmaksızın aşılanmamış veya geçirilmiş enfeksiyon öyküsü olmayan ≥ 50 yaş yetişkinler ciddi hastalık gelişimi için riskli grupta bulunmaktadır. [105, 106, 107, 108].

Akut COVID-19 kliniğinin aksine, "long COVID" gelişme ihtimali ise kadın hastalarda daha yüksektir [109].

1.2.6. Klinik Bulgular

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu COVID-19, multisistemik bir tutulum göstermektedir ve hastalığın şiddeti asemptomatik enfeksiyondan, ARDS'ye kadar değişkenlik gösterebilir. Ancak COVID-19 ile enfekte hastaların %80'inde çoğunlukla asemptomatik klinik veya ateş, öksürük, boğaz ağrısı, halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, mide bulantısı, kusma, ishal, tat ve koku kaybı gibi hafif semptomlar olmaktadır [110, 111, 112].

Ağır klinikte olan hastalarda bir hafta sonrasında belirginleşen nefes darlığı, ARDS tablosu, septik şok, metabolik asidoz ve koagülopatiyeye eğilim görülebilmektedir. Ayrıca ağır hastalarda böbrek, kalp ve diğer organ hasarları ve çoklu organ yetmezliklerinin ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir [113, 114]. Semptomatik COVID-19 hastaları arasında öksürük, miyalji ve baş ağrısı en sık bildirilen semptomlardır. İshal, boğaz ağrısı, koku veya tat anormallikleri gibi diğer semptomlar da görülebilmektedir. Hafif üst solunum semptomları (nazal konjesyon, hapşırma) Delta ve Omicron varyantında daha yaygın görülmektedir [115].

Hastalığın inkübasyon süresi yaklaşık 14 gün olup, çoğu vakada maruziyetten yaklaşık dört veya beş gün sonra bulgular ortaya çıkmaktadır [116]. Postenfeksiyöz-hiperinflamatuvar hastalık ise SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrası ortaya çıkan ek bir klinik sonuç olarak tanımlanmıştır.

P.1 (Gama) kaynaklı suşlarda re-enfeksiyonların daha yaygın ve sık olduğu, bu durumun varyantın yaygın olduğu yerlerde salgınlarda önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir [117]. Üst solunum yolu semptomların başlangıcından benzer zamanlar sonrasında alınan ve viral yükü temsil eden real time RT-PCR siklus sayısı (CT) P.1 pozitif ve P.1 negatif örneklerde karşılaştırıldığında P.1 enfeksiyonlarında RNA seviyesinin özellikle yetişkinlerde (18-59 yaş) P.1 dışı grupta saptanan seviyeden yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu P.1 varyantının daha bulaştırıcı olduğu gösterilmiştir [118]. Amazon bölgesinde P.1 varyantının ortaya çıkmasından sonra, kadın popülasyonda ve 20-59 yaş arası popülasyonda COVID-19'a bağlı ölüm oranının arttığını, farklı yaş grupları ve cinsiyetler arasında da mortalite, vaka ölüm

oranı ve hastane ölüm oranlarının değiştiği gösterilmiştir [119]. Bu durum P.1 varyantının önceki suşlara kıyasla erkekler ve kadınlar üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu ve farklı yaş grupları üzerinde patojenite ve virülans spektrumunda farklılıklar olduğunu göstermektedir.

B.1.617.2 (Delta) varyantı en bulaşıcı varyantlardan biri olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar, önceki varyantlarla karşılaştırıldığında, Delta varyantının immün sistemden kaçabilirliği yanında aynı zamanda iyileşmiş hastalardan alınan nötralize edici antikora karşı duyarlılığının daha az olduğunu göstermiştir [120]. İn vitro çalışmalarda B.1.617.2'nin, bireylerin serumundaki nötralize edici antikora duyarlılığının yaklaşık altı kat daha düşük olduğu ve aşılama sonucu oluşmuş antikoların yaklaşık sekiz kat daha az etkin olduğu gösterilmiştir [121]. B.1.617.2'nin önceki varyantlara göre, doku hasarına neden olma olasılığı daha yüksektir. Yine bağışıklıktan yanıtından kaçış, kolon ve akciğerdeki hücrelere giriş ve sınırsız oluşturma etkileri de önceki suşlardan daha yüksektir [122].

Omicron'un genel olarak diğer SARS-CoV-2 suşlarına göre daha düşük şiddetle hastalık tablosu oluşturduğunu, Omicron'un solunum yolunda replike olma gücünün Alfa varyantına kıyasla önemli ölçüde zayıfladığı, Omicron ile enfekte olmuş farelerde virüs replikasyonunun ve virüs kaynaklı akciğer hasarının önemli ölçüde azaldığı deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir [123, 124]. Bununla birlikte Delta varyantına göre 3,31 kat daha yüksek bir bulaştırıcılığa ve antiviral bağışıklığa karşı artmış dirence sahiptir [125]. Omicron BA.2'nin bir ürünü olan BA.2.12.21 varyantı önceki varyantlardan daha bulaşıcı olup büyük ölçüde üst solunum yollarında sınırlı bir enfeksiyon kliniği yaratmıştır [126]. BA.4 ve BA.5'in, Omicron'ın önceki alt tiplerinde göre daha iyi bağışıklık sisteminden kaçabileceği ve aşı olmuş veya yakın zamanda COVID-19'dan iyileşmiş kişilerde bile yeniden enfeksiyonlara neden olabileceği öne sürülmektedir.

Varyantların bulaştırıcılık, patojenite, duyarlı popülasyon verileri ve re-enfeksiyon yapabilme gibi klinik özelliklerini vurgulamak araştırmacıların, devam eden COVID-19 salgınına durdurmak için uygun stratejiler formüle etmesine yardımcı olacaktır.

1.2.7. Tanı

COVID-19 pandemisinin başından itibaren güçlü bulaştırıcılık profili ve ciddi şekilde halk sağlığını tehdit etmesi nedeniyle erken teşhis ve tedavi açısından önem arz etmiştir.

Klinik olarak yeni başlayan ateş yüksekliği ve/veya solunum semptomları, koku veya tat alma bozuklukları, miyalji ve ishal şikayetleri olan veya başka bir etkenle açıklanamayan ciddi alt solunum yolu hastalığı olan hastalarda COVID-19 düşünülmelidir [127]. Tat kaybı ve koku alma kaybının, pozitif bir SARS-CoV-2 testiyle en çok korelasyon gösteren semptomlar olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur [128]. Ancak enfeksiyon şüphesi olan semptomatik hastalara mikrobiyolojik testler yapılmadan kesin tanı konulamamaktadır. Özellikle açıklanamayan solunum yolu bulguları olan ve hastanede yatan kritik hastalar, sağlık çalışanları veya ilk müdahale ekipleri, toplu yaşam ortamlarında çalışan veya ikamet eden veya ciddi hastalık için risk faktörlerine sahip semptomatik bireyler test yapılması için öncelikli gruplardır [127].

SARS-CoV-2 enfeksiyonunda vaka tanımlanması ve yönetimi için Sağlık Bakanlığı tarafından olası ve kesin vaka kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterlere göre ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az biri ve bu klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması ve semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde yüksek riskli bölgede bulunma öyküsü, veya bu belirtilerin en az biri ile birlikte semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde doğrulanmış COVID-19 vakası ile yakın temas etme öyküsü ya da ateş ve ağır akut solunum yolu enfeksiyonu belirti ve bulgularından en az biri (öksürük ve solunum sıkıntısı), hastanede yatış gerekliliği varlığı ve bu klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması, bunların dışında klinik belirti ve bulgularından en az ikisinin bir arada olması ve bu durumun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması hali olası vaka olarak tanımlanmıştır. Olası vaka tanımına uyan olgularda moleküler yöntemlerle SARS-CoV-2 saptanması ile kesin vaka olarak tanımlanmaktadır [129].

SARS-CoV-2 için, semptomun başladığı zamana bakılmaksızın, test yapmaya karar verildikten sonra numuneler mümkün olan en kısa sürede alınmalıdır.

SARSCoV-2 tanısı için solunum yolu örneğinin alınarak test edilmesi önerilmektedir. Kabul edilen numune türleri:

- Nazofarengeal (NF) sürüntü örneği (Sağlık çalışanları tarafından alınan)
- Orofarengeal (OF) sürüntü örneği (Sağlık çalışanları tarafından alınan)
- Kombine sürüntü örneği (NF + OF)
- Orta burun bölgesi numuneleri (sağlık çalışanları ya da kişinin kendisi)
- Ön burun ucu numuneleri (sağlık çalışanı gözetiminde kişinin kendisi tarafından alınabilir)
- Alt solunum yolu numuneleridir.

1.2.7.1.Nükleik Asit Amplifikasyon Testi (NAAT)

COVID-19 olgularının rutin doğrulaması gerçek zamanlı reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) gibi bir NAAT testi ile virus RNA'sının özgül dizilerinin saptanması ve gerekli olduğunda nükleik asit dizi analizi yöntemi ile doğrulanması temeline dayanmaktadır. SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısı için ya bir NAAT, yaygın olarak revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi ya da bir antijen testi gibi bir viral test gerekmektedir.

Yüksek duyarlılıkları ve spesifiteleri, makul sürede yanıt alınması nedeniyle öncelikle laboratuvarlarda uygulanan NAAT testleri önerilmektedir. Bununla birlikte COVID-19 şüphesi yüksek olan bir hastadan negatif sonuç elde edildiğinde, özellikle sadece üst solunum yolu örnekleri toplanmış ise mümkünse alt solunum yolu örneklerini içeren ek örnekler alınmalı ve çalışılmalıdır [129].

1.2.7.2.Viral Antijen Testleri

Viral antijen testleri, immünofloresans yatay akım yöntemi ile nükleokapsid antijenini saptama yöntemine dayanmaktadır [130]. Hızlı antijen testi sadece virus replikasyonu sırasında akut enfeksiyonun tanısında kullanılabilir. NAAT'tan daha kolay erişilebilir, daha az maliyetli ve NAAT'tan daha kısa geri dönüş süresine sahip olması nedeniyle evlerde ve kritik bakım noktalarında sık tercih edilmektedir [131]. Ancak antijen testlerinin duyarlılığın NAAT'lerden daha düşük olduğunun ve negatif antijen testlerinin genellikle ek testlerle onaylanmasını gerektirdiği

bilinmelidir. NAAT testlerine erişimin sınırlı olduğu ortamlarda, hastalığın viral yükünün yüksek olduğu erken dönemde ve semptom başlangıcından itibaren ilk 5-7 gün içinde tanıda kullanılabilir [132].

1.2.7.3. Antikor Testleri

SARS-CoV-2 nükleokapsid (N) veya S (S1, RBD) proteinine karşı gelişen özgül antikorların (IgM, IgG, IgA) tespiti yöntemine dayanan antikor testleri SARS-CoV-2 tanısında kullanılmaktadır. Hızlı immünokromatografik antikor testlerine göre ELISA ve CLIA testlerinin özgüllük ve duyarlılığına daha çok güvenilmektedir [130]. İlk antikor yanıtı (IgM) 6-7 günden sonra başlamakla birlikte hastaların çoğunda antikor pozitifliği belirtilerin başlamasından 10 gün sonra gelişmektedir. Tespit edilen antikorların bağışıklık sağlayıp sağlamadığı ve ne kadar süreyle tespit edilebileceği bugün için kesin belli değildir. Ancak NAAT testlerinin negatif olduğu durumlarda tanı yöntemi olarak ve atak hızı ve salgının şiddetinin retrospektif olarak değerlendirilmesi gerektiğinde serolojik tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır [129].

1.2.7.4. Viral Kültür

Viral kültür, aktif replikatif bir virüsün tespiti ve bulaştırıcılık potansiyelinin değerlendirilmesi için altın standart tanı yöntemidir. Ancak biyogüvenlik seviyesi 3 tesisler, deneyimli personel ve RT-PCR'den daha uzun bir geri dönüş süresi gerektirmesi nedeniyle rutin teşhis algoritmalarında kullanılmamaktadır [133]. Kültür yöntemi, bulaşıcılığının ve bulaşıcılık süresinin anlaşılmasını sağlamada önemli bir rol oynaması nedeniyle enfeksiyon önleme ve kontrolüne yönelik çalışmalarda, terapötik ajanların ve aşılarda geliştirilmesi ve moleküler tanı yöntemlerinin duyarlılığının ve özgüllüğünün değerlendirilmesi için gereklidir [134].

1.2.7.5. Genom Sekanslama

SARS-CoV-2 tanısı için kullanılan rutin tanısal testler, enfeksiyona neden olan spesifik SARS-CoV-2 varyantını belirleyememektedir. Bunun için viral genom sekanslama veya özel multipleks PCR genotip testleri gerekmektedir. Varyantların saptanması ve tanımlanması için toplumdan temsili örnekler seçilerek farklı SARS-CoV-2 mutasyonlarının dolaşımının değerlendirilmesi, virüs evriminin izlenmesi ve

bunların sonucunda aşı içeriğine karar verilmesi salgın yönetimi için oldukça önem arz etmektedir [135].

Yeni nesil sekanslama teknolojisi ile SARS-CoV-2'nin tam genom analizi, yeni varyantların izlenmesi ve tanımlanmasında altın standart olup virüsün tüm genomu sekanslanarak dolaşımdaki diğer suşlarla genomdaki belirli mutasyonlar ön bilgiye ihtiyaç duymadan karşılaştırılabilmektedir [135, 136]. RT-PCR kullanımına dayalı olarak SARS-CoV-2'nin varyant tespiti tekniği ise genetik sürveyans uygulaması için sekanslamaya göre işçilik ve finansal maliyetlerinin azaltılmasına ve analiz süresini önemli ölçüde kısaltmasına yardımcı olmuştur [137]. Ancak VOC/VOI'lerdeki farklılaşma için örneklerin dikkatli seçimi gerekmektedir. Özgüllükleri, belirli SARS-CoV-2 varyantlarını belirlemek için yetersiz kalabilmektedir [138].

Sekanslama öncelikle, birinci ve ikinci basamak merkezlerinde, değişen özelliklere sahip ve yeni varyantların ortaya çıktığına dair önemli sinyaller sağlayabilen uygun özellikli SARS CoV-2 pozitif numunelerde yapılmalıdır. Varyant analiz örnekleri SARS-CoV-2 için aşılınmış ancak aşırıya uygun bir bağışıklık yanıtı göstermesine rağmen daha sonra SARS-CoV 2 ile enfekte olan bireylerde; SARS-CoV-2 enfeksiyonuna duyarlı çok sayıda insan-hayvan etkileşiminin olduğu yerlerde, özellikle SARS CoV-2'ye karşı antikor tedavisi alırken uzun süreli viral saçılımı olan, bağışıklığı baskılanmış hastaların olduğu riskli ortamlarda, SARS-CoV-2 bulaşabilirliği ve/veya virülansında beklenmeyen bir artış veya değişiklik olduğu durumlarda, tanısal yöntemlerin (antikor, antijen, moleküler yöntemler) veya tedavilerin etkililiğinde bir değişiklik şüphesi olduğunda; olağandışı bir klinik ile karşılaşılana, vakaların kümelenme gösterdiği sekanslama ile bulaş yollarının anlaşılabilirdiği ve/veya enfeksiyon kontrol prosedürlerinin etkinliğini değerlendirebildiği araştırmalar sırasında yapılmalıdır. [135, 139].

Varyant tiplene sonuçları Avrupa Sürveyans Sistemine (TESSy) bildirilmeli ve SARS-CoV-2 sekanslama sonuçları, Global Tüm İnfluenza Verilerini Paylaşma Veritabanına (GISAID) kaydedilmelidir. Numunenin alındığı yer dahil olmak üzere epidemiyolojik veriler, numunenin temsili olarak mı yoksa hedefli bir sürveyanstan mı alındığı, vakanın yurtdışı veya yerel olarak edinilmiş olduğu ve/veya olası enfeksiyon ülkesi verileri de bildirilmelidir [135].

1.2.8. Tedavi

SARS-CoV-2'nin 2020 yılının başlarında tanımlanmasına rağmen COVID-19 için güvenilirliği ve etkinliği kesin olarak kanıtlanmış bir antiviral tedavi henüz bulunmamaktadır. COVID-19'dan şüphelenilen veya teyit edilen hastalar, ayaktan takibin uygunluğu, semptomların ciddiyeti, ciddi hastalığa ilerleme riski, hipoksemi durumu, ev ortamının güvenliği, COVID-19'a özgü tedavilerin uygunluğunu açısından değerlendirilmelidir. Ayaktan tedavi planlanan hafif ile orta şiddette COVID-19'u olan (hipoksi bulunmayan) hastalarda ciddi hastalık gelişimi için risk faktörü mevcut ise yakından takip önerilmektedir [140].

1.2.8.1. Antiviral Tedaviler

Türkiye'de Molnupiravir tedavisi, tanısı PCR ile doğrulanmış, hafif-orta seyirli, semptomlarının ilk beş gününde olan ve ağır COVID-19'a ilerleme açısından yüksek riskli belirtilen gruplarda yer alan erişkin (≥ 18 yaş) COVID-19 hastalarında, aşılama durumuna bakılmaksızın kullanılması önerilmektedir [141]. Türkiye'de henüz kullanılmayan oral proteaz inhibitörlerinin bir kombinasyonu olan Nirmatrelvir-ritonavir, şiddetli hastalığa ilerleme riski olan, semptomatik, ayaktan tedavi gören hastalarda COVID-19 tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Hafif ile orta şiddette COVID-19'u olan ayaktan hastalarda hastaneye yatış ve ölüm riskini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [142].

Hastanede yatan, şiddetli hastalığa ilerleme riski yüksek olan hafif-orta şiddette, oksijen tedavisine ihtiyacı olmayan COVID-19 hastalarında kullanım için Remdesivir, FDA tarafından ≥ 12 yaş ve ≥ 40 kg ağırlığındaki yetişkin ve pediatrik hastalarda COVID-19 tedavisi için onay almıştır [143].

1.2.8.2. Antiinflamatuar Tedaviler

Hastanede takip edilen ve takiplerinde oksijen desteğine ihtiyaç duyan COVID-19 hastaları için Remdesivir ile birlikte deksametazon kullanılması önerilmektedir. Deksametazon yoksa, eşdeğer dozda başka bir kortikosteroid (prednizon, metilprednizon veya hidrokortizon) kullanılabilir [144]. Remdesivirin temin edilemediği durumlarda, oksijen ihtiyacı olan COVID-19 hastalarında tek başına deksametazon kullanımının da mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir [145].

Çalışmalarda, kortikosteroidlerle birlikte veya tek başına interlökin (IL)-6 inhibitörlerinin (tosilizumab, sarilumab) veya Janus kinaz (JAK) inhibitörlerinin (barisitinib, tofasitinib) özellikle hızlı bir şekilde oksijen ihtiyacı gelişen ve/veya inflamatuvar belirteç seviyeleri hızlı yükselen hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir [146, 147]. Barisitinib, tofasitinib, tosilizumab veya sarilumabın elde edilemediği durumlarda mekanik ventilasyon veya Ekstrakorporal Membran Oksijenizasyonu (ECMO) gerektiren COVID-19 hastalarının tedavisinde tek başına deksametazon kullanılması önerilmektedir [148].

1.2.8.3.Konvelasan Plazma

COVID-19'dan iyileşen bireyler, SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorlar geliştirir ancak bu bağışıklığın ne kadar süreceği belirsizdir. Bununla birlikte COVID-19'u yönetmede bu nötralizan antikorların terapötik ajanlar olarak rolleri klinik deneylerde kapsamlı bir şekilde takip edilmektedir. COVID-19 tedavisi için yüksek titreli konvelasan plazma tedavisinin kullanımını lehinde veya aleyhinde tavsiyede bulunması için yeterli kanıt bulunmamaktadır. COVID-19 hastaları arasında ciddi semptomları ve aktif SARS-CoV-2 replikasyonu belirtileri olan, mevcut tedavilere yetersiz yanıt veren, bağışıklığı baskılanmış olanlarda, hastanın hastalığına neden olan varyanta benzer bir SARS-CoV-2 varyantının neden olduğu COVID-19 sonrası yakın zamanda iyileşen veya aşılanmış bir donörden yüksek titreli konvelasan plazma elde edilerek tedavi edilebileceği yönünde öneriler vardır [149].

1.2.8.4.Monoklonal Antikorlar

SARS-CoV-2 Spike proteinini hedef alan monoklonal antikorların (mAb'ler), SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde klinik faydaları olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte laboratuvar çalışmaları anti-SARS-CoV-2 mAb'lerin spesifik varyantlara ve alt varyantlara karşı aktivitesinin önemli ölçüde değişebileceğini göstermiştir. Bu nedenle bu ürünlerin dolaşımdaki varyantların ve alt varyantların mAb'lere dirençli olduğu alanlarda COVID-19 için etkili tedaviler olması beklenmemektedir. 16 Nisan 2021'de FDA, L452R ve E484K amino asit değişikliklerini taşıyan varyantların (Iota, Epsilon) gösterdiği direnç nedeniyle Bamlanivimabın acil kullanım iznini bu nedenle sonlandırmıştır [150].

Dört anti-SARS-CoV-2 mAb (bamlanivimab ve etesevimab, casirivimab ve imdevimab, sotrovimab, bebtelovimab) hafif ile orta şiddette COVID-19'lu ayakta tedavi gören hastaların tedavisi için FDA onayı almakla birlikte dolaşımdaki baskın Omicron alt varyantlarının bu ürünlere duyarlı olmaması nedeniyle şu anda ABD'de kullanımları için izin verilmemiştir [148]. Bu mAb'ların klinik ortamda BQ.1.1 veya XBB'ye karşı etkili olmayabileceği çalışmalarda gösterilmiştir [151].

Tiksagevimab ile silgavimab (Evushheld) kombinasyonu, temas öncesi profilakside kullanım için yetkilendirilmiş tek anti-SARS-CoV-2 mAb ürünüdür. Bu rekombinant insan mAb'leri, SARS-CoV-2'nin Spike protein reseptörüne bağlanır. ABD'de baskın Omicron alt varyantları da dahil olmak üzere birçok Omicron alt varyantının, tiksagevimab ile silgavimab'a karşı in vitro duyarlılığının düşük olması nedeniyle tedavilerin etkinliğinin azalabileceği düşünülmektedir. Özellikle daha yakın zamanda yayılan BA.4 ve BA.5 soyları, bugüne kadar herhangi bir VOC'nin en yüksek mAb kaçırma seviyelerini göstermektedir [150]. Tedavinin uygulanma kararı, dirençli alt varyantların bölgesel prevalansına, hastanın bireysel risklerine ve lojistiğe dayalı olarak verilmelidir [152].

1.2.9. Komplikasyonlar

COVID-19'a ait hastalık sırasında veya sonrasında gelişebilen birden fazla sistemi tutabilen komplikasyonlar tanımlanmıştır. SARS-CoV-2'nin vücutta geniş kapsamlı etkileri olabilse de COVID-19 ağırlıklı olarak bir solunum yolu hastalığı olmaya devam etmektedir [153]. ARDS, şiddetli hastalığı olan hastalardaki en önemli komplikasyondur ve nefes darlığının başlamasından kısa bir süre sonra ortaya çıkabilmektedir. ABD'deki büyük çalışmalarda, hastanede yatan hastaların %12 ile 24'ü mekanik ventilasyona ihtiyacı geliştiği gösterilmiştir [154].

