



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS-CoV-2’NİN NÜKLEOKAPSİD GEN ANALİZİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. MERVE İLBURUNOLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. KEZBAN TÜLAY YALÇINKAYA

KAHRAMANMARAŞ – 2021



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SARS-CoV-2’NİN NÜKLEOKAPSİD GEN ANALİZİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. MERVE ÇİLBURUNOĞLU

DANIŞMAN

Prof. Dr. KEZBAN TÜLAY YALÇINKAYA

Bu araştırma, 2020/8-1 A kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

KAHRAMANMARAŞ – 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleri ile eğitimime katkısı olan, tez çalışmamın konu seçiminden son aşamasına kadar bana yol gösteren ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA'ya,

Asistanlığımın ilk gününden itibaren hem mesleki hem sosyal alanda bizlere rehber olan, tez çalışmamın her aşamasında değerli bilgi ve önerileriyle büyük katkılar sunan ana bilim dalı başkanımız, çok kıymetli hocam Prof. Dr. Murat ARAL'a

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerine başvurduğum, eğitimimde katkıları olan kıymetli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Filiz ORAK'a ve Doç. Dr. Özlem KİRİŞÇİ'ye,

Birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarım ve tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmama olan katkılarından dolayı KSÜ ÜSKİM Merkez Sekans Laboratuvarı ekibine,

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi sayısız fedakarlıklar yapan, varlıklarıyla huzur veren sevgili aileme,

Attığım her adımda beni yüreklendiren, her daim yanımda olan, mutluluk kaynağım sevgili eşim İdris ÇİLBURUNOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

EKİM-.2021

Dr. Merve ÇİLBURUNOĞLU

SARS-CoV-2’NİN NÜKLEOKAPSİD GEN ANALİZİ

(Tıpta Uzmanlık Tezi)

Dr. Merve ÇİLBURUNOĞLU

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Ekim 2021

ÖZET

Giriş ve Amaç: Aralık 2019 tarihinde, Çin'in Wuhan şehrinde SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs ortaya çıktı ve olağandışı bir viral pnömoni salgınına neden oldu. SARS-CoV-2'nin dünyaya yayılırken birkaç ay içinde hem yapısal hem de yapısal olmayan proteinlerinde mutasyonların geliştiği gösterilmiştir. Bu yapısal proteinlerden nükleokapsid proteininin viral RNA sentezinde ve dolayısıyla koronavirüs yaşam döngüsünde kritik rol oynadığı bilinmektedir. Nükleokapsid proteini yüksek oranda immünojeniktir ve enfeksiyon sırasında bol miktarda eksprese edilir. Ayrıca, nükleokapsid proteini aşı geliştirmede ve serolojik testlerde sıklıkla kullanılır. Halen SARS-CoV-2 nükleokapsid proteinine odaklanan az sayıda çalışma bulunmaktadır ve güncel bilgilere ihtiyaç vardır. Genetik varyans analizleri, salgını kontrol altına almak için bu yeni virüs hakkındaki bilgileri genişletmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Mutasyonların sürekli izlenmesi, virüsün bireyler ve coğrafi alanlar arasındaki hareketini izlemede de çok önemli olacaktır. Bu faydaları göz önünde bulundurarak yaptığımız çalışmamızda; SARS-CoV-2 nükleokapsid geninde meydana gelen genetik değişiklikleri saptamayı ve bu konuda ileride yapılacak olan çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

Materyal ve Metot: 2021 Ağustos ayında, KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kombine burun-boğaz sürüntü örneklerinden SARS-COV-2 Real-time PCR testi pozitif bulunan 112 örnek çalışmaya dahil edildi. Örnekten viral RNA izolasyonu HibriGen Genel RNA İzolasyon Kiti ile yapıldı. İzolasyonla elde edilen RNA örnekleri, revers transkripsiyonla RNA'dan cDNA sentezi için abmgood OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti kullanıldı. cDNA örneklerine Solis Biodyne HOT FIREPol® DNA Polimeraz Kiti kullanılarak PCR işlemi uygulandı. Nükleotid dizi analizi KSÜ ÜSKİM Merkez Sekans Laboratuvarı'nda Sanger yöntemiyle yapıldı. Elde edilen nükleotid dizileri, Sequencher 5.4.6 programı aracılığı ile SARS-CoV-2 Wuhan izolatu (NC_045512.2) referans alınarak birleştirildi ve konsensus dizileri çıkarıldı. Konsensus dizilerin mutasyon analizinde, soy belirlenmesinde ve dendrogram oluşturulmasında Nextclade v1.7.1 platformu kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamıza alınan 112 SARS-CoV-2 izolatının N gen bölgesi, referans Wuhan (NC 045512.1) N dizisi ile karşılaştırıldığında izolatların tamamında çeşitli mutasyonlar tespit edildi. Saptanan mutasyonlardan 18'i nonsinonim (yanlış anlamlı), 14'ü sinonim (sessiz) mutasyonlardı. Nonsinonim mutasyonlar D63G (n=112), R203M (n=112), G215C (n=112), D377Y (n=112), S232G (n=9), E253D (n=9), L139S (n=2), A308S (n=2), R319H (n=2), R41Q (n=2), T24I (n=2), L139F (n=1), T205I (n=1), A119S (n=1), G243C (n=1), A359S (n=1), P364L (n=1), P46S (n=1) olarak saptandı. Sinonim mutasyonlar ise T29164C(n=6), C28312T(n=5), G29422T(n=5), G29179A(n=4), C28744T (n=3), C29200T (n=2), A29113G (n=2), G28396A (n=2), G29260T (n=1), A28699T (n=1), G29332T (n=1), G29227A (n=1), C29167T (n=1), C28585A(n=1) olarak saptandı. En sık saptanan nükleotid mutasyonu G>T (n=12), ikinci sıklıkta C>T(n=8) idi. D63G, R203M, G215C, D377Y mutasyonları tüm izolatlarda saptandı. Ayrıca 9 izolatın her birinde mevcut mutasyonlara ek olarak S232G ve E253D mutasyonları bir arada saptandı. Nextclade v1.7.1 ile referans izolatlarla karşılaştırılıp dendogram oluşturulduğunda 112 örneğin tamamı 21A(Delta) soyu ile gruplanmıştır.

Sonuç: SARS-CoV-2'nin nükleokapsid gen bölgesini hedefleyen çalışmamız az sayıda örnekle ve kısa bir zaman diliminde yapılmasına karşın yüksek oranda ve farklılıkta nükleokapsid mutasyonları ortaya çıkarmış ve varyant tayinine olanak sağlamıştır. Yerel ölçekte (il düzeyinde) yapılacak benzer çalışmaların ulusal sürveyansa katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Farklı bölgelerde, salgının epidemiyolojik yayılımının izlenmesi, patojenin evrimini ve ilerlemesini takip etmek ve tanı, tedavi, aşı çalışmalarına katkı sağlamak için gen analizlerinin yapılması son derece önemlidir. Nükleokapsid geni ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamız nükleokapsid geni araştırmalarına katkı sağlamakta ve nükleokapsid geni analizlerine dikkat çekmektedir. Devam eden COVID-19 pandemisinin ciddiyeti göz önüne alındığında, SARS-CoV-2 araştırmalarının artarak devam etmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, nükleokapsid, Sanger dizileme, nükleotid dizi analizi

Sayfa adedi: 98

Danışman: Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

NUCLEOCAPSIDE GENE ANALYSIS OF SARS-COV-2

(Specialization Thesis in Medicine)

Merve ÇİLBURUNOĞLU, MD

KAHRAMANMARAS SUTCU IMAM UNIVERSITY

FACULTY OF MEDICINE

October 2021

ABSTRACT

Introduction and Purpose: In December 2019, a new coronavirus named SARS-CoV-2 emerged in Wuhan, China, causing an unusual viral pneumonia outbreak. SARS-CoV-2 has been shown to develop mutations in both structural and nonstructural proteins within a few months as it spreads around the world. It is known that the nucleocapsid protein, one of these structural proteins, plays a critical role in viral RNA synthesis and therefore in the coronavirus life cycle. The nucleocapsid protein is highly immunogenic and abundantly expressed during infection. In addition, the nucleocapsid protein is frequently used in vaccine development and serological testing. Currently, there are few studies focusing on the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein, and up-to-date information on the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is needed. Genetic variance analyzes play a crucial role in expanding knowledge about this new virus to contain the epidemic. Continuous monitoring of mutations will also be crucial in tracking the movement of the virus between individuals and between geographic areas. Considering these benefits, in our study; we aimed to detect genetic changes in the SARS-CoV-2 nucleocapsid gene and to contribute to future studies on this subject.

Material and Method: In August 2021, 112 samples with positive SARS-COV-2 Real-time PCR test from combined nose-throat swab samples sent to KSU Medical Faculty Medical Microbiology Laboratory were included in the study. Viral RNA isolation from the sample was done with HibriGen General RNA Isolation Kit. Abmgood OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit was used for cDNA synthesis from RNA samples obtained by isolation, reverse transcription. cDNA samples were amplified with PCR using Solis Biodyne HOT FIREPol® DNA Polymerase Kit. Nucleotide sequence analysis was performed in KSÜ ÜSKİM Central Sequence Laboratory using Sanger method. The obtained nucleotide sequences were assembled with reference to the SARS-CoV-2 Wuhan isolate (NC_045512.2) via the Sequencher 5.4.6 program and consensus sequences were generated. Nextclade v1.7.1 platform was used for mutation analysis of consensus sequences, lineage determination and dendrogram creation.

Results: When the nucleocapsid gene regions of 112 SARS-CoV-2 isolates were compared with the reference Wuhan (NC 045512.1) Nucleocapsid sequence, various mutations were detected in all isolates. Of the mutations detected, 18 were nonsynonymous (missense) and 14 were synonymous (silent) mutations. Nonsynonymous mutations were D63G(n=112), R203M(n=112), G215C(n=112), D377Y(n=112), S232G(n=9), E253D(n=9), L139S(n=2), A308S(n=2), R319H (n=2), R41Q(n=2), T24I (n=2), L139F(n=1) , T205I(n=1), A119S(n=1), G243C(n=1), A359S(n=1), P364L(n=1), P46S(n=1). Synonymous mutations were T29164C(n=6), C28312T(n=5), G29422T(n=5), G29179A(n=4), C28744T(n=3), C29200T(n=2), A29113G(n=2), G28396A(n=2), G29260T(n=1), A28699T(n=1), G29332T(n=1), G29227A(n=1), C29167T(n=1), C28585A(n=1). The most common nucleotide mutation was G>T (n=12) and, the second most common was C>T(n=8). D63G, R203M, G215C, D377Y mutations were detected in all isolates. In addition to the mutations present in each of the 9 isolates, S232G and E253D mutations were detected together. All 112 samples were grouped with 21A (Delta) clade when a dendrogram was created by comparing them with reference isolates with Nextclade v1.7.1.

Conclusions: Although our study targeting the nucleocapsid gene region of SARS-CoV-2 was performed with a small number of samples and in a short period of time, it revealed a high rate and diversity of nucleocapsid mutations and enabled variant determination. It is thought that similar studies to be carried out at the local (provincial level) will contribute to national surveillance. It is extremely important to carry out gene analyzes to monitor the epidemiological spread of the epidemic in different regions, to follow the evolution and progression of the pathogen, and to contribute to the diagnosis, treatment, and vaccine studies. More research is needed on the N gene. Our study contributes to nucleocapsid gene research and draws attention to nucleocapsid gene analysis. Considering the seriousness of the ongoing COVID-19 pandemic, SARS-CoV-2 research needs to be escalated.

Key Words: SARS-CoV-2, nucleocapsid, Sanger sequencing, nucleotide sequence analysis

Page Number: 98

Advisor: Prof. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Viroloji	4
2.2.1. Sınıflandırma ve Adlandırma	4
2.2.2. Fenotipik Özellikleri ve Genomik Yapısı	5
2.2.3. Viral Proteinler ve Görevleri	7
2.2.4. Viral Replikasyon.....	11
2.3. Epidemiyoloji	13
2.3.1. Salgının Mevcut Durumu	13
2.3.2. Rezervuar.....	13
2.3.3. Bulaş ve Yayılma	15
2.4. Patogenez.....	19
2.5. İmmün Yanıt.....	21
2.5.1. Doğal İmmün Yanıt.....	21
2.5.2. Edinsel İmmün Yanıt.....	22
2.5.2.1. Hümmoral immün yanıt	22
2.5.2.2. Hüccresel immün yanıt	23
2.6. Klinik.....	24
2.6.1. Genel Belirti ve Bulgular	24
2.6.2. Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular	24
2.6.3. Komplikasyonlar	24
2.7. Tanı.....	25
2.7.1. Serolojik Tanı	25

2.7.2. Moleküler Tanı	27
2.7.2.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)	27
2.7.2.1.1. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon PCR (rRT-PCR)	27
2.7.2.2. Genomik Dizileme	28
2.8.Tedavi	28
2.9. Aşılar	37
2.9.1. Tam İnaktif Virüs.....	37
2.9.2. Canlı Atenüe Virüs	38
2.9.3. Nükleik Asit	39
2.9.3.1. DNA	40
2.9.3.2. RNA.....	40
2.9.4. Viral Vektör (VV)	41
2.9.5. Rekombinant Protein Alt Birimi	42
2.9.6. Virüs Benzeri Partikül (VLP).....	42
3. MATERYAL VE METOT	44
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
7. KAYNAKÇA.....	74
8. ŞEKİLLER DİZİNİ	92
9. TABLOLAR DİZİNİ	93
10. EKLER DİZİNİ	94
11. EKLER.....	95
12. ÖZGEÇMİŞ	97

KISALTMALAR

+ssRNA	: Pozitif polariteli tek zincirli ribonükleik asit
A	: Adenin
Ab	: Antikor
ACE2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
Ag	: Antijen
ARDS	: Akut Respiratuar Distres Sendromu
ATP	: Adenozin trifosfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
C	: Sitozin
CCL	: Kemokin ligand
CD	: Bağlayıcı alan
CDC	: Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi
CH	: Merkezi sarmal
CLIA	: Kemilüminesans immünolojik test
CNGBdb	: Çin Ulusal Genbank Veri tabanı
CoV	: Koronavirüs
COVID-19	: Koronavirüs hastalığı 2019
CRS	: Sitokin Salınım Sendromu
CSG	: <i>Coronaviridae</i> Çalışma Grubu
CT	: Sitoplazmik kuyruk
CTD	: C-terminal bölge
CTL	: Sitotoksik T lenfosit
DMAH	: Düşük moleküler ağırlıklı heparin
DMC	: Veri İzleme Komitesi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dsRNA	: Çift sarmallı ribonükleik asit
E	: Zarf proteini
ELISA	: Enzim bağlı immünolojik yöntem
ER	: Endoplazmik retikulum
ERGIC	: Endoplazmik retikulum- Golgi ara bölmesi
EtOH	: Etil Alkol

FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FP	: Füzyon peptidi
FPV	: Favipravir
G	: Guanin
GISAID	: İnfluenza Verilerinin Paylaşımına İlişkin Küresel Girişim
gRNA	: Genomik ribonükleik asit
HCoV	: İnsan koronavirüsü
HPV	: İnsan Papilloma Virüsü
HR	: Heptad tekrar
IBV	: Enfeksiyöz Bronşit Virüsü
ICTV	: Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi
IDR	: Doğal düzensiz bölge
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
IP-10	: İnterferon gama kaynaklı protein 10
IRF3	: İnterferon düzenleyici faktör 3
ISG	: İnterferon stimüle edici gen
LAMP	: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon
LFA	: Lateral akım immünokromatografik test
LKR	: serin/arginin açısından zengin bağlayıcı bölge
LNP	: lipid nanopartikül
LPV/r	: Lopinavir/Ritonavir
M	: Membran proteini
MBL	: Mannoza Bağlayıcı Lektin
MCP	: Monosit kemotaktik protein
MERS	: Orta Doğu Solunum Sendromu
MIG	: IFN- γ tarafından indüklenen monokin
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
N	: Nükleokapsit proteini
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testi
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NEAR	: Nicking enzim aracılı reaksiyon
NF-κB	: nükleer faktör kappa B
NHC	: β -D-N4 hidroksisitidinin

NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
NLR	: NOD benzeri reseptör
NSP	: Yapısal olmayan protein
NTD	: N terminal bölge
ORF	: Açık okuma çerçevesi
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler yapı
PHEIC	: Uluslararası Önem Sahip Halk Sağlığı Acil Durumu
PL pro	: Papain benzeri proteaz
POC	: Hasta başı testleri
Pp1a/b	: Poliprotein 1a/b
PRR	: Patern tanıma reseptörü
RBD	: Reseptör bağlama alanı
RdRp	: RNA'ya bağımlı RNA polimeraz
RIG-I	: retinoik asit ile indüklenebilir gen I
RNA	: Ribonükleik asit
RNP	: Ribonükleoprotein
RPA	: Rekombinaz polimeraz amplifikasyon
rRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RTC	: Replikasyon transkripsiyon kompleksi
RT-PCR	: Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Spike proteini
SARS	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu
sgRNA	: Subgenomik ribonükleik asit
ssRNA	: Tek sarmallı ribonükleik asit
T	: Timin
TCR	: T hücre reseptörü
TGF	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü
Th	: T yardımcı hücresi
TLR	: Toll benzeri reseptör
TM	: Transmembran alan
TMA	: Transkripsiyon aracılı amplifikasyon
TMH	: Transmembran sarmal
TMPRSS2	: Transmembran proteaz serin 2
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör

Treg	: T regulatuar hücre
tRNA	: transfer ribonükleik asit
TRS	: Transkripsiyon düzenleyici dizi
VLP	: Virüs benzeri partikül
VOC	: Endişe uyandıran varyantlar
VOI	: Dikkate alınması gereken varyantlar
VUM	: İzleme altındaki varyantlar
VV	: Viral vektör



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aralık 2019 tarihinde, Çin'in Wuhan şehrinde SARS-CoV-2 olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs ortaya çıktı ve beklenmedik bir viral pnömoni salgınına neden oldu. Son derece bulaşıcı olan bu yeni koronavirüs tüm dünyaya hızla yayıldı. Hem enfekte insan sayısı hem de salgın alanlarının konumsal uzaklığı açısından SARS ve MERS'i ezici bir şekilde geride bıraktı. Devam eden COVID-19 pandemisi, küresel halk sağlığı için olağanüstü bir tehdit oluşturmaktadır (1).

Virüs öncelikle solunum sistemini etkilemekte ve öksürük, ateş ve daha ciddi vakalarda nefes almada zorluk gibi semptomlarla grip benzeri hastalığa neden olmaktadır. Mevcut istatistiklere göre, daha büyük yaş grubundaki bireylerde (>60 yaş) ve altta yatan hastalığı olan kişilerde mortalitesi yüksektir. Akut solunum sıkıntısı sendromu ve solunum yetmezliğine ek olarak, COVID-19'un yüksek risk altındaki hastalarda sepsis, akut kalp hasarı ve kalp yetmezliği ve çoklu organ disfonksiyonuna yol açan sistemik inflamasyon olarak ortaya çıkmaktadır (2).

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) ve Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü (MERS-CoV) ile benzer şekilde, SARS-CoV-2 bir beta-koronavirüstür. Tek sarmallı pozitif polariteli RNA genomuna sahiptir. Virüs genomu; zarf (E), membran (M), nükleokapsid (N) ve spike (S) proteinlerinin yanı sıra yapısal olmayan proteinler de dahil olmak üzere çeşitli yapısal proteinleri kodlar. Virüsün dünyaya yayılırken birkaç ay içinde hem yapısal hem de yapısal olmayan proteinlerinde mutasyonların geliştiği gösterilmiştir (3).

Bu yapısal proteinlerden nükleokapsid proteininin viral RNA sentezinde ve dolayısıyla koronavirus yaşam döngüsünde kritik rol oynadığı bilinmektedir (4). N proteini yüksek oranda immünojeniktir ve enfeksiyon sırasında bol miktarda eksprese edilir. Ayrıca, N proteini aşı geliştirmede ve serolojik testlerde sıklıkla kullanılır. Elde edilen veriler koronavirus genomunun yüksek evrim hızına ve mutasyonların, N geninin evrimsel seçilimi üzerinde güçlü etkisine işaret etmektedir. Şu anda, SARS-CoV-2 N proteinine odaklanan az sayıda çalışma bulunmaktadır ve SARS-CoV-2 N proteini ile ilgili güncel bilgilere ihtiyaç vardır (5,6,7).

Nükleotid ve aminoasit değişiklikleri, bunların dolaşımında olan virüslerdeki sıklıklarının belirlenmesi, aşı tasarım çabaları, SARS-CoV-2 tanı testlerinin tasarımı ve

terapötik bileşikler dahil olmak üzere halk sağlığı açısından karar verme süreçlerinde faydalı olacaktır (8). Bununla birlikte, virüsün tüm genomunu kapsayan nükleotit dizileri elde edildikçe, virüs varyantlarının belirli coğrafi dağılımlarını tanımlama ihtiyacı, yerel düzeyde klinik ve politik stratejileri tanımlamak için pratik bir önem kazanmaktadır. Genetik varyans analizleri, salgını kontrol altına almak için bu yeni virüs hakkındaki bilgileri genişletmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Mutasyonların sürekli izlenmesi, virüsün bireyler arasındaki ve coğrafi alanlar arasındaki hareketini izlemede de çok önemli olacaktır (9).

Bu faydaları göz önünde bulundurarak yaptığımız çalışmamızda; SARS-CoV-2 nükleokapsid geninde meydana gelen genetik değişiklikleri saptamayı ve bu konuda ileride yapılacak olan çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Koronavirüsler, çiftlik hayvanları ve evcil hayvanlar da dahil olmak üzere çok çeşitli memeli ve kuş türlerini enfekte ettiği uzun süredir bilinen büyük bir virüs ailesidir. 1931’de kuş enfeksiyöz bronşit virüsü (IBV), bulunan ilk koronavirüs oldu. Daha sonra 1966 ve 1967’de ilk insan koronavirüsleri (HCoV); HCoV-229E ve HCoV-OC43 keşfedildi (10).

SARS-CoV’un zoonotik ortaya çıkışı ve ardından 2002-2003’teki SARS salgını, %10’u ölümcül sonuçlara yol açan 8.000 belgelenmiş SARS vakasına neden oldu. İnsandan insana bulaşma esas olarak semptomların başlamasından sonra meydana geldiğinden, seyahat kısıtlamaları ve enfekte hastaların izolasyonu dahil olmak üzere ciddi halk sağlığı önlemleri, uluslararası yayılımı sınırlamayı başardı. SARS salgını sırasında yapılan virüs taraması ve moleküler analizler neticesinde, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 tanımlandı. SARS-CoV’nin aksine, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HCoV-HKU1 bağışıklığı yeterli kişilerde genellikle sadece hafif üst solunum yolu semptomlarına neden olmaktadır.

2012’de zoonotik kökenli, yüksek patojeniteye sahip diğer bir koronavirüs olan MERS-CoV’nin ortaya çıkması, akciğer hasarı ve ciddi klinik belirtilerle ilişkili 2.500’den fazla insan MERS vakası ile sonuçlandı (%36 vaka ölüm oranı). Sadece uzun süreli temas halinde insanlara sporadik zoonotik bulaşmalara ve insandan insana sınırlı bulaşma olmasına rağmen, MERS-CoV enfeksiyonları hala tespit edilmektedir (10,11).

Yakın zaman önce ortaya çıkan üçüncü büyük HCoV patlaması, Aralık 2019’da Çin’in Wuhan eyaletinde meydana geldi ve SARS-CoV-2 olarak sınıflandırılan bu yeni koronavirüsün neden olduğu hastalık COVID-19 olarak adlandırıldı. Koronavirüs salgınları, öngörülemeyen ortaya çıkışları, hızlı ve kolay yayılmaları ve ciddi sonuçlara yol açmaları nedeniyle insanlar ve dünya ekonomisi için sürekli tehdit olarak görülmektedir (12).

2.2. Viroloji

2.2.1. Sınıflandırma ve Adlandırma

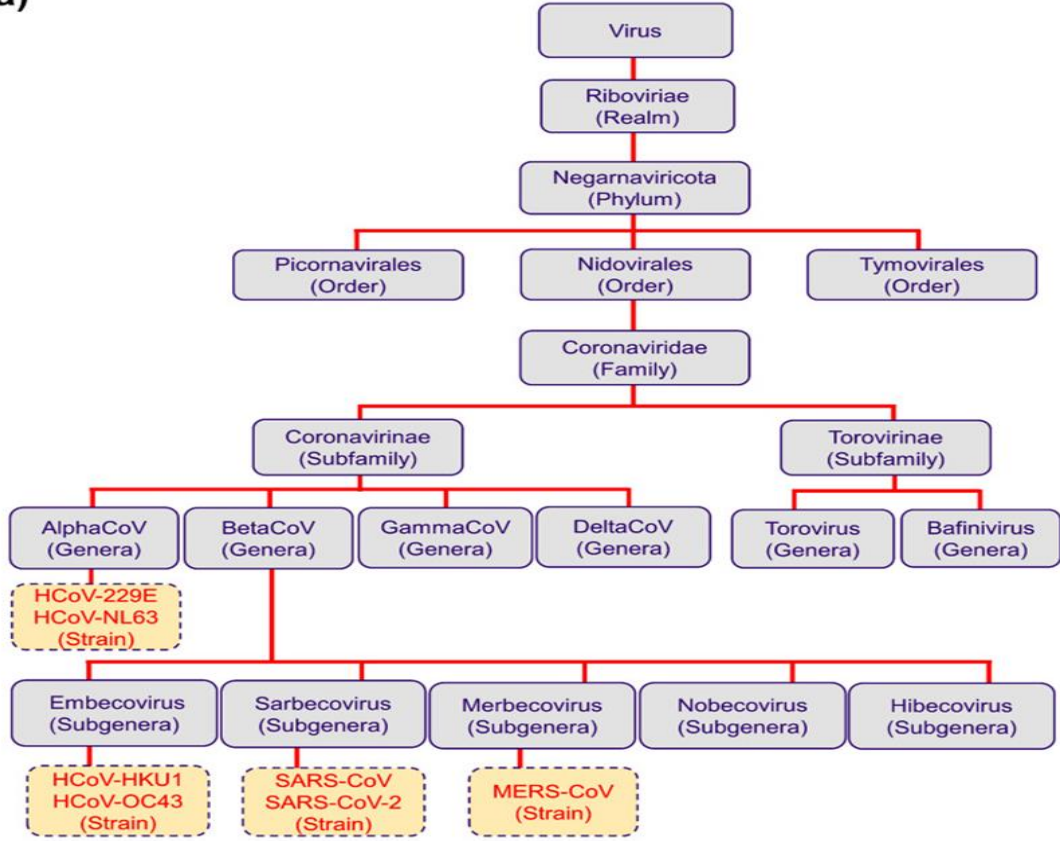
Koronaviruslar, *Nidovirales* takımının *Coronaviridae* ailesindeki *Coronavirinae* alt ailesine aittir ve bu alt aile dört cins içerir: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* ve *Deltacoronavirus*. Farklı koronavirüsler, çeşitli konak aralığı ve doku tropizmi sergiler. Genellikle alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler memelileri enfekte eder. Buna karşılık, gamakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler kuşları ve balıkları enfekte eder, ancak bazıları memelileri de enfekte edebilir (13,14).

2019 yılına kadar insanları enfekte ettiği ve solunum yolu hastalıklarına neden olduğu bilinen yalnızca altı CoV bilinmekteydi. Bunlar; HCoV-229E (alfakoronavirüs), HCoV-NL63 (alfa koronavirüs), HCoV-OC43 (beta koronavirüs), HCoV-HKU1 (betakoronavirüs), SARS-CoV (betakoronavirüs), MERS-CoV (betakoronavirüs) (15).

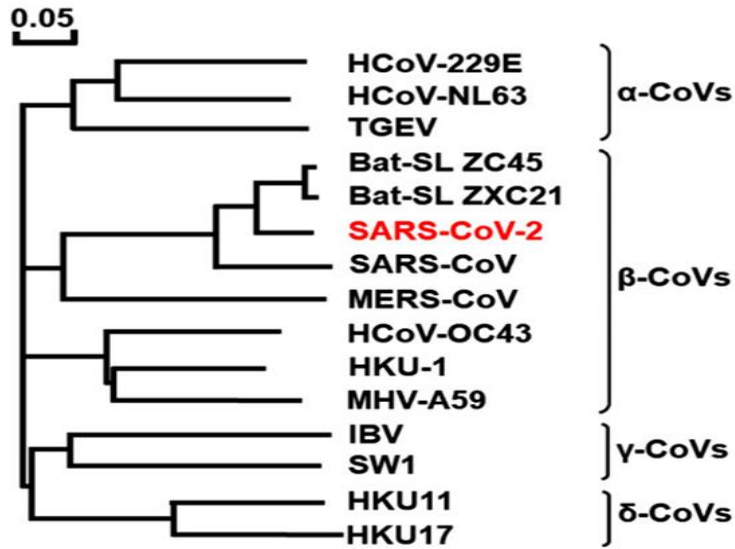
İnsanlarda ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan şehrinde keşfedilen yeni koronavirüs, önce 2019-nCoV olarak adlandırıldı ve daha sonra türlerle taksonomik ve genomik ilişkileri nedeniyle Uluslararası Virus Taksonomi Komitesinin (ICTV) bir çalışma grubu olan *Coronaviridae* Çalışma Grubu (CSG) tarafından SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı (16).

Tüm genom için yapılan ilk filogenetik analizde, SARS-CoV-2'nin, yarasalarda bulunan SARS-CoV ve SARS ile ilgili koronavirüslerde (SARSr-CoV'ler) kümелendiği ve *Betacoronavirus* cinsinin *Sarbecovirus* alt cinsine yerleştiği gösterilmiştir. Bu analiz SARS-CoV-2'nin SARS ve MERS ile sırasıyla, yaklaşık %79 ve %50 dizi özdeşliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. SARS-CoV-2'nin, MERS-CoV'dan çok SARS-CoV'a benzer olduğu saptanmıştır. Homoloji modelleme çalışmalarına dayanarak, SARS-CoV-2'nin yarasa (*Rhinolophus affinis*) koronavirüsü olan BatCoV RaTG13 ile %96,2 benzer olduğu gösterilmiştir (17). (Şekil 1)

(a)



(b)

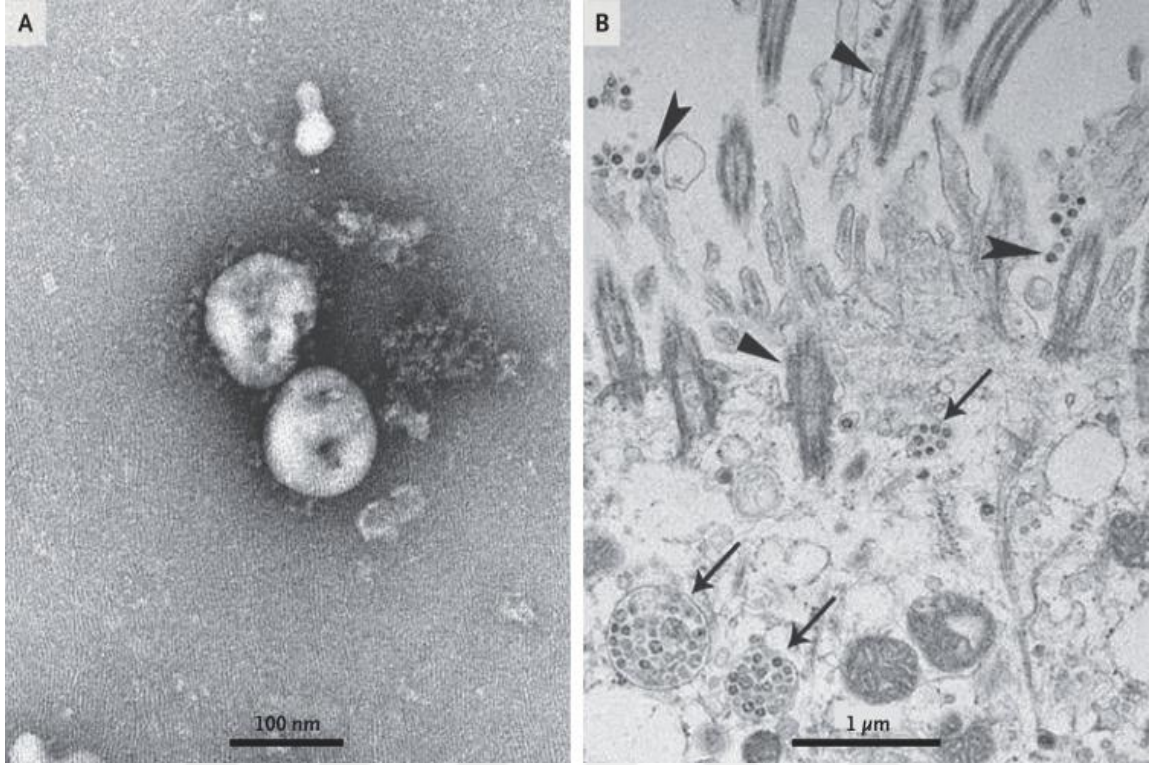


Şekil 1. İnsan koronavirüslerinin taksonomik sınıflandırması ve filogenetik ağaç analizi (12).

2.2.2. Fenotipik Özellikleri ve Genomik Yapısı

Viral partiküller, 100 ila 120 nm çapında ve zarflıdır. Koronavirüsler, viral partiküllerin yüzeyindeki (yaklaşık 20 nm uzunluğunda) spike protein çıkıntıları ile karakterize olduğu ve elektron mikroskopik görünümü bir tacı (korona) andırdıkları için

"koronavirüsler" olarak adlandırılır. Elektron mikroskopisinde, SARS-CoV-2 partikülleri bir miktar pleomorfizm ile beraber genellikle küreseldir (18).



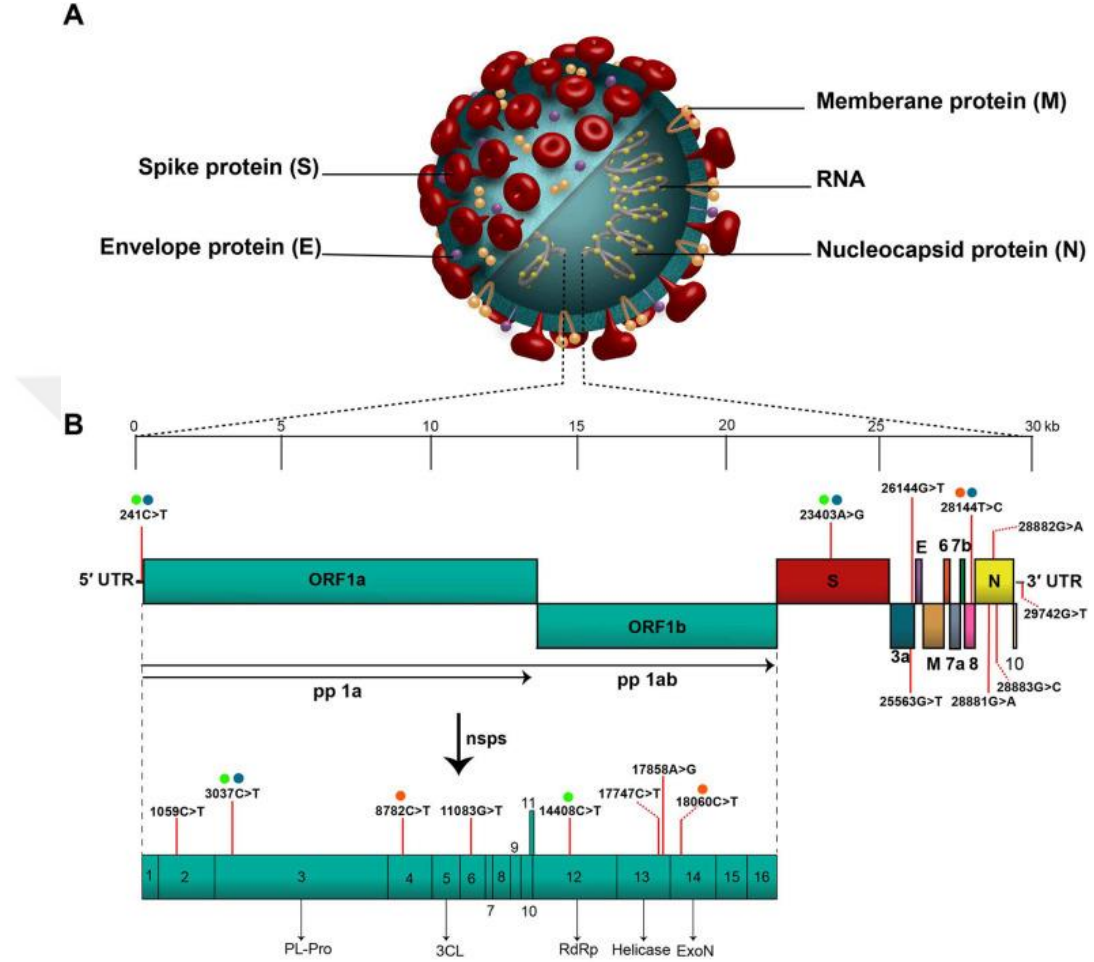
Şekil 2. SARS-CoV-2 nin transmisyon elektron mikroskobu ile görünümü (18).

Şekil 2A'da SARS-CoV-2 virüsü görülmekte. Şekil 2B'de insan solunum yolu epitel hücresinde SARS-CoV-2 partikülleri görülmektedir. Okbaşı işareti ekstrasellüler virüs partiküllerini, ok işareti virüs komponentleri tarafından oluşturulan inklüzyon cisimciklerini, üçgen işareti siliyayı göstermektedir.

Koronavirüslerin genomu; segmentsiz, pozitif polariteli, tek sarmallı bir RNA'dır (+ssRNA) (19). Koronavirüsler, bilinen tüm RNA virüsleri arasında en büyük genoma (26,4–31,7 kb) sahiptir ve G+C içerikleri %32 ile %43 arasında değişmektedir (20).

SARS-CoV-2 virüsü, β -koronavirüslerin (β -CoV) B soyuna aittir; bu aile, replikaz poliproteinlerinin translasyonu için bir mRNA olarak işlev görmesine izin veren, 5' başlık yapısı ve 3' poli-A kuyruğu olan, zarflı, segmentsiz, pozitif polariteli tek sarmallı bir RNA virüs genomu içerir. Tüm genom analizlerinin verilerine dayanarak, β -CoV'lerin genomu, spike (S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsid (N) dahil olmak üzere dört yapısal ve birçok yapısal olmayan proteini kodlar. SARS-CoV-2 genom dizileri, 27 proteini kodlayan 12 açık okuma çerçevesi (ORF) içerir. Genomik organizasyon, soldan sağa doğru 5'-lider dizi-ORF1/ab-S-ORF3a-E-M-ORF6a-ORF7a-ORF7b-ORF8-N-ORF10-3' içerir. ORF'lerin her biri arasındaki kavşakta ve ayrıca β -CoV'lerin lider dizisinin aşağısındaki genomik RNA'nın 5' ucunda transkripsiyon

düzenleyici diziler (TRS) yer alır. SARS-CoV-2'nin RNA'sının yaklaşık üçte ikisi, 16 yapısal olmayan protein (nsp1-16) ile en büyük ORF olarak kabul edilen ORF1a/b bölgesini içerir. 3'-terminaline yakın genomun kalan üçte biri, yapısal ve aksesuar proteinleri kodlayan ORF'leri içerir (21). (Şekil 3)



Şekil 3. SARS-CoV-2'nin referans dizisine (EPI_ISL_412026) dayalı yapısının ve genom organizasyonunun şematik sunumu (21).