Miyokard infarktüsü, kalp yetmezliği, aritmi ve kardiyojenik şok gibi kardiyolojik komplikasyonlar, derin ven trombozu, pulmoner emboli, serebrovasküler emboliler dahil olmak üzere venöz tromboembolizm olayları, ensefalopati, hareket bozuklukları, motor ve duyu kusurları, ataksi ve nöbetler gibi nörolojik hadiseler, inatçı ateş yükseklikleri, yüksek inflamatuvar belirteçler (örn., D-dimer, ferritin) ve yüksek proinflamatuvar sitokinler ile abartılı bir inflamatuvar yanıt ile kendini gösteren inflamatuvar komplikasyonlar ve sekonder enfeksiyon gelişimi COVID-19'a ait

komplasyonlardır [153, 155, 156, 157]. Uzun dönemde ise yorgunluk, hafıza sorunları, nefes darlığı, göğüs ağrısı, öksürük ve bilişsel eksiklikleri içeren kalıcı semptomlar görülebilmektedir. Ayrıca devam eden solunum bozukluğu problemleri ve kardiyak sekel ile sonuçlanan komplasyonlar gösterilmiştir [158, 159].

1.2.10. Aşılama

SARS-CoV-2'e karşı etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış aşılama, COVID-19 enfeksiyonlarıyla savaşmanın en iyi yolu olarak kabul edilmektedir. 21 Şubat 2023 itibariyle DSÖ tarafından klinik çalışması devam eden 180 aday aşılama, kullanımı onaylanmış 50 aşılama ve acil kullanım için onay alan 11 aşılama bulunmaktadır [160, 161]. Pfizer-BioNTech BNT162b2, Moderna mRNA-1273 Spikevax, Sinopharm'ın inaktive aşılama Covilo, Çin'in inaktive aşılama Sinovac:CoronaVac, Johnson and Johnson'ın adenovirüs serotip 26-vektör aşılama Ad26.COV2.S (Jcovden), Oxford AstraZeneca'nın şempanze adenovirüs serotip-Y25 viral vektör aşılama ChAdOx1 ve Covishield, Hindistan'da üretilen subunit protein aşılama Novavax/Covovax ve Nuvaxovid(NVX-CoV2373), Bharat Biotech'in inaktive virüs aşılama BBV152 (Covaxin), Çin'in CanSino Biotech-adenovirüs tip 5-vektör aşılama Convidecia acil kullanım onayı alan aşılama.

Virüsün küresel yayılımı nedeniyle, çok sayıda SARS-CoV-2 varyantının ortaya çıkışı ve varyantlarda aşılama hedef Spike bölgesinin mutasyonunun görülmesi nedeniyle aşılama etkinliğinde değişiklikler olabilmektedir [162]. 2020'nin sonundan bu yana Beta ve Delta varyantları gibi birçok SARS-CoV-2 varyantının insanlarda ve hayvan modellerinde aşılama sonrası serumlara karşı nötralizasyon direnci gösterdiği ve acil kullanım için onaylanan birinci nesil COVID-19 aşılama için koruyucu bağışıklığın belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir [163]. Yapılan başka bir çalışmada Delta varyantı enfeksiyonlarına karşı aşılama etkinliğinin, aşılama 4 ay sonra %93'ten %53'e düştüğü gösterilmiştir [164]. Yine başka bir çalışmada mRNA aşılama etkinliğinin Alfa varyantına kıyasla Delta'ya karşı azaldığı raporlanmıştır [165].

Spike RBD'deki çok sayıda mutasyon nedeniyle artmış re-enfeksiyon ve bulaştırıcılığı olan Omicron varyantının mevcut COVID-19 aşılama sağladığı antikor nötralizasyonundan kaçabileceğine dair bir endişe duyulmuştur. Özellikle inaktive aşılama (Coronavac) alıcılarında Omikron varyantı izolatlarına karşı saptanabilir nötralizasyon edici antikorun olmadığı gözlemlenmiştir [166].

Omicron varyantı, hem Beta (K417N, N501Y) hem de Delta (T478K) varyantlarında bulunan önemli Spike proteini mutasyonları taşır. Bununla birlikte Omicron varyantı, E484A mutasyonunu da içerir ve E484A'nın, antikor tarafından nötralizasyondan kaçtığı gösterilmiştir. Çalışmalarda E484K taşıyan RBD'lerin, aşılananlardan veya geçirilmiş COVID-19'lu hastalardan alınan serumdaki antikorlarla en düşük bağlanmaya sahip olduğu gösterilmiştir [167].

COVID-19 aşuları Spike proteini NTD ve S2 bölgesini hedefleyen nötraliz edici antikorları da indükleyebilmektedir. Omicron varyantı, bu bölgelerde içerdiği mutasyonlar nedeniyle de aşuların nötraliz edici aktivitelerden kaçabilmektedir [168]. mRNA aşısı BNT162b2 (Pfizer/BioNTech)'nin de benzer şekilde, Omicron'a karşı önceki bir SARS-CoV-2 suşuna kıyasla daha az etkili olduğu ile ilgili çalışmalar mevcut olup yeni jenerasyon aşuların üretimine kadar booster dozlarla antikor düzeyinin artırabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırma prospektif klinik araştırmadır.

2.2. ARAŞTIRMANIN YERİ

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği

2.3. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ

Çalışmada belirlenen birey sayısı çalışmanın bütçesi doğrultusunda 21 kişi olarak belirlenmiştir

2.4. ETİK KURUL ONAYI

25.5.2021 tarihinde 60116787-020/56297 sayı ile Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

Dahil edilme kriterleri:

18 yaş ve üzeri, çalışmaya katılmayı kabul eden/onamı alınan ve DSÖ tarafından genomik sekanslama yapılması için aşağıdaki kriterlerden herhangi birini sağlayan olgular çalışmaya dahil edildi:

-Son 3 ay içinde SARS-CoV-2 aşısı ile aşılmasına rağmen SARS-CoV 2 ile enfekte olanlar

- PCR ile uzun süre pozitiflik görülen hastalar (dört hafta üzeri)

- Tekrarlayan COVID-19 öyküsü olan olgular

- İmmüsuprese olgular

2.5. HARIÇ TUTULMA KRİTERLERİ

-18 yaş altı bireyler

2.6. ARAŞTIRMANIN YERİ VE KATILIMCI SAYISI

2022 Ocak ve Kasım ayları arasında Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'ne başvuran 21 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

2.7. NUMUNE SEÇİMİ VE VİRAL RNA İZOLASYONU

COVID-19 şüpheli hastaların nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örnekleri alınmıştır. Genom analizi için yüksek viral yüklü (Real-time PCR ile değerlendirilen) 21 SARS-CoV-2 pozitif numune seçilmiştir. Doğrulanmış COVID-19 vakalarının viral RNA'ları, üreticinin 2020-07'deki talimatlarına göre QIAamp Viral RNA Mini kiti (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanılarak gerçek zamanlı PCR ile Cq <20'nin ekstrakte edilmiştir.

Sekanslama kitaplıkları, üreticinin talimatları izlenerek CleanPlex® SARS-CoV-2 Araştırma ve Gözetim Paneli (Paragon Genomics, San Francisco, CA, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır. Kısaca, viral RNA örneklerinin miktarı Qubit RNA HS Assay kiti ile değerlendirilmiştir. 50 ng ekstre edilmiş viral RNA, her numune için bir girdi olarak kullanılmıştır. İlk adım olarak RNA'lar ters transkripsiyon için bir şablon olarak kullanılmış, daha sonra her örneğin genomu, medyan boyutu 149 bp olan Sars-CoV-2'nin tüm genomunu kaplamak için on döngü multipleks PCR ile iki primer havuz protokolü (iki havuzda ayrılmış 343 primer çifti) kullanılarak amplifiye edilmiştir. Reaksiyon, 2 ul durdurma tamponu ilave edilerek sona erdirilmiştir. PCR ürünleri daha sonra manyetik boncuklar eklenerek saflaştırılmıştır. İndeksleme primerleri yirmi beş döngü kullanılarak ikinci PCR ile eklenerek ardından son boncuk saflaştırması gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerinin, üreticilerin talimatlarına göre Qubit 4.0 Florometre (Thermo Fisher Scientific Inc.) içeren dsDNA HS Test Kitleri ve Yüksek Hassasiyetli DNA Çipleri (Agilent Technologies Inc.) içeren bir Agilent Bioanalyzer 2100 ile kalitasyon ve kantitasyonları yapılmıştır. Son olarak, 50 kitaplık eşmolar konsantrasyonlarda pool oluşturularak, NextSeq500 cihazında orta çıkışlı 2x150 bp akış hücreleri (Illumina) ile sekanslanmıştır.

2.8.FİLOGENETİK ANALİZ

21 SARS-CoV-2 tam genom dizisinin arasındaki moleküler ilişkiyi ve evrimleri ortaya çıkarmak için SARS-CoV-2 dizileri GISAID'de analiz edilmiştir. Yirmi bir

hastaya ait genom dizilerinin filogenetik ağaç grafisi, mutasyon sıklık grafisi ve Spike protein 3D görünümü GISAID web sitesi üzerinde araştırmacı tarafından oluşturulmuştur. Mutasyonların Dünya’da ve Türkiye’de görülme sıklıkları yine GISAID verileri üzerinden elde edilmiştir.

2.9. HASTALARIN KLİNİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

2022 Ocak ve Kasım ayları arasında Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği’nde takip edilen nazofarengeal swab Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) pozitif sonucu olan, COVID-19 teşhisi konulan 21 hasta klinik durumlarına göre hafif, orta ve ağır olmak üzere gruplandırılmış olup klinik, laboratuvar, radyolojik verilerine göre gen analizi sonuçları ile ilişkileri araştırılmıştır.

Hafif klinikteki vakalar, nefes darlığı veya akciğer tomografisinde tutulumu olmayan ateş, öksürük, yorgunluk gibi genel semptomlar gösteren ayaktan veya hastanede yatarak tedavi gören hastaları ifade ederken, orta klinik seyirdeki hastalar, akciğer grafisinde veya bilgisayarlı tomografide pnömoni bulguları, deniz seviyesinde oda havasında SpO₂ %94 altında, solunum hızı 30 nefes / dakika üstünde, PaO₂ / FiO₂ <300 mmHg hastalar olarak seçilmiştir. Ağır klinik seyirli hastalar ise ciddi solunum sıkıntısı olan ve mekanik ventilasyon desteği alan veya şok, çoklu organ yetmezliği gelişen ve yoğun bakım ünitesinde takip ihtiyacı gereken hastalar arasından belirlenmiştir.

Hastaların yaş, cinsiyet gibi demografik bilgileri, ateş, öksürük, balgam, nefes darlığı, boğaz ağrısı, tat ve koku kaybı, bulantı, kusma, ishal, baş ağrısı semptomları, ek hastalıkları, daha öncesinde COVID-19 geçirme durumları, aşılanma durumları (hangi aşı ile kaç doz aşılama ve en son ne zaman yapıldığı) sorgulanmıştır. Hastaların başvuru anında tam kan sayımları, biyokimya tetkikleri, sedimentasyon, C-Reaktif Protein (CRP), prokalsitonin, ferritin, fibrinojen, D-dimer, Interlökin-6 (IL-6) düzeyleri, SARS-CoV-2 antikor düzeyleri, COVID-19 pozitif kalma süreleri incelenmiştir. Akciğer görüntülemeleri hastalığı tutulumu açısından değerlendirilmiş olup, serviste ve yoğun bakımda takip edilme süreleri, mekanik veya non-mekanik ventilasyon durumları, aldıkları antiviral ve antiinflamatuvar tedaviler, destek tedavileri ve mortalite durumları incelenmiştir.

2.10. İSTATİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS 17.0 paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında parametrik test varsayımları sağlanmadığında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman ya da Pearson korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelendi. P değeri $<0,05$ istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.



3. BULGULAR

2022 Ocak ve Kasım ayları arasında, Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'nde COVID-19 tanısı ile takip edilen ve elde edilen SARS-CoV-2 izolatlarından tam genomik sekanslama yapılan 21 hasta çalışmaya dahil edildi.

2022 yılında çalışmaya alınan hastalardan yedisi (%33,3) Şubat-Mart aylarında, sekizi (%38) Nisan-Mayıs, dördü (%19) Haziran-Temmuz ve ikisi (%9,5) Ekim ayında takip edildi.

Çalışmaya dahil edilen 21 hastanın 13'ü (%61,9) erkekti. Hastaların yaş ortalaması $65,3 \pm 20,7$ di (min:26, max:97). Sekiz (%38) hasta 18-70 yaş aralığında iken, 13 (%62) hasta 70 yaş ve üzerindedir. Toplamda 18 (%85,7) hastanın hastanede servis veya yoğun bakım koşullarında takip ve tedavisi yapılırken, üç (%14,3) hasta ayaktan takip edildi. Hastaların demografik verileri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1 : Hastaların demografik özellikleri ve servis yatış durumları

Demografik özellikler	(n, %)
Erkek/Kadın	13/8 (61,9/38,1)
Yaş (ort, min-maks)	65,3±20,7 (26-97)
18-70 yaş	8 (38,1)
70 yaş ve üzeri	13 (61,9)
Hastanede takip	18 (85,7)
Ayaktan takip	3 (14,3)

Hastaların başvuru semptomlarına bakıldığında 18'inde (%85,7) öksürük, 17'sinde (%81) nefes darlığı, 16'sında (%76,2) ateş yüksekliği, 12'sinde (%57,1) balgam yakınması vardı. Altı (%28,6) hastada boğaz ağrısı, altısında (%28,6) kusma, beş (%23,8) hastada tat kaybı, iki (%9,5) hastada koku kaybı, üç (%14,3) hastada karın ağrısı, iki (%9,5) hastada baş ağrısı ve bir (%4,8) kişide ishal yakınması mevcuttu.

Ek komorbidite durumları incelendiğinde 10 (%47,6) hastada hipertansiyon, yedisinde (%33,3) koroner arter hastalığı, yedisinde (%33,3) malignite (beş hastada

lenfoma, bir hastada mesane kanseri, bir hastada prostat kanseri), beşinde (%23,8) diyabetes mellitus, beşinde (%23,8) kronik böbrek yetmezliği (iki hasta rutin hemodiyaliz programında), üçünde (%14,3) obezite, bir (%4,8) hastada da kazanılmış immün yetmezlik tanısı (CD4:126, HIV RNA:1347000 kopya/mL) mevcuttu.

Hastaların COVID-19' a karşı aşılama durumlarına bakıldığında iki hasta, iki doz Sinovac-CoronaVac ve üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 aşısı ile, bir hasta dört doz Sinovac- CoronaVac ve bir doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 aşısı ile, beş hasta iki doz Sinovac- CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile, beş hasta dört doz Sinovac-CoronaVac ile, bir hasta üç doz Sinovac-CoronaVac ve bir doz Pfizer-BioNTech BNT162b2, bir hasta üç doz Sinovac-CoronaVac, bir hasta üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile, bir hasta iki doz Sinovac-CoronaVac ve bir doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ve iki hasta iki doz Sinovac- CoronaVac ile aşılama öyküsü mevcuttur. İki hastanın ise öncesinde COVID-19'a karşı bağışıklama öyküsü yoktu (Tablo 2).

Tablo 2: Hastaların COVID-19'a karşı bağışıklanma durumları

Hasta no	Aşılama Durumu
1	2 Sinovac-CoronaVac
2	2 Sinovac-CoronaVac
3	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
4	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
5	3 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
6	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
7	2 Sinovac-CoronaVac 3 Pfizer-BioNTech BNT162b2
8	2 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
9	4 Sinovac-CoronaVac
10	4 Sinovac-CoronaVac
11	4 Sinovac-CoronaVac
12	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
13	AŞISIZ
14	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
15	3 Pfizer-BioNTech BNT162b2
16	4 Sinovac-CoronaVac
17	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
18	3 Sinovac-CoronaVac
19	4 Sinovac-CoronaVac
20	4 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
21	AŞISIZ

En az iki Sinovac-CoronaVac ve en az iki Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile minimum dört doz aşılı hastalar tam aşılı olarak kabul edilerek, etkin antikor düzeylerine (ort: 15.480) ulaşan altı (%28,5) hasta diğer hastalarla klinik durum açısından **Tablo 3**'te karşılaştırılmıştır.

Tablo 3: Tam aşılanan ve aşılınmayan hastaların klinik seyirleri

		Hafif Klinik		Ağır-Orta Klinik		p değeri
		sayı	yüzde(%)	sayı	yüzde(%)	
Tam Aşılama	Olan	4	% 66.7	2	% 13.3	<u>p=0.031</u>
	Olmayan	2	% 33.3	13	% 86.7	

En az dört doz aşılama öyküsü olan ve antikor yanıtı oluşan hastalar, hafif ve orta-ağır hastalık gelişimi açısından diğerleri ile karşılaştırıldığında aşı yanıtı oluşan hastalarda daha çok hafif klinik seyir gözlemlenmiştir (p=0.031). Yine bu hasta grubunda PCR pozitifliği süresi daha kısadır (ort:6, ort:26,9 p=0,04) Başvuru semptomları ve demografik veriler, mortalite, mutasyon ve varyant analizi açısından ise farklılık gözlemlenmemiştir.

COVID-19 için medikal tedavi alan hastalardan 16'sı (%76,2) oral Molnupiravir tedavisi (beş gün boyunca günde iki kez 800 mgr), 16'sı (%76,2) intravenöz metilprednizolon tedavisi, beş (%23,8) hasta yoğun bakım takibinde vazopressör destek olarak Noradrenalin ve bir hasta (%4,8) Interlökin-1 inhibitörü (Anakinra) aldı.

Çalışmadaki hastaların COVID-19' a bağlı akciğer tutulumları incelendiğinde altı hastada herhangi bir akciğer tutulumu olmadığı veya erken evre tek taraflı minimal buzlu cam alanları şeklinde görünüm olduğu, altı hastada ileri evre bilateral yaygın konsolidasyon alanları veya ARDS benzeri tutulum olduğu gözlemlendi. Kalan dokuz hastanın ise radyolojik görüntülemelerinde buzlu cam opasiteleri, konsolidasyon alanları ve crazy-paving görünümü ile karakterize tutulum gözlemlendi. Hastalık evresini belirleme aşamasında akciğer radyolojik görüntüleme bulgularından yararlandı.

Hastaların altısı (%28,6) hafif klinik bulgular gösterdi. Yedisi (%33,3) orta dereceli klinik bulgulara ve sekizi (%38,1) ise ağır klinik tabloya sahipti (**Tablo 4**). İki hastanın daha öncesinde bir kez geçirilmiş COVID-19 öyküsü mevcuttu. Altı (%28,5) hasta COVID-19 nedeniyle hayatını kaybetti.

Tablo 4: Hastaların demografik ve klinik verileri, nadir görülen mutasyonlar

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Ek hastalıklar	Klinik Seyir	İlk kez izole edilen mutasyonlar
1	Erkek	73	Lenfoma, HIV	Orta	-
2	Erkek	54	Lenfoma	Ağır	-
3	Kadın	79	KAH	Hafif	-
4	Erkek	73	Mesane kanseri, DM, KBY, obezite	Ağır	-
5	Erkek	75	DM	Orta	-
6	Erkek	78	DM, KAH, KBY	Hafif	-
7	Kadın	30	-	Hafif	Spike A263T
8	Erkek	76	Lenfoma	Ağır	-
9	Erkek	75	DM, KBY, lenfoma	Orta	-
10	Erkek	89	HT	Orta	NSP2 L18I
11	Kadın	66	HT, KAH, KOAH, KBY, obezite	Ağır	-
12	Erkek	85	DM, HT, Prostat kanseri, KBY	Orta	NSP2 V599I
13	Kadın	97	HT	Orta	NSP14 V40I
14	Erkek	32	-	Hafif	-
15	Erkek	50	HT	Hafif	-
16	Erkek	70	DM, KAH	Ağır	-
17	Kadın	26	-	Hafif	-
18	Erkek	70	KAH, lenfoma	Orta	NSP2 F156L
19	Kadın	80	DM, HT	Ağır	-
20	Kadın	67	HT, KAH, obezite	Ağır	-
21	Kadın	28	SLE	Ağır	-

DM: Diyabetes Mellitus, HT: Hipertansiyon, KBY: Kronik Böbrek Yetmezliği, KAH: Koroner Arter Hastalığı, KOAH: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı, SLE: Sistemik Lupus Eritamatozis

Ağır klinik seyir gösteren hastalar (n=8) ile hafif-orta klinikteki hastalar karşılaştırıldığında cinsiyet (p=0.646) ve yaş ortalaması (p=0,425) açısından iki grup benzerdi. Semptomlardan ateş yüksekliği (p=0,111), öksürük (p=0,257), balgam (p=0,367), boğaz ağrısı (p=0,631), tat kaybı (p=0,606), karın ağrısı (p=0,531), ishal (p=0,381) ve kusma (p=0,631) yakınmaları açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (**Tablo 5-6**).

Tablo 5: Hastaların klinik durumlarına göre demografik verileri

	Hafif – Orta Klinik		Ağır Klinik		p değeri
	n	%	n	%	
Cinsiyet					
Kadın	9	%69	4	%30,8	p=0,646
Erkek	4	%50	4	%50,0	
Yaş (ortalama)	66		64		p=0,425

Tablo 6: Hastaların klinik seyirleri ve semptomları

		Hafif – Orta Klinik		Ağır Klinik		p değeri
		n	%	n	%	
Ateş	Olan	8	% 61,5	8	%100	p=0,111
	Olmayan	5	% 38,5	0	0	
Öksürük	Olan	10	% 76,9	8	%100	p=0,257
	Olmayan	3	% 23,1	0	0	
Balgam	Olan	6	% 46,2	6	% 75	p=0,367
	Olmayan	7	% 53,8	2	% 25	
Nefes darlığı	Olan	9	% 69,2	8	% 100	p=0,131
	Olmayan	4	% 30,8	0	0	
Boğaz ağrısı	Olan	3	% 23,1	3	% 37,5	p=0,631
	Olmayan	10	% 76,9	5	% 62,5	
Tat kaybı	Olan	4	% 30,8	1	% 12,5	p=0,606
	Olmayan	9	% 69,2	7	% 87,5	
Koku kaybı	Olan	2	% 15,4	0	0	p=0,505
	Olmayan	11	% 84,6	8	% 100	
Karın ağrısı	Olan	1	% 7,7	2	% 25	p=0,531
	Olmayan	12	% 92,3	6	% 75	
Kusma	Olan	3	% 23,1	3	% 37,5	p=0,631
	Olmayan	10	% 76,9	5	% 62,5	

Komorbit hastalıklara bakıldığında, diyabetes mellitus ($p=0,656$), hipertansiyon ($p=0,387$), koroner arter hastalığı ($p=0,557$), kronik obstruktif akciğer hastalığı ($p=0,381$), malign hastalık öyküsü ($p=0,557$) ve kronik böbrek yetmezliği ($p=0,325$), öncesinde geçirilmiş COVID-19 öyküsü olması ($p=0,629$) açısından farklılık gözlemlenmedi. Obezite, ağır klinikteki hastalarda, istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek oranda görüldü ($p=0,042$) (**Tablo 7**).