2.2.3. Viral Proteinler ve Görevleri

Spike Proteini (S)

S proteini homotrimerik yapıda olup tip 1 membran glikoproteinidir. Viral yüzeydeki çıkıntıları oluşturur ve konak reseptörlerine bağlanmadan sorumludur (13). S proteinindeki değişiklikler, konak çeşitliliğini ve doku tropizmini büyük oranda etkiler. S1 ve S2 olarak adlandırılan iki fonksiyonel alt üiteden oluşur. S1 alt birimi, N-terminal alanından (NTD) ve reseptör bağlanma alanından (RBD) oluşur. S1 alt ünitesi perifereldir ve konak reseptörü ACE2 (anjiyotensin dönüştürücü enzim 2) ile etkileşip

virionu hücre membranına bağlayarak enfeksiyonu başlatır. S2 alt birimi, füzyon peptidi (FP), heptad tekrar 1 (HR1), merkezi sarmal (CH), bağlayıcı alan (CD), heptad tekrar 2 (HR2), transmembran alanı (TM) ve sitoplazmik kuyruk (CT) içerir. S2, sınıf I viral füzyon proteini olarak viral ve hücresel membranların füzyonuna aracılık eder. Genel olarak bakıldığında, S proteini, konak hücreye bağlanmayı, hücre füzyonunu sağlar (22,23,24).

Membran proteini (M)

SARS-CoV-2 M proteini, 222 aminoasit uzunluğunda bir tip III transmembran glikoproteinidir ve en çok bulunan yapısal proteindir. M proteininin üç ana alanı vardır: N-terminal ekto-alanı, ardından üç transmembran sarmal (TMH1-TMH3) ve C-terminal endo-alanı. M proteini kendisiyle (homotipik) ve diğer yapısal proteinler olan S, E ve N (heterotip etkileşimi) ile etkileşime girer. Bu etkileşimler, virüsün konak membranından tomurcuklanma ile salınmasında ve yeni virionlarının oluşturulmasında kritik öneme sahiptir (25). M proteini ayrıca, viral RNA'yı kaplamak için nükleokapsid proteini ile etkileşime girer ve bu bağlanma N protein-RNA kompleksinin stabilizasyonunu sağlar (26,27), virionları şekillendirir ve membran eğriliğini destekler (13). Ayrıca M proteininin apoptozu indüklediği gösterilmiştir (26). M proteini güçlü bir humoral tepkiye neden olur ve SARS-CoV M proteininin TM1 ve TM2 bölgelerinde antijenik epitoplar tanımlanmıştır (25).

Zarf proteini (E)

E proteini, başlıca yapısal proteinlerin en küçüğüdür ve viral partiküllerin birleştirilmesi (assembly), tomurcuklanma, zarf oluşumu ve patogenezi ile ilişkilidir (28). Replikasyon döngüsü sırasında enfekte hücre içinde bol miktarda eksprese edilirken, virion zarfına sadece küçük bir kısım dahil edilir (27). E proteini, konak hücre membranında iyon taşınmasını sağlayan protein-lipid porları oluşturur ve viroporinler olarak hareket ettiği bilinmektedir (2). Yüksek oranda korunduğu tespit edilen E proteini, SARS-CoV-2 aşısı ve patojeniteyi azaltmaya yönelik terapötik müdahaleler için potansiyel bir hedef olabilir (28).

Nükleokapsid proteini (N)

Nükleokapsid proteini, koronavirüsler için önemli bir yapısal proteindir. SARS-CoV N proteini ile %90,52 dizi özdeşliği ile yüksek homoloji paylaşır. Enfeksiyon sırasında viral RNA ile birlikte konak hücreye girerek replikasyonu kolaylaştırır. Virüs

partiküllerinin bir araya gelmesini ve virionların salınmasını sağlar. En önemli işlevi, viral RNA genomunu çepeçevre sararak, viral RNA ile ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur. Böylece viral genomu korur, genomun zamanında replikasyonunu ve güvenli bir şekilde taşınmasını sağlar (6,29).

SARS-CoV-2 nükleokapsid proteini beş bölgeden oluşur: N-terminal kuyruk bölgesi (1-40 rezidü, IDR1), N-terminal RNA bağlanma alanı (41-173 rezidü, N1b veya N-NTD olarak adlandırılır), Ser/Arg zengin bağlayıcı bölge (174- 249 rezidü, IDR2/LKR olarak adlandırılır), C-terminal dimerizasyon alanı (250-364 rezidü, N2b veya N-CTD olarak adlandırılır) ve C-terminal doğal düzensiz bölge (365-419 rezidü, IDR3 olarak adlandırılır) (30). Pozitif yüklü aminoasitler nedeniyle, N-NTD ve N-CTD'nin viral RNA genomuna bağlandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, SARS-CoV-2 N proteininin moleküler özellikleri henüz keşfedilmeyi beklemektedir (6).

N proteini, enfeksiyon sırasında bol miktarda eksprese edilir ve yüksek oranda immünojeniktir. N proteini konak bağışıklığı ve hastalık teşhisi için güçlü ve önemli bir antijendir. Ayrıca interferon (IFN) antagonisti işlevi vardır. N proteini aşı geliştirmede ve serolojik testlerde sıklıkla kullanılır (6,13).

Yapısal olmayan proteinler (NSP)

Yapısal proteinlere ek olarak, viral genom, replikasyon ve viral partiküllerin bir araya getirilmesi süreçlerinde sayısız rol oynayan birçok yapısal olmayan proteini kodlar. Bu proteinler, erken transkripsiyon regülasyonunu, helikaz aktivitesini, immünomodülasyonu, gen transaktivasyonunu modüle ederek ve antiviral yanıtı karşı koyarak viral patogeneizde yer alır (2). SARS-CoV-2'de Nsp'lerin bazı temel işlevleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. SARS-CoV-2'deki yapısal olmayan proteinlerin listesi ve moleküler işlevleri

Protein	Açıklama	İşlev
Nsp1	Viral replikazın N-terminal ürünüdür.	Lider protein konak transkripsiyon inhibitörü. RNA'nın replikasyonu ve işlenmesine aracılık eder. mRNA degradasyonunda yer alır
Nsp2	Viral replikasyonun düzeltilmesi için gerekli bir replikaz ürünüdür	Konak hücredeki inhibitin 1 (PHB1) and inhibitin 2 (PHB2) ile etkileşime girerek konak hücrede hayatta kalma sinyal yolunun modülasyonu
Nsp3	Papain benzeri bir proteinazdır.	Poliproteini farklı proteinlerine ayırmak için bir proteaz olarak işlev görür
Nsp4	Membran kapsayan bir protein, transmembran bölge 2'yi (TM2) içerir	Viral replikasyon-transkripsiyon kompleksini modifiye ER membranlarına tutturduğu düşünülmektedir
Nsp5	3C-benzeri proteinaz ve ana proteinaz	Replikasyon sırasında viral poliprotein işlemede yer alır
Nsp6	Transmembran alanı	Konak endoplazmik retikulumdan otofagozomların ilk indüksiyonunda rol oynar
Nsp7	RNA'ya bağımlı bir RNA polimeraz	nsp8 ile kompleks oluşturur
Nsp8	Multimerik RNA polimeraz	nsp7 ile kompleks oluşturur
Nsp9	Tek sarmallı bir RNA bağlayıcı viral protein	Bir ssRNA bağlayıcı protein olarak hareket ederek viral replikasyona katılır
Nsp10	Büyüme faktörü benzeri protein	Viral transkripsiyonda hem nsp14 3'-5' ekzoribonükleaz hem de nsp16 2'- O-metiltransferaz aktivitelerini uyararak viral mRNA'ların başlık metilasyonunda önemli bir rol oynar
Nsp11	13 aminoasitten oluşmuştur ve Nsp12'nin ilk bölümüyle aynıdır.	Bilinmiyor
Nsp12	RNA'ya bağımlı RNA polimeraz	Viral RNA genomunun replikasyonu ve transkripsiyonundan sorumludur
Nsp13	Çinko bağlama alanı, NTPaz/helikaz alanı, RNA 5'-trifosfataz	ATP'yi bağlayan bir sarmal çekirdek alanı. Çinko bağlayıcı alan, replikasyon ve transkripsiyonda yer alır
Nsp14	Eksoribonükleaz alanı düzeltme	3' ila 5' yönünde hareket eden eksoribonükleaz aktivitesi ve N7-guanin metiltransferaz aktivitesi
Nsp15	EndoRNaz	Endoribonükleaz aktivitesi
Nsp16	2'-O-riboz metiltransferaz	Viral mRNA'ların 5' başlık yapısının metilasyonuna aracılık eden metiltransferaz

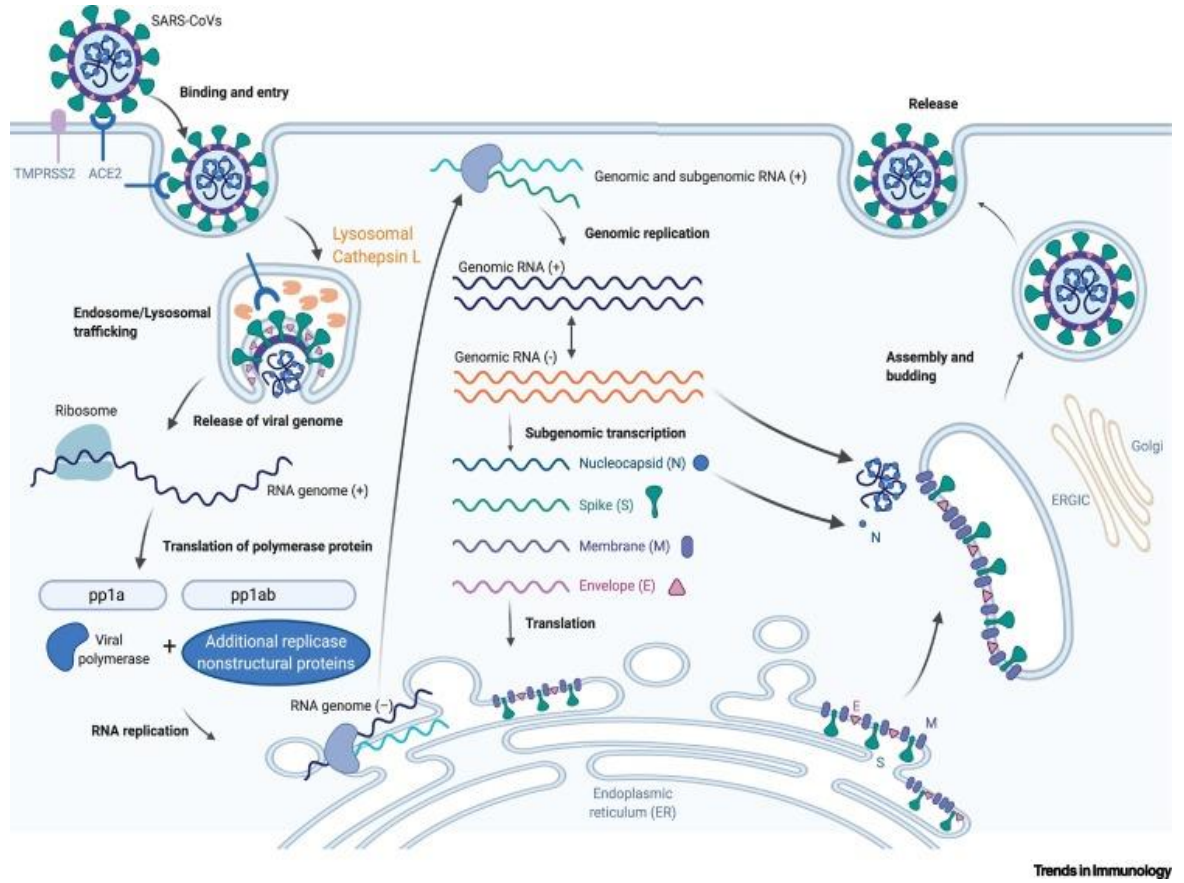
2.2.4. Viral Replikasyon

SARS-CoV-2, viral zarf yüzeyinde bulunan spike glikoproteini ile membranda yer alan ACE2 reseptörlerine bağlanarak konak hücreye girer. CD147 gibi diğer reseptörlerin de SARS-CoV-2'nin konak hücreye girişine aracılık etmesi mümkündür. Bağlanmadan sonra, insan transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) spike proteinini bölerek aktive eder. Bu durum SARS-CoV-2'nin endositoz yoluyla hücrelere girmesini veya viral zarfın konak hücre membranıyla doğrudan füzyonunu sağlar. Hücreye girdikten sonra, mesajcı RNA (mRNA) olarak işlev gören viral RNA, viral replikasyon enzimlerini üretmek için konak hücre ribozomları tarafından translasyona uğrar. Yeni oluşan viral partikülleri birleştirmede gerekli olan bileşenlerin sentezi için yeni RNA genomları ve mRNA'lar üretilir (31).

Pozitif sarmallı viral RNA, konak hücre mekanizmasını kullanarak bir polipeptit zincirine çevrilir. Konak hücrenin içinde ORF1a, ORF1ab, pp1a ve pp1a/b poliproteinlerine dönüşür. Bu poliproteinlerden nsp3, yani papain benzeri proteaz (PL pro) ve nsp5, yani ana proteaz (M pro /3CL pro) tarafından gerçekleştirilen proteolitik bölünme yoluyla 16 nsp üretilir. Yapısal ve aksesuar proteinlerin çevrildiği genomik (gRNA) ve subgenomik RNA (sgRNA)'nın daha fazla sentezi için; PL pro, M pro /3CL pro ve nsp12 (RdRP), nsp7 ve nsp8 kofaktörleri ile bir replikasyon-transkripsiyon kompleksi (RTC) oluşturulur. Daha sonra, iç içe geçmiş bir dizi sgRNA'lar ve gRNA'lar RTC kompleksi tarafından sentezlenir. Genomik RNA'dan, pozitif genomik ve sgRNA dizilerini oluşturmak için kullanılan ara negatif iplikli RNA'lar sentezlenir. Negatif iplikli sgRNA'lar, subgenomik mRNA'ların üretimi için şablon görevi görür. Subgenomik mRNA'lar, ortak 5'-lider ve 3'-terminal dizilere sahiptir. 3'-terminaline yakın genomun üçte birindeki diğer ORF'ler en az dört ana yapısal proteini kodlar: spike (S), membran (M), zarf (E) ve nükleokapsid (N) proteinleri. Bu dört ana yapısal proteinin yanı sıra farklı koronavirüsler; hemaglütinin esteraz proteini, 3a/b proteini ve 4a/b proteini gibi özel yapısal ve yardımcı proteinleri kodlar. Tüm yapısal ve yardımcı proteinler, koronavirüslerin sgRNA'larından sentezlenir (13,31,32).

SARS-CoV-2, kendi proteinlerinin translasyonu için konak transfer RNA (tRNA)'sını kullanır. Yüksek düzeyde viral transkript, virüs translasyonunu kolaylaştırır ve konak translasyonunu baskılar. Translasyon ile oluşan yapısal ve yardımcı proteinler endoplazmik retikulum (ER)'dan salınır. Özel bir ER-Golgi ara kompartmanı (ERGIC),

bu viral partikülleri sekretuar yollar boyunca taşır. ERGIC, koronavirüslerin karakteristik bir özelliğidir. Virion benzeri parçacıkları bir araya getirmek için viral protein-protein etkileşimi gereklidir ve buna M proteinini aracılık eder. Daha önce çevrilen gRNA, N proteinini ile etkileşime girerek RNP kompleksini oluşturur. N proteinini, RNA ile “ip üzerindeki boncuklar” yapısına benzeyen bir kompleks oluşturur. Bu kompleks daha sonra ERGIC'in M proteinine bağlanır. Tamamen birleştirilmiş virion daha sonra ekzositoz yoluyla hücre dışına salınır. Altı transmembran sarmallı bir dimer olan ORF3a tarafından kodlanan protein, virüs salınımına katılan iyon kanalını oluşturur (13,31,32). (Şekil 4)



Şekil 4. SARS-CoV-2 yaşam döngüsü (33)

2.3. Epidemiyoloji

2.3.1. Salgının Mevcut Durumu

Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), ilk kez Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan şehrinde etiyolojisi bilinmeyen bir pnömoni salgını hakkında bilgilendirildi. 30 Ocak 2020'de DSÖ, salgınının uluslararası öneme sahip bir halk sağlığı acil durumu (PHEIC) olduğunu ilan etti. 11 Şubat 2020'de hastalık resmi olarak Koronavirüs Hastalığı-2019 (COVID-19) olarak adlandırdı ve Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi hastalık etkenini SARS-CoV-2 olarak adlandırdı (24).

DSÖ verilerine göre 8 Ekim 2021 tarihi itibarıyla dünya çapında COVID-19 tespit edilen toplam 236.599.025 onaylanmış vaka ve 4.831.486 ölüm bildirildi. Dünya genelinde bölgelere bakıldığında toplam vaka ve ölüm sayıları en yüksek Amerika'da (91.014.944 vaka, 2.235.162 ölüm); ikinci sırada Avrupa'da (71.486.376 vaka, 1.355.383 ölüm); üçüncü sırada Güneydoğu Asya'da (43.300.384 vaka, 680.736 ölüm) tespit edildi (34). Aynı tarih itibarıyla Türkiye'de toplam 7.182.943 onaylanmış vaka ve 64.264 ölüm tespit edildi (35).

Dünya genelinde toplam 6.262.445.422 aşı dozu uygulandı (34). Türkiye de 112.225.352 aşı dozu uygulandı (36).

Toplam kümülatif onaylanmış vaka sayısı, SARS dönemindeki vaka sayılarının çok üzerine geçmiştir. SARS-CoV ve MERS-CoV'nin ortaya çıkmasından sonra, SARS-CoV-2, bu yüzyılın üçüncü zoonotik salgın etkeni olan koronavirüstür (37).

2.3.2. Rezervuar

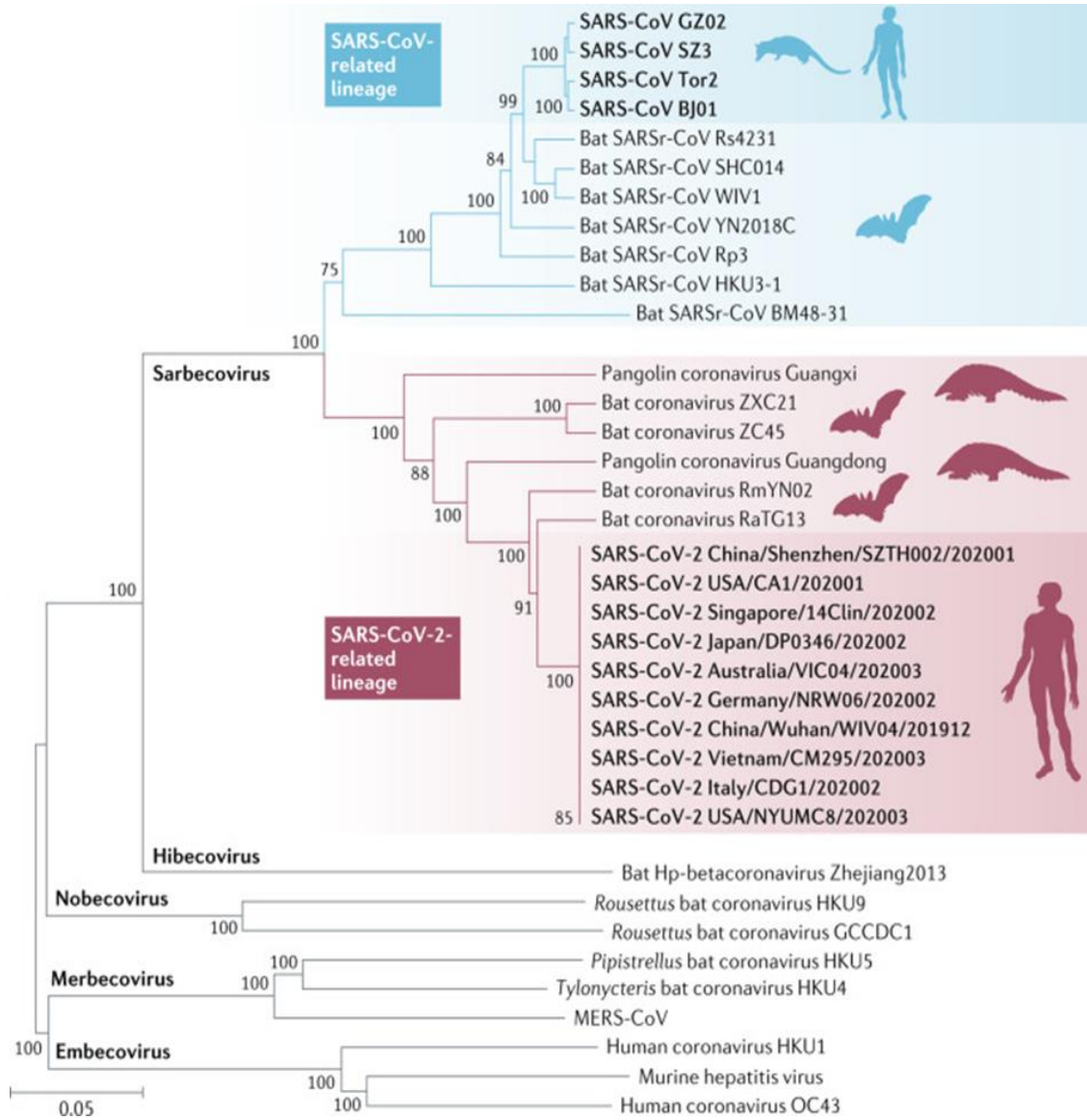
Koronavirüsler, yarasalar tarafından doğal olarak barındırılır ve evrimsel olarak şekillendirilir. Gerçekten de, insanlardaki koronavirüslerin çoğunun yarasa rezervuarından türediği ortaya konmuştur (38).