Tablo 7: Hafif-orta ve ağır klinik seyirli hastaların komorbidite durumları

Ek komorbidite durumu		Hafif – Orta Klinik		Ağır Klinik		p değeri
		sayı	yüzde(%)	sayı	yüzde(%)	
DM	Olan	3	23,1	2	25	p=1,0
	Olmayan	10	76,9	6	75	
HT	Olan	5	38,5	5	62,5	p=0,387
	Olmayan	8	61,5	3	37,5	
KAH	Olan	4	30,8	3	37,5	p=1,0
	Olmayan	9	69,2	5	62,5	
KOAH	Olan	0	0	1	12,5	p=0,381
	Olmayan	13	100	7	87,5	
Malignite	Olan	4	30,8	3	37,5	p=1,0
	Olmayan	9	69,2	5	62,5	
Lenfoma	Olan	3	23,1	2	25	p=1,0
	Olmayan	10	76,9	6	75	
Obezite	Olan	0	0	3	37,5	p=0,042
	Olmayan	13	100	5	62,5	
KBY	Olan	2	15,4	3	37,5	p=0,325
	Olmayan	11	84,6	5	62,5	
HIV	Olan	1	7,7	0	0	p=1,0
	Olmayan	12	92,3	3	100	

Laboratuvar değerlerine bakıldığında başvuru anındaki beyaz küre sayısı (p=0,469), yatış süresince bakılan tetkiklerindeki maksimum beyaz küre sayısı (p=0,148), başlangıç anındaki nötrofil sayısı (p=0,562), lenfosit sayısı (p=0,089), platelet sayısı (p=0,169), total bilirubin değeri (p=0,772), alanin aminotransferaz (ALT) (p=0,364), sedimentasyon değeri (p=0,875), ferritin (p=0,052), fibrinojen (p=0,563) değerleri açısından hafif-orta klinik seyir ile ağır klinik seyirli hastalar açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Ortalama C-reaktif protein (CRP) değeri ağır hasta grubunda daha yüksek saptandı (p=0,014). Hemoglobin ölçümleri karşılaştırıldığında ise hafif-orta klinik seyirli hastalarda hemoglobin değerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,037). Aspartat aminotransferaz (AST) düzeyleri de yine ağır klinik seyirli hastalarda daha yüksek saptandı (p=0,001). Diğer laboratuvar tetkikleri incelendiğinde D-dimer yüksekliği saptanması (p=0,177) açısından iki grup arasında fark yoktu (**Tablo 8**).

Tablo 8: Klinik bulgularına göre laboratuvar değerlerinin karşılaştırılması

	Hafif-Orta Klinik	Ağır Klinik	p değeri
C- Reaktif Protein (mg/L)	48,6	136,1	p=0,014
Beyaz küre-Başlangıç (K/uL)	6740	5280	p=0,469
Beyaz küre -Maksimum (K/uL)	9530	17200	p=0,148
Nötrofil (K/uL)	5700	4200	p=0,562
Lenfosit (K/uL)	1280	640	p=0,089
Hemoglobin (g/dL)	11,7	8,9	p=0,037
Trombosit sayısı (K/uL)	223.400	190.800	p=0,169
AST (IU/L)	16,5	102	p=0,001
ALT (IU/L)	16	34	p=0,364
Total bilirubin (mg/dL)	0,43	1,94	p=0,772
Sedimentasyon (mm/sa)	52	51	p=0,875
Prokalsitonin (ng/mL)	2,6	2,5	p=0,024

AST: Aspartat Aminotransferaz, ALT: Alanin Aminotransferaz

Klinik takiplerinde BUN ($p=0,018$) ve kreatinin yüksekliği ($p=0,003$) saptanması ağır klinik seyir gösteren hastalarda daha fazla görüldü. Non-invaziv mekanik ventilasyon açısından bakıldığında ağır hastaların daha fazla high-flow ve B-PAP ihtiyacının olduğu gözlemlendi ($p=0,002$). Yoğun bakım takip ihtiyacı gelişimi ($p=0,018$) ağır hasta grubu için daha yüksek oranlarda saptandı. Molnupiravir tedavisi alma ($p=0,606$), intravenöz metilprednizolon kullanımı ($p=0,111$) açısından gruplarda farklılık saptanmadı.

Uzamış PCR pozitifliği (dört haftanın üzerinde) saptanan hastalar diğer hastalarla karşılaştırıldığında bu grupta daha fazla malign hastalık ($p=0,016$) ve lenfoma öyküsü olduğu ($p=0,006$), PCR süresi uzun süre pozitif kalan hastaların daha çok orta- ağır hastalık grubunda yer aldığı görülmüştür. Ağır veya hafif klinik seyirli hastalarda mutasyonların görülme sıklığı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Yine uzamış PCR pozitifliği olan hastalar diğer hastalarla karşılaştırıldığında görülen mutasyonlar ve sıklıkları benzerdi.

Hastalar bağışıklama durumlarına göre karşılaştırıldığında ise aşılardan herhangi biriyle dört doz ve üzeri aşılamanan hastalar ile diğerleri arasında dört dozun üzerinde aşı olan hastalardaki suşlarda Spike Q493R mutasyonunun daha yüksek oranlarda olduğu görüldü ($p=0,043$).

Çalışmada sekiz hasta, dört doz ve üzerinde aşılama öyküsü sonrası COVID-19 tanısı alması nedeniyle, yedi hasta iki doz ve üstü aşılama rağmen yoğun bakım takibi gerektiren ağır klinik tabloya sahip olması nedeniyle, altı hasta dört haftanın üzerinde COVID-19 PCR pozitifliğinin devam etmesi nedeniyle, dokuz hasta immunsupresyona neden olabilecek ek komorbiditelerinin olması nedeniyle (yedi hasta malignite, bir hasta HIV, bir hasta organ nakli alıcısı, bir hasta SLE) genomik sekanslama için çalışmaya dahil edildi.

21 numunenin okunan ham veri sayısı 20570027 okuma çifti olarak elde edildi ve tüm numunelerden SARS CoV-2 genomları (>%96 kapsama) elde edildi. Çalışmada 12 hastada Omicron BA.2, dört hastada Omicron BA.1, dört hastada Omicron BA.5 alt varyantları ve bir hastada Delta varyantı saptandı. On iki BA.2 varyantı saptanan hastaların dokuzunda BA.2, birinde BA.2.1, birinde BA.2.1.2 ve birinde de BA.2.1.9 altvaryantı saptandı (**Tablo 9**).

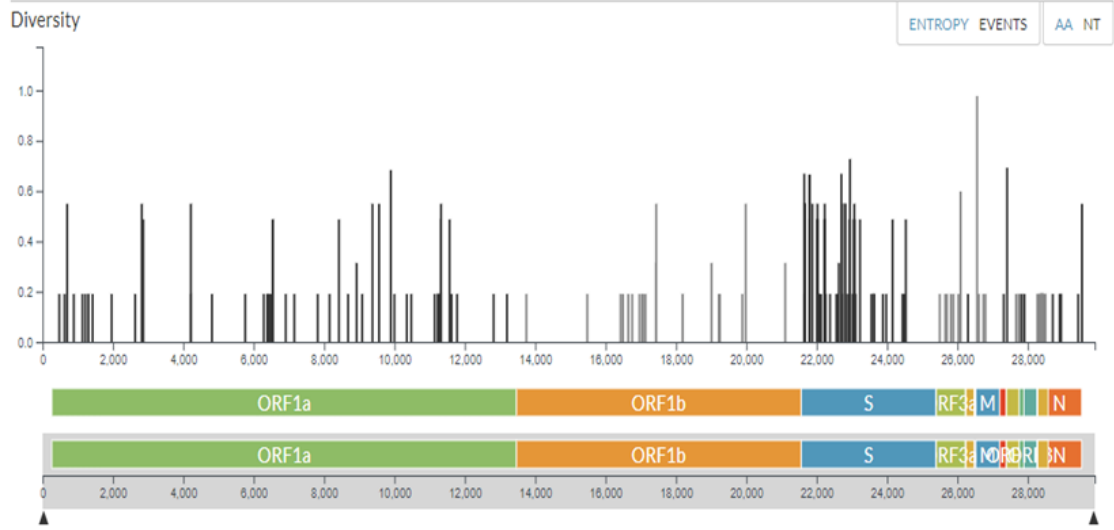
Tablo 9: Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve varyant analiz sonuçları

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Varyant	Subvaryant	PCR pozitiflik süresi (gün)	Saptandığı Dönem
1	Erkek	73	Omicron (BA.1-like)	BA.1.14	33	Şubat 2022
2	Erkek	54	Delta (B.1.617.2-like)	AY.121	64	Şubat 2022
3	Kadın	79	Omicron (BA.2-like)	BA.2.12	-	Şubat 2022
4	Erkek	73	Omicron (BA.2-like)	BA.2	15	Mart 2022
5	Erkek	75	Omicron (BA.2-like)	BA.2	-	Mart 2022
6	Erkek	78	Omicron (BA.1-like)	BA.1.18	-	Şubat 2022
7	Kadın	30	Omicron (BA.1-like)	BA.1.1	-	Mart 2022
8	Erkek	76	Omicron (BA.1-like)	BA.1.1	45	Nisan 2022
9	Erkek	75	Omicron (BA.2-like)	BA.2	134	Nisan 2022
10	Erkek	89	Omicron (BA.2-like)	BA.2	-	Nisan 2022
11	Kadın	66	Omicron (BA.2-like)	BA.2.9	-	Nisan 2022
12	Erkek	85	Omicron (BA.2-like)	BA.2	11	Nisan 2022
13	Kadın	97	Omicron (BA.2-like)	BA.2	29	Nisan 2022
14	Erkek	32	Omicron (BA.5-like)	BE.1.1	-	Temmuz 2022
15	Erkek	50	Omicron (BA.5-like)	BA.5.2	-	Haziran 2022
16	Erkek	70	Omicron (BA.2-like)	BA.2	-	Haziran 2022
17	Kadın	26	Omicron (BA.2-like)	BA.2	-	Mayıs 2022
18	Erkek	70	Omicron (BA.2-like)	BA.2.1	93	Haziran 2022
19	Kadın	80	Omicron (BA.2-like)	BA.2	-	Mayıs 2022
20	Kadın	67	Omicron (BA.5-like)	BA.5.6	14	Ekim 2022
21	Kadın	28	Omicron (BA.5-like)	BA.5.6	15	Ekim 2022

Dört BA.1 varyantı saptanan hastaların ikisi BA.1.1, biri BA.1.14 ve biri BA.1.18'di. Toplamda dört hastada saptanan Omicron BA.5 varyantının ise ikisi BA.5.6, biri BA.5.2 ve biri BE.1.1' di. Delta saptanan hastanın ise genomik dizisi AY.121'di.

İncelenen tüm izolatlarda c.1841A>G (D614G), c.425G>A (G142D), c.9764C>T NSP4 (T492I), c.14144C>T (NSP12 P323L) mutasyonları saptandı. En yaygın tespit edilen varyantlar c.1841A>G (S), c.425G>A (S), c.9764C>T (ORF1ab),

c.14144C > T (ORF1ab), c.1-25C>T(5'UTR), c.1-3A>T (N), c.1963C>T (S), c.2037T>G (S), c.2042C>A (S) ve c.2386G>T (S) idi. Ek olarak, hastaların her birinde yalnızca bir kez saptanan 13 tane Spike, bir tane M, 66 N mutasyonu vardı. Toplamda 146 missense, 78 synonym alel elde edildi. Varyantların çoğu Surface Glikoprotein ve ORF1ab'de tespit edildi (Şekil 4).



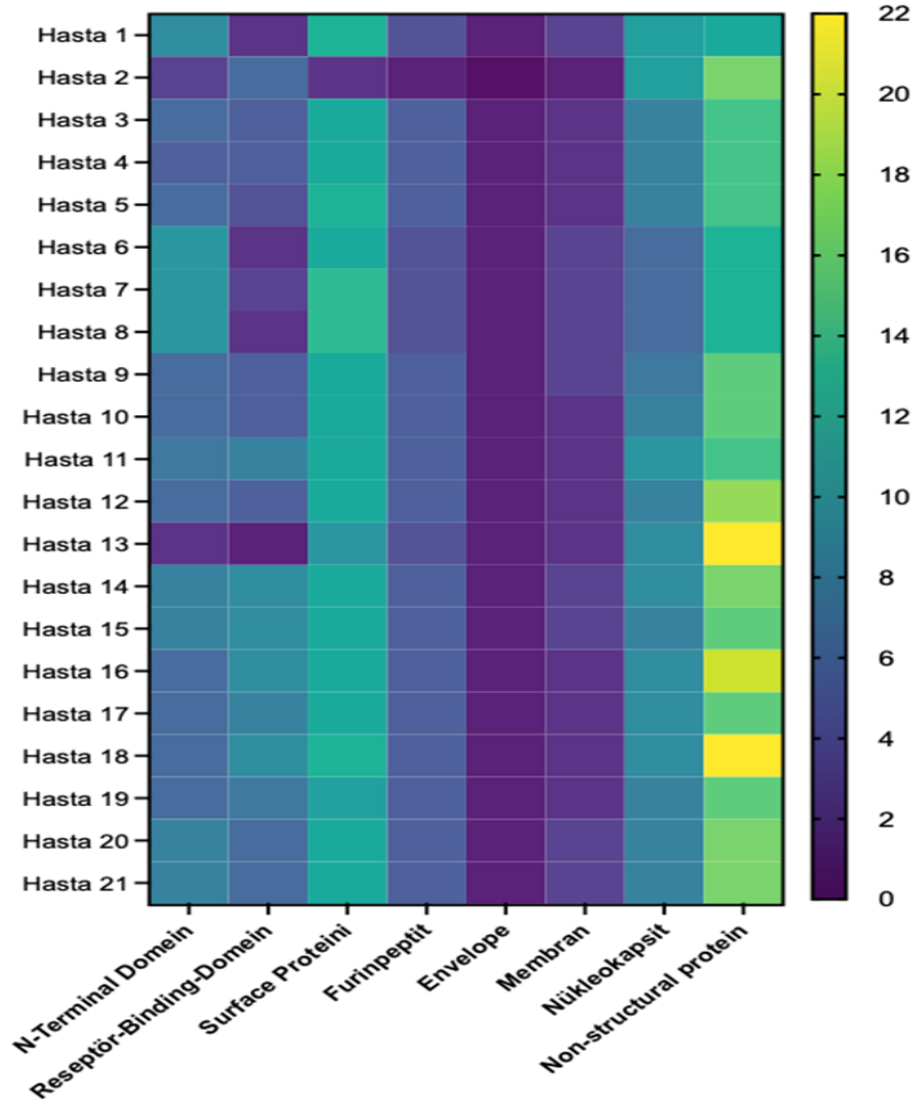
Şekil 4: Genom değişikliklerinin görülen bölgelere göre dağılımı

Hastalardan izole edilen örneklerde tespit edilen mutasyonlar ile bu mutasyonların tüm dünyada aynı sekansta görülme sıklıkları Pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, bu değişkenler arasında yüksek derecede pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r(163)=0.81$, $p<0.001$) (GISAID/ map) [169].

BA.1, BA.2 ve BA.5 varyantları arasında hastaların başvuru semptomları, klinik bulgular ve laboratuvar değerleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

BA.1 varyantı saptanan hastalarda (dört hasta) Spike A67V ($p<0,001$), Spike G446S ($p<0,001$), Spike H69del ($p=0,012$), Spikeins214EPE ($p<0,001$), Spike L212I ($p<0,001$), Spike L981F ($p<0,001$), Spike N211del ($p<0,001$), Spike N856K ($p<0,001$), Spike R346K ($p=0,029$), Spike S371L ($p<0,001$), Spike T547K ($p<0,001$), Spike T95I ($p<0,001$), Spike V143del ($p<0,001$), Spike V70del ($p=0,012$), Spike Y144del ($p=0,001$) ve Spike Y145del ($p<0,001$), M D3G ($p=0,001$), NSP3 A1892T ($p<0,001$), NSP3 K38R ($p<0,001$), NSP3 L1266I ($p<0,001$), NSP3 S1265del ($p<0,001$), NSP6 I189V ($p<0,001$), NSP6 L105del ($p<0,001$) mutasyonlarının daha

fazla olduğu görüldü. Görülme bölgelerine göre mutasyon sıklıkları Heat-Map grafisi ile Şekil 5'te gösterilmiştir [169].



Şekil 5: Mutasyonların görülme yerleri dağılımına göre Heat-map grafiği

Çalışmada en sık saptanan BA.2 varyantı (12 hasta) ile diğer varyantlar arasında mutasyon değişiklikleri incelendiğinde bazı mutasyonların BA.2 varyantında daha sık olduğu görüldü. Spike A27S (p=0,046),D405N (p=0,006),E484A (p=0,046), L24del (p=0,046), P25del (p=0,046), P26del (p=0,046), Q493R (p<0,001), R408S (p=0,006), S371F (p=0,006), S477N (p=0,046), T19I(p=0,046), T376A (p=0,006), V213G (p=0,046), NSP4 L264F (p=0,006), NSP4 L438F (p<0,001), NSP4 T327I (p=0,046), NSP6 F108del (p=0,006), NSP13 R392C (p=0,006), NSP15 T112I (p=0,006), N S413R (p=0,006), NS3 T223I (p=0,046), NSP1 S135R (p=0,006), NSP3

G489S (p=0,006), NSP3 T24I (p=0,006) mutasyonları BA.2 varyantı suşlarında daha sık gözlemlendi.

BA.5 varyantı saptanan olgularda Spike F486V (p<0,001), Spike L452R (p=0,001), M D3N (p<0,001), NSP13 A389V (p=0,029), NSP14 M315I (p=0,029), NSP16 T140I (p=0,029) mutasyonları daha sık saptandı. Bı çalışmada Türkiye'den alınan örneklerde ilk kez bulunan bazı missense mutasyonlar da belirlendi [169].

Çalışmada sırasıyla BA.1, BA.2, Delta ve BA.5 varyantı saptanan olgularda o varyanta özgü olarak görülen veya nadir olarak sadece o varyantta saptanan mutasyonlar ele alınmıştır.

Omicron varyantının BA.1 alt varyantı saptanan dört hasta incelendiğinde bir hastada görülen Spike A263T ve diğer iki hastada görülen Spike R346K mutasyonları haricinde dört hastadan izole edilen genomda tamamen aynı değişiklikler gözlemlendi. Dört hastanın ikisinde ağır klinik seyir ile beraber dört haftanın üzerinde PCR pozitifliği rapor edilmiş olup (33 ve 45 gün), iki olgu da mortal seyretti. Bu hastalar ileri yaşta olup (73 ve 76 yaş) ikisinin de lenfoma tanısı mevcuttu. Olgulardan biri aynı zamanda AIDS ile takipli iken iki doz Sinovac ile aşılama öyküsü mevcuttur. Diğer olgu ise üç doz Sinovac ile aşılandı ve diğer olgulardan farklı olarak Spike R346K mutasyonu saptandı.

Omicron varyantının BA.1 alt varyantı görülen ve hafif klinik seyirli olan diğer olgular sırasıyla 30 ve 78 yaşlarındaydı. İlk olgunun bilinen ek kronik rahatsızlığı mevcut olmayıp, ayaktan takip edildi. İki doz Sinovac-CoronaVac ve üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşıllı olan yüksek antikor düzeyine sahip (30024pg/ml) bu hastada nadir görülen (Spike dizisine sahip tüm numunelerin %0,01'i) daha önce Türkiye'den bildiri yapılmayan Spike A263T mutasyonu saptandı. Diğer hastanın ise DM, KAH ve kronik böbrek yetmezliği tanıları mevcut olup kısa süreli (beş gün) servis koşullarında takibinin sonrasında taburcu edildi. Hastanın iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşılama öyküsü mevcuttur. İki hastada da ateş, öksürük, boğaz ağrısı, tat kaybı ve miyalji gibi üst solunum yolu bulguları mevcut olup belirgin akciğer tutulumu gözlemlenmedi.

Çalışmada 12 hastada Omicron BA.2 subvaryantı saptandı. Bunlardan ikisi hafif, altısı orta, dördü ise ağır klinik seyir gösterdi.

Ağır klinik gösteren hastaların ikisi mortal seyretti. Bu iki olgudan birinde, diğer hastalardan farklı olarak varyant spesifik mutasyonlar dışında nadir görülen (Spike dizisine sahip tüm numunelerin %0,07'si) ve Türkiye'de bir kez bildirim yapılan Spike R21T mutasyonu bildirilmiştir. Dört Sinovac-Coronovac aşılması sonrası COVID-19 olan bu hastada, daha az sıklıkta görülen NS3 H78Y(NS3 dizisine sahip tüm numunelerin %1,8'i), NS3 W131C (NSP3 dizisine sahip tüm numunelerin %0,54'ü) mutasyonları da saptanmıştır.

Mortal seyreden diğer olguda da diğer hastalardan farklı olarak Türkiye'den iki kez bildirim yapılmış olan ve nadir görülen (Spike dizisine sahip tüm numunelerin %0,21'i) Spike L452M mutasyonu saptanmıştır [169]. Bu olguda Spike proteini dışında da diğer olgulardan farklı olarak NS3 D155Y(NS3 dizisine sahip tüm numunelerin %0,74'si), NSP3 A1215T (NSP3 dizisine sahip tüm numunelerin %0,03, Türkiye'den bir olgu Ankara'dan), NSP3 A1803V (NSP3 dizisine sahip tüm numunelerin %0,01'i, Türkiye'den Ankara'dan bir olgu), NSP3 L1244F((NSP3 dizisine sahip tüm numunelerin %0,13'ü), NSP4 A472V (NSP4 dizisine sahip tüm numunelerin %0,02'si, Ankara'dan yedi bildirim), NSP13 G54C (NSP13 dizisine sahip tüm numunelerin %0,01'i, Türkiye'de Ankara'dan bir olgu) mutasyonları saptandı [169]. Hasta üç Sinovac-Coronovac ve bir kez Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşılandı.

Omicron BA.2 subvaryantı ve ağır klinik seyir gösteren diğer iki hastaya bakıldığında hastalardan biri mesane kanseri tanılı 73 yaş, erkek, iki kez Sinovac-Coronovac ve iki kez Pfizer-BioNTech BNT162b2 aşılması sonrası (antikor düzeyi 26580 pg/ml) COVID-19 olan ve uzun süre yoğun bakım koşullarında takip edilen (22 gün) bir hastadır. Ek bir mutasyon saptanmamıştır. Diğer ağır klinik seyir ise 80 yaşında, kadın, dört doz Sinovac-Coronovac ile aşılandı (antikor düzeyi 4750 pg/ml) non-invaziv mekanik ventilasyon ihtiyacı gelişen hastada gözlemlendi. Hastada, NSP1 H110Y (NSP1 dizisine sahip tüm numunelerin %0,33'ü) mutasyonu diğer olgulardan farklı olarak saptandı.

Omicron BA.2 saptanan orta şiddetli klinik seyir gösteren üç hastada, dört haftanın üzerinde devam eden PCR pozitifliği saptanmıştır (134, 93 ve 29 gün). Doksan üç gün PCR pozitifliği saptanan ve lenfoma tanısı olan, inaktif aşı ile en son bir sene öncesinde aşılanmış 70 yaş erkek hastada diğer hastalarda görülen mutasyonlara ek olarak Spike A222V, T323I ve NS7a A106T değişiklikleri görülmüştür. Spike T323I ve NS7a A106T mutasyonları Türkiye’den daha öncesinde bir kez bildirilmiş olup ender görülen mutasyonlardır. Yine aynı hastada saptanan NSP2 F156L tüm dünyada toplamda 697 kez saptanmış olup (NSP2 dizisine sahip tüm numunelerin $\leq 0,001$) Türkiye’den ilk kez bildirilmiştir [169].

134 gün uzamış PCR pozitifliği saptanan 75 yaş, erkek, lenfoma tanılı hastada dört doz Sinovac-Coronavac aşı öyküsü mevcut olup, M D3G ve NSP4 T114I (8337 kez (tüm NSP4 sekanslarının %0,06’sı, Türkiye’de bir kez İstanbul’dan bildirim) mutasyonları saptandı [169].

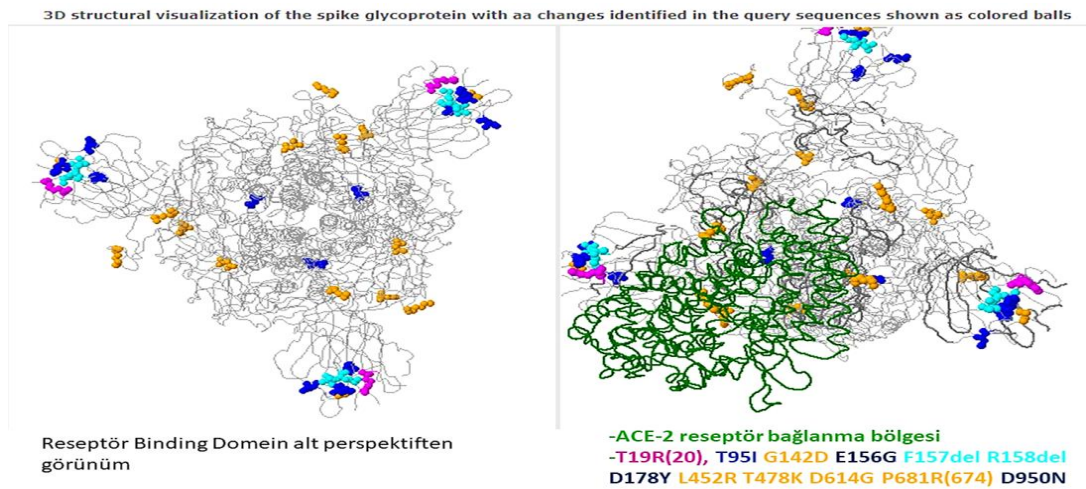
29 gün pozitiflik saptanan, aşısız, 97 yaş kadın hastada sekiz nadir mutasyon saptandı. NS3 L94F (10267 kez, NS3 sekanslarının %0,07’si, Türkiye’den İstanbul ve Ankara’da), NSP1 V60I (5356 kez, NSP1 sekanslarının %0,04’ü, Türkiye’de Ankara’dan iki olgu bildirim), NSP2 I100T (2913 kez, NSP2 sekanslarının %0,02’si, Ankara’dan bir olgu bildirim) NSP3 G1691S (1364 kez, NSP3 sekanslarının %0,01’i, Ankara’dan altı olgu) NSP3 V1388I (1255 kez, NSP3 sekanslarının %0,01’i, Ankara’dan iki olgu bildirim) NSP4 M33I (NSP4 sekanslarının %0,07’si), NSP4 T114I (8337 kez, (NSP4 sekanslarının %0,06’sı, İstanbul’dan bir olgu), NSP13 S259L (21195 kez (NSP13 sekanslarının %0,14’ü, Türkiye’de Ankara ve Antalya’dan bildirim), NSP14 V40I, dünya genelinde toplamda 435 kez bildirilmiş olup (NSP14 dizisine sahip tüm numunelerin $\leq 0,001$) Türkiye’den ve komşu ülkelerden henüz bildirim yapılmamıştır [169].

Orta dereceli klinik gösteren hastalardan biri 89 yaş erkek hasta olup dört Sinovac- CoronaVac aşılması sonrası enfeksiyon kliniği gelişmiştir. Sadece bu hastada bildirilen NSP2 L18I mutasyonu tüm dünyada toplamda 395 kez saptanmış olup NSP2 dizisine sahip tüm numunelerin $\leq 0,001$) toplamda 48 ülkeden bildirim yapılmıştır. Türkiye’den ise olgumuz dışında daha öncesinde bildirim bulunmamaktadır [169].

Yine Omicron BA.2 subvaryantı, orta seyirli klinik gösteren, 85 yaşında, erkek, prostat kanseri tanılı iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech aşısı olan, aşı sonrası yüksek antikor titresine sahip (12757 Au/ml) olan diğer hastada, ayırıcı olarak NSP2 P129L (tüm dünyada 133607 kez (NSP2 dizisine sahip tüm örneklerin %0,91'i)), NSP2 V599I (tüm dünyada 1163 kez Türkiye'de ilk kez saptanan ve tüm dünyada NSP2 dizisine sahip tüm numunelerin %0,01'inde görülen) ve NSP5 K90R (NSP5 dizisine sahip tüm örneklerin %1,36'sı) mutasyonları saptanmıştır [169].

Omicron BA.2 subvaryantı izole edilen ve orta şiddetli klinik bulgular gösteren altıncı hasta ise 75 yaşında erkek, DM tanılı, üç doz Sinovac-CoronaVac ve bir doz Pfizer- BioNTech BNT162b2 ile aşıyla yaygın akciğer tutulumu olan (evre 4) servis koşullarında altı gün takibi sonrasında taburcu edilen bir olgudur. Çalışmada sadece bu olguda Spike proteininde T678I mutasyonu saptanmıştır. Dünya genelinde 10436 kez (Spike dizisine sahip tüm örneklerin %0,07'si) izole edilen mutasyon Türkiye'de Ankara ve Denizli'den bildirilmiştir [169].

Hafif seyirli klinik gösteren Omicron BA.1.4 varyantı olan iki hasta da iki doz Sinovac- CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech ile aşılanmıştır. Bu hastalardan birinde varyant spesifik mutasyonlar dışında ek bir mutasyon saptanmamıştır. Diğer hasta ise hafif klinik bulgular taşımasına rağmen semptomları ateş yüksekliği, miyalji semptomları iki haftanın üzerinde devam etmiştir. Bu hastada NS6 L29F ve NSP3 A1179V mutasyonları diğer hastalardan farklı olarak görülmüş olup, iki mutasyon da daha öncesinde Türkiye'den bir kez bildirilmiştir [169].



Şekil 6: Delta varyantının Spike Protein 3D görünümü ve aa değişiklikleri

Çalışmada bir olgu Delta B.1.617.2 varyantı saptanmıştır (**Şekil 6**). Hasta 54 yaşında, lenfoma tanısı ile takip edilen, ARDS benzeri akciğer tutulumu olan, 30 günün üzerinde yoğun bakım koşullarında takip edilen ve 64 gün PCR pozitifliği sonrasında mortal seyreden bir olgudur. Hastada Spike D178Y, NS3 V202L, NSP3 L689F, NSP6 A79V, NSP6 Q208R, NSP6 Y85H, NSP10 T49I ve NSP15 A80V olmak üzere toplamda 8 nadir görülen mutasyon saptanmıştır. NSP3 L689F, NSP6 A79V, NSP6 Q208R, NSP6 Y85H, NSP10 T49I ve NSP15 A80V Türkiye’de ilk olarak Denizli’de saptanan mutasyonlardır. NSP6 Y85H tüm dünyada 200 kez (27 ülkede, NSP6 dizisine sahip tüm numunelerin $\leq 0,001$) bildirilirken, Türkiye’de daha öncesinde sadece bir kez Denizli’den bildirilmiştir [169].

Omicron BA.5 subvaryantı saptanan dört hastanın ikisi hafif, ikisi ağır klinik seyir gösterdi. Ağır klinik seyir gösteren hastaların ikisi de romatizmal hastalık nedeniyle immunsupresif tedavi almaktaydı. BA.5.6 alt grubu hastalardan izole edildi.

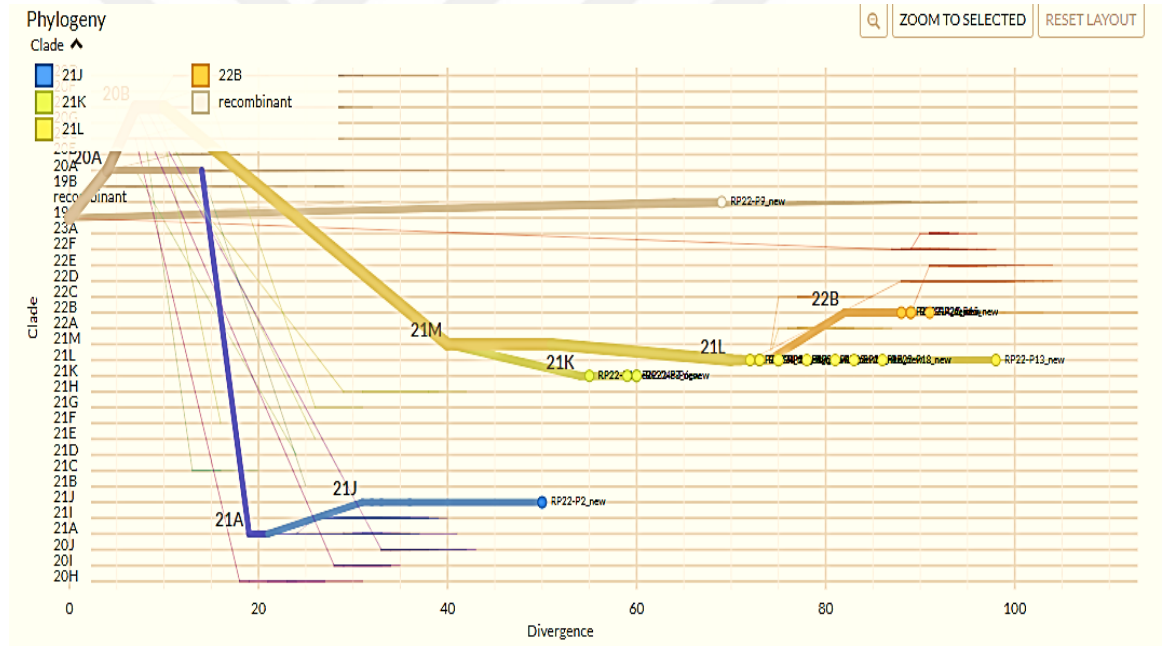
Hastalardan ilki 28 yaşında, Sistemik Lupus Eritamozise bağlı kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz desteği alan, daha önce COVID-19’a karşı herhangi bir aşılama öyküsü olmayan ve yaygın akciğer tutulumu olan bir hasta iken diğeri ise 67 yaşında kadın, üç doz Sinovac-CoronaVac ve 2 doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşıllı, ağır klinik seyir sonrası mortal seyreden olgudur. İki hastada da aynı mutasyonlar saptanmıştır. NSP13 A389V, (NSP13 dizisine sahip tüm örneklerin %0,33’ü), NSP14 M315I (NSP14 dizisine sahip tüm numunelerin %0,13’ü), NSP16 T140I (NSP16 dizisine sahip tüm numunelerin %0,50’si) hastalarda nadir saptanan mutasyonlardır.

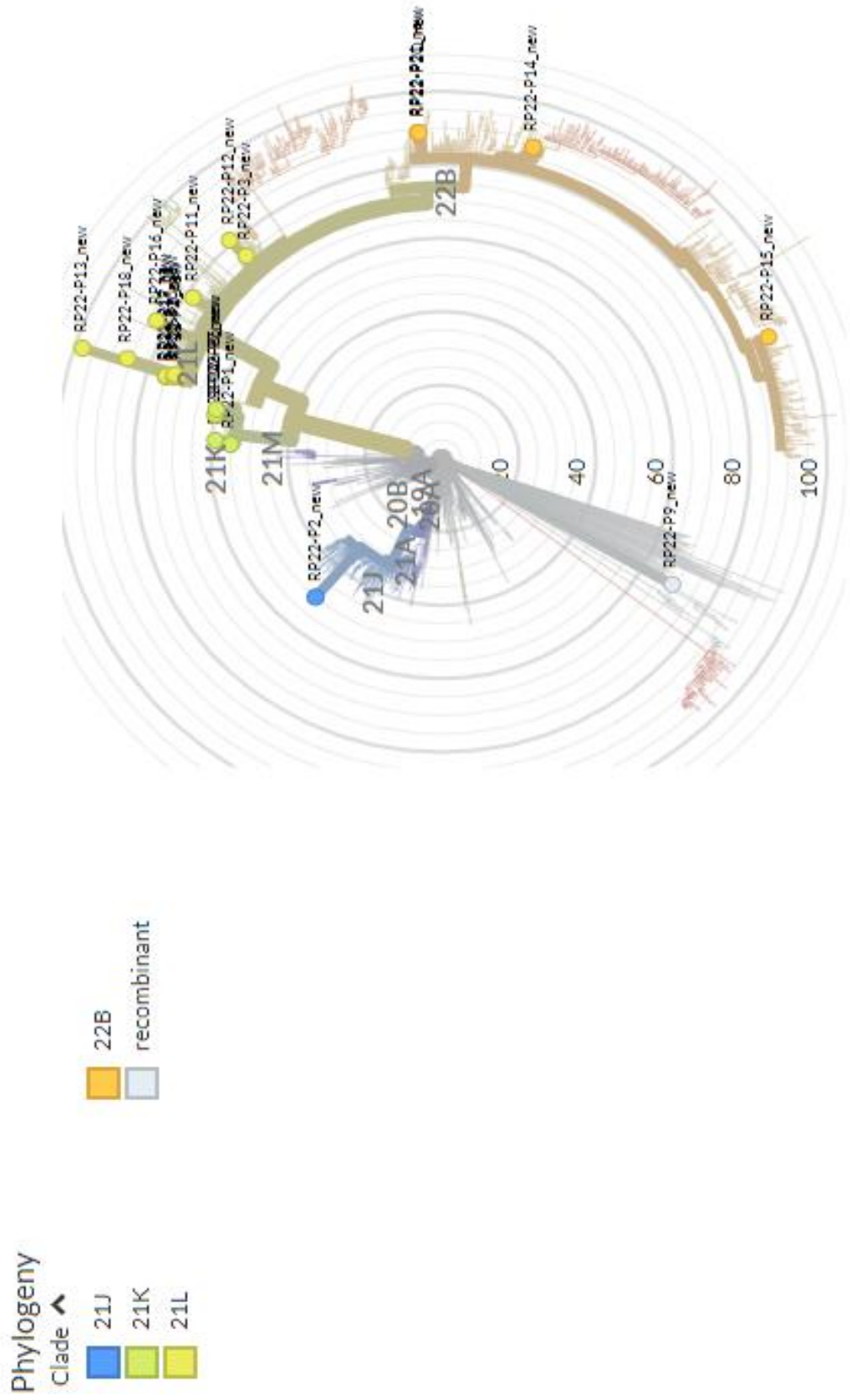
Omicron BA.5 subvaryantı saptanan diğer iki hasta da hafif klinik seyir gösterdi. Hastalardan ilki 32 yaş erkek cinsiyette, iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşıllı ve ayaktan takip edilen hastadır. Ek komorbiditesi olmayan hastanın ateş yüksekliği, miyalji ve öksürük semptomları bir haftayı aşan sürede devam etti. N E136D (535550 kez, N dizili tüm örneklerin %3,64’ü, Türkiye’den Ankara, İstanbul’dan bildirim), NSP2 Q376K (548303 kez, NSP2 dizisine sahip tüm örneklerin %3,73’ü, Türkiye’den Ankara, Adana, İstanbul’dan bildirim), NSP6 L260F (534517 kez, NSP6 dizisine sahip tüm örneklerin %3,64’ü, Türkiye’den Ankara, Adana, İstanbul’dan bildirim), NSP13 M233I (510505

kez, NSP13 dizisine sahip tüm örneklerin %3,47'si) sadece bu hastadan izole edilmiştir [169].

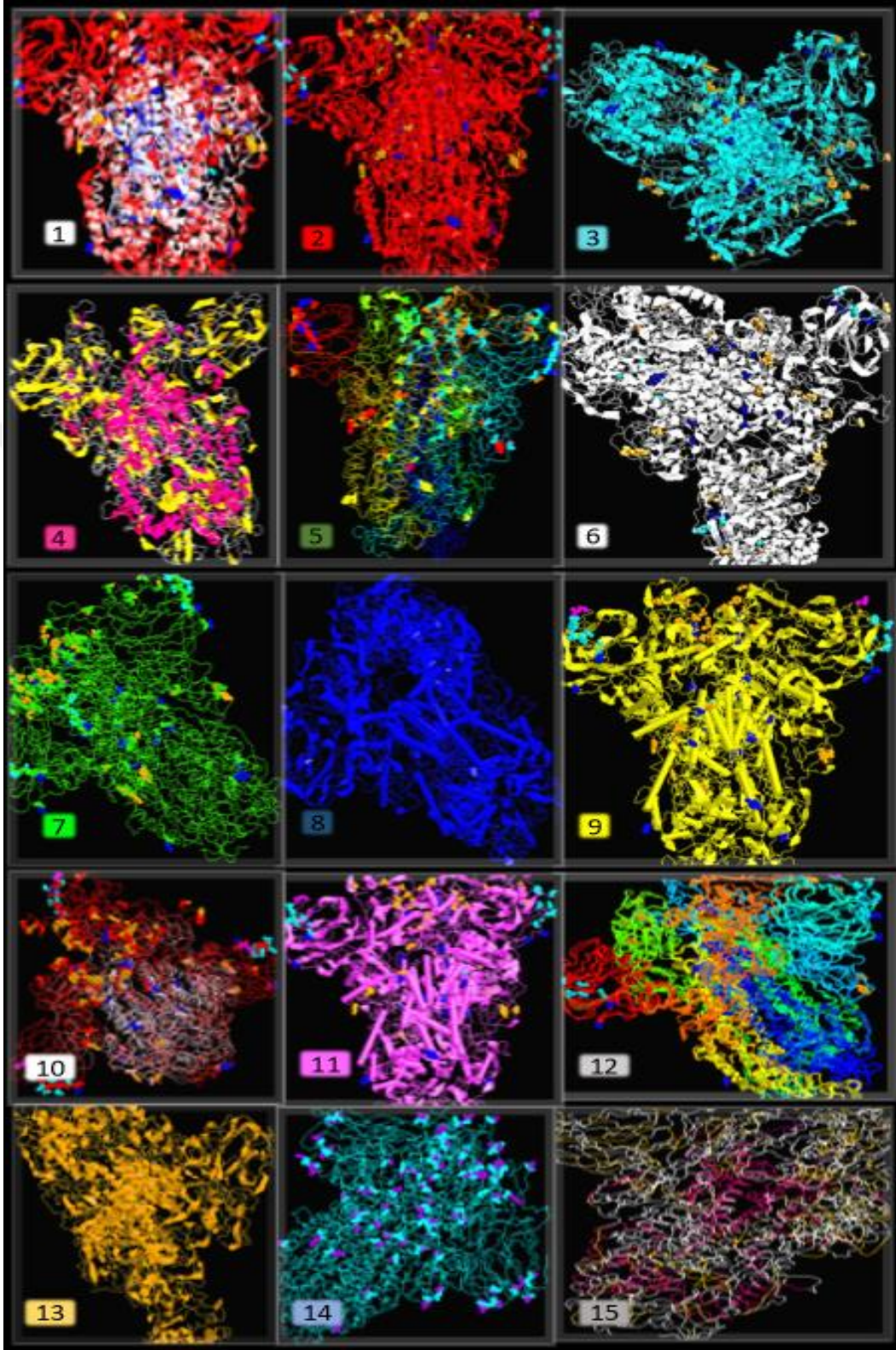
Omicron BA.5 subvaryantı saptanan diğer hasta ise 50 yaşında erkek, renal transplasyon sonrası takip edilen üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile aşılı olan olguydu. Hastadan NSP12 P94S 3115 kez (NSP12 dizisine sahip tüm numunelerin %0,02'si, Ankara'da üç kez), NSP13 T127N (396333 kez (NSP13 dizisine sahip tüm numunelerin %2,70'i Türkiye'den Ankara, Adana, İstanbul'dan bildirim) mutasyonları hastadan izole edildi [169].

Şekil 7: Çalışmadaki örneklerin soylara göre filogenetik analiz grafiği





Şekil 8: Çalışmadaki izolatların filogenetik ağaç yapısı



Şekil 9: İzlenen 15 olgudan elde edilen SARS-CoV-2 Spike proteinlerinin GISAID web sitesi üzerinden araştırmacı tarafından oluşturulmuş 3D görünümü

4. TARTIŞMA

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde SARS-CoV-2'nin farklı varyantlarının klinik ile ilişkisinin incelendiği 493 (Pubmed) çalışma bulunmuştur. Bu çalışmada toplamda 21 hasta incelenmiştir. Türkiye'de SARS-CoV-2 varyant analizi ve klinik ilişkisinin değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır.

Varyantların izole edikleri dönem ile ilişkisine bakıldığında, büyük oranda o dönemin baskın varyantlarının elde edildiği görülmüştür [170]. Şubat- Mart 2022 tarihinde Dünya genelinde, baskın varyant olan Delta'nın yerini, BA.1 ve BA.2 alırken, çalışmamızda da bu dönemde alınan örneklerde bir hastadan Delta varyantı, üç hastadan BA.1, üç hastadan BA.2 varyantları izole edilmiştir. Nisan- Haziran 2022 tarihleri arasında ise dünya genelinde baskın varyant BA.2 haline gelirken, Haziran- Temmuz 2022 tarihlerinde BA.5 varyantı görülmeye başlanmıştır [171]. Bu çalışmada da Nisan-Haziran 2022 tarihinde alınan örneklerin büyük çoğunluğunda BA.2 izole edilirken (10 hastanın 9'unda BA.2 ve bir hasta BA.1) Haziran ayı sonu ve Temmuz başında alınan iki örnekte BA.5 saptanmıştır. Ekim 2022 de ise dünya genelinde %77,1'lik bir oran ile BA.5 ve alt varyantları dominant varyant olup, %1.4 XBB görülmeye başlanmıştır [172]. Ekim 2022'de alınan iki olgumuzun SARS-CoV-2 örneği Omicron BA.5 varyantı olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada farklı dönemlerde alınan örnekler büyük oranda o dönemin baskın varyantını temsil etmektedir.

SARS-CoV-2'nin genetik analizi, hastalık şiddetini olumsuz etkileme olasılığına ilişkin potansiyel değişiklikleri zamanında belirlemek için seçilmiş örneklerde yapılmalıdır [135]. Bu doğrultuda çalışmamıza dahil edilen hastaların %85'i hastanede yatırılarak izlenen hastalar olup, büyük çoğunluğunu 65 yaş üzeri (ort yaş: 65,3 yıl) ve erkek hastalar (n=13 %61,9) oluşturmaktaydı. Bu çalışmayla benzer şekilde diğer literatür çalışmalarında da özellikle 65 yaş üstü olmanın ve erkek cinsiyet olmanın COVID-19 hastalığı için risk faktörü olduğu gösterilmiştir [173, 174].

Bu çalışmada saptanan en sık varyant Omicron varyantıydı. Omicron varyantına karakterize semptomlar ateş yüksekliği, öksürük, boğaz ağrısı ve ses kısıklığı gibi daha çok üst solunum yolu sistemine sınırlıdır [175, 176]. Çalışmamızda

literatürle benzer şekilde en sık görülen semptomlar ateş yüksekliği ve öksürük olup, ileri evre olgularda nefes darlığı görülmüştür. Omicron varyantında, Delta ve diğer ilk varyantlara göre koku kaybı görülme sıklığında azalma olduğu ve yaklaşık hastaların %11.7'inde görüldüğü çalışmalarda gösterilmiştir [177]. Bu çalışmada da Omicron vakalarının %10'unun azında koku almada kayıp gözlemlenmiştir.

Solunum sistemi sonrası en sık gastrointestinal sistem bulguları (%33) gözlemlenmiştir. COVID-19 enfeksiyonunda gastrointestinal bulguların görülme oranı %3 ile %61 arasında değişmekle birlikte, yapılan bir araştırmada çalışmamızla yakın oranlarda Omicron varyantı hastaların %22.3'ünde abdominal semptomların olduğu belirtilmiştir [179].