Filogenetik analizlerde, tespit edilen yarasa koronavirüslerinin SARS-CoV-2 ile oldukça benzer olduğu saptanmıştır. Yunnan eyaletinde, *Rhinolophus affinis*'te tespit edilen bir yarasa koronavirüsünde (BatCoV RaTG13) tam uzunlukta genomik dizileme gerçekleştirildi. Analizde genom genelinde %96,2 oranında dizi özdeşliği saptanarak, RaTG13 ve SARS-CoV-2'nin oldukça benzer olduğunu gösterildi (39). Yunnan eyaletinde yapılan başka bir çalışmada, *Rhinolophus malayanus*'ta başka bir

koronavirüs rapor edilmiştir. 'RmYN02' olarak adlandırılan bu yeni yarasa virüsü, SARS-CoV-2 ile genom genelinde %93,3 oranında dizi özdeşliği saptanmıştır (40). Başka bir filogenetik analizde ise, Doğu Çin'de *Rhinolophus pusillus* yarasalarında daha önce tespit edilen ZC45 ve ZXC21 yarasa koronavirüslerin *Sarbecovirus* alt cinsinin SARS-CoV-2 soyunda kümелendiği gösterilmiştir. SARS-CoV-2 ile yakından ilişkili çeşitli yarasa koronavirüslerinin keşfi, yarasaların olası SARS-CoV-2 rezervuarları olduğunu düşündürmektedir (41) (Şekil 5).

Yarasaların yanı sıra pangolinlerden izole edilen koronavirüsün, SARS-CoV-2 ile yüksek genetik benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi pangolinlerin ara konak olma potansiyelini düşündürmektedir (42,43,44).

Yaban hayatının dışında insanlarla yakın teması olan evcil hayvanların SARS-CoV-2'ye karşı duyarlılığı araştırılmıştır. Köpeklerin virüse karşı düşük duyarlılığa sahip olduğu ve domuz, tavuk ve ördeklerin SARS-CoV-2'ye duyarlı olmadığı gösterilmiştir. SARS-CoV-2'nin yaban gelinciğinin üst solunum yollarını enfekte ettiği, ancak kendi aralarında zayıf bir şekilde bulaştığı bulunmuştur. Kedilerde virüsün burun ve boğazda çoğaldığı ve alt solunum yollarında inflamasyona neden olduğu, kedi çiftleri arasında hava yoluyla bulaşma meydana geldiği gösterilmiştir (45).

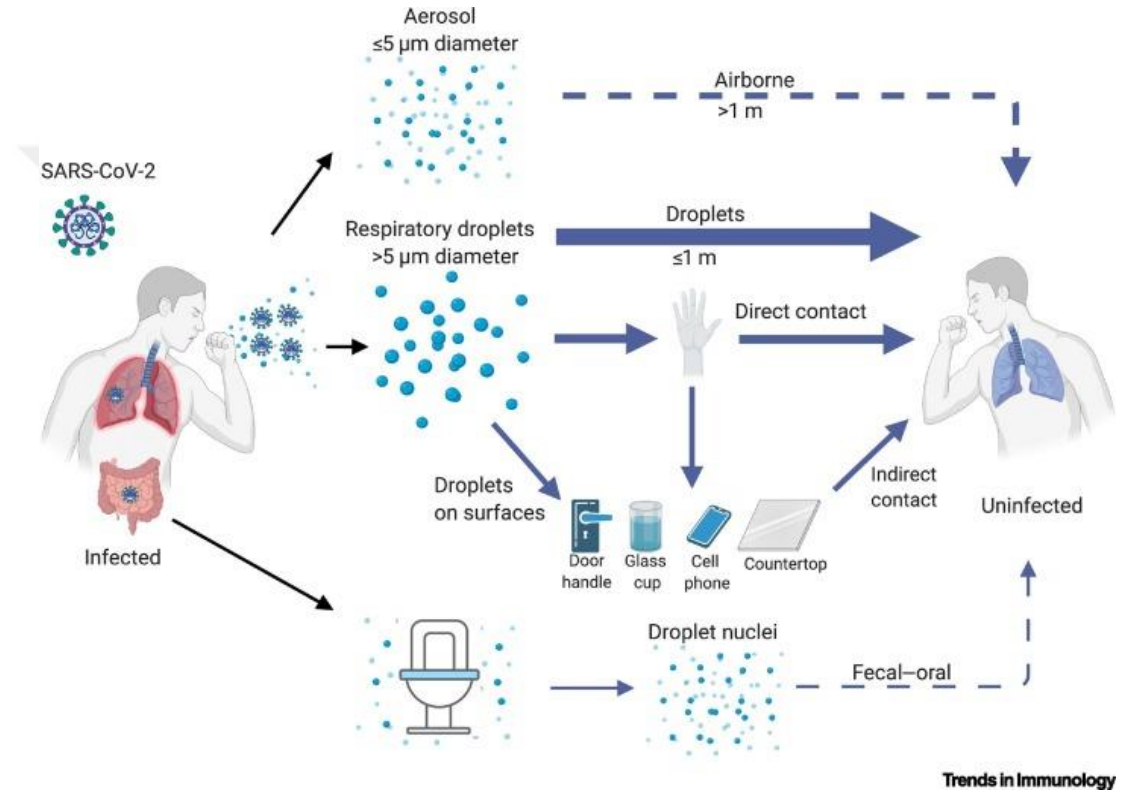


Şekil 5. SARS-CoV-2, SARSr-CoV'ler ve diğer betakoronavirüslerin tam uzunluktaki genom dizilerinin filogenetik ağacı (1)

2.3.3. Bulaş ve Yayılma

İnsan koronavirüsleri en belirgin şekilde solunum damlacıkları ($> 5 \mu\text{m}$) yoluyla bulaşır; ancak SARS-CoV-2 salgını sırasında aerosollerle ($\leq 5 \mu\text{m}$), kontamine yüzeylerle doğrudan temas ve fekal-oral yolla bulaşma da bildirilmiştir. Solunum damlacıkları yoluyla doğrudan bulaşma, hem üst solunum yollarında hem de alt solunum yollarında üretken (prodüktif) SARS-CoV-2 replikasyonunu ve aktif öksürük sergileyen yakın temaslılar arasında insandan insana yayılımını göstermektedir. Enfekte bir kişiden naif bir kişiye doğrudan temas, özellikle aile üyeleri arasında yakın etkileşimlerin olduğu evlerde bulaşmanın önemli nedenlerinin başında gelmektedir. SARS-CoV-2'nin

fomitelere (örneğin, kapı kolları) yerleşmesinden sonra bulaşıcılığı araştırılmaktadır; ancak damlacık veya temas yoluyla oluşan bulaşmadan daha az sıklıkta ve büyük olasılıkla bulaşma için bir bileşik faktördür. Hem havadan hem de fekal-oral yoldan insandan insana bulaşma, daha önceki SARS-CoV salgınında rapor edilmiş, ancak mevcut SARS-CoV-2 salgınında henüz kanıtlanmamıştır (33) (Şekil 6). Güncel bilgilere göre, hamile kadınlardan fetüse transplental geçiş tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, doğum sonrası bulaşmaya bağlı yenidoğan hastalığı tanımlanmıştır (46).



Şekil 6. SARS-CoV-2 bulaşma yolları (33)

Temel üreme sayısı veya hızı (R_0), patojenin salgın potansiyelini gösteren bir ölçüdür. Bu sayı, enfekte bir kişinin virüsü yayabileceği ortalama kişi sayısı olarak tanımlanır. Standart salgınlara göre, R_0 'ın 1'den büyük olması, hastalıkların potansiyel olarak yayılmasına neden olabilir. SARS-CoV-2'nin temel üreme hızı 2 ile 3 arasında değişir. Bu anlamda, enfekte olmuş her bir kişi virüsü 2 veya 3 kişiye daha bulaştıracaktır. "Diamond Princess yolcu gemisinden" daha yüksek tahminler (14,8'e kadar) bildirilmiştir. Sayılar diğer parametrelerin yanı sıra hareketlilik, kısıtlama önlemleri, duyarlılık, risk altındaki nüfus ile ilişkiye göre değişir (47,48).

R_0 tahminlerinin farklılığı, en iyi şekilde, tek bir vakadan bulaşma olasılığı varyanslarının bireyler arasında yüksek olması ile açıklanabilir. SARS-CoV-2, birkaç büyük toplulukta çok etkin bulaşma göstermiştir. Bu varyans, aşırı dağılım parametresi k (kappa) ile açıklanabilir; k ne kadar düşükse, bireyler arası aktarım hızlarının varyansı o kadar yüksek olur. Mevcut R_0 (2,5) ve k (0,1) tahminlerini kullanarak, enfeksiyonların %60'ı bulaşmazken, %10'u bulaşmaların %80 ve fazlasından sorumludur (48).

Ayrıca SARS-CoV'nin bulaşma dinamiklerinin aksine, SARS-CoV-2'nin semptomatik olmayan/presemptomatik yayılımına ilişkin kanıtlar mevcuttur. Bu bulgu, SARS-CoV-2'nin enfeksiyonun erken döneminde boğazda kolonize olma ve çoğalma yeteneğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, pandemi boyunca SARS-CoV-2'nin asemptomatik yayılımı belgelenmiştir (33).

Kuluçka süresi ortalama 5,7 gündür. Tüm enfeksiyonların %99'u 2. gün ile 14. gün arasında gerçekleşir. Latent dönem muhtemelen 1 gün daha kısadır. Medyan seri enfeksiyon aralığı başlangıçta 7,6 gün kadar yüksek olarak tahmin edilmiştir, daha sonraki gözlemler bu parametreyi 4 güne yaklaştırmıştır (48).

Tablo 2. SARS-CoV-2'nin epidemiyolojik parametreleri (48)

Parametre	Değer
Temel çoğaltma numarası R_0	2-3 (Görüş birliği) Aralık: 1,7–14,8
Dağılım katsayısı (k)	0,1 (0,05-0,2)
Kuluçka süresi	Ortalama 5,7 gün, 2-14 gün içinde enfeksiyonların %99'u
Seri aralık	4,0

SARS-CoV-2 Varyantları

Koronavirüslerin ekzonükleaz enzimi *in vitro* replikasyon hata oranını yaklaşık 15 ila 20 kat azaltır ve influenzadan yaklaşık 10 kat daha düşük bir *in vivo* viral mutasyon oranı verir. Bu mutasyonlar, farklı viral soyların oluşumuyla sonuçlanır. Bununla birlikte, farklı mutasyonlara sahip varyantlar aynı konağı enfekte ettiğinde, mutasyonlar birikir ve rekombinasyon süreci boyunca daha fazla çeşitlilik üretirler. SARS ile ilgili

farklı koronavirüsler arasındaki rekombinasyon SARS-CoV-2'nin ortaya çıkmasına yol açmış olabilir ve çoğu dizinin benzerliği nedeniyle tespit edilmesi zor olsa da, dolaşımdaki SARS-CoV-2 varyantları arasında bir dereceye kadar rekombinasyon meydana gelmektedir (49).

DSÖ ulusal yetkililerle, kurumlarla ve araştırmacılarla işbirliği içinde, Ocak 2020'den bu yana SARS-CoV-2'nin gelişimini izlemekte ve değerlendirmektedir. 2020'nin sonlarında, küresel halk sağlığına yönelik artan bir risk oluşturan varyantların ortaya çıkmasından dolayı küresel izleme ve araştırmaya öncelik vermiştir. GISAID, Nextstrain ve Pango tarafından SARS-CoV-2 genetik soylarının adlandırılması ve izlenmesi için oluşturulmuş isimlendirme sistemleri kullanılmaya devam etmektedir. DSÖ 9 Temmuz 2021 itibarıyla yedi endişe uyandıran varyant (VOC) ve dört dikkate alınması gereken varyant (VOI) belirlemiştir (50).

Endişe Uyandıran Varyantlar (VOC)

VOI tanımına uyan ve küresel halk sağlığı açısından aşağıdaki değişikliklerden bir veya birden fazlasıyla ilişkili olan:

- COVID-19 epidemiyolojisinde bulaşıcılıkta artış veya olumsuz değişiklik
- Virülansta artış veya klinik hastalık sunumunda değişiklik
- Halk sağlığı ve sosyal önlemlerin veya mevcut tanı testlerinin, aşıların, tedavilerin etkinliğinde azalma (50)

Tablo 3: Endişe Uyandıran Varyantlar (VOC) (50)

DSÖ sınıflaması	Pango sınıflaması	Nextstrain sınıflaması	İlk görüldüğü ülke ve tarih	Kabul tarihi
Alfa	B.1.1.7	20I (V1)	Birleşik Krallık, Eylül 2020	18 Aralık 2020
Beta	B.1.351	20H (V2)	Güney Afrika, Mayıs 2020	18 Aralık 2020
Gama	S.1	20J (V3)	Brezilya, Kasım 2020	11 Ocak 2021
Delta	B.1.617.2	21A	Hindistan, Ekim 2020	VOI: 4 Nisan 2021 VOC: 11 Mayıs 2021

Dikkate alınması gereken Varyantlar (VOI)

Bir SARS-CoV-2 varyantı:

- Bulaşıcılık, hastalık şiddeti, immüniteden kaçış, tanısal veya terapötik kaçış gibi virüs özelliklerini etkilediği bilinen veya tahmin edilen genetik değişikliklerle VE
- Zaman içinde artan vaka sayısının yanı sıra artan göreceli prevalansı olan birden fazla ülkede önemli topluluk bulaşmasına veya birden fazla COVID-19 kümesine veya küresel halk sağlığı için ortaya çıkan bir riske işaret eden diğer belirgin epidemiyolojik etkilere neden olan (50)

Tablo 4: Dikkate alınması gereken Varyantlar (VOI) (50)

DSÖ sınıflaması	Pango sınıflaması	Nextstrain sınıflaması	İlk görüldüğü ülke ve tarih	Kabul tarihi
Lambda	C.37	21G	Peru, Aralık 2020	14 Haziran 2021
Mü	B.1.621	21H	Kolombiya, Ocak 2021	30 Ağustos 2021

İzleme Altındaki Varyantlar (VUM)

Gelecekte bir risk oluşturabileceğine dair bazı belirtilerle birlikte virüs özelliklerini etkilediğinden şüphelenilen genetik değişikliklere sahip bir SARS-CoV-2 varyantı, ancak fenotipik veya epidemiyolojik etki kanıtı şu anda belirsizdir ve yeni kanıtlara kadar gelişmiş izleme ve tekrar değerlendirme gerektirir (50).

2.4. Patogenez

SARS-CoV-2, S proteini aracılığıyla ACE2 reseptörüne bağlanarak, nazofarengeal ve bronşiyal epitel hücrelerini ve pnömositleri hedefler. Konak hücrede bulunan TMPRSS2, ACE2'yi bölerek ve SARS-CoV-2 S proteinini aktive ederek virüsün konak hücreye girişini destekler. Virüsün reseptör aracılı endositoz yoluyla konak hücreye girişi, replikasyonu ve sonrasında hücreden salınımı gerçekleşir (51).

İnsanlarda ACE2'nin birincil fizyolojik işlevi, anjiyotensin I ve II peptitlerini, koruyucu kardiyovasküler fonksiyonlar sağlayan anjiyotensin 1-9 ve anjiyotensin 1-7'ye dönüştürmektir. SARS-CoV-2 ile enfeksiyon, ACE2 ekspresyonunda azalmaya ve renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde bozulmaya neden olarak ciddi inflamatuvar ve dolaşım bozukluğuna neden olur (51).

ACE2 solunum yolunda alveolar epitel hücreleri, trakea, bronşlar, bronşiyal seröz bezler, monositler ve alveolar makrofajlarda yaygın olarak eksprese edilir. Ayrıca, bir yüzey molekülü olarak kan damarlarının endotel hücrelerinde, bağırsak mukoza hücrelerinde, böbrek tübül epitel hücrelerinde, serebral sinir hücrelerinde ve vücudun bağışıklık hücrelerinde bulunur. Virüs bu hedef hücrelere girer ve çoğalır. Virüs daha sonra primer enfekte hücrelerden salınarak yeni hedef hücreleri enfekte eder (52).

Enfeksiyonun sonraki aşamalarında viral replikasyon hızlandığında epitelyal-endotelyal bariyer bütünlüğü tehlikeye girer. SARS-CoV-2 epitel hücrelerine ek olarak, pulmoner kapiller endotel hücrelerini enfekte ederek inflamatuvar yanıtı tetikler. Otopsi çalışmaları, endotelite ek olarak hava boşluklarını infiltre eden mononükleer hücreler ve makrofajlarla alveolar duvarın yaygın olarak kalınlaştığını göstermiştir. İnterstisyel mononükleer inflamatuvar infiltratlar ve ödem, bilgisayarlı tomografik görüntülemeye buzlu cam opasiteleri olarak görünür. Alveolar boşlukları hiyalin membran oluşumu ile dolduran pulmoner ödemi, erken faz akut respiratuvar distres sendromu (ARDS) takip eder (53).

ARDS için başlıca mekanizmalardan biri, SARS-CoV enfeksiyonunda immün efektör hücreler yoluyla büyük miktarlarda proinflamatuvar sitokinler (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , ve TGF β) ve kemokinlerin (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, ve CXCL10) salınımından kaynaklanan ölümcül kontrolsüz sistemik inflamatuvar yanıt olan sitokin fırtınasıdır. Sitokin fırtınası; pnömoni, ARDS, solunum yetmezliği, şok, organ yetmezliği ve ölüm dahil olmak üzere diğer komplikasyonlara neden olan viral sepsis ve inflamatuvar kaynaklı akciğer hasarını başlatabilir (54).

Şiddetli COVID-19'da, pıhtılaşmanın fulminan aktivasyonu ve pıhtılaşma faktörlerinin tüketimi meydana gelir. İnflame akciğer dokuları ve pulmoner endotel hücreleri mikrotrombüs oluşumuna neden olabilir ve kritik hastalarda derin ven trombozu, pulmoner emboli ve trombotik arteriyel komplikasyonlar gibi trombotik komplikasyonların artmasına neden olur (53).

Akut miyokard hasarı, tromboembolizm ve iskemik olaylar şeklinde kardiyovasküler sistem tutulumu bildirilmiştir. Bazı hastalarda beyin sapı işlev bozukluğu gibi nörolojik sorunlar ortaya çıkar ve yaygın akciğer hasarı olmasa bile solunum yetmezliğinden sorumlu olabilir. Nefrolojik ve gastrointestinal tutulumlar da bildirilmiştir. Bu patolojilerin birlikte ortaya çıkması çoklu organ yetmezliğine yol açabilir. Bununla birlikte, izole akciğer hasarı, COVID-19 ölümünün önde gelen nedeni gibi görünmektedir (55).