Bu çalışmada Omicron BA.1, BA.2 ve BA.5 alt varyantları arasında başvuru semptomları, klinik ve laboratuvar verileri açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Literatürde diğer klinik çalışmalarda da Omicron alt varyantları arasında hastalığın ciddiyeti ile ilişkili direk bir atfetme yapılamamaktadır [180] Delta varyantında ağır hastalık gelişimi, hastane başvurularında artış, semptomatik hastalık gelişimi ve yoğun bakım ihtiyacı gelişiminin Omicron alt varyantlarına göre daha yüksek olduğu bilinmektedir [181]. Bu çalışmadaki Delta olgusu ağır hastalık tablosu, yaygın akciğer tutulumu, uzun süre yoğun bakımda yatış (30 gün), uzun süren PCR pozitifliği (64 gün) sonrası mortal seyretmiştir. Omicron varyantı, Delta'ya kıyasla daha az şiddetli klinikle ilişkilendirilse de varyant bulaştırıcılığın artması, bağışıklık yanıtından kaçarak tekrarlayan enfeksiyonlara neden olma, yüksek sayıda hastane başvuruları sonucunda sağlık sisteminde aksamalar ve uzun süreli bakım veren tesislerde ciddi hastalık vakalarının ve ölümlerin meydana gelmesi nedeniyle varyantların epidemiyolojik dinamiklerini izlemeyi amaçlayan sürveyans çalışmaları devam etmelidir [182].

Çalışmada Omicron alt varyantları izole edilen 20 hastanın 5'i mortalite ile sonuçlanmış olup tekrarlayan enfeksiyonlar, uzamış PCR pozitifliği, aşı ile bağışıklamaya rağmen özellikle immunsupresif hastalarda görülen ağır enfeksiyon kliniği nedenleri ile bu hastalara genomik sekanslama yapılmıştır.

Hastaların ek komorbidite durumları incelendiğinde %85'inin (n=18) en az bir kronik hastalığının olduğu görülmüştür. En sık saptanan ek hastalık ise

hipertansiyondur (%47,6 n=10). Hipertansiyonu olan hastalar ile diğer hastalar karşılaştırıldığında varyant analizi ve klinik bulgular açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Çalışmada hafif ve ağır hastalar arasında ek hastalıkların görülme oranlarına bakıldığında, obezitenin ağır hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Önceki meta-analiz ve sistematik incelemelerde, obezitenin yoğun bakım ünitesi ihtiyacı ve COVID-19'da invaziv mekanik ventilasyon gereksinimi için önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur [183]. Bu nedenle hastaların antropometrik ve metabolit parametrelerinin ölçümleri COVID-19 risk değerlendirme kriterlerine dahil edilmeli ve olumsuz klinik sonuçlardan kaçınmak için bu hastalar yakın gözlem altında tutulmalıdır.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 14'ünde (%66,6) malignite, DM, HIV, KBY, SLE gibi nedenlerden ötürü doğal ve kazanılmış immünyetmezlik durumu mevcuttu. Bu hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı şekilde daha fazla hastaneye yatış ve daha ağır hastalık tablosu gözlemlendi. Önceki çalışmalarda da Omicron varyantında immünyesyon kliniğinin daha yüksek oranlarda hospitalizasyon ve ağır hastalık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [184, 185].

COVID-19 da immünyesyonun virüsün mutasyon geçirmesindeki rolü hakkında bilgi edinmek, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin enfeksiyonu nasıl ele aldığını anlamak açısından önemlidir. Birçok çalışmada multi-mutasyonel SARS-CoV-2 varyantlarının persistant COVID-19 vakalarının seyri sırasında ortaya çıkabileceği, kısmi bağışıklık kontrolü ortamında meydana gelebilecek çok aşamalı evrimsel sıçramaların görülebileceği belirtilmiştir [186, 187, 188]. Çalışmada bu hastaların genetik değişiklikler için rezerv olabileceği düşünülerek immünyesyon hastalarının dahil edilmesine öncelik verilmiştir.

Çalışmada tam doz aşılı (dört doz ve üzeri) ve aşılama sonrası antikor yanıtı oluşan hastalarda daha çok hafif klinik seyir ve PCR pozitifliği süresinde kısalma gözlemlenmiştir. Bu çalışmayla benzer şekilde, İngiltere'de yapılan bir çalışmada COVID-19'a karşı Pfizer-BioNTech aşısı olan 1.610 sağlık çalışanı bireylerin PCR pozitifliği süresinin kontrol grubuna göre daha kısa olduğu, aşılanmış bireylerin semptomları daha hafif seyrettiği ve hastaneye yatırılma oranlarının daha düşük

olduğu gösterilmiştir [189]. Yine başka bir çalışmada da aşılanma ile asemptomatik enfeksiyonun, bulaştırıcılığın azaldığı ve NAAT pozitiflik suresinin kısaltığı gösterilmiştir [190]. COVID-19 ile mücadelede aşılar ve antikor terapileri ile olduğa başarılı ilerleme kaydedilmiştir. Ancak varyantların aşı kaynaklı bağışıklıktan kaçma yeteneklerini gözlemlemek için, aşılama sonrasında görülen asemptomatik ve semptomatik enfeksiyonlarda nötrale edici antikor titrelerinin izlenmesi ve viral RNA sekanslama çalışmaları gereklidir [191].

alışmamızdakine benzer şeklide COVID-19' da hastalığın ciddiyeti ile ilişkili biyokimyasal belirteçlerden biri olan CRP değerinin, ağır klinik seyirli olgularda keskin şekilde arttığı, hastalıkla ilgili komplikasyonların gelişimi, erken müdahale ve tedavinin etkililiği açısından takipte kullanabileceği ile ilgili çalışmalar mevcuttur [192, 193]. Yine takip edilen ağır klinik seyirli hastalarda, hastalık başlangıcında AST değerlerinin hafif klinik seyirli hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Daha nceki çalışmalarda COVID-19 hastalarında hepatoselüler hasar ve ağır klinik seyir göstergesi olarak AST'nin ön planda olduğu laboratuvar değişiklikleri benzer şekilde ele alınmıştır [194]. Karaciğer hasarı, COVID-19 enfeksiyonunun tanımlanmış önemli extra-pulmoner tutulumlarından biridir. Bu hastalar ciddi hastalık gelişimi, yakından izlem ve yoğun bakımda takip kararları için göz önünde bulundurulmalıdır [185].

Çalışmada ağır klinik seyirli hastalarda Hgb değeri hafif-orta klinik seyirli hastalara göre önceki çalışmalara benzer şekilde daha düşük saptanmıştır. Ağır hastalık gelişimi açısından risk faktörü olarak görülen anemi, dokulara oksijen transportunun bozulmasına ve hipoksi gelişimine neden olarak hastalığın progresyonunu kolaylaştırmaktadır [195]. Yine bu çalışmada hastalığın başlangıcında BUN ve kreatinin yüksekliği saptanan hastalarda istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha ağır klinik seyir gözlemlenmiştir. Kritik COVID-19 hasta gruplarında sitokin fırtınası dahil olmak üzere multi-sistem inflamasyon sonucu BUN yeniden emilimini ve BUN/Cr oranı artabilmektedir. Bu nedenle bu oranın COVID-19 hastalığının ciddiyetini ve sağkalımını değerlendirmede önemli bir parametre olduğu çalışmamızla benzer şekilde diğer çalışmalarda da gözlemlenmiştir [196]. CRP, AST, Hgb, BUN ve kreatinin tetkiklerinin maliyet etkin ve uygulamalarının kolay olması nedeniyle COVID-19'un ciddiyetini tahmin etmede kullanılması önerilir.

Çalışmada uzamış PCR pozitifliği (dört haftanın üzerinde) saptanan hastalar diğer hastalarla karşılaştırıldığında, bu grupta daha fazla malign hastalık ve lenfoma öyküsü olduğu, PCR süresi uzun süre pozitif kalan hastaların daha çok orta- ağır hasta grubunda yer aldığı görülmüştür. Malign hastalıkların tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, kortikosteroidler ve hastalığın oluşturduğu immüendisregülasyon COVID-19 hastalığına karşı bağışıklık yanıtını bozarak uzun süre viral saçılıma neden olabilmektedir [197, 198]. Uzun süren bulaştırıcılık riski ve bağışıklık yanıtından kaçan mutasyonlar üretebilen suşların baskın hale gelmesi söz konusu olduğu için bu hastaların enfeksiyon kontrol önlemlerine ve izolasyon sürelerine uyulması konusuna önem verilmelidir. Bu çalışmayla benzer şekilde uzun süreli saçılımın ciddi hastalık göstergesi olduğu ve prognozu etkileyebileceği ile ilişkili yayınlar mevcuttur [199].

Çalışmada dört doz ve üzeri aşılama öyküsü olan hastalar (n=14 %66) ile diğer hastalar arasında mutasyon karşılaştırılması yapıldığında aşı olan hastalardaki suşlarda Spike Q493R mutasyonu anlamlı olarak daha fazla elde edilmiştir (p=0,043). Spike Q493 mutasyonu, ACE-2 reseptörüne bağlanma afinitesini artırmaktadır. Daha önce İtalya'dan bildirilen bir olgu sunumunda bu mutasyonun Bamlanivimab ve Etesevimab monoklonal antikor tedavisine dirençle ilişkili olabileceği bildirilmiştir [200]. Psödo viral nötralizasyon testlerinde de Spike Q493R, bamlanivimab duyarlılığını altı kat, etesevimab duyarlılığını 232 kat ve her iki ilacın kombinasyonunu 100 kat azalttığı gösterilmiştir [201]. Antikor tedavilerine direnç ile birlikte çalışmamızdaki veriler, aşı ile oluşan bağışıklık yanıtının da bu varyant virüsün kontrolünde yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle aşıli bireylerdeki breakthrough enfeksiyonların surveyansı oldukça önem kazanmaktadır.

Çalışmada en sık görülen mutasyonlara bakıldığında tüm hastalarda Spike D614G, Spike G142D, NSP4 T492I, NSP12 P323L mutasyonları saptanmıştır. GISAID 2023 verilerine göre Spike D614G ile NSP12 P232L mutasyonları, dünya genelinde de çalışmamızla korele şekilde sırasıyla %99.2 ile %97.2'sinde görülme yüzdesi ile en prevalan mutasyonlardır. 2022 yılında mutasyonların sıklık analizi ile ilgili yapılan global bir çalışmada Asya, Afrika ve Amerika kıtalarında ve totalde en sık saptanan Spike mutasyonu D614G olarak saptanmıştır [202].

D614G mutasyonunun evrimsel trendi Şubat 2020’de başlamış olup virüsün ACE-2 bağlanmasını artırmaktadır. Bununla birlikte D614G’nin ciddi hastalık ile ilişkilendiren bir etkisinin olmaması, onu küresel olarak en yaygın Spike proteini mutasyonu yapmaktadır. Yine Türkiye’de yapılan SARS-CoV-2 genom çalışmasında da en sık saptanan Spike mutasyonu D614G olarak saptanmıştır [203].

Tüm olgularda gördüğümüz diğer Spike mutasyonu G142D ise Spike proteini N-Terminal Domein bölgesinin konformasyonuna neden olarak antikor bağlayıcı bölgede değişikliğe neden olur ve nötralize edici antikorların bağlanmasını zayıflatır [181]. Artmış bulaştırıcılık, aşı ile oluşan bağışıklık yanıtından kaçma ve breakthrough enfeksiyonla ilişkilendirilen bu etki, Spike T951 mutasyonunun varlığı ile şiddetlenmektedir. Çalışmamızda bu verilerle uyumlu olarak iki mutasyonun birlikte görüldüğü beş hastadan üçünde, dört haftanın üzerinde devam eden PCR pozitifliği (33 gün, 64 gün ve 45 gün) saptanmış, diğer iki hastada da dört doz ve üzeri aşılama rağmen (iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech BNT162b2, iki doz Sinovac-CoronaVac ve üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2) COVID-19 ile hastalık gelişimi gözlemlenmiştir.

Çalışmada hafif, orta ve ağır klinikteki tüm hastalardan izole edilen diğer bir mutasyon NSP4 T492I’dır. Bu mutasyonun artan görülme sıklığı üzerine yapılan çalışmalarda, pozitif seleksiyonunu ve artmış adaptasyonunu, monositik makrofajlarda viral RNA ilişkili kemokin üretimini baskılayarak bağışıklık yanıtından kaçmasının oluşturduğu gözlemlenmiştir [204]. Mutasyonun tüm hastalarda görülmesi, hastalığın ciddiyetinden ziyade bulaştırıcılık üzerine etkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmada Omicron BA.1 subvaryantı saptanan olgulardan ikisinin mortal seyretmesi, diğer iki olgunun ise son üç ay içinde dört doz aşı şemasını tamamlaması ile birlikte enfeksiyon kliniğinin gözlemlenmesi nedeniyle genetik sekanslama yapılmıştır. Hastaların tümünde saptanan ve diğer BA.1 dışı Omicron varyantlarında görülmeyen mutasyonlara bakıldığında Spike A67V, del211 ve ins214EPE mutasyonları Spike proteininde yapısal bir değişikliğe neden olmaktadır [205]. A67V, H69-V70 delesyonu ile çalışan ve antijenik bölgeyi değiştirerek viral enfektiviteyi etkileyen bir mutasyondur [206, 207]. Ayrıca ins214EPE, Y145D ile birlikte antikorlara karşı dirençte yedi kat artış ile ilişkilidir. A67V mutasyonu da iyileşme ve

aşılama sonrası oluşan serum nötralizasyonda azalma ile ilişkilendirilmiştir [208]. Bu çalışmada varyantlarda görülen bu üç mutasyon, hastalardaki viral infektivitede artış ve bağışıklık yanıtına direnç ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmada Omicron BA.1 subvaryantında mortal seyreden hastalarda Spike proteinin N-terminal bölgesinde yer alan G446S ve Spike N440K mutasyonları ortak olarak saptanmıştır. Bu iki mutasyonla ilgili yapılan çalışmalarda antijen işleme/sunumunu olumlu olarak etkileyerek, T hücrelerinin antiviral aktivitesini güçlendirdiği ve virüsün T hücreleri tarafından tanınmasını sağladığı gösterilmiştir [209]. Ancak mortal seyir gösteren bu hastaların AIDS ve lenfoma tanıları nedeniyle varyantlara karşı oluşan T hücre sayısının ve aktivitesinin etkilenmiş olabileceği, bu nedenle mutasyonların bu etkisinden farklı olarak ağır hastalık seyri gösterdikleri düşünülmüştür.

Omicron BA.1 varyantı izole edilen toplam dört hastada nadir görülen mutasyonlar ele alınmıştır. Beş doz aşılı (iki doz Sinonav-Coronavac +üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2) olan ve hafif klinik seyir gösteren ve üç doz aşılı (iki doz Sinonav-Coronavac + bir doz Pfizer-BioNTech BNT162b2) olan mortal seyreden iki hastada Spike R346K mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyonun bağışıklık yanıtından kaçışı ile ilgili olarak, 2022 de Japonya’ da Pfizer- BioNTech BNT162b2 aşısının ikinci dozu sonrası bireylerden alınan serumlar ile klinik çalışma yürütülmüştür. Çalışma sonucunda bizim olgularımızla benzer şekilde Spike R346K mutasyonunun, aşı bağışıklık yanıtından kaçışı indükleyebileceği belirtilmiştir [210]. Nötralizasyon antikollarının bağlandığı, reseptör bağlanma alanındaki mutasyonlar kadar N-terminal alandaki mutasyonlar da aşı yanıtından kaçışta dikkate değer bir rol oynamaktadır. Bu nedenle aşılı bireylerde görülen enfeksiyonlarda kapsamlı genomik sürveyans ve fenotipik tarama, klinik öneme sahip varyantları zamanında karakterize etmek ve tanımlamak için kritik öneme sahiptir.

Omicron BA.1 varyantı izole edilen hafif klinik seyirli bir hastada görülen diğer bir nadir mutasyon Spike A263T’dir. Nadir görülen (tüm dünyada 1163 kez, Spike dizisine sahip tüm numunelerin %0,01’i) bu mutasyonun daha önce Türkiye’den ve Türkiye’ye komşu ülkelerden bildirim yapılmamıştır [169]. Mutasyonun klinik etkileri ile ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Çalışmada saptanan tek olgunun

klirik 6zellikleri incelendiğinde komorbiditesi olmayan, hafif klinik seyir ile ayaktan takip edilen 30 yaş kadın hastadır. İki doz Sinovac-CoronaVac ve 6ç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile bir ay 6ncesinde aşılanma 6yk6s6 mevcut olup y6ksek antikor d6zeyine sahip (30024 Au/ml)'tir. Olgunun tek vaka olması, gen6ç olması ve komorbiditesinin olmaması ve Spike A263T mutasyonunun nadir g6r6lmesi nedeniyle, klinik etkisinin infektivite ve bulaştırıcılıktan 6ok, antikor yanıtından ka6ıř ile ilişkili olabileceğini d6ř6nd6rm6řt6r.

6alışmada Omicron BA.2 subvaryantı hastaları arasında ge6irilmiş COVID-19 ve d6rt doz Sinovac-Coronovac aşılması sonrası yaygın akciğer tutulumu ve gastrointestinal bulgularla ağır klinik seyir g6steren ve mortal seyreden hastada nadir olarak g6r6len Spike R21T mutasyonu saptanmıştır. Başka bir 6alışma, B.1.617.1'e (Kappa varyantı) eşlik eden Spike R21T mutasyonunun, 6alışmamıza benzer şekilde vir6s6n insan ve bağırsak h6crelerine ge6işini artırdığını ve monoklonal antikor Bamlanivimab'a diren6li olduğunu g6stermiştir [211]. Spike R21T'nin N-Terminal Domein'de yer alan diğer mutasyonlar gibi antikor n6tralizasyonunda azalmaya neden olabileceği d6ř6n6lmelidir. Aynı hastada saptanan diğer bir nadir mutasyon NS3 H78Y mutasyonu olup klinik etkisi ile ilgili 6alışma bulunmamaktadır. Hasta 66 yaş kadın hasta olup ek olarak bilinen KBY, HT ve obezite tanıları mevcuttur. Ge6irilmiş COVID-19 ve son 66 ayda tamamlanmış d6rt doz aşılanma 6yk6s6, yaygın akciğer tutulumu ve mortal seyretmesi nedeniyle diğer hastalardan farklılaşmıştır. Yakın zamanda aşılanmış hastada, SARS-CoV-2'nin Spike proteinindeki değişikliklerin ağır klinik seyirle ilişkili olduğu d6ř6n6lm6řt6r.

6alışmada Omicron BA.2 subvaryantı hastaları arasında mortal seyreden diğer olguda ise farklı olarak Spike L452M mutasyonu saptanmıştır. Hasta bilinen DM ve KAH dışında komorbiditesi olmayan hiperinflamatuvar (IL-6:1355 Au/ml) klinik seyir sonrası, IL-1 blok6r6 (Anakinra) tedavisine yanıt vermeyen bir olgudur. Spike L452M mutasyonunun ACE-2-RBD bağlanma afinitesini geliştirdiği, Spike glikoprotein temelli aşıların SARS-CoV-2'ye karşı etkinliğini olumsuz etkileyebilecek bir mutasyon olduğu 6alışmalarda belirtilmiştir [212]. L452M mutantlarının hem bağışıklık yanıtından ka6ışı hem de g66lendirilmiş vir6s-h6cre bağlanması, SARS-CoV-2'nin bulaşıcılığının ve/veya patojenitesinin artmasına yol a6abilmektedir [213]. Mutasyonun RBD-ACE-2 arasında artan etkileşimi ve vir6s6n aşır6 ekspresyonunun

olguda görülen aşırı immün yanıt, hiperinflamasyon ve ağır klinik seyir ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Hastaya spesifik diğer mutasyonlara bakıldığında ORF3a'da tespit edilen D155Y mutasyonu saptanmıştır. ORF3a, NLRP3 inflamatuvarını ve NFkB yolunu aktive etme, fibrinojen sekresyonunun up regülasyonu, IFN-Tip 1 uyarımının down regülasyonu ve ER stresini ve proapoptotik aktiviteyi indüklemeye dahil olmak üzere çok işlevli rollere sahiptir [214, 215]. ORF3a'yı tespit edebilen SARS-CoV ile enfekte hastalardan izole edilen antiserumlar, bu viral proteinin oldukça immünojenik olduğu göstermiştir [216]. Hastamızda görülen yüksek AST, ALT, fibrinojen, ferritin, CRP ve prokalsitonin değerleri bu immün sistem aşırı uyarımını göstermektedir.

Hastamızda ağır klinik tabloya neden olabilecek diğer mutasyonlara bakıldığında NSP3'ün mutasyonların replikaz poliproteininin işlenmesi görevini yürüterek replikasyonu etkilediği, NSP4 mutasyonlarının proinflamatuvar mtDNA salınımını indüklediği, bunun da daha sonra proinflamatuvar IL-1B ekspresyonunu ve çevredeki hücrelerde hücre ölümünü indüklediği, mitokondriyal hasara neden olduğu, NSP13 helikaz aktivitesi ile replikasyonu düzenlediği bilinmektedir [217, 218, 219]. Proinflamatuvar yanıtın indüklenmesi ve IL-1B aşırı ekspresyonunun IL-1 blokör tedavisine dirençle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmada Omicron BA.2 varyantı hastaları arasında diğer ağır klinik seyir ise 80 yaşında, kadın, DM ve HT tanılı, dört ay önce dördüncü doz Sinovac-Coronovac aşısını tamamlamış, (antikör düzeyi 4750 Au/ml) non-invaziv mekanik ventilasyon ihtiyacı gelişen hastada gözlemlendi. Hastada, NSP1 H110Y mutasyonu diğer hastalardan farklı olarak saptandı. NSP1 C-terminali, konakçı ribozomun 40S alt birimine bağlanarak kompleks oluşturur ve konakta mRNA'nın ribozomal giriş tüneline bağlanmasını önler [220]. NSP1 H110Y konak mRNA translasyonunu bloke ederek konakçı gen ifadesini inhibe eder ve bu yolla bağışıklık sisteminden kaçma etkisine sahiptir [221]. Çalışmamızda mutasyon tespit edilen hastanın aşılama duruma göz önünde bulundurulduğunda, NSP1'in konak mRNA translasyonu üzerindeki önemli rolüne göre, bu proteine karşı aşı ve ilaç tasarımı geliştirmek, COVID-19'un kontrolü için umut verici olabilir.

Omicron BA.2 varyantı saptanan hafif dereceli akciğer tutulumu ile orta şiddetli klinik seyir gösteren, 93 gün PCR pozitifliği saptanan, lenfoma tanılı, inaktif aşı ile en son bir sene öncesinde aşılanmış 70 yaş erkek hastada diğer hastalarda görülen mutasyonlara ek olarak Spike A222V, T323I ve NS7a A106T değişiklikleri görülmüştür. Hastanın üç doz Sinovac-Coronavac aşılması, son dozu bir yıl öncesinde olmak üzere tamamlanmıştır. Hastada saptanan Spike A222V mutasyonu, RBD açık bölgesini artırarak, ACE-2 bağlanmasını hafifçe artırmaktadır ve virüsün konakçı hücrelere bağlanmasını güçlendirir. Ancak serum antikorunun nötralizasyon kapasitesini düşürmeye neden olmamaktadır, bu da aşı etkinliğini etkilemediğini düşündürmektedir [222]. N-glikozilasyon bölgesini ortadan kaldıran RBD mutasyonu Spike T323I, virüsün enfektivitesinde azalma, plazma nötralizasyonundan yüksek kapasitede etkilenme sonucu virülansın azalması ile ilişkilidir [223]. Olguda lenfoma tanısı, ileri yaş, immünsupresyon kliniği, inaktif aşılarla eksik doz aşılanma öyküsü olmakla birlikte hafif-orta dereceli klinik seyir, sınırlı akciğer tutulumu ve uzamış PCR pozitifliği görülmüştür. Bu durum Spike protein mutasyonlarının neden olduğu azalmış infektivite, bağışıklık yanıtından kaçış ve artmış konakçı-virüs bağlanması ile ilişkilendirilmiştir.