2.5. İmmün Yanıt

2.5.1. Doğal İmmün Yanıt

Doğal bağışıklık, konak savunmasının ilk hattıdır ve patojenlerin yayılmasını engellemede kilit rol oynar. Mikrobiyal antijenlere karşı spesifik reseptörler (yani antikorlar veya TCR'ler) üreterek çalışan adaptif bağışıklığın aksine, doğuştan gelen bağışıklık, mikrobiyal yapılarda bulunan genel moleküler yapıları tanımaya dayanır. Bu "patojenle ilişkili moleküler yapıları" (PAMP) tanıyan doğal immün sistem molekülleri ise; hücre yüzeyi veya endozomal Toll benzeri reseptörler (TLR), retinoik asit ile indüklenbilir gen I (RIG-I) ve NOD benzeri reseptörleri (NLR) içeren patern tanıma reseptörleri (PRR) olarak adlandırılır. SARS-CoV-2 ile ilişkili PAMP'ler, viral genomik ssRNA'yı ve viral replikasyon sırasında üretilen ara maddeleri, yani dsRNA'yı ve ayrıca viral proteinleri içerir. Bu PAMP-PRR etkileşimleri, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve IFN düzenleyici faktör 3 (IRF3) dâhil olmak üzere "inflamasyonu teşvik eden" transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır (55). Bu transkripsiyon faktörleri, IFN-I ve IFN-III ve farklı kemokinlerin üretilmesine neden olur. Bu kemokinler, aynı zamanda MIG, IP-10 ve MCP-1 gibi kemokinler üreten, lenfositleri toplama yeteneğine sahip olan ve daha sonra dendritik hücreler tarafından sunulan viral antijenleri tanıyacak olan doğal immün yanıt hücrelerini (polimorfonükleer lökositler, monositler, NK hücreleri, dendritik hücreler) çeker (56).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun, yüksek kemokin sekresyonu ile birlikte yeterli interferon stimüle edici gen (ISG) ekspresyonuna sahip Tip I ve III interferonların daha düşük üretimi nedeniyle antiviral genlerin transkripsiyonunda genel bir azalmaya yol açtığı ortaya koyuldu. Bu nedenle, hiperinflamasyon ile birlikte doğuştan gelen antiviral yanıtta azalma, şiddetli COVID-19'un nedenlerinden biri olabilir (57,58). Düzensiz IFN

yanıtları muhtemelen betakoronavirüsler tarafından kullanılan etkili bağışıklığı değiştiren stratejilerin bir sonucudur. İnkübasyon dönemi sırasında SARS-CoV-2, saptanabilir IFN indüksiyonu olmadan konak hücrelerde gizlice çoğalır. Ağırlıklı olarak yapısal olmayan proteinler olmak üzere birçok korunmuş betakoronavirüs proteininin doğrudan IFN-antagonistik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir (55).

2.5.2. Edinsel İmmün Yanıt

Edinsel immün yanıt sistemi üç ana hücre tipinden oluşur: B hücreleri, CD4+ T hücreleri ve CD8+ T hücreleri. B hücreleri antikor üretir. CD4+ T hücreleri, bir dizi yardımcı ve efektör işlevlerine sahiptir. CD8+ T hücreleri, enfekte olmuş hücreleri öldürür. Edinsel immün yanıtın insanlarda hastalığa neden olan neredeyse tüm viral enfeksiyonların kontrolü ve temizlenmesi için önemli olduğu ve edinsel immün yanıtın ve immün hafızanın tüm aşıların başarısı için merkez olduğu göz önüne alındığında, SARS-CoV-2'ye verilen edinsel yanıtı anlamak kritik öneme sahiptir (59).

2.5.2.1. Hümorale immün yanıt

Hümorale immün yanıt, antikor aracılı bir immün yanıttır. T yardımcı hücreleri (Th), B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Plazma hücreleri ise viral antijene (Ag) özgü antikorlar (Ab) üretir (60). Nötralizan antikor üretimi, virüsün konak hücreye girişini engellemede etkilidir. Daha sonraki bir aşamada enfeksiyonu sınırlayarak koruyucu bir rol oynar ve reenfeksiyonu önler (61,54).

SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı hümorale immün yanıtta, başta S glikoproteini ve N proteini olmak üzere viral yüzey glikoproteinlerine yönelik antikorlar aracılık eder. Bu antikorlar, enfeksiyonun PCR ile saptanmasından yaklaşık 6 gün sonra saptanabilir ve S proteinin reseptör bağlama alanına yönelik olanlar, nötralize etme yeteneği ve dolayısıyla viral klirens ve enfeksiyonun önlenmesini gösterir. Akut SARS-CoV-2 enfeksiyonunu takiben, erken IgM ve geç IgG antikorlarının ortaya çıkması için geçen süre, hafif vakalarda daha uzun olmak üzere 6 ila 28 gün arasında değişmektedir. COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2 sistein benzeri proteaza karşı IgG, IgM ve IgA antikor yanıtları da bildirilmiştir ve bu yanıtlar, N proteinine yönelik antikor titreleri ile koreledir. Viral klirens ve iyileşmenin koordineli B ve T hücre fonksiyonu gerektirmesi muhtemeldir; ancak uzun süreli bağışıklık ve yeniden enfeksiyona karşı koruma

sağlayıp sağlamadığı açık değildir. Bu durum, değişken bağışıklık tepkileri ve koruyucu aşılama beklentileri göz önüne alındığında çok önemlidir (51).

Nötralizan aktiviteye ek olarak, virüse özgü antikorlar tarafından kompleman aktivasyonu, hümmoral immün yanıt kapsamında düşünülmesi gereken başka bir yoldur. Klasik (antikor aracılı) veya alternatif/MBL yoluyla kompleman sisteminin aktivasyonu, çeşitli kemotaktik/inflamatuvar araçların üretilmesiyle koruyucu ve/veya patojenik etkilere neden olabilir (55).

2.5.2.2. Hücresel immün yanıt

Virüse özgü CD8⁺ sitotoksik hücreler (CTL), virüse karşı hücresel immün yanıtın efektör kısmını temsil eder. CD8⁺ sitotoksik hücrelerinin ve B hücrelerinin aktivitesi, Th1, Th2, Th9, Th17 ve Treg fonksiyonel fenotiplerine ayrılan CD4⁺ T yardımcı hücreler tarafından düzenlenir (55).

İyileşme dönemindeki COVID-19 hastalarında yeterli T hücre sayımı ve yeterli T hücre aktivasyonu/klonal genişlemesi kaydedilmiştir. Bu da iyileşme ve hastalığın gerilemesinde T hücre aracılı bağışıklığın önemine işaret etmektedir. T hücrelerine bağlı koruyucu roller, sistemik antiviral immün yanıtı ve B hücrelerinin Th hücre aracılı aktivasyonunu kapsarken, CTL'ler virüsle enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli rollere sahiptir (62).

Lenfopeni ve/veya T hücre tükenmesi, COVID-19 hastalarında kötüleşen klinik sonuçların başlıca nedenlerinden biri olabilirken; T hücre aracılı inflamasyon ve doğal immün yanıt hücrelerinin kalıcı aktivasyonu, akciğer patolojisine ve ciddi vakalarda görülen sekonder komplikasyonlara katkıda bulunan faktörler olabilir. Bununla birlikte, ciddi COVID-19 vakalarında gözlenen sitotoksitenin, edinsel immün yanıtın hiperreaktivitesinden mi yoksa baskılanmasından mı kaynaklandığı hala belirsizdir (62).

COVID-19'un koruyucu bellek T hücrelerinin oluşumuna yol açıp açmayacağı önemli bir sorudur. COVID-19'dan iyileşen hastalardan toplanan erken veriler, iyileşen vakalarda sırasıyla %100 ve %70'inde bellek CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin varlığı göstermiştir. Spike, aynı zamanda nükleoprotein ve membran proteini de dahil olmak üzere farklı SARS-CoV-2 proteinlerine karşı bellek T hücrelerinin oluştuğu gösterilmiştir (55).

2.6. Klinik

2.6.1. Genel Belirti ve Bulgular

COVID-19'un semptomları genellikle ateş, kuru öksürük ve yorgunluk gibi spesifik olmayan bulgu ve belirtilerle başlar. Solunum sistemi (öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, burun akıntısı, hemoptizi ve göğüs ağrısı), gastrointestinal sistem (ishal, bulantı ve kusma), kas-iskelet sistemi (kas ağrısı) ve nörolojik sistem (baş ağrısı veya konfüzyon) dahil olmak üzere birden fazla sistem tutulabilir. Daha yaygın belirti ve semptomlar; ateş (%83-98), öksürük (%76-82) ve nefes darlığıdır (%31-55). Hastalığın başlangıcından sonra, semptomlar hafiftir ve ilk hastane kabulüne kadar geçen medyan süre 7 (4-8) gündür. Ancak yaklaşık %39 hastada, hastalık nefes darlığına (~8 gün), ARDS (~9 gün) ve mekanik ventilasyona (~10,5 gün) kadar ilerleyebilir. Ölümcül hastalığı olan hastalarda ARDS gelişir ve kısa sürede kötüleşir ve hastalar çoklu organ yetmezliğinden ölür. Hastanede yatan hastalardan oluşan vakalarda, salgının erken dönemindeki ölüm oranı %11-15 idi, ancak daha sonraki verilerle %2-3 olarak saptandı (63).

2.6.2. Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular

Hastanede yatan COVID-19 hastalarında görülen yaygın laboratuvar anormallikleri arasında lenfopeni (%83), yüksek inflamatuvar belirteçler (eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein, ferritin, tümör nekroz faktörü- α , IL-1, IL-6 gibi) ve anormal pıhtılaşma parametreleri (uzamış protrombin zamanı, trombositopeni, yüksek D-dimer [hastaların %46'sı], düşük fibrinojen gibi) bulunur (53).

COVID-19'lu bireylerin yaygın radyografik bulguları arasında akciğerde, bilateral alt loblarda baskın infiltratlar ve bilgisayarlı tomografik görüntülemelerde, bilateral periferik alt loblarda buzlu cam opasiteleri ve/veya konsolidasyon yer alır (53).

2.6.3. Komplikasyonlar

Hastanede yatan COVID-19 hastalarında pnömoni dahil (% 75) sık görülen komplikasyonlar: ARDS (%15); aspartat transaminaz, alanin transaminaz ve bilirubinde (%19) yükselmeler ile karakterize akut karaciğer hasarı; troponin yükselmesi (%7-17), akut kalp yetmezliği, aritmiler ve miyokardit dahil kardiyak hasar; venöz ve arteriyel

tromboembolik olaylarla sonuçlanan protrombotik koagülopati (%10-25); akut böbrek hasarı (%9); bilinç bozukluğu (%8) ve akut serebrovasküler hastalık (%3) dahil nörolojik belirtiler ve şok (%6) (53).

COVID-19'lu kritik hastalardaki nadir komplikasyonlar arasında sitokin fırtınası ve makrofaj aktivasyon sendromu (sekonder hemofagositik lenfositik lenfositosis) görülür (53).

Tablo 5. COVID-19 hastalarının sınıflandırılması (64).

Asemptomatik	SARS-CoV-2 nükleik asit testi pozitif, herhangi bir klinik semptom ve bulgu yok ve göğüs görüntülemesi normal
Hafif	Akut üst solunum yolu enfeksiyonu belirtileri (ateş, yorgunluk, kas ağrısı, öksürük, boğaz ağrısı, burun akıntısı, hapşıрма) veya sindirim sistemi semptomları (bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal)
Orta	Belirgin hipoksemi olmayan pnömoni (sık ateş, öksürük), BT'de akciğer lezyonu
Şiddetli	Hipoksemili pnömoni ($SpO_2 < \%92$)
Kritik	Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), şok, ensefalopati, miyokard hasarı, kalp yetmezliği, pıhtılaşma bozukluğu ve akut böbrek hasarı

Sonuç olarak, hastalığın klinik özellikleri ve prognozu, yaşa göre farklılık gösterir ve kapsamlı bir yaş değerlendirmesi, dünya çapında klinisyenlerin COVID-19 hastaları için risk sınıflandırması oluşturmaya yardımcı olabilir. 60 yaş ve üzerindeki hastalar, 60 yaşın altındakilere kıyasla daha ağır klinik belirti, daha ağır ve uzun hastalık seyri göstermektedir. Yaşlı hastalar için yakından izleme ve daha fazla tıbbi müdahale gerekebilir (65).

2.7. Tanı

2.7.1. Serolojik Tanı

İmmünolojik testler olarak da adlandırılan serolojik testler, SARS-CoV-2 antijenlerinin ve/veya anti-SARS-CoV-2 antikorlarının kalitatif veya kantitatif tespitine dayalı SARS-CoV-2'ye maruz kalmış bireylerin taranması için hızlı ve basit alternatiflerdir. Bu

testlerde yaygın olarak kan, serum, plazma veya tükürük örneği kullanılır. Çeşitli özel, akademik ve halk sağlığı laboratuvarları şu anda klasik immünolojik testler (çoğunlukla enzim bağlı immünolojik yöntem; ELISA), kemilüminesans immünolojik testler (CLIA), akım sitometri yöntemleri gibi teknolojileri kullanarak SARS-CoV-2 serolojik testleri için platformlar geliştirmektedir. Manuel sistemlerden yüksek verimli otomatize sistemlere kadar değişen çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Hasta başı testleri (POC), lateral akım immünokromatografik testler (LFA), kullanım kolaylığı ve hızlı tespit yetenekleri nedeniyle giderek daha popüler hale gelmektedir. Tüm serolojik test yöntemleri, SARS-CoV-2'ye karşı antikorları tespit etmede ortak bir işlevi paylaşırsa da, hedeflenen viral antijenlere, tespit edilen antikorun alt sınıfına ve genel doğruluk ve güvenilirliğe bağlı olarak testler arasında büyük farklılıklar vardır (47, 66).

Koronavirüslerin dört yapısal proteini vardır: S, M, E ve N proteinleri. Bu proteinlerden ikisi, S ve N proteini, COVID-19 tespitinde serolojik testlerin geliştirilmesi için önemli antijenik bölgeler olarak görünmektedir. Çeşitli SARS-CoV-2 hedefli serolojik testler ticari olarak mevcuttur ve halen geliştirilmektedir (67).

Serolojik testler, virüse özgü antikorlar geliştiren bireyleri tanımlayarak geçirilmiş enfeksiyonu tespit edebilir ve bir popülasyondaki hastalık prevalansı hakkında bilgi verebilir. Virüse özgü antikorlar, semptom başlangıcından sonra birkaç hafta ila aylarca kanda kalır. FDA'ya göre, SARS-CoV-2'ye karşı IgM antikorları, ilk enfeksiyondan sadece birkaç gün sonra kanda saptanabilir. Bununla birlikte, enfeksiyon seyri boyunca IgM seviyeleri iyi karakterize edilmemiştir. IgG, semptom başlangıcından üç gün sonra veya enfeksiyondan en az 7-10 gün sonra saptanabilir hale gelir. Bu testler, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken evrelerindeki bireyleri tespit etmek için yetersiz kalabilir. Örneğin, ilk yedi gün içinde enfekte bireylerin %40'ından azı seropozitifdir (IgM/IgA), bu da akut olarak enfekte olmuş kişilerin tespitinde testin güvenilirliğini düşürür. Daha da önemlisi, hafif SARS-CoV-2 enfeksiyonu vakalarının antikor üretmediğine dair raporlar vardır (68).

Serolojik yöntemler, COVID-19 epidemiyolojisinde ve asemptomatik hastaların bağışıklık durumunun belirlenmesinde önemli bir rol oynar, ancak enfeksiyonların erken teşhisinde herhangi bir rol oynaması muhtemel değildir. Bununla birlikte, hem serolojik hem de moleküler tekniklerin birleştirilmesi değerli bir tanısal sonuç verecektir (67). Ayrıca, serolojik testler antikor üretme yeteneğine bağlı olduğundan,

bireyler arasındaki immünolojik farklılıklar ve/veya yanıtların bu testlerin sonucunu önemli ölçüde etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır (47).

2.7.2. Moleküler Tanı

2.7.2.1. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

Pozitif COVID-19 vakalarının hızlı ve doğru tespiti, toplumdaki ve sağlık kuruluşlarındaki viral salgını kontrol etmek için çok önemlidir. Genel olarak araştırmalar, moleküler teknolojilerin, SARS-CoV-2'nin nükleik asitini hedefleyip tanımlayabildikleri için, COVID-19'un kesin tanısında BT taramalarından ve serolojik testlerden daha doğru olduğunu göstermiştir. SARS-CoV-2'ye karşı moleküler tanı teknolojilerinin geliştirilmesi, virüsün proteomik ve genomik bileşiminin anlaşılmasına, enfeksiyon sırasında ve sonrasında hastada protein ve gen ekspresyonundaki değişikliklerin viral indüksiyonuna bağlıdır (68).

Şu anda, SARS-CoV-2 için kullanılabilen nükleik asit amplifikasyon testleri; rRT-PCR testini ve izotermal amplifikasyon teknolojilerini içerir. Bu yeni gelişen teknolojiler, TMA, NEAR, LAMP, RPA ve CRISPR-Cas testlerini barındırır (69).

2.7.2.1.1. Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon PCR (rRT-PCR)

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun etiyolojik tanısı için mevcut altın standart tanı yöntemi, bronkoalveolar lavaj sıvısı, fiber bronkoskop fırça biyopsileri, balgam, nazal sürüntüler, faringeal sürüntüler, dışkı veya kan dahil olmak üzere çeşitli klinik örneklerde çalışılan rRT-PCR testidir. rRT-PCR testleri çeşitli avantajlar sunar. Özellikle, viral yükün en düşük olduğu enfeksiyonun erken aşamasında değerlidir. Bu nedenle, amaç enfektiviteyi önlemek olduğunda ve henüz antikorlar oluşmadığında, virüs RNA'sını saptayarak patojeni doğrudan tespit ettiğinden, serolojinin aksine, enfeksiyonun ilk aşamalarında daha değerli bilgi sağlar. Ayrıca, çok sayıda örnekte kolayca çalışılabilir (68). Konvansiyonel PCR'ye göre diğer bir önemli avantajı, amplifikasyon ürünü kontaminasyonu ile ilişkili yanlış pozitif sonuçları en aza indirmek için amplifikasyon ve analizin kapalı bir sistemde aynı anda yapılmasıdır (70).

Koronavirüs rRT-PCR testlerinin tercih edilen hedefleri, yapısal S ve N genleri ve yapısal olmayan RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) ve ORF 1a/b genleri gibi korunmuş ve/veya bol miktarda eksprese edilen genleri içerir (70).

Amerika Birleşik Devletleri'nde CDC, iki nükleokapsid protein hedefi (N1 ve N2) önerirken; DSÖ, bir E geni testi ile birinci basamak taramayı ve ardından RdRp geni kullanılarak bir doğrulayıcı test yapılmasını önerir. Diğer endemik koronavirüslerle olası çapraz reaksiyonun yanı sıra SARS-CoV-2'nin potansiyel genetik kaymasını önlemek için teste en az iki moleküler hedef dahil edilmelidir. Farklı ülkelerdeki çeşitli araştırmacılar, rRT-PCR testleri için bu moleküler hedefleri kullanmaktadır (67).

Bir çalışmada, ilk rRT-PCR testi için sarbekovirüsler arasında yüksek oranda korunan iki dizi bölgesi (ORF1b ve N) kullanılmıştır. Çin, Hong Kong'da yapılan bir başka çalışmada ise, rRT-PCR testi için kullanılan hedeflerden; ilki tarama için N geni ve ardından doğrulama için ORF1b kullanılmıştır. Almanya'da iki moleküler hedef; E ve RdRp geni seçilmiştir (67). Başka bir çalışma, SARS-CoV-2'nin RdRp/Hel, S ve N genlerini hedefleyen üç yeni rRT-PCR testinin performansını karşılaştırmıştır. COVID-19-RdRp/Hel testinin *in vitro* ve COVID-19 hasta örneklerinde SARS-CoV-2 RNA tespiti için oldukça hassas ve spesifik olduğunu göstermiştir (70).

Bugüne kadar, kullanılan dizi bölgelerinden herhangi birinin klinik tanı testi için üstün bir avantaj sunduğuna dair kanıt bulunmamaktadır. Bununla birlikte ideal tasarım, virüsün doğal evrim süreciyle hedef gen bölgelerinin değişmesi olasılığına karşı en az iki hedef bölge içermelidir (67).

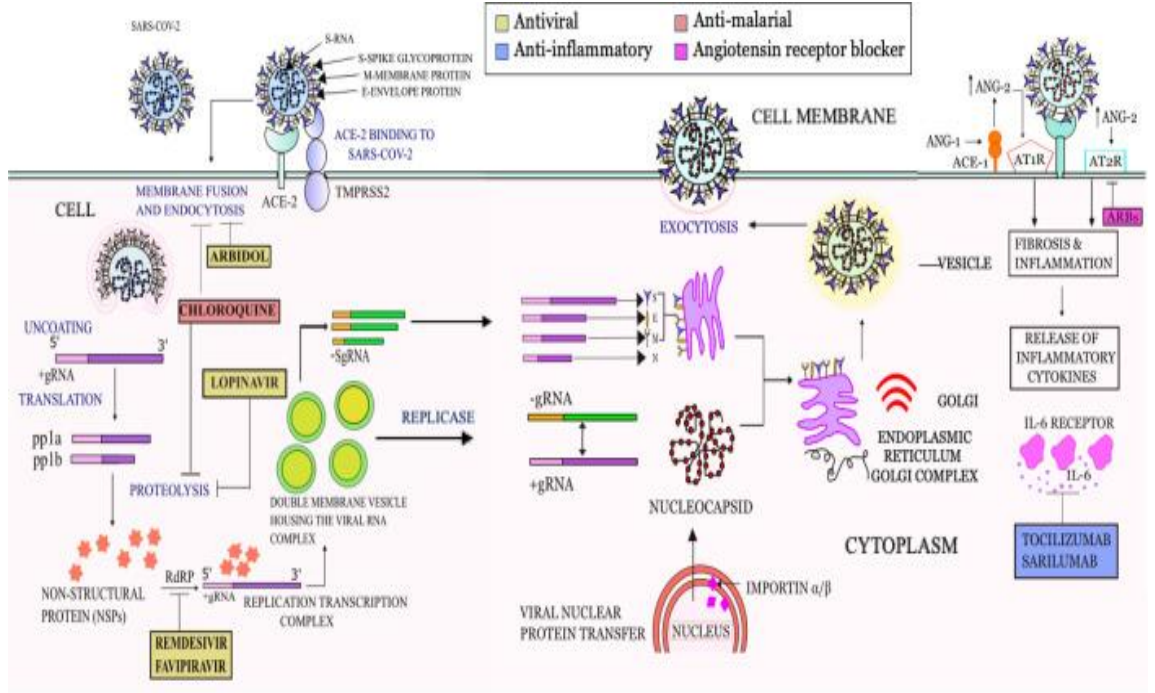
2.7.2.2. Genomik Dizileme

Virüslerin genomik dizilimini belirlenmesi, virüsün evrimini ve hastalıklarla genetik ilişkisini analiz etmek, salgınları izlemek, yeni tedaviler ve aşılar geliştirmek için güçlü bir araçtır. Mart 2020 itibarıyla binlerce SARS-CoV-2 genomu, GISAID, NCBI GenBank ve Çin Ulusal Genbank Veri tabanı (CNGBdb) dahil olmak üzere halka açık veri tabanlarında yayınlanmaktadır. SARS-CoV-2 dizileme yöntemleri arasında metatranskriptomik dizileme, hibrit yakalama tabanlı dizileme, amplikon dizileme ve nanogözenek hedefli dizileme yer almaktadır (71).

2.8.Tedavi

COVID-19 tedavisi için klinik deneyleri devam eden birkaç ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlar, virüsün konak hücreye girişi veya replikasyonunu engellemeyi amaçlamaktadır (Şekil 7). Bu ilaçların bazıları daha önce SARS-CoV enfeksiyonunu tedavisinde

kullanılmış olsa da birkaçı ilk kez SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemek için kullanılmaktadır (72).



Şekil 7. Çeşitli farmakolojik ajanların hücresel düzeydeki etki mekanizmaları (72)

Remdesivir

Remdesivir, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde etkinlik açısından test edilmiş RNA'ya bağımlı bir polimeraz inhibitörüdür ve umut verici anti-viral terapötik sonuçlar göstermiştir. Diğer nükleotid analoglarından farklı olarak Remdesivir; *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Pneumoviridae* ve *Orthocoronavirinae* (SARS CoV ve MERS CoV) gibi birçok virüse karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahip bir fosforamidat ön ilacıdır (73, 74). Gilead Sciences (Foster City, CA) tarafından 2013-2016 salgını sırasında Ebola tedavisi için geliştirilmiştir (75). Ayrıca hayvan modellerinde MERS-CoV, SARS-CoV ve SARS-CoV-2 replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Şimdiye kadar Ebola, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 ve diğer RNA virüslerinin tedavisi için araştırma amaçlı bir ilaç olarak kullanılmıştır, ancak herhangi bir hastalık için henüz onaylanmamıştır (76,77,78).

Yapılan bir çalışmada, Remdesivirin IFN- β ile kombinasyonun; Lopinavir/Ritonavir-IFN- β kombinasyonundan daha üstün antiviral özelliklere sahip olduğu gösterildi (78). Orta dereceli COVID-19 hastalığı olan hastalarda yapılan Faz III klinik denemesinde, 5 günlük Remdesivir tedavisinin, standart bakıma kıyasla 11.

günde klinik iyileşme sağlama olasılığının %65 daha fazla olduğunu gösterildi. Bu veriler, 5 günlük bir tedavi rejimi ile erken müdahalenin klinik sonuçları önemli ölçüde iyileştirebileceğini göstermektedir. Remdesivir'in kullanımına ilişkin yayınlanan ilk raporda, hastaneye yatırılan 53 ağır COVID-19 hastasının 36'sında (%68) klinik iyileşme olduğu bildirildi (79).

Remdesivir'in orta şiddetli hastalığı olan ve ek oksijen tedavisi gerektiren COVID-19 hastaları için en uygun seçenek olduğu görülmektedir. 1 Mayıs 2020'de FDA, ağır COVID-19 ile hastaneye yatırılan hastalarda Remdesivir için acil kullanım izni verdi; nihai izin bu tür hastalarda Remdesivir etkinliğinin geçici kanıtları ışığında verilmektedir. Bununla birlikte, bu ilacın kullanımına rağmen yüksek ölüm oranı göz önüne alındığında, tek başına Remdesivir ile tedavinin yeterli olmayacağı belirtilmelidir (80).

Molnupravir

Merck ve Ridgeback'ın araştırma amaçlı oral antiviral ilacı Molnupiravir, nükleozid analogu β -D-N4 hidroksisitidinin (NHC) oral olarak biyoyararlı bir ön ilacıdır (81). COVID-19 hastalarının tedavisi için şu anda Faz III denemelerinde bulunan oral kullanılabilen bir antiviral ilaç adayıdır. Molnupiravir, viral RNA mutasyonlarının sıklığını artırır ve hayvan modellerinde ve insanlarda SARS-CoV-2 replikasyonunu bozar (82). Koronavirüslerin replikasyonunda G'den A'ya ve C'den U'ya geçiş mutasyonlarını artırabilir (81).

Mevcut veriler, Molnupiravir'in viral replikasyon sırasında mutajen bir ajan gibi davrandığını göstermektedir. Bununla birlikte, Remdesivir gibi Molnupiravir de viral RNA düzeltme mekanizmasından kaçır. Molnupiravir, SARS-CoV-2 dahil olmak üzere çeşitli virüslerin replikasyonuna müdahale eder. İnsan akciğer dokusunda SARS-CoV-2 replikasyonunu inhibe eder ve SARS-CoV-2 RNA'sını azaltır (82).

Merck ve Ridgeback, Faz III çalışmasının pozitif ara analizini yayınladı. Bu analize göre Molnupiravir, hafif veya orta derecede COVID-19 hastaları için hastanede yatış veya ölüm riskini plaseboya göre yaklaşık yüzde 50 azaltmıştır. Tüm önemli alt gruplarda hastaneye yatış ve/veya ölüm riskini azaltmıştır; etkinlik, semptom başlangıcının zamanlamasından veya altta yatan risk faktöründen etkilenmemiştir. Molnupiravir alan hastaların %7,3'ünün ve plasebo alan hastaların %14,1'inin ya hastaneye kaldırıldığını ya da randomizasyondan sonra 29. günde öldüğünü bildirmiştir.

29. günde Molnupiravir grubunda ölüm bildirilmezken, plasebo grubunda sekiz kişi rapor edilmiştir. Veri İzleme Komitesi (DMC)'nin tavsiyesi üzerine ve FDA ile istişare halinde, bu olumlu sonuçlar nedeniyle çalışmaya katılım erken aşamada durdurulmuştur (83). Yakın zamanda Merck ve Ridgeback, risk altındaki yetişkinlerde hafif-orta düzeyde COVID-19 tedavisinde Molnupiravir için FDA'ya acil kullanım izni başvurusunda bulundu (84).

Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)

LPV/r, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunun tedavisi için onaylanmış bir kombine proteaz inhibitörüdür. Lopinavir viral proteaza bağlanır ve gag-pol poliproteininin bölünmesini önleyerek olgunlaşmamış, enfeksiyöz olmayan virüs partiküllerinin üretilmesine neden olur. Ritonavir, sitokrom P450 3A metabolizmasını inhibe ederek lopinavirin plazma konsantrasyonunu artırır (85).

Hem SARS hem de MERS'e karşı *in vitro* ve hayvan çalışmalarından elde edilen bulgulardan dolayı başlangıçta COVID-19 için potansiyel bir tedavi seçeneği olarak görülmüştür (86). Ancak Mart 2020'de, LPV/r'nin ilk COVID-19 klinik çalışmasının sonuçları yayınlanmıştır. Hastanede yatan ciddi Covid-19'lu yetişkin hastalarda, LPV/r tedavisinin standart bakımın ötesinde herhangi bir yararı gözlenmemiştir. Bu randomize çalışma, ciddi Covid-19'lu hastalarda LPV/r tedavisinin klinik iyileşmeyi önemli ölçüde hızlandırmadığı, mortaliteyi azaltmadığı, viral RNA yükünü ve boğazda viral RNA saptanabilirliğini azaltmadığı bulunmuştur (87).

Yakın zamanda (16 Haziran 2020) güncellenen COVID-19 tedavi yönergeleri için NIH (Ulusal Sağlık Enstitüsü) paneli COVID-19'da LPV/r veya diğer HIV proteaz inhibitörlerinin kullanılmasını önermemiştir. Bunun nedeni, olumsuz farmakodinamik veriler ve esas olarak klinik çalışmaların COVID-19 hastalarında net bir klinik yarar göstermemiş olmasıdır (88).

Favipiravir (FPV)

Favipiravir, influenza tedavisi için geliştirilmiş, nükleozid olmayan bir RNA polimeraz inhibitörüdür. Ayrıca Ebola, Marburg, Nipah, Lassa ateşi ve Zika virüslerine karşı test edilmiştir (89,90,91). Favipiravir, en az beş sağlık çalışanında Ebola'ya maruziyet sonrası profilaksi olarak tek başına veya monoklonal antikorlarla kombinasyon halinde kullanılmıştır (92). Viral hemorajik ateş etkenlerine karşı Ribavirin ile kombinasyon halinde kullanımı, *in vitro* etkisini güçlendirmiştir (91,93). Favipiravir'in, klorokin veya

Remdesivir ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyon gerektirmesine rağmen SARS-CoV-2'ye karşı *in vitro* aktiviteye sahip olduğu belirlendi (76).

COVID-19 hastalarında FPV'nin açık etiketli kontrol çalışması gerçekleştirildi. Bu deneylerde 35 hastaya FPV tedavisi verildi ve 45 hastaya LPV/r kombinasyonu ile tedavi edildi. FPV ile tedavi edilenlerin, LPV/r ile tedavi edilen hastalardan daha hızlı viral klirens ve daha iyi akciğer görüntüleme değişikliğine sahip olduğu görüldü (94). Ayrıca, ağır COVID-19 hastalarında yapılan gözlemlere dayanarak, FPV kullanımının lenfosit sayısını iyileştirebileceği bildirilmiştir (95). Yapılan çalışmalar, FPV'nin COVID-19 tedavisinde yüksek potansiyelini kanıtlamaktadır (96).

Umifenovir (Arbidol)

Umifenovir (Arbidol), İnfluenza, Ebola ve Hepatit B ve C gibi bazı virüslere karşı kullanılan bir antiviral ilaçtır. İnfluenza virüsünün membran füzyon sürecini engeller (97). Dizi analizinde, SARS-CoV-2 spike glikoproteininin trimerizasyon alanının (S2) kısa bölgesinin İnfluenzanın hemaglutinin proteinine benzer olduğu gösterilmiştir. Arbidol, influenza hemaglutininine olan etkisine benzer şekilde SARS-CoV-2 spike proteininin trimerizasyonunu bloke eder ve konak hücreye bağlanmasını ve girişini engeller (98).

İlk sonuçlar, umifenovir tedavisinin COVID-19 hastalarında sonuçları iyileştirmedemediğini ortaya koydu (99). Başka bir çalışmada ise Umifenovir'in COVID-19'daki etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için sistemik bir inceleme ve meta-analiz gerçekleştirildi. Umifenovir'in güvenli olduğunu ve COVID-19 hastalarında 14. günde daha yüksek negatif PCR oranı ile ilişkili olduğunu gösterdiler. Ancak, COVID-19 ile hasta sonuçlarını iyileştirmek için umifenovir kullanımına dair halen destekleyici bir kanıt yoktur (100).

Konveselan Plazma Tedavisi

Konveselan plazma, bir enfeksiyondan iyileşen ve enfeksiyon etkenine karşı nötralizan antikorlar içeren kişiden alınan kan plazmasıdır. Pasif immünoterapinin bir şekli olarak kabul edilir. Konveselan plazma, SARS ve şiddetli grip tedavisi seçeneği olarak araştırılmıştır. Yapılan bir meta-analizde, birçok çalışmanın düşük kalitede olmasına ve kontrol gruplarından yoksun olmasına rağmen mortaliteyi azaltabileceği belirtildi (101).

Konveselan plazma, COVID-19'da birçok yararlı etki gösterebilir. En önemli etki mekanizmalarından biri, iyileşme dönemindeki plazmadan gelen antikorların

viremiyi baskılayabilmesidir. SARS salgınında uygulanan stratejilere benzer şekilde teorik olarak hastalığın erken evresinde konveselan plazmanın verilmesi daha etkili olacaktır (102). Ayrıca, doğrudan antiviral özelliklerin yanı sıra, plazma bileşenlerinin, pıhtılaşma faktörlerini eski haline getirmek gibi başka yararlı etkiler sağlayabileceği de öne sürülmüştür (103).

Konveselan plazmanın şiddetli COVID-19 hastalarına uygulanmasını açıklayan ön çalışmalar, önemli bir iyileşme bildirmiştir ve büyük ölçekli klinik deneyler devam etmektedir (104,105). FDA, COVID-19 konveselan plazmanın acil kullanım izni kapsamında kullanılabilmesinin yanı sıra yeni araştırma ilacı başvurusu kapsamında da kullanılabilmesini kabul etmektedir (106).

Konveselan plazma transfüzyonunun potansiyel riskleri arasında patojen bulaşması, alerjik transfüzyon reaksiyonları, transfüzyonla ilişkili dolaşım yüklenmesi ve transfüzyonla ilişkili akut akciğer hasarı yer alır (107).

Klorokin/Hidroksiklorokin

Klorokin klasik bir sıtma ilacıdır. Asidik endozomal pH'ı nötralize ederek endozom aracılı viral girişi bloke eder ve bu etki geniş spektrumlu antiviral olarak kullanımını destekler (108). Son araştırmalar, klorokin, akciğerler, kan damarları, kalp, böbrek vb. hücrelerinin membranında bulunan bir enzim olan ACE2'nin glikozilasyon sürecini engellediğini ortaya koydu. Böylece SARS-CoV ve SARS-CoV-2 virüslerinin hücresel giriş mekanizmasına etki ettiği bulundu (76,109). Ayrıca klorokin, viral enfeksiyonlarda anti-inflamatuar ve immünomodülatör faydalar gösterir. Hidroksiklorokin, klorokin daha az toksik bir metabolitidir. Her ikisi de aşırı dozda alındığında toksik ve hatta ölümcül olabilir. Olumsuz etkiler arasında retinopati, karaciğer enzim yükselmesi, kan sayımı değişiklikleri ve ruh halindeki değişiklikler yer alır. Diğer QTc uzatıcı ajanlarla ilaç etkileşimlerine dikkat edilmelidir (110,111).

Hidroksiklorokin veya klorokin COVID-19 tedavisi veya profilaksisindeki rolü hakkında yakın zamanda yapılan bir sistematik derleme, güvenlikleri ve toksisite hakkında çelişkili kanıtlar olduğunu bildirmiştir (112). Klorokin ve hidroksiklorokin potansiyel riskleri, acil kullanım izni verilen potansiyel faydalarından daha ağır basmaktadır. Bu nedenle FDA, ciddi kardiyak yan etki ve diğer olası yan etkiler nedeniyle acil kullanım iznini iptal etti (113).

Sistemik Kortikosteroidler

Kortikosteroidler, astım, alerjik durumlar, otoimmün hastalıklar, septik şok ve kanser gibi çeşitli durumların tedavisinde etkili olan antiinflamatuvar ilaçlardır (114). SARS-CoV-2 enfeksiyonu sıklıkla iki fazlı bir patern ile kendini gösterir: 7-10 gün süren ilk viremik faz, ardından hastaların yaklaşık %20'sinde sitokin fırtınası ve solunum yetmezliği ile karakterize ikinci bir inflamatuvar faz gelir (115). Viral pnömonilerde, inflamatuvar organ hasarında kortikosteroidlerin etkinliği tartışmalıdır (116). SARS hastalarına steroid uygulanmasına yönelik sistematik bir incelemede, sağ kalıma bir yararı olmadığı ve avasküler nekroz, psikoz, diyabet ve gecikmiş viral klirens dahil olası zararları olduğu bildirilmiştir (117). MERS için kortikosteroid alan hastalarla ilgili bir başka çalışmada mortaliteye hiçbir fayda sağlamadığı ve ayrıca virüsün alt solunum yolu klirensini de geciktirdiği gösterilmiştir (118).

Tek merkezli bir retrospektif kohort çalışması, hastanede yatan ve kortikosteroidle tedavi edilen COVID-19 hastalarının kortikosteroid almayanlara göre daha düşük bir ölüm oranına sahip olduğunu bildirdi (119). ARDS geliştiren COVID-19 hastalarının retrospektif bir kohort analizi, metilprednizolon tedavisinin mortalitede azalma ile ilişkili olduğunu göstermiştir (120). Tıbbi Yoğun Bakım Derneği (SCCM), refrakter şoku olan COVID-19 hastaları için düşük doz kortikosteroid tedavisinin kullanılmasını önermektedir. COVID-19 ve ARDS'siz solunum yetmezliği olan ve mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda, sistemik kortikosteroidlerin rutin kullanımına yönelik tavsiyede bulunur (121). Hastalığı hızlı ilerleyen veya ciddi hastalığı olan hastalarda kısa süreli metilprednizolon uygulanabilir ve önerilen doz günde 1-2 mg/kg'ı geçmemelidir. Yararları ve riskleri dikkatlice değerlendirilmelidir. Hipoksemisi olan veya kronik hastalıklar nedeniyle düzenli olarak kortikosteroid kullanan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır (122).

Kortikosteroidlerin immünomodülatör etkilerinin bazı hastalarda muhtemelen inflamatuvar pozitif geribildirim döngüsünü kırarak COVID-19'un hiperinflamatuvar fazında etkili olacağı görülmektedir. Ancak, kortikosteroidlerin hastalığın erken evresindeki immünosupresif etkileri tehlikeli olabilir ve antiviral tepkileri bozabilir(123).

Tocilizumab

Tocilizumab, IL-6 reseptörünü bloke eden bir immünoglobulindir. ABD ve Avrupa'da kimerik antijen reseptörü T hücre kaynaklı ciddi veya yaşamı tehdit eden sitokin salınım sendromu (CRS) için lisans almıştır (124). CRS'si olan COVID-19 hastalarında, inflamasyonu ve immünolojik hastalığı gösteren IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi sitokin düzeylerinin yükseldiği bulundu. Ek olarak, CRS'nin COVID-19'un şiddeti ile ilişkili olduğu ortaya çıktı. Bu veriler, IL-6 yolağının COVID-19 hastalarının akciğerlerindeki aşırı aktif inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynayabileceğini düşündürdü. Bu nedenle, Tocilizumab'ın COVID-19 immünoterapisi için potansiyel bir hedef olabileceğini gösterdi (125,126).