Hastada saptanan tüm dünyada toplamda 697 kez bildirilen oldukça nadir (NSP2 dizisine sahip tüm numunelerin $<0,001$) bir mutasyon olan NS7a A106T mutasyonu ve Türkiye’den ilk kez bildirilen NSP2 F156L mutasyonu ile ilgili klinik çalışma bulunmamaktadır [169]. Bu mutasyonların diğer mutasyonlarla birlikte hastanın ileri yaş ve eksik aşılanma öyküsüne rağmen daha hafif seyirli kliniği ve uzun süren viral saçılımı sonucuna etki edebileceğini düşündürmüştür.

Çalışmada Omicron BA.2 varyantı izole edilen ve 134 gün uzamış PCR pozitifliği saptanan, orta dereceli klinik seyir gösteren 75 yaş, erkek, lenfoma tanılı hasta, iki ay öncesinde dördüncü doz Sinovac-Coronavac aşısını tamamlamıştır. Hastada M D3G ve NSP4 T114I (8337 kez, Tüm NSP4 sekanslarının %0.06’sı, Türkiye’de bir kez İstanbul’dan bildirim) mutasyonları saptanmıştır [169]. M glikoproteini, konakçıda doğal bağışıklık yanıtın negatif düzenleyicisi olup, viral RNA tarafından indüklenen antiviral yanıtın baskılanmasına neden olur [224]. NSP4 ise SARS-CoV2’nin en büyük transmembran non-structural proteini ve Spike proteininden sonra ikinci en büyük transmembran proteindir ve viral replikasyona katılır [225].

NSP4 T114I mutasyonunu toplamda çalışmada iki hastada görülmüş olup diğer hastanın da benzer şekilde uzamış PCR pozitifliğinin görülmesi (29 gün) nedeniyle mutasyon sonucu viral replikasyonda artış/viral klerenste azalış olabileceği düşünülmüştür.

29 gün pozitiflik saptanan, aşısız, 97 yaş bu kadın hastada NSP4 T114I dışında 7 nadir mutasyon saptanmıştır. NS3 L94F, NSP1 V60I, NSP2 I100T, NSP3 G1691S, NSP3 V1388I, NSP4 M33I, NSP4 T114I, NSP13 S259L, NSP14 V40I mutasyonlarının klinik rolleri hakkında veri bulunmamaktadır. NSP2 inhibitin 1 ve inhibitin 2 adlı iki konakçı proteine bağlanarak hücre migrasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, hücresel farklılaşma ve mitokondriyal biyogenezi yönetir. NSP3 papain benzeri bir proteazdır ve konak protein sentezini baskılayabilmektedir [226]. NSP3, replikasyon transkripsiyon kompleksinin temel bir bileşenidir. Diğer kofaktörlerle birlikte NSP3 ve NSP4, viral membranın yeniden düzenlenmesini sağlar virüs replikasyonu için gereklidir. NSP13 helikaz ve NTPaz aktivitesi ile replikasyonu düzenler. NSP14'ün ekzonükleotik aktivitesi mevcuttur ve bu ekzonükleolitik aktivite, diğer RNA virüslerinde olmayan bir özellik olan Koronavirüs replikasyonun proofreading aktivitesi için çok önemlidir [227]. NSP2, NSP3, NSP4, NSP13 VE NSP14'ün virüsün enfeksiyonu sırasında replikasyonu ve çoğalması için gerekli olup bu proteinlerde görülen genomik değişiklikler, virüsün viral yükünü, replikasyon hızını ve nihayetinde hastalığın şiddetini etkileyebilmektedir. Bazı mutasyonlar, virüsün daha bulaşıcı olmasına veya daha az bulaşıcı hale gelmesine, ayrıca bazı mutasyonlar da aşıların etkililiğini azaltabilmektedir [228].

Çalışmadaki bu olgu diğer olgulara göre daha fazla NSP mutasyonları içermesi açısından önemlidir. Hastanın aşısız olmasının bu durum üzerinde etkisi olabileceği düşünülmüştür. Virüsün aşılınmamış kişilerde daha fazla replikasyona uğraması nedeniyle bu hastalarda mutasyonların oluşma olasılığı artmaktadır. Delta ve Omicron varyantlarının ilk saptandığı aşısız ve immunsupresif hastalarda olduğu gibi, bu kişilerde virüsün daha hızlı mutasyona uğradığı ve yeni varyantların ortaya çıkma olasılığının daha yüksek olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur [229]. Olgumuzun klinik bulguları ile izole edilen çok sayıda NSP mutasyonları arasında direk bir ilişki kurulamamakla birlikte, bu hastalarda yapılan genom sekanslama analizlerine daha fazla ihtiyaç vardır.

Çalışmada Omicron BA.2 varyantı izole edilen hafif-orta dereceli klinik seyir gösteren ikisi de son iki ay içerisinde aşılanmış iki hastadan biri 89 yaş erkek hasta olup dört doz Sinovac- CoronaVac ile diğer ise 85 yaş erkek iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech ile aşılanmıştır. Klinik bulguları benzer olan bu iki hastadan ortak izole edilen mutasyonlara bakıldığında Spike proteininde görülen A27S, K417N, N440K, Q493R, T19I, G142D mutasyonlarının ortak olarak RBD etkilediği ve antikorun nötralizasyon aktivitesini azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [230]. Diğer ortak görülen Spike D405N mutasyonunun Spike-İntegrin bağlantısını önleyerek, daha hafif klinik seyir görülmesine neden olduğu düşünülmektedir [231]. İki ay öncesinde 4. doz aşılmasını tamamlayan, ileri yaş hastalarda ortaya çıkan hafif- orta klinik seyir açısından bu mutasyonların görülmesi aydınlatıcı olmaktadır. Sadece ilk hastada bildirilen NSP2 L18I mutasyonu nadir görülen bir mutasyon olup (tüm dünyada toplamda 395 kez saptanmış olup NSP2 dizisine sahip tüm numunelerin <math><0,001</math>) Türkiye’de ilk kez bu çalışmada saptanmıştır [169]. Diğer hastada görülen NSP2 P129L, NSP5 K90R, NSP2 V599I mutasyonları da nadir görülmekte olup NSP2 V599I Türkiye’de ilk kez bu çalışmada saptanmıştır [169].

Klinik rolleri ile ilgili çalışma olmamakla birlikte NSP2 proteinin konakçı-virüs etkileşimlerini etkileyebileceği, viral büyüme ve RNA sentezinde rol aldığı bilinmektedir [232]. Klinik öneminin yanı sıra SARS-CoV-2’nin NSP proteinindeki bu missense mutasyonlar, SARS-CoV-2’nin heterojenitesini etkileyebilmektedir. Virüsün zaman içindeki patojenik dinamiklerinin yanı sıra virülansının anlaşılmasında ve coğrafi dağılımı ile ilgili bilgi vermede nadir görülen bu mutasyonların araştırılmasının önemi büyüktür.

Omicron BA.2 subvaryantı izole edilen ve orta şiddetli klinik bulgular gösteren altıncı hasta ise 75 yaşında erkek, DM tanılı, üç doz Sinovac-CoronaVac ve bir doz Pfizer- BioNTech BNT162b2 ile iki ay öncesinde aşılanmış yaygın akciğer tutulumu olan (evre 4) servis koşullarında altı gün takibi sonrasında taburcu edilen bir olgudur. Olguda izole edilen Spike T678I mutasyonunun klinik sonuçları ile ilgili çalışma bulunmamaktadır, ancak diğer Spike proteinlerine benzer şekilde insan hücrelerine daha kolay bağlanma, aşılarda etkinliğinde azalma, bulaştırıcılığın artması gibi virülans faktörlerine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Mutasyonun daha

önceden Türkiye’den ilk olarak Denizli’den bildirilmesi de bölgesel epidemiyolojik özellikler hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu tür mutasyonların izlenmesi, enfeksiyon kontrolü ve aşılama stratejilerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Çalışmada Omicron BA.2 subvaryantı izole edilen ve hafif klinik seyir gösteren diğer hasta ise 26 yaşında, iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer-BioNTech ile üç ay öncesinde aşılanmış ve yüksek antikor titresine (104769 Au/ml) sahip bir olgudur. Hafif klinik bulgular taşımasına rağmen ateş yüksekliği, miyalji semptomları iki haftanın üzerinde devam etmiştir. Olguda görülen toplam 11 mutasyon ile ilgili yapılan bir çalışmada Spike G339D, S373P, S375F, K417N, N440K, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R, N501Y bağışıklık yanıtından kaçınma ve potansiyel bulaştırıcılığın artışında önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir [233]. Daha önce Türkiye’den bir kez bildirilen, nadir görülen NSP3 A1179V, NS6 L29F mutasyonları da ikinci kez bu olguda saptanmıştır [169].

Çalışmada bir olguda Delta (B.1.617.2) varyantı saptanmıştır. Hastamız 54 yaşında olup, lenfoma tanılı ARDS benzeri akciğer tutulumu olan, iki doz Sinovac-CoronaVac ile bir yıl öncesinde aşılanmış ve 64 gün PCR pozitifliği sonrasında mortal seyreden olgudur. Olgumuzla benzer şekilde Delta varyantının Omicron varyantına göre, özellikle aşılama şemasını tamamlamamış bireylerde daha ağır klinik seyir gösterdiği ve daha fazla hastaneye yatış ile ilişkilendirildiği birçok çalışmada gösterilmiştir [234, 235].

Delta varyantında mutasyonların klinik etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, Spike protein NTD spesifik E156G/del157-158 ve L452R kombinasyonunu taşıyan psödoptipli virüsler, artan enfektivite, aşı ile ortaya çıkan poliklonal antikorlara direnç ve artmış hücreden hücreye füzyon göstermiştir [236]. Bu çalışmada da sadece bu olguda gördüğümüz E156G/del157-158 ve L452R kombinasyonunun sinerjik şekilde, hastanın immunsupresyon kliniği ve eksik aşılanma durumu ile ağır klinik durumuna neden olabileceği düşünülmüştür. Yine sadece bu olgumuzda gördüğümüz Spike T19R, P681R VE D950N mutasyonlarının ACE-2 reseptör bağlanımı artırarak, bulaştırıcılığı ve infektiviteyi artırdığı başka bir çalışmada gösterilmiştir [237].

Spike P681R değişikliğinin, S1/S2 bölünmesini artırarak Delta varyant replikasyonunu arttırmada anahtar bir mutasyon olduğu da gösterilmiştir [238].

Hastada saptanan ve nadir görülen Spike D178Y mutasyonları ile diğer non-structural protein mutasyonları ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Bu mutasyonların, diğerleri ile birlikte hastanın ağır klinik seyiri ve uzamış PCR pozitifliği (64 gün) ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Omicron BA.5 varyantı için karakteristik olan Spike F486V, Spike L452R, Spike H69del mutasyonları bu çalışmada da benzer şekilde BA.5 varyantı suşlarda saptanmıştır [239]. Önceki çalışmalarda, bu mutasyonların ACE-2 reseptör afinitesini artırarak bulaştırıcılığı artırdığı ve BA.5 varyantının bağışıklık yanıtından kaçmasına katkıda bulunduğu teorize edilmiştir [240].

Çalışmada Omicron BA.5 subvaryantı saptanan ağır klinik seyir gösteren, ARDS benzeri akciğer tutulumu olan 28 yaşında hastada COVID-19 enfeksiyonu sırasında hiperinflamasyon kliniği görülmüştür (IL-6: 125 Au/ml). Sistemik Lupus Eritamozise bağlı kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz desteği alan aşısız kadın hastada, NSP13 A389V, NSP14 M315I, NSP16 T140I mutasyonları diğer hastalardan farklı olarak saptanmıştır. Mutasyonlarla ilgili klinik veri bulunmamaktadır. Ancak NSP13, NSP14, NSP15 proteinlerinin SARS-CoV'nin erken enfeksiyon döneminde en güçlü viral interferon antagonistleri olduğu ile ilgili çalışmalar mevcuttur [241]. Mutasyonların IFN üretimini erken dönemde etkili bir şekilde baskıladığı ve sonrasında gecikmiş interferon sinyal üretiminin, abartılı inflamatuvar yanıt ve ciddi akciğer immünopatolojisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [242]. Hastamızda KBY, SLE gibi komorbiditelerin bulunması ve aşısız olmasının yanı sıra bu varyant nedeniyle de hiperinflamasyon kliniği ve ARDS benzeri akciğer tutulumu geliştiği düşünülmüştür.

Çalışmada Omicron BA.5 subvaryantı saptanan diğer hafif klinik seyirli iki hastanın da son altı ay içinde aşılama öyküleri mevcut olup (iki doz Sinovac-CoronaVac ve iki doz Pfizer- BioNTech BNT162b2, diğer hasta üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2) N E136D, NSP2 Q376K, NSP6 L260F, NSP13 M233I mutasyonları ilk hastada, NSP12 P94 ve NSP13 T127N mutasyonları ikinci hastada saptanmıştır. N E136D mutasyonu, 2022 Temmuz- Ağustos döneminde Almanya'dan birçok Avrupa ülkesine yayılan ve uzun süren üst solunum yolu semptomları nedeniyle "Weird Summer Cold" veya mutasyonun ilk harflerinin kısaltması olarak "Bad Ned"

olarak da bilinen BA.5 alt varyantına aittir [243]. Temmuz 2022’de takip ettiğimiz olgumuz da Almanya’dan Türkiye’ye seyahat eden kişilerle temas öyküsü olması ve benzer şekilde iki haftaya yakın devam eden inatçı üst solunum yolu semptomları olması nedeniyle dikkat çekmiştir.

Olgumuzla benzer şekilde BA.5 varyantının antikor yanıtından kaçma ve nötralizasyona direnç gösterdiği, BA.1 ve BA.2’e göre daha ağır ve uzun seyreden üst solunum yolu bulguları ile seyrettiği gösterilmiştir [244, 245]. Uluslararası seyahat ve hareketlilik virüsün yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yabancı ülkeden gelen kişiler, farklı virüs türlerini taşıyarak yerel popülasyonlar için yeni bir enfeksiyon kaynağı olabilmektedir. Olgumuz bunların yanında mutasyonun Türkiye’den ilk bildirilen olgulardan biri olması nedeniyle de önem taşımaktadır [169].

NSP13 T127N, olgumuzda da olduğu üzere BA.5.2’ye spesifik bir mutasyondur, onun dışında diğer NSP mutasyonları ve klinik dışı vurumları ile ilgili bilimsel çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu nadir mutasyonların görülmesi genetik sürveyansın ve epidemiyolojideki farklılıkların anlaşılması açısından oldukça önem arz etmektedir.

5. SONUÇ

COVID-19 pandemisi üçüncü yılında halen devam etmekte olup, bu süreçte yeni viral varyantların ortaya çıkması öncekiler gibi kaçınılmazdır. SARS-CoV-2'nin evrimini ve yayılımını izlemek ve takip etmek için en önemli yöntem olan genomik sekanslama virüsün bulaştırıcılığı, hastalıkla ilişkili semptomları ve COVID-19 aşılarının etkililiğini saptama işlevlerinin yanı sıra bölgesel epidemiyolojik farklılıklar ve farklı hastalık vakalarının kaynaklarını belirlemede de oldukça önemlidir.

Çalışma sonucu tespit edilen protein değişiklikleri ve bu değişikliklerin olası bağışıklık yanıtından kaçma ve konakçı mRNA etkileri göz önünde bulundurularak, bu proteinlere karşı aşı ve ilaç tasarımı geliştirmek, COVID-19'un kontrolü için umut verici olabilir. Analiz sonunda virüsün farklı varyantları izlenmiş olup genomik değişiklikler takip edilerek, epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Analiz, bir popülasyondaki virüs varyasyonlarının tam bir resmini sunarak epidemiyolojik modellerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca, virüsün kaynak ülkesi veya bölgesi, bulaşma yolları ve enfeksiyon paternleri gibi önemli bilgileri de sağlayabilir. Tam genom analizleri ağır klinik seyir, hiperinflamasyon, artmış gastrointestinal semptomlar, uzamış PCR pozitifliği gibi farklı klinik antitelerin mutasyonlarla olası ilişkisi anlamaya yardımcı olmaktadır. Bu bilgi, COVID-19 hastalarının tedavisinde kullanılabilecek potansiyel terapötik yaklaşımları tanımlamak için önemlidir.

Omicron varyantı daha az şiddetli klinik bulgularla seyretse de bulaştırıcılığın artması, tekrarlayan enfeksiyonlara neden olma, artmış hastane başvuruları sonucunda sağlık sisteminde aksamalar ve uzun süreli bakım veren tesislerde ciddi hastalık vakalarının ve ölümlerin meydana gelmesi nedeniyle varyantların epidemiyolojik dinamiklerini izlemeyi amaçlayan sürveyans çalışmaları devam etmelidir.

Tam genomik sekanslama, yüksek maliyetli ve yüksek veri hacmine sahip bir teknik olmakla birlikte yeni varyantların etkileşimini anlamada, yeni paradigmaların üretilmesinde, COVID-19' a karşı bağışıklamaya ve yüksek antikor titresine sahip hastalarda görülen breakthrough enfeksiyonların anlaşılmasında, sonuçta pandeminin kontrolünde ülkelere yeni bir vizyon kazandıracaktır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 270-284. ISSN: 1740-1526. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0.
- [2] Chatterjee, S., Kim, E. Y., Kim, J. H., Kim, Y. J., Lee, J. H., & Ahn, J. H. (2022). Whole-genome analysis and mutation pattern of SARS-CoV-2 during first and second wave outbreak in Gwangju, Republic of Korea. *Scientific Reports*, 12, 11354. ISSN: 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-022-14989-y. URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-14989-y>. APA format.
- [3] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Erişim tarihi: [Haziran 2022], adres: <https://covid19.who.int/>
- [4] T.C. Sağlık Bakanlığı. COVID-19 Bilgilendirme Sayfası. Erişim tarihi: [Haziran 2022], adres: <https://covid19.saglik.gov.tr/>
- [5] Williamson, E. J., Walker, A. J., Bhaskaran, K., Bacon, S., Bates, C., Morton, C. E., ... & Hippisley-Cox, J. (2020). Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature*, 584, 430-436. ISSN: 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4.
- [6] Robinson, J., Loxton, H., Sey, N., Nowak, G., Jovanovic, M., & McSweeney, K. (2021). COVID-19 and mutations: A threat level assessment. *Nepal Journal of Epidemiology*, 11(1), 983.
- [7] CDC. (n.d.). Variant classifications. Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html?CDCAAref>.
- [8] Ryder, S. P., Morgan, B. R., & Massi, F. (2020). Analysis of rapidly emerging variants in structured regions of the SARS-CoV-2 genome. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.105648>. APA format.

- [9] Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *BMJ*, 1(5448), 1467-1470. ISSN: 0959-8138. doi: 10.1136/bmj.1.5448.1467.
- [10] Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. J. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *Journal of General Virology*, 1, 175-178. ISSN: 0022-1317. doi: 10.1099/0022-1317-1-2-175.
- [11] Hamre, D., & Procknow, J. J. (1966). A new virus isolated from the human respiratory tract. *Experimental Biology and Medicine*, 121, 190-193. ISSN: 1535-3702. doi: 10.3181/00379727-121-30734. URL: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-121-30734>. APA format.
- [12] McIntosh, K., Becker, W. B., Chanock, R. M., & Kapikian, A. Z. (1967). Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 57, 933-940. ISSN: 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.57.4.933. URL: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.57.4.933>. APA format.
- [13] Abdelrahman, Z., Li, M., & Wang, X. (2020). Comparative review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A respiratory viruses. *Frontiers in Immunology*, 11, ISSN: 1664-3224. doi: 10.3389/fimmu.2020.552909. URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.552909/full>
- [14] Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., ... & Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 300(5624), 1394-1399. ISSN: 0036-8075. doi: 10.1126/science.1085952. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1085952>. APA format.
- [15] Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92, 418-423. ISSN: 0146-6615. doi: 10.1002/jmv.25681. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25681>. APA format.
- [16] Bukhari, K., Muldrew, B., & Gulyaeva, A. (2018). Description and initial characterization of metatranscriptomic nidovirus-like genomes from the proposed new

family *Abysoviridae*, and from a sister group to the *Coronavirinae*, the proposed genus *Alphale tovirus*. *Virology*, 524, 160-171. ISSN: 00426822. doi: 10.1016/j.virol.2018.08.010.

[17] Khan, M. M., Rahman, N. U., Ahmed, N., Ahmed, S., Ahmed, R., Alam, M. J., ... & Uddin, M. N. (2022). Understanding and combating COVID-19 using the biology and chemistry of SARS-CoV-2. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 45, 1753-1769. ISSN: 16157605. doi: 10.1007/S00449-022-02788-8/FIGURES/11. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-022-02788-8>. APA format.

[18] Hulswit, R. J. G., Lang, Y., Bakkers, M. J. G., Li, W., Li, Z., Schouten, A., ... & de Groot, R. J. (2019). Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 2681-2690. ISSN: 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1809667116. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679277> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6377473>. APA format.

[19] Zhang, R. H., Li, J., Zhang, A. L., Wang, Y., & Molina, M. J. (2020). Genomic characterization and phylogenetic evolution of the SARS-CoV-2. *Acta virologica*, 64, 496-500. ISSN: 1336-2305. doi: 10.4149/av2020403.

[20] Li, X., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., Zhao, Q., Li, Y., & Chaillon, A. (2020). Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *Journal of medical virology*, 92(5), 501-511.

[21] Ferron, F., Subissi, L., Silveira De Morais, A. T., Le, N. T. T., Sevajol, M., Gluais, L., ... & Imbert, I. (2018). Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(2), E162-E171.

[22] Mercatelli, D., & Giorgi, F. M. (2020). Geographic and genomic distribution of SARS-CoV-2 mutations. *Frontiers in microbiology*, 11, 1800.

[23] Chakraborty, C., Bhattacharya, M., & Sharma, A. R. (2022). Present variants of concern and variants of interest of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: Their significant mutations in S-glycoprotein, infectivity, re-infectivity, immune

escape and vaccines activity. *Reviews in Medical Virology*, 32(2), e2270. doi: 10.1002/rmv.2270.

[24] Panzera, Y., Pirez, M., Real, G., Freitas, A. I., Sousa, J. D., Hernandez, M., García-Aguirre, L., & Pérez, W. (2021). Genome Sequences of SARS-CoV-2 P.1 (Variant of Concern) and P.2 (Variant of Interest) Identified in Uruguay. *Microbiology Resource Announcements*, 10. doi:10.1128/MRA.00410-21.

[25] “Coronaviruses”. In: (). url: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/coronaviruses>.

[26] Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Niu, P. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733.

[27] Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., & Thomson, E. C. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 409-424. doi: 10.1038/s41579-021-00573-0.

[28] Yang, H. and Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 685–700.

[29] Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E. et al. “Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant”. In: *Cell* 183 (3 Oct. 2020), 739–751.e8.

[30] Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., ... & Montefiori, D. C. (2020). Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. *BioRxiv*.

[31] Tyler N. Starr et al. “Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding”. In: *Cell* 182 (10 Sept. 2020), 1295–1310.e20. issn: 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.012.

[32] Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J. C. C., ... & Bieniasz, P. D. (2020). Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *eLife*, 9, e61312. doi: 10.7554/eLife.61312.

- [33] Hoque, M.N., Chakraborty, A., Sharma, A. et al. "Genomic diversity and evolution, diagnosis, prevention, and therapeutics of the pandemic COVID-19 disease". In: PeerJ 8 (2020), e9689.
- [34] McBride, R., Van Zyl, M., and Fielding, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 6(8), 2991-3018. doi: 10.3390/v6082991.
- [35] Weiss, S. R. & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 635-664. doi: 10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005.
- [36] De Maio, F., Posteraro, B., & Sanguinetti, M. (2020). Improved binding of SARS-CoV-2 Envelope protein to tight junction-associated PALS1 could play a key role in COVID-19 pathogenesis. *Microbes and infection*, 22(10), 592-597.
- [37] Rahman, M. S., Hoque, M. N., Islam, M. R., Akter, S., Rubayet-Ul-Alam, A. S. M., Siddique, M. A. A., Sultana, M., Hossain, M. A., & Hasan, M. M. (2021). Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene Reports*, 22, 100997. doi:10.1016/j.genrep.2020.100997.
- [38] Tahamtan, A. & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert review of molecular diagnostic*, 20(5), 453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
- [39] Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., ... & Poon, L. L. M. (2020). Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clinical Chemistry*, 66(4), 549-555.
- [40] Mou, K., Khan, S. A., Shilabin, A. G., Hossain, M. A., & Nabi, A. H. M. N. (2021). Emerging mutations in envelope protein of SARS-CoV-2 and their effect on thermodynamic properties. *Informatics in Medicine Unlocked*, 25, 100675.
- [41] Masters, P. S., & Sturman, L. S. (1990). Background paper functions of the coronavirus nucleocapsid protein. *Coronaviruses and their Diseases*, 235-238.

- [42] Kopecky-Bromberg, S. A., Martínez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R. A., & Palese, P. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *Journal of virology*, 81(2), 548-557.
- [43] Bai, Z., Zhou, Q., Liang, Y., Wang, Y., Li, X., & Wang, L. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses*, 13(6), 1115.
- [44] Zhu, Z., Lu, X., Yuan, Z., Deinhardt-Emmer, S., Neubauer, P., & Rupp, J. et al. (2021). Rapid spread of mutant alleles in worldwide SARS-CoV-2 strains revealed by genome-wide single nucleotide polymorphism and variation analysis. *Genome Biology and Evolution*, 13(2), evab015. doi: 10.1093/gbe/evab015.
- [45] Wu, H., Shang, L., Gao, Y., Liu, Q., Vavricka, C. J., & Li, B. (2021). Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*, 29. doi: 10.1016/j.chom.2021.11.005.
- [46] Zhang, Z., Nomura, N., Muramoto, Y., Ekimoto, T., Uemura, T., Liu, K., ... & Shimizu, T. (2022). Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nature Communications*, 13(1), 4399.
- [47] Stern, A., Klemperer, N., Sharko, O., Sirota, FL., Shemesh, M., Zoler, E., ... & Savidor, A. (2021). The unique evolutionary dynamics of the SARS-CoV-2 Delta variant. Preprint. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.07.31.21261387>
- [48] Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., ... & Velu, G. S. K. (2022). SARS-CoV-2 mutations and their impact on diagnostics, therapeutics and vaccines. *Frontiers in medicine*, 9.
- [49] Peiris, J. S. M., Guan, Y., & Yuen, K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine*, 10(Suppl), S88-S97. doi: 10.1038/nm1143
- [50] Chan, J. F. W., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2015). Middle East respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 465–522.

- [51] Vincent C. C. Cheng et al. “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus as an Agent of Emerging and Reemerging Infection”. In: *Clinical Microbiology Reviews* 20 (4 Oct. 2007), pp. 660–694. issn: 0893-8512. doi: 10.1128/CMR.00023-07. url: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.0002307>.
- [52] Chan, J. F., Li, K. S., To, K. K., Cheng, V. C., Chen, H., & Yuen, K. Y. (2012). Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic?. *Journal of Infection*, 65(6), 477-489.
- [53] Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Niu, P. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [54] Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... & Feng, Z. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199-1207. doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [55] Li, R., Pei, S., Chen, B., Song, Y., Zhang, T., Yang, W., & Shaman, J. (2020). Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*, 368(6490), 489-493. doi: 10.1126/science.abb3221.
- [56] Korber, B., & Wyles, W. D. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, 182, 812–827.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
- [57] Silva, J. C. et al. (2021). New Brazilian variant of the SARS-CoV-2 (P1/Gamma) of COVID-19 in Alagoas state. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 25, 101588. doi: 10.1016/j.bjid.2021.101588.
- [58] Kaya, G. & Altindis, M. (2022). Virological, Epidemiological Features and Prevention of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) Variant: A Review. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8, 162-171. doi: 10.30934/kusbed.1060956.

- [59] Martins, M., et al. (2022). The Omicron Variant BA.1.1 Presents a Lower Pathogenicity than B.1 D614G and Delta Variants in a Feline Model of SARS-CoV-2 Infection. *Journal of Virology*, 96. doi: 10.1128/jvi.00961-22.
- [60] McLean, G., Mukherjee, S., Huda, S., Pastrello, C., & Prasad, V. R. (2022). The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. *mBio*, 13. doi: 10.1128/mbio.02979-21.
- [61] World Health Organization. (2020). Coronavirus disease (COVID-19): weekly epidemiological update, 31 August 2020.
- [62] World Health Organization. (2022). Mortality rates of COVID-19. Retrieved December 16, 2022, from <https://www.who.int/data>.
- [63] Jayaweera, M., Perera, H., Gunawardana, B., & Manatunge, J. (2020). Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environmental Research*, 188, 109819. doi: 10.1016/j.envres.2020.109819.
- [64] Morawska, L., & Milton, D. K. (2020). It is time to address airborne transmission of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*, 71. doi: 10.1093/cid/ciaa939.
- [65] Galloway, S.E., et al. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 lineage—United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70(3), 95.
- [66] Duong, D. (2021). Alpha, Beta, Delta, Gamma: What’s important to know about SARS-CoV-2 variants of concern? *Canadian Medical Association Journal*, 193, E1059-E1060. doi: 10.1503/cmaj.1095949.
- [67] WHO. (2021, July 30). WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19. Retrieved from
- [68] Brown, C. M., et al. (2021). Outbreak of SARS-CoV-2 Infections, Including COVID-19 Vaccine Breakthrough Infections, Associated with Large Public Gatherings — Barnstable County, Massachusetts, July 2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70, 1059-1062. doi: 10.15585/mmwr.mm7031e2.

- [69] WHO. (2022). Omicron subvariants under monitoring. Retrieved December 19, 2022, from <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
- [70] Katella, K. (2021). Omicron, Delta, Alpha, and More: What To Know About the Coronavirus Variants. *Yale Medicine: Family Health*.
- [71] Mustafa, M., & Makhawi, A. (2022). What Learned from Omicron Sub-Variants BQ. 1 and BQ. 1.1.
- [72] Qu, P., et al. (2023). Extraordinary evasion of neutralizing antibody response by Omicron XBB.1.5, CH.1.1 and CA.3.1 Variants. *bioRxiv*, 2023.01.24.477733. doi: 10.1101/2023.01.24.477733.
- [73] Regev-Yochay, G., Lustig, Y., Alter, J., et al. (2022). Efficacy of a Fourth Dose of Covid-19 mRNA Vaccine against Omicron. *New England Journal of Medicine*, 386, e29. doi: 10.1056/nejmc2202542.
- [74] Liu, Y., & Rocklöv, J. (2021). The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *Journal of Travel Medicine*, 28. doi: 10.1093/jtm/taab124.
- [75] Dhar, M. P. K. S., & IATM, P. G. M. B. F. (2021). Datir R Collier DA Albecka A Singh S et al SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*, 599, 114-119.
- [76] Siqueira, F. G. N. M., Costa, A. D. C., Sousa Jr, E. C., de Oliveira, W. K., Nogueira, M. L., Rodrigues, D. S. G., ... & Vasconcelos, P. F. C. (2021). COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nature Medicine*, 27(7), 1230-1238. doi: 10.1038/s41591-021-01378-7.
- [77] Gusev, E., Chistyakov, D., Dukhanina, E., Bibikova, A., Bobrovnik, S., Bobyleva, V., ... & Bokhan, N. (2021). Problems of Pathogenesis and Pathogenetic Therapy of COVID-19 from the Perspective of the General Theory of Pathological Systems (General Pathological Processes). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7582. doi: 10.3390/ijms22147582.

- [78] Gusev, E., et al. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
- [79] Diab, A.M., Carleton, B.C., & Goralski, K.B. (2021). Covid-19 pathophysiology and pharmacology: What do we know and how did Canadians respond? A review of Health Canada authorized clinical vaccine and drug trials. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 99(6). doi: 10.1139/cjpp-2021-0038.
- [80] Gorkhali, R., et al. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinformatics and Biology Insights*, 15, 117793222110258. doi: 10.1177/11779322211025876.
- [81] Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., et al. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181, 271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [82] Knoops, K., Kikkert, M., Worm, S.H.E. et al. (2008). SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum. *PLoS Biology*, 6, e226. doi: 10.1371/journal.pbio.0060226.
- [83] Zhang, J., Wang, X., Liu, H., & Liu, D. (2022). Understanding the role of SARS-CoV-2 ORF3a in viral pathogenesis and COVID-19. *Frontiers in microbiology*, 13, 854567. doi: 10.3389/fmicb.2022.854567.
- [84] Aboudounya, M. M. & Heads, R. J. (2021). COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators of Inflammation*, 2021, 8874339. doi: 10.1155/2021/8874339.
- [85] Ramasamy, S. & Subbian, S. (2021). Critical Determinants of Cytokine Storm and Type I Interferon Response in COVID-19 Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34. doi: 10.1128/CMR.00299-20.
- [86] de las Heras, N., et al. (2020). Implications of Oxidative Stress and Potential Role of Mitochondrial Dysfunction in COVID-19: Therapeutic Effects of Vitamin D. *Antioxidants*, 9, 897. doi: 10.3390/antiox9090897.

- [87] Zhao, Z., et al. (2021). The interplay between emerging human coronavirus infections and autophagy. *Emerging Microbes Infections*, 10, 196-205. doi: 10.1080/22221751.2021.1872353.
- [88] Wang, P., et al. (2020). The Impact of Mutations in SARS-CoV-2 Spike on Viral Infectivity and Antigenicity. *Cell*, 182, 1284-1294.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.012.
- [89] Galloway, S. E., et al. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 70, 95-99. doi: 10.15585/mmwr.mm7003e2.
- [90] Nicholas G. Davies et al. “Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England”. In: *Science* 372 (6538 2021). issn: 10959203. doi: 10.1126/science.abg3055.
- [91] Nicole L Washington et al. “Genomic epidemiology identifies emergence and rapid transmission of SARS-CoV-2 B.1.1.7 in the United States.” In: medRxiv: the preprint server for health sciences (2021). doi: 10.1101/2021.02.06.21251159.
- [92] E. Volz et al. “Transmission of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 in England: Insights from linking epidemiological and genetic data”. In: medRxiv (2021). doi: 10.1101/2020.12.30.20249034.
- [93] Janhavi Prasad Natekar et al. “Differential pathogenesis of SARS-CoV-2 variants of concern in human ACE2-expressing mice”. In: *Viruses* 14.6 (2022), p. 1139.
- [94] Takahisa Fujino et al. “Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan”. In: *Emerging Infectious Diseases* 27 (4 Apr. 2021). issn: 1080-6040. doi: 10.3201/eid2704.210138.
- [95] Jun Lan et al. “Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor”. In: *Nature* 581 (7807 May 2020), pp. 215–220. issn: 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- [96] Zhen Yang et al. “Clinical characteristics, transmissibility, pathogenicity, susceptible populations, and re-infectivity of prominent COVID-19 variants”. In: *Aging and disease* 13.2 (2022), p. 402.

- [97] Sarah Cherian et al. “Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India”. In: bioRxiv (2021). doi: 10.1101/2021.05.02.442080.
- [98] Delphine Planas et al. “Reduced sensitivity of infectious SARS-CoV-2 variant B.1.617.2 to monoclonal antibodies and sera from convalescent and vaccinated individuals”. In: Biorxiv (2021). doi: 10.1101/2021.05.07.443760.
- [99] Raquel Viana et al. “Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa”. In: Nature 603 (7902 Mar. 2022), pp. 679–686. issn: 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-022-04411-y. [100] Chu, H., & Yuen, K.-Y. (2022). Pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron. Clinical and Translational Medicine, 12(5). <https://doi.org/10.1002/ctm2.518>
- [101] Bálint, G., Vörös-Horváth, B., & Széchenyi, A. (2022). Omicron: Increased transmissibility and decreased pathogenicity. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1), 151.
- [102] Meng, B., Kemp, S. A., Papa, G., Datir, R. P., Ferreira, I. A. T. M., Marelli, S., ... SARS-CoV-2 Omicron Impact Consortium. (2022). Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. Nature, 603(7902), 706–714.
- [103] Yek, C., Tseng, L.-F., Kang, G., Chen, S. C., Crouse, H. L., Kumar, P., ... Kim, L. (2022). Risk Factors for Severe COVID-19 Outcomes Among Persons Aged 18 Years Who Completed a Primary COVID-19 Vaccination Series — 465 Health Care Facilities, United States, December 2020–October 2021. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, 71, 19–25.
- [104] Verity, R., Okell, L. C., Dorigatti, I., Winskill, P., Whittaker, C., Imai, N., ... Ferguson, N. M. (2020). Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: A model-based analysis. The Lancet Infectious Diseases, 20.
- [105] UpToDate. COVID-19: Management of adults with acute illness in the outpatient setting. (n.d.). Retrieved December 22, 2022, from <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-management-of-adults-with-acute-illness-in-the-outpatient->

[setting?search=covid%5C%2019%5C%20treatment&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/)

[106] Rosenthal, N., Cao, Z., Gundrum, J., Sianis, J., Safo, S., & Kuenzig, M. (2020). Risk Factors Associated With In-Hospital Mortality in a US National Sample of Patients With COVID-19. *JAMA Network Open*, 3.

[107] de Giorgi, A., Fabbian, F., Greco, F., Panzera, F., Angelini, L., Pala, M., ... Manfredini, R. (2020). Prediction of in-hospital mortality of patients with SARS-CoV-2 infection by comorbidity indexes: An Italian internal medicine single center study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(19), 10258-10266.

[108] Dominguez-Ramirez, L., García-Sancho, C., Marín-Zamora, L., Rodríguez-González, C. G., & Montero Vega, D. (2020). The role of metabolic comorbidity in COVID-19 mortality of middle-aged adults. The case of Mexico. *medRxiv*.

[109] Carfi, A., Bernabei, R., & Landi, F. (2020). Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 324(6), 603-605.

[110] Zaim, S., Chong, J. H., Sankaranarayanan, V., & Harky, A. (2020). COVID-19 and Multiorgan Response. *Current Problems in Cardiology*, 45, 100618.

[111] Kim, C., Kang, S. J., Park, J. H., Park, J. S., Cho, Y. J., Kim, S. W., Kim, J. Y., Jeong, S. H., & Kim, H. Y. (2021). COVID-19 infection with asymptomatic or mild disease severity in young patients: Clinical course and association between prevalence of pneumonia and viral load. *PLoS ONE*, 16(4), e0250358.

[112] National Institutes of Health. (2022, December 19). Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>

[113] Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395, 497–506.

- [114] Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323, 1061–1069.
- [115] Menni, C., Valdes, A. M., Freydin, M. B., Ganesh, S., El-Sayed Moustafa, J. S., Visconti, A., Hysi, P., Bowyer, R. C. E., Mangino, M., Falchi, M., Wolf, J., Ourselin, S., Chan, A. T., Steves, C. J., & Spector, T. D. (2022). Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: A prospective observational study from the ZOE COVID Study. *The Lancet*, 399(10335), 1618-1624.
- [116] Wu, Y., Liu, X., Wang, H., Li, Y., Long, Q., & Chen, Q. (2022). Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Network Open*, 5(8), e2228008.
- [117] Prete, C. A., Souza, W. M., Pinto, M. A., Menezes, A. N. S., & Nascimento, V. A. (2022). Reinfection by the SARS-CoV-2 Gamma variant in blood donors in Manaus, Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 22, 1–8.
- [118] Naveca, F. G., da Costa, C., Nascimento, V., Souza, V., Corado, A., Nascimento, F., Silva, G., Costa, Á., Duarte, D., Silva, L., Gomes, T., Araújo, F., Pereira, G., Pinho, J., Malheiros, D., Santos, L., Jesus, M., ... Vasconcelos, P. F. C. (2021). COVID-19 epidemic in the Brazilian state of Amazonas was driven by long-term persistence of endemic SARS-CoV-2 lineages and the recent emergence of the new Variant of Concern P.1. *Research Square*.
- [119] Freitas, A. R. R., Souza, W. M., Fintelman-Rodrigues, N., da Silva, R. A., Resende, P. C., Barbosa, M. F., et al. (2021). The Emergence of Novel SARS-CoV-2 Variant P.1 in Amazonas (Brazil) Was Temporally Associated with a Change in the Age and Gender Profile of COVID-19 Mortality. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3804788>
- [120] J.-L. Kiemdé et al. “SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant emergence and vaccine breakthrough”. In: *bioRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.07.31.454955.

- [121] Petra Mlcochova et al. “SARS-CoV-2 B. 1.617. 2 Delta variant emergence, replication and sensitivity to neutralising antibodies”. In: *BioRxiv* (2021), pp. 2021–05. doi: 10.1101/2021.05.08.443253.
- [122] Prerna Arora et al. “Increased lung cell entry of B.1.617.2 and evasion of antibodies induced by infection and BNT162b2 vaccination”. In: *bioRxiv* (2021). doi: 10.1101/2021.07.01.450017.
- [123] Huiping Shuai et al. “Attenuated replication and pathogenicity of SARS-CoV-B.1.1.529 Omicron”. In: *Nature* 603 (7902 2022). issn: 14764687. doi: 10.1038/s41586-022-04442-5.
- [124] Huiping Shuai et al. “Emerging SARS-CoV-2 variants expand species tropism to murines”. In: *EBioMedicine* 73 (2021). issn: 23523964. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103643.
- [125] Rigel Suzuki et al. “Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant”. In: *Nature* 603 (7902 Mar. 2022), pp. 700–705. issn: 0028-0836. doi: 10.1038/s41586-022-04462-1. url: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04462-1>.
- [126] Julia M. Baker et al. “SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant Transmission Within Households — Four U.S. Jurisdictions, November 2021–February 2022”. In: *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 71 (9 Mar. 2022), pp. 341–346. issn: 0149-2195. doi: 10.15585/mmwr.mm7109e1.
- [127] Souheil Zayet et al. “Clinical features of COVID-19 and influenza: a comparative study on Nord Franche-Comte cluster”. In: *Microbes and Infection* 22 (9 2020). issn: 1769714X. doi: 10.1016/j.micinf.2020.05.016.
- [128] Patrick Dawson et al. “Loss of Taste and Smell as Distinguishing Symptoms of Coronavirus Disease 2019”. In: *Clinical Infectious Diseases* 72 (4 2021). issn: 15376591. doi: 10.1093/cid/ciaa799.
- [129] “T.C. Sağlık Bakanlığı COVID-19 Genel Bilgiler, Epidemiyoloji ve Tanı”. In: (). url: <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66337/genel-bilgiler-epidemiyoloji-ve-tani.html>. [130] Selda Erensoy. “SARS-CoV-2 and microbiological diagnostic

dynamics in COVID-19 pandemic”. In: Mikrobiyoloji Bulteni 54 (3 2021). issn: 03749096. doi: 10.5578/MB.69839.

[131] Dinnes, J., Deeks, J. J., Berhane, S., Taylor, M., Adriano, A., Davenport, C., ... & Dittrich, S. (2021). Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2021(3). doi: 10.1002/14651858.CD013705.pub2.

[132] Lai, C. K. C., & Lam, W. (2021). Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 226-230. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.10.069.

[133] Atiya-Nasagi, Y., Shenhar-Tsarfaty, S., & Berliner, S. (2022). Development of an immunofluorescence assay for detection of SARS-CoV-2. *Archives of Virology*, 167(4). doi: 10.1007/s00705-022-05392-z.

[134] Dao, T. L., Hoang, V. T., & Gautret, P. (2021). SARS-cov-2 infectivity and severity of covid-19 according to sars-cov-2 variants: Current evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 10(12), 2635. doi: 10.3390/jcm10122635.

[135] ECDC. (2021). Sequencing of SARS-CoV-2: first update. Retrieved from <https://cov-lineages.org>

[136] WHO. (2021). SARS-CoV-2 genomic sequencing for public health goals. Interim guidance, January 2021.

[137] Esman, A., Nitzan, O., Schwartz, A., & Glatman-Freedman, A. (2022). SARS-CoV-2 Variants Monitoring Using Real-Time PCR. *Diagnostics*, 12(10), 2388. doi: 10.3390/diagnostics12102388.

[138] Mögling, R., Hodcroft, E. B., Salathé, M., Peeters, M., & Huijbers, P. M. (2022). Sensitivity of Detection and Variant Typing of SARS-CoV-2 in European Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(12), e01261-22. doi: 10.1128/JCM.01261-22.

[139] WHO. (2022). End-to-end integration of SARS-CoV-2 and influenza sentinel surveillance: revised interim guidance, 31 January 2022. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/351409>.

- [140] “Interim Clinical Considerations for COVID-19 Treatment in Outpatients | CDC”. In: (). url: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/outpatient-treatment-overview.html>.
- [141] T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI Danışma Bilim Kurulu. “ERİŞKİN HASTA TEDAVİSİ”. In: (). url: <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/43095/0/covid-19rehberieriskinhastayonetimivetedavi-12042022pdf.pdf>.
- [142] Ronza Najjar-Debbiny et al. “Effectiveness of Paxlovid in Reducing Severe Coronavirus Disease 2019 and Mortality in High-Risk Patients”. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 76 (3 Feb. 2023). issn: 1537-6591. doi: 10.1093/CID/CIAC443. url:
- [143] Christoph D. Spinner et al. “Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients with Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial”. In: *JAMA - Journal of the American Medical Association* 324 (11 2020). issn: 15383598. doi: 10.1001/jama.2020.16349.
- [144] “Hospitalized Adults: Therapeutic Management | COVID-19 Treatment Guidelines”. In: (). url: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/management/clinical-management-of-adults/hospitalized-adults--therapeutic-management/>.
- [145] RECOVERY Collaborative Group. “Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19”. In: *New England Journal of Medicine* 384.8 (2021), pp. 693– 704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
- [146] Abbas F.et al Abani O. Abbas A. “Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial”. In: *Lancet (London, England)* 397 (10285 May 2021), pp. 1637–1645. issn: 1474-547X. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00676-0.
- [147] Vincent C Marconi et al. “Efficacy and safety of baricitinib for the treatment of hospitalised adults with COVID-19 (COV-BARRIER): a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled phase 3 trial”. In: *The Lancet Respiratory Medicine* 9.12 (2021), pp. 1407–1418. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00463-1.

- [148] National Institutes of Health. (n.d.). Hospitalized adults: Therapeutic management | COVID-19 treatment guidelines. Erişim Tarihi: Şubat 2023 <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/management/clinical-management-of-adults/hospitalized-adults--therapeutic-management/>
- [149] Denkinger, C.M., Becker, M., Zickler, M., Rieger, C.T., Habermehl, A., Bauer, A., ... & Beutel, G. (2022). Anti-SARS-CoV-2 antibody containing plasma improves outcome in patients with hematologic or solid cancer and severe COVID-19 via increased neutralizing antibody activity – a randomized clinical trial. medRxiv, 12, 2022.10.10.22280850. doi: 10.1101/2022.10.10.22280850.
- [150] Tasnim Saifudin Zakir et al. “Characterization of a Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody against SARS-CoV-2 Variants”. In: Viruses 14 (2 2022). issn: 19994915. doi: 10.3390/v14020230.
- [151] Emi Takashita et al. “Efficacy of Antiviral Agents against the SARS-CoV-2 Omicron Subvariant BA.2”. In: New England Journal of Medicine 386 (15 2022). issn: 0028-4793. doi: 10.1056/nejmc2201933.
- [152] “Prevention of SARS-CoV-2 | COVID-19 Treatment Guidelines”. In: (). url: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/prevention-of-sars-cov-2/>.
- [153] Amar D. Desai et al. “Long-term complications of COVID-19”. In: American Journal of Physiology- Cell Physiology 322 (1 2022). issn: 15221563. doi: 10.1152/AJPCELL.00375.2021.
- [154] Safiya Richardson et al. “Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes among 5700 Patients Hospitalized with COVID-19 in the New York City Area”. In: JAMA- Journal of the American Medical Association 323 (20 2020). issn: 15383598. doi: 10.1001/jama.2020.6775.
- [155] Eric M. Liotta et al. “Frequent neurologic manifestations and encephalopathy-associated morbidity in Covid-19 patients”. In: Annals of Clinical and Translational Neurology 7 (11 2020). issn: 23289503. doi: 10.1002/acn3.51210.