Tocilizumab, yakın zamanda Çin ve İtalya'da ciddi COVID-19 hastalarında gözlenen CRS sırasında immünosupresif bir ajan olarak kullanıldı ve umut verici sonuçlar verdi (127,128). Mekanik ventilasyon gerektiren 154 COVID-19 hastasını içeren başka bir tek merkezli çalışmada Tocilizumab'ın etkinliğini ve güvenliğini değerlendirildi ve daha düşük mortalite ile ilişkilendirildi (129). Çin'de, Tocilizumab ile tedavi edilen COVID-19 hastalarında belirgin bir iyileşme sağlandı ve ciddi COVID-19 tedavisinde potansiyel olarak çok etkili olabileceği gösterildi. Bununla tutarlı olarak, İtalya'da pnömonisi olan bir COVID-19 hastasında Tocilizumab uygulaması, tedaviden sonraki 14 gün içinde BT bulgularında olumlu değişiklikler gösterdi. Bu veriler, Ciddi COVID-19 hastaları için umut verici bir tedavi olduğunu ortaya çıkarmaktadır (130).

IL-6 antagonistlerinin kullanımı şu anda SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yönelik tedavi kılavuzlarında yer almamaktadır. Tek bir ajan olarak veya kombinasyon tedavilerinde kullanımını değerlendirmek için çoklu randomize, çok merkezli klinik çalışmalar devam etmektedir (131).

Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparin (DMAH)

Venöz tromboembolizm ve özellikle pulmoner emboli, diğer viral pnömoniler ve ARDS'ye kıyasla, ağır COVID-19'da çok daha yüksek oranda görülmektedir. Bildirilen insidansı %25-27'ye ulaşmaktadır (132,133). Bu popülasyonda yüksek D-dimer, fibrin yıkım ürün seviyeleri, inflamatuvar belirteçler ve uzamış protrombin zamanı ve aktive kısmi tromboplastin zamanı gibi pro-pıhtılaşma durumunun göstergeleri, artan mortalite riski ile ilişkilidir (134,135,136).

DSÖ kılavuzu, ağır ila kritik hastalığı olan COVID-19 hastalarında venöz tromboembolizme karşı profilaktik DMAH veya heparin kullanılmasını önermiştir (137). Ayrıca Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği, sadece yoğun bakım ünitesindekilerin değil, hastanede yatan tüm COVID-19 hastalarının kontrendikasyon yokluğunda profilaktik DMAH almalarını tavsiye etmiştir (138).

Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar, kanser, otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yeni bir alanı temsil etmektedir. Bir monoklonal antikor, tek bir B hücre klonundan türetilen bir antikor olarak tanımlanır. Monoklonal antikorlar hedef antijen üzerinde kendi epitopuna bağlanarak, hedef antijenin işlevinin bozulması ve hücrelerin veya patojenlerin ortadan kaldırılması gibi birçok etkiye aracılık edebilir. Küresel ölçekte mevcut tedavilere yönelik acil ihtiyacın olması, SARS-CoV-2 nötralizan monoklonal antikorların hızla gelişmesine yol açmıştır (139).

SARS-CoV-2'yi nötralize eden monoklonal antikorların ana hedefi, konak hücrelere viral girişe aracılık eden yüzey spike glikoproteinidir. Esasen ilgili tüm monoklonal antikorlar bu proteini hedefler (140). Faz II/III ara analizi verilerine dayanarak bugüne kadar dört monoklonal antikor ürünü; REGN-COV2 (casirivimab ve imdevimab), Regdanvimab, VIR-7831'in (sotrovirimab), yetişkinlerde ve 12 yaş (40 kg'ın üzerinde) ve üzeri pediyatrik hastalarda erken dönem ve hafif-orta şiddette COVID-19 tedavisi için FDA'dan acil kullanım izni almıştır. Monoklonal antikorların, COVID-19' un erken ve geç tedavisi için Faz2/3 klinik deneyleri devam etmektedir (139).

VOC/VOI'lerde bulunan birkaç mutasyonun, onaylanmış veya ileri araştırmada olan birkaç monoklonal antikorun nötralize edici aktivitesini azalttığı veya ortadan kaldırdığı bulunmuştur ve varyantlara karşı farklı derecelerde güvenlik açığı göstermiştir. Profilakside, monoklonal antikorlar potansiyel olarak tek başına veya aşıları tamamlayıcı olarak kullanılabilir. Ayrıca, yaşlılar ve komorbiditesi olan veya bağışıklığı baskılanmış kişiler gibi ciddi COVID-19 komplikasyonları geliştirme riski yüksek olan bireyler için ek bir koruma sağlamak ve ayrıca aşı etkinliğini tamamlamak için kullanılabileceğine dair veriler vardır. Bu konuda araştırmalar devam etmektedir (139).

2.9. Aşılar

SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu bağışıklık sağlayan aşılar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu morbidite ve mortalitenin önlenmesi ve azaltılması için çok önemlidir. Mevcut anlayış, dengeli bir hümmoral ve Th1'e yönelik hüccresel bağışıklık tepkisinin, COVID-19'dan korunma için önemli olabileceğini düşündürmektedir. Nükleik asit aşıları, inaktive virüs aşıları, canlı atenüe aşılar, protein veya peptit alt birim aşıları ve viral vektörlü aşılar dahil olmak üzere çeşitli aday aşılar geliştirilmekte ve test edilmektedir. Her yaklaşımın, avantajları ve dezavantajları vardır. Önde gelen aşı adaylarının tümü intramüsküler yoldan uygulanır; bu nedenle mukozal immün yanıt yerine kandaki immün yanıtı değerlendirmeye odaklanılır (141).

Çeşitli coğrafi bölgelerde her biri on binlerce katılımcıyı içeren çoklu Faz III klinik aşı denemeleri başlamıştır. Özellikle, bazı Faz III denemeleri birincil olarak, şiddetli COVID-19'u önlemeye yönelik tasarlanır ve istatistiksel olarak değerlendirilir. FDA, bir COVID-19 aşısının etkili kabul edilmesi için aşılanmış kişilerin en az %50'sini koruması gerektiğini belirtir (141).

2.9.1. Tam İnaktive Virüs

Virüs, aşı üretimi için DSÖ sertifikalı bir hücre dizisi olan Vero hücrelerinde pasajlanır ve ardından β -propionalakton kullanılarak kimyasal olarak inaktive edilir. Bu aşı türünün potansiyel olarak önemli bir yararı, aşılanmış bireyi bir hedef yerine birden çok viral proteine maruz bırakmasıdır. Bununla birlikte, inaktivasyon şekli, antijenlerin yapısal bütünlüğünü etkileyebilir ve T hücre yanıtını bir Th2 profiline doğru çevirebilir (142). İnaktive aşılar, kısa bir geliştirme döngüsünde hazırlanabilir, ancak sızıntı ve yetersiz inaktivasyon nedeniyle üretimi sırasında yüksek güvenlik gerektirmektedir (143).

Sinopharm

İnaktive COVID-19 aşı adayı, Çin Ulusal İlaç Grubu (Sinopharm) bünyesinde yer alan Pekin Biyolojik Ürünler Enstitüsü ve Wuhan Biyolojik Ürünler Enstitüsü araştırmacıları tarafından geliştirildi. Faz III klinik denemelerinde ölçülen birincil sonuç; tam aşılama sürecini takip eden 14 gün sonra COVID-19'a karşı koruyucu etki gösterdiğiidir (142).

CoronaVac (Sinovac Biotech)

Bu aşı, hastanede yatan bir COVID-19 hastasından alınan ve daha sonra Vero hücrelerinde verimli büyüme için uyarlanan bir SARS-CoV-2 izolatına (CN2) dayanmaktadır. Suşun genetik stabilitesi, kültürde 10 kez pasajlanarak ve ardından tüm genom dizilimi yapılarak tespit edildi. Virüs, β -propiolakton kullanılarak inaktive edildi ve alum adjuvanı eklendi (142). Faz I ve II deneme sonuçlarında, çoğu hastada immünojenisite bulundu ve aşı, iyi bir güvenlik ve tolere edilebilirlik profili gösterdi (144,145,146). Bu aşının, SARS-CoV-2'ye karşı spesifik nötralize edici antikor tepkilerini ortaya çıkardığı görüldü (147).

CoronaVac'ın, 2020'nin ortasından beri Brezilya, Endonezya, Şili ve Türkiye'de Faz III denemeleri devam etmektedir. 28 Nisan 2021 itibarıyla 22 ülkede acil kullanım için onay almıştır. Türkiye'de çift kör, randomize, plasebo kontrollü bir Faz III denemesinin ara analizi sonuçlanmıştır. Bu ara analiz, 18-59 yaşları arasındaki bir popülasyonda CoronaVac'ın ikinci dozdan en az 14 gün sonra semptomatik COVID-19 (plaseboya göre %83,5) ve COVID-19 ile ilişkili hastaneye yatışları (%100) önlemede yüksek etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma örneğinin bir alt kümesindeki gönüllülerin %89,7' sinde anti-RBD antikorları geliştiği ve seropozitif olanların %92'sinin ikinci aşı dozundan en az 14 gün sonra koruyucu düzeyde nötralizan antikor ürettiği görülmüştür (148).

Brezilya'daki araştırmacılar tarafından yayınlanan Faz III denemesinin ilk sonuçları, aşının sağlık çalışanlarında hem ağır hem de hafif hastalığı önlemede yaklaşık %50,4 oranında etkili olduğunu bildirdi. Bu sonuçlar, bu aşı için Türkiye'de (%91,25 etkili) ve Endonezya'da (%65,3 etkili) yapılan daha önceki denemelerde görülen sonuçlardan farklıdır, ancak aşı yapılan kişilerin hastaneye yatırılması gerekmediği görüldü (142).

2.9.2. Canlı Atenüe Virüs

Canlı atenüe aşılar, doğal viral enfeksiyonu en yakından taklit eder. Canlı atenüe aşıları düşük seviyede enfeksiyona neden olduğu için, tekrarlayan aşılar veya adjuvanlar gerektirmeden genellikle güçlü ve kalıcı hücrel bağışıklık tepkileri ortaya çıkarır. Canlı atenüe aşılarının dezavantajları arasında aşının daha az atenüe bir forma geri dönmemesini sağlamak için kapsamlı kalite kontrolü ve soğuk depolama (2-8 °C)

gerektirmeleri yer alır. Ayrıca, bu aşılar bağışıklığı baskılanmış kişilerde ve yaşlılarda kullanılamaz (142). Canlı atenüe aşilar, seri pasajlama veya hedeflenen genetik mühendisliği ile elde edilebilir, ancak RNA'nın yüksek geri mutasyon oranı nedeniyle, potansiyel olarak tehlikeli olabilen daha virülan suşlar veya virüsler de üretebilirler (143).

BCG

Bacillus Calmette-Guerin (BCG), Murdoch Çocuk Araştırma Enstitüsü ve Hollanda Araştırma Grubu tarafından COVID-19 için canlı zayıflatılmış bir aşı olarak kullanılmaktadır. İlginç bir şekilde, çocukluk döneminde BCG aşılama programlarına sahip olan ülkelerin, BCG aşısı olmayan ülkelere kıyasla COVID-19 ile mücadelede daha iyi olduğu ileri sürülmektedir. Bu, BCG aşısının COVID-19 üzerinde koruyucu etkileri olabileceği ve muhtemelen bu ciddi hastalığın ve ilgili ölümlerin ilerlemesini önleyebileceği anlamına gelir. Son zamanlarda, BCG aşısının COVID-19'a karşı koruyucu etkisini araştırmak için Avustralya ve Hollanda da iki Faz III çalışması planlandı (149).

TNX-1800

TNX-1800, Tonix Pharmaceuticals Holding Corp (NASDAQ: TNXP) ve Southern Research tarafından COVID-19'u önlemek için geliştirilen, perkütan uygulanan canlı modifiye edilmiş bir at çiçeği virüsü aşısıdır. TNX-1800, koronavirüs enfeksiyonuna neden olan virüsten türetilen proteini ifade etmek için tasarlanmıştır. Canlı replikasyon aşısı olarak TNX-1800, aşı tasarımında potansiyel bir vektör olarak kabul edilen Horsepox viral vektörüne dayalı olarak tasarlanmıştır. Güçlü T hücre bağışıklığı sağlamayı hedeflemektedir. Vaccinia aşıları ile karşılaştırıldığında, farelerde virülanı azaltmada daha etkin bulunmuştur. Aşının etkinliğinin değerlendirilmesi klinik öncesi deneme aşamasındadır (149).

2.9.3. Nükleik Asit

Nükleik asit bazlı aşilar, ilgilenilen bir immünojeni kodlayan plazmit DNA veya RNA'nın hücreye verilmesi esasına dayanır. Hücresel alımın ardından ya kopyalanır ve çevrilir (DNA) ya da doğrudan hem hümmoral hem de T hücre aracılı bağışıklık tepkilerini ortaya çıkarabilen protein antijenlerine çevrilir (RNA). Bu aşilar,

ölçeklenebilir oldukları ve bulaşıcı virüse müdahale edilmeden hızla sentezlenebildikleri için bir pandemi ortamında son derece yararlı olabilir (142).

2.9.3.1. DNA

Bu aşılar, ilgili genden oluşan bir ökaryotik protein ekspresyon kasetinin, seri üretim için *Escherichia coli* gibi organizmalarda çoğaltılabilen bir bakteriyel plazmide klonlanmasıyla tasarlanır. Uygulandıktan sonra, plazmitin transkripsiyon için nükleer membranı geçmesi ve ardından hücre sitoplazmasında immünojenin ekspresyonu gelir. Protein üretimi için karmaşık hücrese gereksinimler nedeniyle, bu aşılar RNA veya protein bazlı vektörler kadar immünojenik olmayabilir ve elektroporasyon gibi özel uygulama teknikleri gerektirebilir. Şu anda klinik değerlendirme altında olan dört DNA aşısı bulunmaktadır (142).

INO-4800

Inovio Pharmaceuticals tarafından SARS-CoV-2 için INO-4800 adlı yeni bir DNA aşısı geliştirildi. Faz I/II aşamasında olan INO-4800, uygulama üzerine konak hücrelerinde antijenik SARS-CoV-2 spike proteinini üretmesine yol açan bir plazmit DNA içerir ve bu da bağışıklık yanıtının indüklenmesine neden olur. DNA aşılarının optimal geliştirme hızları ve termal stabilite gibi çeşitli avantajlarına rağmen, DNA aşıları alanında hala bazı endişeler ve zorluklar bulunmaktadır. Temel zorluklardan biri, daha geleneksel aşı türlerine kıyasla yeterli bağışıklığın sağlanması için daha büyük hacimlerde DNA aşısı gerektirmesidir (149).

2.9.3.2. RNA

RNA aşıları ya kendi kendini çoğaltan alfavirüs türevli RNA ya da replikasyon yapmayan mRNA'dır. Mevcut SARS-CoV-2 RNA aşıları, stabilize edilmiş S proteinini kodlar ve lipit nanopartiküller içinde kapsüllenir. DNA aşılarıyla karşılaştırıldığında, transkripsiyon için nükleer giriş gerektirmeden ilgili proteine çevrilebildiklerinden dolayı daha immünojeniktirler. RNA aşılarının, doğal olarak katlanmış ve işlenmiş proteinlerin üretilmesiyle sonuçlandığı ve bunun da etkili antijen sunumuna ve B hücresi aktivasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. RNA aşıları ile ilgili potansiyel olarak ciddi husus, yaygın olarak uygulanacak herhangi bir SARS-CoV-2 aşısı için stabilite gerekliliği ile ilgilidir. Ayrıca, nükleik asit aşıları için insanlarda büyük ölçekli güvenlik verileri bulunmamaktadır (142).

mRNA-1273

mRNA-1273, Moderna tarafından geliştirilen yeni bir lipid nanopartikül kapsüllü mRNA aşısıdır. Bu aday aşı, Spike proteininin viral prefüzyonla stabilize edilmiş formunu kodlayarak COVID-19 enfeksiyonlarının önlenmesini sağlar. Faz III denemelerinin ilk ara analizinde, şiddetli COVID-19' u önlemede %94,5 etkinlik gösterdiği açıklandı. Moderna, aşının bu etkileri nasıl üretebileceğine dair temel verileri sunmadı. Faz III'ün birincil sonucunda, aşının yaşlı hastalar da dahil olmak üzere sağlıklı deneklerde, koronavirüs antikorları ürettiği ve T hücre reaksiyonu verdiği görüldü (150).

BNT162b2 (3 LNP-mRNA)

Pfizer/BioNTech tarafından geliştirilen mRNA aşısı BNT162b2, iki prolin yerleştirilerek modifiye edilip prefüzyonla stabilize edilmiş, SARS-CoV-2 tam uzunlukta spike proteinini kodlar (150).

Faz I/II verilerinin ön sonuçları, aşının SARS-CoV-2 proteinine özgü antikorlar ve T hücre yanıtı ürettiğini gösterdi (149,151). Faz III klinik deneme aşamasında olan mRNA aşısı adayı BNT162b2'nin ilk dozdan 28 gün sonra %95 etkili olduğu bulundu. Faz III denemesini tamamladıktan sonra, COVID-19 aşısı adaylarını acil kullanım izni için FDA'ya sunuldu (152). Aralık 2020'de BNT162b2 mRNA aşısı, FDA tarafından onaylandı ve semptomatik COVID-19 hastalığını önlemede %95 etkili olduğu gösterildi. Klinik ve gerçek dünya verileri, orijinal SARS-CoV-2 ve Alfa (B.1.1.7) varyantına karşı mRNA bazlı aşının %95 etkinliğini göstermiştir (153).

2.9.4. Viral Vektör (VV)

Viral vektör tabanlı aşılar, ilişkisi olmayan bir patojenden seçilen bir immünojeni kodlayan, zayıflatılmış veya replike olamayan virüslerdir. Geleneksel canlı atenüe aşılarında olduğu gibi, zayıflatılmış VV bazlı aşılar hücreleri enfekte edebilir ve hem T hücresi hem de antikor yanıtı ortaya çıkarabilir. Potansiyel olarak geleneksel aşılarından daha fazla etki sağlar. Ayrıca, bu aşı türü (ve canlı atenüe aşılar), aşılama için son derece verimli ve iyi tolere edilen yollar olabilen intranazal veya oral uygulanabilir. Bu aşı türünün bir sınırlaması, aşı antijenine karşı bağışıklık tepkilerini baskılayabilen ve bu aşıların etkinliğini sınırlayabilen vektöre karşı önceden var olan bağışıklığın varlığı olabilir. Bunun için geçici bir çözüm, daha az immünojenik olan veya şempanze

adenovirüsü (ChAd) gibi hayvan virüslerinden türetilen vektörlerin kullanılmasıdır (142).

Canlı atenüe aşılarında olduğu gibi, VV bazlı aşılar da bağışıklığı baskılanmış popülasyonlarda kullanım için uygun değildir ve sağlıklı insanlarda aşıdan sonra beklenen yan etkilere neden olabilir. İnsanlarda kullanım için henüz lisanslı VV bazlı aşılar bulunmamaktadır; bu aşılar için erken güvenlik ve immünojenisite verileri umut vericidir. SARS-CoV-2 VV bazlı aşılar için, S proteini (ve stabilize edilmiş varyantları), denenmekte olan en yaygın antijenlerdir (142).

Faz III klinik denemede olan VV bazlı aşılar; SARS-CoV-2 spike proteinini eksprese etmek için replike olmayan adenovirüs tip-5 viral vektörünü içeren Ad5-nCoV-19 aşısı; replike olmayan bir şempanze adenovirüs viral vektörünü içeren ChAdOx1 nCoV-19 aşısı; adenovirüs tip-5 ve adenovirüs tip-26 viral vektörünü içeren Gam-COVID-Vac Lyo ve Gam-COVID-Vac aşılarıdır (149).