- [156] Puja Mehta et al. “COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression”. In: *The Lancet* 395 (10229 2020). issn: 1474547X. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
- [157] Timothy M. Rawson et al. “Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review to Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing”. In: *Clinical Infectious Diseases* 71 (9 2020). issn: 15376591. doi: 10.1093/cid/ciaa530.
- [158] Valentina O. Puntmann et al. “Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)”. In: *JAMA Cardiology* 5 (11 2020). issn: 23806591. doi:10.1001/jamacardio.2020.3557.
- [159] Chen Chen et al. “Global prevalence of post-coronavirus disease 2019 (COVID-19) condition or long COVID: a meta-analysis and systematic review”. In: *The Journal of infectious diseases* 226.9 (2022), pp. 1593–1607. doi: 10.1093/infdis/jiab291.
- [160] WHO. (n.d.). COVID19 Vaccine Tracker. Retrieved from <https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/>
- [161] WHO. (n.d.). COVID-19 vaccine tracker and landscape. Retrieved from <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- [162] Jia, Z., & Gong, W. (2021). Will mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 lead to the failure of COVID-19 vaccines? *Journal of Korean Medical Science*, 36(1), e24.
- [163] Su, S., Li, W., & Jiang, S. (2022). Developing pan-coronavirus vaccines against emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Trends in Immunology*, 43(3), 170–172.
- [164] Tartof, S. Y., Slezak, J. M., Fischer, H., Hong, V., Ackerson, B. K., Ranasinghe, O. N., ... & Zhan, Y. (2021). Effectiveness of mRNA BNT162b2 COVID-19 vaccine up to 6 months in a large integrated health system in the USA: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 398(10309), 1407-1416.
- [165] Kislaya, I., Goldfeld, M., Babushkin, F., Cohen, D., & Kreiss, Y. (2022). Comparative effectiveness of coronavirus vaccine in preventing breakthrough

infections among vaccinated persons infected with Delta and Alpha variants. *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 331-339.

[166] Lu, L., Wang, C., Shen, C., Xiao, J., Yang, Y., Kuang, D., ... & Jiang, S. (2022). Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 75(4), e822-e826.

[167] Chen, L. L., Zhou, W. J., Zhou, Y. Y., Chen, X., Wang, W., Gao, Y. F., ... & Zheng, B. J. (2022). Impact of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variant-associated receptor binding domain (RBD) mutations on the susceptibility to serum antibodies elicited by coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection or vaccination. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 74(10), 1623-1630.

[168] Lu Lu et al. "The impact of spike N501Y mutation on neutralizing activity and RBD binding of SARS-CoV-2 convalescent serum". In: *EBioMedicine* 71 (Sept. 2021), doi: 10.1016/J.EBIOM.2021.103544.

[169] GISAID. (2023). CoVsurver Mutations App. Retrieved April 8, 2023, from <https://gisaid.org/database-features/covsurver-mutations-app/>

[170] World Health Organization. (2022, February 22). Statement on Omicron sublineage BA.2. <https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage-ba.2>

[171] Xiong, W., Huang, Y., Lam, J. C., Teng, J. L., Wu, X., & Yang, Y. (2023). Epidemiology of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 Infections, Macau, June-July 2022. *Emerging Infectious Diseases*, 29(2).

[172] World Health Organization. (2022, October 26). Weekly epidemiological update on COVID-19 - 26 October 2022. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19-26-october-2022>

[173] Grasselli, G., Zangrillo, A., Zanella, A., Antonelli, M., Cabrini, L., Castelli, A., Cereda, D., Coluccello, A., Foti, G., Fumagalli, R., Iotti, G., Latronico, N., Lorini, L., Merler, S., Natalini, G., Piatti, A., Ranieri, M. V., Scandroglio, A. M., Storti, E., ...

- Presenti, A. (2020). Risk Factors Associated with Mortality among Patients with COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. *JAMA Internal Medicine*, 180.
- [174] Peckham, H., de Gruijter, N. M., Raine, C., Radziszewska, A., Ciurtin, C., Wedderburn, L. R., & Rosser, E. C. (2020). Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nature Communications*, 11.
- [175] Sohn, Y. J., Kim, J. H., Kim, Y. K., & Lee, J. H. (2022). Clinical Characteristics of Patients Who Contracted the SARS-CoV-2 Omicron Variant from an Outbreak in a Single Hospital. *Yonsei Medical Journal*, 63(8), 790.
- [176] Menni, C., Valdes, A. M., Drew, D. A., Ganesh, S., Varsavsky, T., Cardoso, M. J., El-Sayed Moustafa, J. S., Visconti, A., Hysi, P., Bowyer, R. C. E., Mangino, M., Falchi, M., Hammers, A., Silverwood, R. J., Spector, T. D., Ourselin, S., & Steves, C. J. (2022). Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID Study. *The Lancet*, 399(10335), 1618–1624.
- [177] von Bartheld, C. S. & Wang, L. (2023). Prevalence of olfactory dysfunction with the omicron variant of SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Cells*, 12(3), 430. doi: 10.3390/cells12030430.
- [178] Thakur, V., Ratho, R., Kumar, P., & Bhatia, S. (2021). Multi-organ involvement in covid-19: Beyond pulmonary manifestations. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), 446. doi: 10.3390/jcm10030446.
- [179] Sahin, A., Aydin, E., Çolak, İ., Tükenmez Tigen, E., Altın, N., & Beken, S. (2023). The diversity in the clinical features of children hospitalized with COVID-19 during the nonvariant, Alpha (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2), and Omicron (B.1.1.529) variant periods of SARS-CoV-2: Caution for neurological symptoms in Omicron variant. *Journal of Medical Virology*. doi: 10.1002/jmv.27703.
- [180] Lewnard, J.A. et al. (2022). Clinical outcomes associated with SARS-CoV-2 Omicron (B. 1.1. 529) variant and BA. 1/BA. 1.1 or BA. 2 subvariant infection in southern California. *Nature Medicine*, 28(9), 1933-1943.

- [181] Bager, P. et al. (2022). Risk of hospitalisation associated with infection with SARS-CoV-2 omicron variant versus delta variant in Denmark: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(7), 967-976.
- [182] Gozzi, N. et al. (2022). Preliminary modeling estimates of the relative transmissibility and immune escape of the Omicron SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. medRxiv.
- [183] Földi, M. et al. (2020). Obesity is a risk factor for developing critical condition in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 21, e13095.
- [184] Malahe, S.R.K. et al. (2023). Clinical Characteristics and Outcomes of Immunocompromised Patients With Coronavirus Disease 2019 Caused by the Omicron Variant: A Prospective, Observational Study. *Clinical Infectious Diseases*, 76(3), e172-e178.
- [185] Nevejan, L. et al. (2022). Severity of COVID-19 among Hospitalized Patients: Omicron Remains a Severe Threat for Immunocompromised Hosts. *Viruses*, 14(12), 2736.
- [186] Corey, L. et al. (2021). SARS-CoV-2 Variants in Patients with Immunosuppression. *New England Journal of Medicine*, 385, 562-566.
- [187] "Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host." (2020). *New England Journal of Medicine*, 383, 2291-2293.
- [188] Truong, T.T. et al. (2021). Persistent SARS-CoV-2 infection and increasing viral variants in children and young adults with impaired humoral immunity. medRxiv.
- [189] Hall, V.J. et al. (2021). Effectiveness of BNT162b2 mRNA Vaccine Against Infection and COVID-19 Vaccine Coverage in Healthcare Workers in England, Multicentre Prospective Cohort Study (the SIREN Study). *SSRN Electronic Journal*.
- [190] Emary, K. R. W., Golubchik, T., Aley, P. K., Ariani, C. V., Angus, B., Bibi, S., ... & Chappell, H. (2021). Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. *The Lancet*, 397(10282).

- [191] Hacısuleyman, E., Hale, C., Saito, Y., Blachere, N. E., Bergh, M., Conlon, E. G., ... & Bagci, U. (2021). Vaccine breakthrough infections with SARS-CoV-2 variants. *New England Journal of Medicine*, 384(23).
- [192] Yitbarek, G. Y., Abraham, G., Girma, B., & Tilahun, T. (2021). The role of C-reactive protein in predicting the severity of COVID-19 disease: A systematic review. *SAGE Open Medicine*, 9.
- [193] Ahnach, M., Laaribi, A. B., Alaoui, R., & Elidrissi Errahhali, M. (2020). C-reactive protein as an early predictor of COVID-19 severity. *Journal of Medical Biochemistry*, 39(4).
- [194] Weber, S., Mayerle, J., Irlbeck, M., Gerbes, A. L., Seufferlein, T., & Meister, T. (2021). Liver function test abnormalities at hospital admission are associated with severe course of SARS-CoV-2 infection: a prospective cohort study. *Gut*, 70(10), 1925-1932.
- [195] Hariyanto, T. I., & Kurniawan, A. (2020). Anemia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Transfusion and Apheresis Science*, 59(6).
- [196] Ok, F., Erdogan, O., Durmus, E., & Bildik, A. (2021). Predictive values of blood urea nitrogen/creatinine ratio and other routine blood parameters on disease severity and survival of COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93(2).
- [197] Lee, C. Y., Huang, S. Y., Hung, E. C., Tsai, C. H., Chen, J. S., Wu, Y. C., ... & Yen, M. Y. (2022). Prolonged SARS-CoV-2 Infection in Patients with Lymphoid Malignancies. *Cancer Discovery*, 12(1).
- [198] Baang, J. H., Smith, C., Mirabelli, C., Valesano, A. L., Manthei, D. M., Bachman, M. A., & Yeh, T. S. (2021). Prolonged Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication in an Immunocompromised Patient. *Journal of Infectious Diseases*, 223(1).
- [199] Liu, Y., Yan, L.M., Wan, L., Xiang, T.X., Le, A., Liu, J.M., Peiris, M., Poon, L.L.M., Zhang, W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 656-657. 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30232-2.

- [200] Focosi, D., Tuccori, M., Baj, A., & Maggi, F. (2021). Emergence of SARS-CoV-2 Spike Protein Escape Mutation Q493R after Treatment for COVID-19 - Volume 27, Number 10—October 2021 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 27(10), 2728–2731.
- [201] Phillips, C. (n.d.). Emergency Use Authorization (EUA) for Bamlanivimab 700 mg and Etesevimab 1400 mg IV Administered Together Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Review Identifying Information Application Type (EUA or Pre-EUA) If EUA, designate whether pre-event or intra-event EUA request. EUA Application Number(s) 1 EUA 000094 Sponsor (entity requesting EUA or Eli Lilly and Company pre-EUA consideration), point of.
- [202] Abavisani, M., Soleimani, S., Fotouhi, F., & Bahrami, A. (2022). Mutations in SARS-CoV-2 structural proteins: A global analysis. *Virology Journal*, 19(1), 1–19.
- [203] Hatirnaz Ng, O., Tüzün, E., & Öztürk, A. (2021). Mutational landscape of SARS-CoV-2 genome in Turkey and impact of mutations on spike protein structure. *PLoS ONE*, 16(12), e0260438.
- [204] Gobeil, S. M. C., Janowska, K., McDowell, S., Mansouri, K., Parks, R., Stalls, V., Kopp, M. F., Manne, K., Li, D., Wiehe, K., Saunders, K. O., & Acharya, P. (2020). D614G mutation alters SARS-CoV-2 spike conformation and enhances protease cleavage susceptibility. *bioRxiv*.
- [205] Asif, A., Ali, M., Khan, M. A., Akram, W., Majeed, F., Ali, A., & Kamran, M. (2022). The Comparison of Mutational Progression in SARS-CoV-2: A Short Updated Overview. *Journal of Molecular Pathology*, 3(4), 201–218.
- [206] Ozer, E. A., Afolaranmi, O. A., Ayodele, O. A., Ogunkunle, T. O., Fagbami, A. H., & Oyewole, I. O. (2021). Coincident rapid expansion of two SARS-CoV-2 lineages with enhanced infectivity in Nigeria. *medRxiv*.
- [207] Cui, Z., Zhang, T., Zhang, X., Feng, J., Sun, R., Shi, Y., Zhang, M., Wang, L., Bai, Y., Yang, J., Li, H., Zhang, S., Li, Y., Li, J., Li, S., Li, J., Li, W., Li, Y., Li, T., Zhang, X., Li, Y., Sun, H., Gao, G. F., & Tan, W. (2022). Structural and functional characterizations of infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron. *Cell*, 185(5).

- [208] Shahنشah, M. F. H., Alswat, K. A., Al-Shehri, M. A., & Alkharsah, K. R. (2022). Comparative analysis of B.1.617.2 (Delta) variant of SARS-CoV-2. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 12(01), 20-26.
- [209] Motozono, C., Toyoda, M., Zahradnik, J., Saito, A., Nasser, H., Tan, T. S., Ngare, I., Kim, J. H., Uriu, K., Kosugi, Y., Yue, Y., Shimizu, R., Ito, J., Torii, S., Kageyama, T., Ha, D., Anraku, M., Ishikawa, T., De Silva, N. S., & Sato, K. (2022). The SARS-CoV-2 Omicron BA.1 spike G446S mutation potentiates antiviral T-cell recognition. *Nature Communications*, 13(1), 13.
- [210] Koyama, T., Weeraratne, D., Snowden, J. L., & Parida, L. (2022). Evasion of vaccine-induced humoral immunity by emerging sub-variants of SARS-CoV-2. *Future Microbiology*, 17, 417-424.
- [211] World Health Organization. (2021). Weekly epidemiological update on COVID-19- 11 May 2021. Retrieved from https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20210511_weekly_epi_update_39.pdf
- [212] Khairnar, K., et al. (2023). L452M in spike glycoprotein indicative of zoonotic links of SARS-CoV-2 XBC.1. *Authorea Preprints*. doi: 10.22541/AU.167357764.45753521/V1.
- [213] Tchesnokova, V., et al. (2021). Acquisition of the L452R Mutation in the ACE2-Binding Interface of Spike Protein Triggers Recent Massive Expansion of SARS-CoV-2 Variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 59. doi: 10.1128/JCM.00921-21/SUPPL_FILE/JCM.00921-21-S0007.PDF.
- [214] Siu, K.L., et al. (2019). Severe acute respiratory syndrome Coronavirus ORF3a protein activates the NLRP3 inflammasome by promoting TRAF3-dependent ubiquitination of ASC. *FASEB Journal*, 33. doi: 10.1096/fj.201802418R.
- [215] Ren, Y., et al. (2020). The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cellular and Molecular Immunology*, 17. doi: 10.1038/s41423-020-0485-9.
- [216] Oostra, M., et al. (2006). Glycosylation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Triple-Spanning Membrane Proteins 3a and M. *Journal of Virology*, 80. doi: 10.1128/jvi.80.5.2326-2336.2006.

- [217] Kaushal, N., Gupta, Y., Goyal, M., & Mangla, S. (2020). Mutational Frequencies of SARS-CoV-2 Genome during the Beginning Months of the Outbreak in USA. *Pathogens*, 9, 565. doi: 10.3390/PATHOGENS9070565
- [218] Newman, J. A., Douangamath, A., Yadzani, S., Yosaatmadja, Y., Aimon, A., Brandão-Neto, J., ... & Walsh, M. A. (2021). Structure, mechanism and crystallographic fragment screening of the SARS-CoV-2 NSP13 helicase. *Nature Communications*, 12(1), 1-11. doi: 10.1038/s41467-021-25166-6
- [219] Faizan, M. I., Alam, K., Arif, A., Ahsan, A., & Rao, P. V. (2022). NSP4 and ORF9b of SARS-CoV-2 Induce Pro-Inflammatory Mitochondrial DNA Release in Inner Membrane-Derived Vesicles. *Cells*, 11, 2969. doi: 10.3390/CELLS11192969/S1
- [220] Salami Ghaleh, S., Shekoochian, S., Mahdavi, M., & Shariati, P. (2022). SARS-CoV-2 Non-structural protein 1(NSP1) mutation virulence and natural selection: Evolutionary trends in the six continents. *Virus Research*, 323, 199016. doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2022.199016
- [221] Mou, K., Gou, J., Li, Z., Li, Y., Li, M., & Li, W. (2021). Emerging mutations in nsp1 of sars-cov-2 and their effect on the structural stability. *Pathogens*, 10, 1285. doi: 10.3390/pathogens10101285
- [222] Ginex, T., Querio, G., Ceschi, A., & Savin, V. (2022). The structural role of SARS-CoV-2 genetic background in the emergence and success of spike mutations: The case of the spike A222V mutation. *PLoS pathogens*, 18(7), e1010631. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1010631
- [223] Khateeb, D., Zahi, O., & Ghanem, M. (2022). SARS-CoV-2 variants with reduced infectivity and varied sensitivity to the BNT162b2 vaccine are developed during the course of infection. *PLoS pathogens*, 18(1), e1010242. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1010242
- [224] Fu, Y. Z., Pei, S. N., Huang, Y. P., Lee, C. H., & Chen, J. Y. (2021). SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. *Cellular and Molecular Immunology*, 18, 613. doi: 10.1038/S41423-020-00571-X

- [225] Thomas, S. (2021). Mapping the Nonstructural Transmembrane Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Journal of Computational Biology*, 28, 909-921. doi: 10.1089/CMB.2020.0627.
- [226] Yavarian, J., Shadab, A., Nikbakht, M., & Izadi, M. (2022). Whole genome sequencing of SARS-CoV2 strains circulating in Iran during five waves of pandemic. *Plos one*, 17(5), e0267847.
- [227] Tahir, M. (2021). Coronavirus genomic nsp14-ExoN, structure, role, mechanism, and potential application as a drug target. *Journal of Medical Virology*, 93, 4258-4264. doi: 10.1002/JMV.27009.
- [228] Hossain, M. U., Hassan, M. M., Rahman, M. M., Rahman, M. S., & Sikder, T. (2021). Novel mutations in NSP-1 and PLPro of SARS-CoV-2 NIB-1 genome mount for effective therapeutics. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-8. doi: 10.1186/s43141-021-00152-z.
- [229] Niesen, M., Menda, G., Schmid, B., Scherer, A., & Dehio, C. (2021). COVID-19 vaccines dampen genomic diversity of SARS-CoV-2: Unvaccinated patients exhibit more antigenic mutational variance. *medRxiv*. doi: 10.1101/2021.07.01.21259833.
- [230] Ai, J., Zhang, H., Xie, X., Chen, J., & Zhang, Y. (2022). Antibody evasion of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.1.1, BA.2, and BA.3 sub-lineages. *Cell Host Microbe*, 30, 1077. doi: 10.1016/J.CHOM.2022.05.001.
- [231] Bugatti, A., Turrini, F., Merli, F., Vergani, E., & Caccuri, F. (2023). The D405N Mutation in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 Inhibits Spike/Integrins Interaction and Viral Infection of Human Lung Microvascular Endothelial Cells. *Viruses*, 15, 332. doi: 10.3390/V15020332.
- [232] Zou, L., Hu, X., & Liu, J. (2022). The SARS-CoV-2 protein NSP2 impairs the microRNA-induced silencing capacity of human cells. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2022.01.25.477753.
- [233] Kumar, S., Karuppanan, K., & Subramaniam, G. (2022). Omicron (BA.1) and Sub-Variants (BA.1, BA.2 and BA.3) of SARS-CoV-2 Spike Infectivity and

Pathogenicity: A Comparative Sequence and Structural-based Computational Assessment. bioRxiv. doi: 10.1101/2022.02.11.480029.

[234] Hyams, C., Marlow, R., McNaughton, A. L., Patel, A., Takwoingi, Y., Horby, P., ... & O'Connor, D. (2023). Severity of Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) SARS-CoV-2 infection among hospitalised adults: A prospective cohort study in Bristol, United Kingdom. *The Lancet Regional Health-Europe*, 25, 100556.

[235] Jassat, W., Tempia, S., Fonseca, V., Van den Bergh, D., Seale, A., Smith, M., ... & Madhi, S. A. (2022). Clinical severity of COVID-19 in patients admitted to hospital during the omicron wave in South Africa: a retrospective observational study. *The Lancet Global Health*, 10(7), e961-e969.

[236] Mishra, T., Sharma, V., Puniya, B. L., & Rathore, A. S. (2022). SARS-CoV-2 spike E156G/157-158 mutations contribute to increased infectivity and immune escape. *Life Science Alliance*, 5(7), e202201415.

[237] Mahmood, T. B., Mehedi, S. S., Paul, G., Haque, M. A., & Rahman, M. S. (2022). Missense mutations in spike protein of SARS-CoV-2 delta variant contribute to the alteration in viral structure and interaction with hACE2 receptor. *Immunity, Inflammation and Disease*, 10(9), e683.

[238] Liu, L., Iketani, S., Guo, Y., Chan, J. F., Wang, M., Liu, L., ... & Huang, K. Y. (2022). Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 602(7898), 676-681.

[239] Aoki, A., Hase, R., Kudaka, J., Nagata, N., Oka, T., Kuroda, M., ... & Tsukagoshi, H. (2022). Rapid identification of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 Spike Mutation F486V in clinical specimens using a high-resolution melting-based assay. *Viruses*, 14(11), 2401.

[240] Ong, C. P., Zhang, H., Ong, C. W., & Foo, S. S. (2023). Comparative analysis of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.12.1 and BA.5.2 variants. *Journal of Medical Virology*, 95(1), e28326.

- [241] Yuen, C. K., Lam, J. Y., Wong, W. M., Mak, L. F., Wang, X., Chu, H., ... & Jin, D. Y. (2020). SARS-CoV-2 nsp13, nsp14, nsp15 and orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1418-1428.
- [242] Channappanavar, R., Fett, C., & Perlman, S. (2016). Dysregulated type I interferon and inflammatory monocyte-macrophage responses cause lethal pneumonia in SARS-CoV-infected mice. *Cell Host & Microbe*, 19(2), 181-193.
- [243] Fortune. (2022, July 9). New Omicron spawn like 'Centaurus' and 'Bad Ned' may be the reason you have a weird summer cold (or worse).
<https://fortune.com/2022/07/09/centaurus-bad-ned-omicron-covid-ba-2-75-ba-5-3-1-ba275-ba531-variants-subvariants-centaurus-in-us-bad-ned-in-us/>
- [244] Hefnawy, M. T., Al-Johani, K. A., Abdel-Rahman, M. E., Gazzaz, M. J., & Al-Malki, E. S. (2023). Could the Omicron BQ.1 sub-variant threaten to reverse the worldwide decline in COVID cases? *IJS Global Health*, 6(1), e106.
- [245] Jiang, X. L., Liu, X., Sun, Q. Y., Li, J., Zhang, Z. Y., Wang, X. P., ... & Zhou, H. (2023). Omicron BQ.1 and BQ.1.1 escape neutralisation by omicron subvariant breakthrough infection. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(1), 28-30.