2.9.5. Rekombinant Protein Alt Birimi

Bakteriyel, böcek veya memeli hücrelerinde eksprese edilen immünojenik viral proteinler, genellikle etkili ve güvenli aşı potansiyeline sahiptir ve bağışıklık tepkisini artırmak için bir adjuvan ile birlikte uygulanabilir. Alt birim protein aşılarının immünojenisitesini arttırmaya yönelik başka bir strateji, taşıyıcı nanopartiküllere konjugasyon yoluyla multimerik antijen gösterimi ve sunumudur. Nükleik asit bazlı veya viral vektör bazlı aşılara göre protein alt birim aşılarının üretilmesi pahalı ve zahmetli olsa da, hepatit B ve influenza virüsleri dahil olmak üzere halihazırda birkaç lisanslı rekombinant protein bazlı aşılar vardır. Şu anda 11 protein alt birim SARS-CoV-2 aşısı Faz I/II klinik denemelerinde ve biri Faz III denemesinde bulunmaktadır (142).

2.9.6. Virüs Benzeri Partikül (VLP)

Rekombinant protein bazlı aşının özel bir kategorisi olan VLP' ler, geometri ve boyutta doğal viryonları taklit etmesi amaçlanan supramoleküler yapılar halinde kendi kendine birleşen viral proteinlerden yapılır. Bu nedenle genellikle yüksek düzeyde immünojeniktirler, güçlü doğal ve edinsel immün yanıt (hem hümoral hem de hücre aracılı) ortaya çıkarırlar. HPV ve hepatit B virüslerine karşı lisanslı aşılar VLP aşı

türündedir ve insanlarda yaygın olarak kullanılır. SARS-CoV'ye karşı, Medicago tarafından üretilen bitki kaynaklı bir VLP aşısı şu anda Faz I klinik deneme aşamasındadır (142).



3. MATERYAL VE METOT

SARS-CoV-2 PCR testi için KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kombine burun-boğaz sürüntü örneklerine Bio-Speedy® SARS-CoV-2 RT-qPCR Tespit Kiti(Katalog No: BS-SY-WCOR-304-100,Türkiye) ile Real-Time PCR testi uygulandı.

Kontaminasyonu önlemek için çalışma süresi boyunca, amplifikasyon öncesi (pre-pcr), amplifikasyon (pcr) ve amplifikasyon sonrası (post-pcr) alanlar ayrı tutuldu. Kişisel koruyucu ekipman kullanıldı. Çalışma alanları ve ekipman dekontamine edildi. İzolasyon, RT ve PCR basamakları, biyogüvenlik düzey 2 kabini içerisinde çalışıldı. PCR için tasarlanmış temiz pipetler ve aerosol dirençli bariyer uçları kullanıldı.

Viral RNA İzolasyonu

Real-Time PCR sonucu pozitif çıkan 112 örneğe, HibriGen Genel RNA İzolasyon Kiti (katalog no: MG-RNA-01, Türkiye) ile izolasyon yapıldı. Bu kit, basit bir metot ile geniş örnek çeşidi (doku, yüzeye bağlı ya da süspansiyon halinde hücreler, tam kan) ve miktarı kullanılarak total RNA izolasyonuna olanak sağlar. Örnekler parçalanır ve guanidium izotiosiyanat (RNA'yı endojen RNazlardan koruyan kaotropik bir tuz) varlığında homojenize edilir. Homojenizasyondan sonra örneğe etanol eklenir. Örnekler daha sonra RNA'nın bağlanabileceği silika tabanlı membran bulunduran filtreli tüplere aktarılır. Kirlilikler yıkamalar ile etkili bir şekilde uzaklaştırılır. Saf RNA daha sonra DEPC uygulanmış su ile toplanır ve farklı uygulamalar için kullanıma hazırdır.

Viral RNA İzolasyon Prosedürü

1. 250 µl örneğin üzerine 1 ml HT tamponu eklendi ve karışım homojen olana dek vortekslendi.
2. Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dk. inkübasyon yapıldı.
3. 200 µl kloroform eklenerek 15 sn. vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı ve buz üzerinde 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
4. Örnek 4°C' de 12000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım 2 kısma ayrıldı. En altta fenol kloroform fazı ve en üstte RNA içeren renksiz faz görüldü. En üstteki renksiz faz pipet yardımıyla alttaki diğer fazların

karişmasına olanak vermeyecek şekilde dikkatlice yeni bir RNaz bulundurmayan boş tũpe aktarıldı.

5. Alınan renksiz fazın hacmine gũre ¼ oranında ¼nceden soğutulmuş EtOH (%100) eklendi (¼rn: 500 µl renksiz faz, 250 µl EtOH şeklinde). Karişım vorteksle iyice kariştırılarak filtreli tũpe aktarıldı. 4°C’de 12000 rpm’de 30 sn. santrifũj edildi ve filtrenin altındaki tũpte toplanan sıvı atıldı.
6. Filtreye 500 µl RY1 eklendi ve 4°C’de 12000 rpm’de 30 sn. kalacak şekilde santrifũj edildi ve yine altta kalan sıvı atıldı.
7. Daha sonra filtreye 500 µl RY2 eklendi, 1 dk. oda sıcaklığında inkũbasyon yapıldı ve 4°C’de 12000 rpm’de 30 sn. santrifũj edildi ve altta kalan sıvı atıldı. Bu aşama tekrarlandı.
8. Filtreli tũp 12000 rpm’de 2 dk. kuruması i¼in santrifũj edildi.
9. Kolon 1,5 ml’lik mikrosantrifũj tũplerine yerleştirildi. Direkt olarak membran ¼zerine 30-100 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklendi. 2 dk. oda sıcaklığında inkũbasyona bırakılıp, sonra RNA’yı bu su i¼erisinde toplamak i¼in 12000 rpm’de 2 dk. santrifũj edildi. Tũp su i¼erisinde saf RNA ¼rnekleri elde edildi. Uzun sureli saklama i¼in RNA -80°C’de muhafaza edildi.

Viral RNA’dan Komplementer DNA (cDNA) Elde Edilmesi

İzolasyonla elde edilen RNA ¼rnekleri, revers transkripsiyonla RNA’dan cDNA sentezi i¼in abmgood OneScript® Plus cDNA Sentez Kiti (Katalog No: G236, ABD) kullanıldı. Kit, termal stabilizasyonu sağlamak i¼in RNaz aktivitesini ortadan kaldıran genetik modifikasyonlara sahip bir Moloney-Murine Løsemi Virũsũ Ters Transkriptaz i¼erir. Bu ¼zel mutant enzim, daha y¼ksek cDNA verimleri, 12 kb’ye kadar daha uzun cDNA sunar ve y¼ksek sıcaklıklarda (50°C - 55°C) ¼alıřabilir ve GC a¼ısından zengin RNA şablonlarıyla ilişkili sekonder yapıların ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır.

Revers Transkripsiyon (RT) Prosedũrũ

1. Temiz odada, kullanmadan ¼nce bileşenler ¼öz¼nd¼r¼ld¼, kariştırıldı ve reaksiyon buz ¼zerinde ger¼ekleřtirildi.
2. RNA ekstraktı hari¼ kit bileşenleri tablo 6’da belirtilen hacimlere gũre kariştırıldı ve kısa s¼re santrifũjlendi.

Tablo 6. Revers transkripsiyon kiti bileşenleri

Kullanılan Malzeme (reaksiyon başına)	Miktar (µl)
Deiyonize Su	8
5x RT Buffer	4
dNTP (10 mM)	1
Primer (10 µM Random primer)	1
OneScript Plus Rtase	1
Premix-Toplam	15
RNA ekstrakt	5
Toplam	20

3. PCR odasında RNA ekstraktı eklendi.
4. Tüpler ısı döngü cihazına yerleştirildi (Perkin Elmer 9700), 25°C'de 10 dakika, 55°C'de 15 dakika, 85°C'de 5 dakika bekletildi.
5. Sonra 50-55°C'de 15 dakika daha inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi.
6. Yeni sentezlenen cDNA, bir sonraki aşama için -20°C'de bekletildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde edilen cDNA örnekleri Solis Biodyne HOT FIREPol® DNA Polimeraz Kiti (5 U/µl) (Katalog No: 01-02-00500 500 U, Estonya) kullanılarak PCR işlemi uygulandı. HOT FIREPol®, özgüllüğü ve doğruluğu artıran, yanlış dizilim/bağlanma (mispriming) ve nonspesifik bağlanan primerler ve primer dimerlerden kaynaklanan uzamayı en aza indiren, hot-start PCR sağlayan kimyasal olarak modifiye edilmiş bir FIREPol® DNA Polimerazdır. HOT FIREPol® oda sıcaklığında inaktiftir ve 95 °C'de 15 dakika boyunca bir ilk aktivasyon adımı ile aktive edilir.

PCR Prosedürü

1. Temiz odada reaktifler oda sıcaklığında çözündürüldü. Her reaktif hafifçe vortekslenerek karıştırıldı, ardından kısa süre santrifüjlendi.
2. Oda sıcaklığında kit bileşenleri tablo 5'te belirtilen hacimlerde eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı. cDNA dışındaki tüm gerekli bileşenler eklendi.
3. Her bir primer çifti için ayrı karışım hazırlandı. Kullanılan primerler (Macrogen, Hollanda) tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 7. cDNA kiti bileşenleri

Kullanılan Malzeme (reaksiyon başına)	Miktar (µl)
NF water	9,8
25 mM MgCl ₂	1,6
10x Buffer 1	2
dNTP mix (20 mM)	0,2
PRİMER-F (10 mikroM)	0,4
PRİMER-R (10 mikroM)	0,4
Solis HOT FIREPol 5 U/µL Taq Polymerase	0,2
Premiks-Toplam	14,6
cDNA	5,4
Toplam	20

Tablo 8. Nükleokapsid Primer Dizileri (154,155)

Primerler	Baz dizisi	Annealing Sıcaklığı	Amplikon boyu (bp)
45-F	CACTTTGCTTCACACTCAA	54,3	790
45-R	TCTGGACTGCTATTGGTGTT	56,4	
46-F	CAGATTCAACTGGCAGTAAC	56,4	807
46-R	TTTCCTTGCGTTTGTCTGG	56,4	
47-F	CTGCTTGACAGATTGAACCA	56,4	705
47-R	CTTGTGCTATGTAGTTACGAGA	58,4	
36-F-1	CACCAAAAGATCACATTGGCAC	60,3	1030
36-R-1	TGTGGTGGCTCTTTCAAGTCC	61,3	
36-F-2	CCGCAATCCTGCTAACAATGC	61,3	1008
36-R-2	TGTGGTGGCTCTTTCAAGTCC	61,3	

3. Reaksiyon karışımı iyice karıştırıldı, ardından kısaca santrifüjlendi. PCR tüplerine (0,2 ml) belirtilen hacimlerde dağıtıldı.

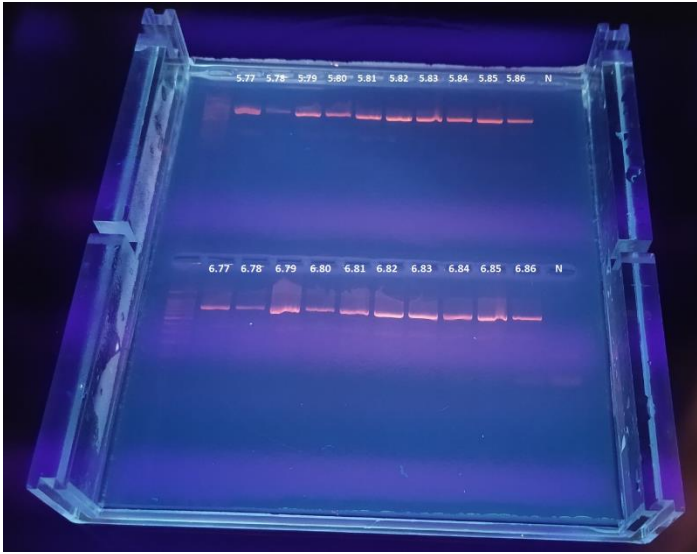
4. PCR odasında, PCR tüplerine kalıp DNA (cDNA) eklendi ve tüpler kapatıldı. Daha sonra tüpler kısaca santrifüjlendi.

5. Isı döngü cihazına yerleştirilerek tablo 7’deki protokol uygulandı.

Tablo 9. PCR Isı Döngü Aşamaları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç aktivasyonu	95 °C	15 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	40
Bağlanma	50°C	30 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son uzama	72 °C	6 dk	1

PCR ürünleri %2 agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. (Şekil 8)



Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Nükleotid Dizi Analizi

KSÜ ÜSKİM Merkez Sekans Laboratuvarında, Sanger yöntemiyle yapılmıştır.

PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Sekans işlemi için ilk olarak enzimatik pürifikasyon yapıldı. Bu amaçla ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific USA, katalog no: 78201.1.ML.) kiti kullanıldı.

Pürifikasyon Prosedürleri

1. Prosedür buz (soğuk blok) üzerinde uygulandı.

2. 2,5 µL PCR ürününün üzerine 1 µL ExoSAP-IT™ reaktifi eklendi ve karıştırıldı, hafifçe sentrifürlenerek tüp dibine çökmesi sağlandı.

3. ısı döngü cihazında, 37°C'de 15 dakika, 80°C'de 15 dakika inkübe edildi.

Döngüsel Dizileme (Cycle-Sequencing) Reaksiyonu

Pürifikasyon işlemi sonrası elde edilen PCR ürünü, BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kiti (ThermoFisher Scientific, USA, katalog no: 4337458) ile döngüsel dizileme reaksiyonuna alındı.

Döngüsel Dizileme Prosedürü

1. Prosedür buz (soğuk blok) üzerinde uygulandı

2. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit bileşenleri ve primerler tamamen çözüldü ve Tablo 10'a göre her bir primer için ayrı karışım hazırlandı. PCR'da kullanılan nükleokapsid primerleri kullanılmıştır (Tablo 8).

Tablo 10. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon Karışımı Miktar (µl)	Miktar (µl)
PCR ürünü	3,5
BigDye	2
Buffer (5x)	2
Steril distile su	0,5
Primer (2 ng/µl)	2
Total Hacim	10

2. Tüpler 2 ila 3 saniye vortekslendi ve santrifüjlendi.

4. Bileşenler eklendikten sonra plak MicroAmp™ Clear Adhesive Film (ThermoFisher Scientific, USA) ile kapatıldı.

5. Plak, 2 ila 3 saniye vortekslendi, ardından içerikleri kuyucukların dibine toplamak için 1.000 x g'de (5 ila 10 saniye) santrifüjlendi.

6. Plak ısı döngü cihazına alındı. Tablo 11'deki termal döngü profili uygulandı.

Tablo 11. Cycle sequencing ısı döngü protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İnkübasyon	96 °C	1 dk	1
Denatürasyon	96 °C	10 sn	25
Bağlanma	50°C	5 sn	
Uzama	60 °C	4 dk	

Döngüsel Dizileme Sonrası Pürifikasyon

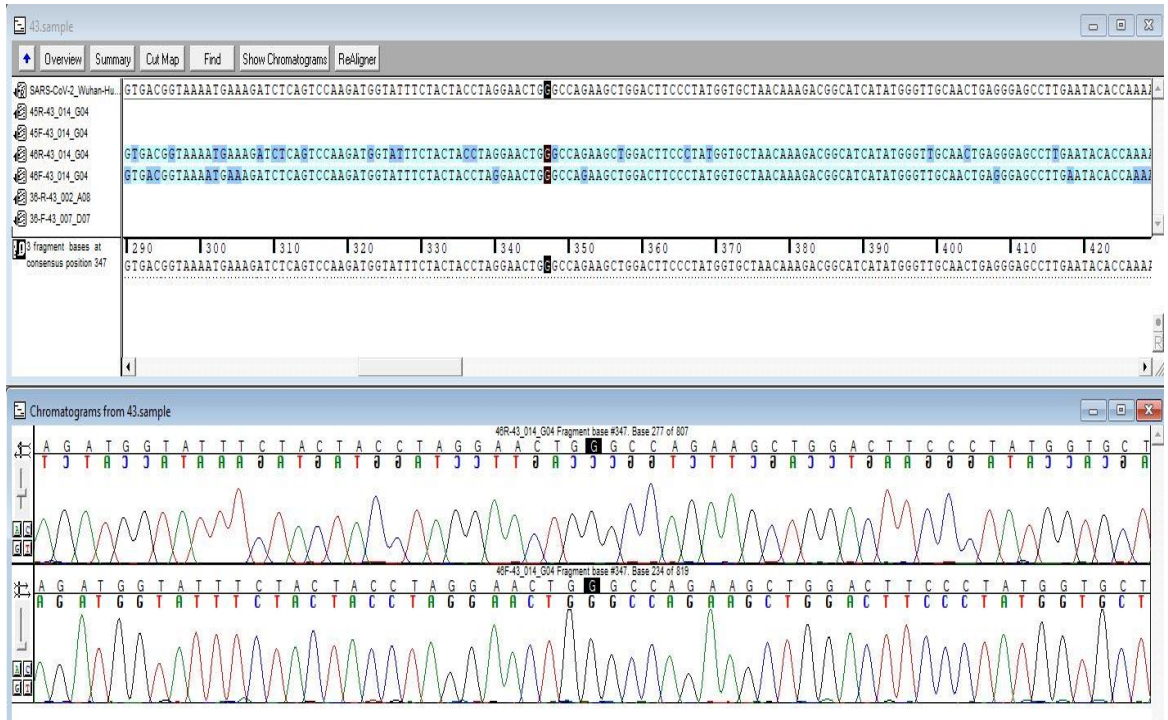
Döngüsel dizileme sonrası 2. pürifikasyon aşaması uygulandı. Bu aşamada (ThermoFisher Scientific, USA, katalog no: 4376484) kullanıldı.

Pürifikasyon Prosedürü

1. plak 1 dakika boyunca 1.000×g'de santrifüjlendi.
2. Pipetlemeden hemen önce BigDye XTerminator™ Solüsyonu 10 kez ters çevirerek solüsyon homojen hale gelene kadar karıştırıldı.
3. Her bir kuyucuğa önce 45 µl Sam™ solüsyonu, ardından 10 µl BigDye XTerminator™ solüsyonu eklendi.
4. Bileşenler eklendikten sonra plağın üzeri MicroAmp™ Clear Adhesive Film (ThermoFisher Scientific, USA) ile kapatıldı.
5. Daha sonra plak 2500 rpm de 20 dk vortekslendi ve 3000 rpm de 3 dk santrifüjlendi.
6. Plak bekletilmeden ABI 3130XL Genetik analizör (16 kapiller, Applied Biosystems™, USA) cihazına yüklendi.

Nükleotid Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen nükleotid dizileri, Sequencher 5.4.6 programı aracılığı ile SARS-CoV-2 Wuhan izolatı (NC_045512.2) referans alınarak birleştirildi ve konsensus dizileri çıkarıldı. (Şekil 9)



Şekil 9. Sequencher 5.4.6 programında konsensüs dizilerin belirlenmesi

Konsensus dizilerin mutasyon analizinde, soy belirlenmesinde ve dendrogram oluşturulmasında Nextclade v1.7.1 (clades.nextstrain.org) platformu kullanıldı.

4. BULGULAR

Kahramanmaraş ilinden 2021 Ağustos ayında çalışmamıza alınan 112 SARS-CoV-2 izolatının N gen bölgesi, referans Wuhan (NC 045512.1) N dizisi ile karşılaştırıldığında izolatların tamamında çeşitli mutasyonlar tespit edildi (Tablo 12). Saptanan mutasyon türlerinden 18'i nonsinonim (yanlış anlamlı), 14'ü sinonim (sessiz) mutasyonlardı. Nonsinonim mutasyonlar, D63G (n=112), R203M (n=112), G215C (n=112), D377Y (n=112), S232G (n=9), E253D (n=9), L139S (n=2), A308S (n=2), R319H (n=2), R41Q (n=2), T24I (n=2), L139F (n=1), T205I (n=1), A119S (n=1), G243C (n=1), A359S (n=1), P364L (n=1), P46S (n=1) olarak saptandı. Sinonim mutasyonlar ise, T29164C (n=6), C28312T (n=5), G29422T (n=5), G29179A (n=4), C28744T (n=3), C29200T (n=2), A29113G (n=2), G28396A (n=2), G29260T (n=1), A28699T (n=1), G29332T (n=1), G29227A (n=1), C29167T (n=1), C28585A (n=1) olarak saptandı. En sık saptanan nükleotid mutasyonu G>T (n=12), ikinci sıklıkta C>T (n=8) idi.

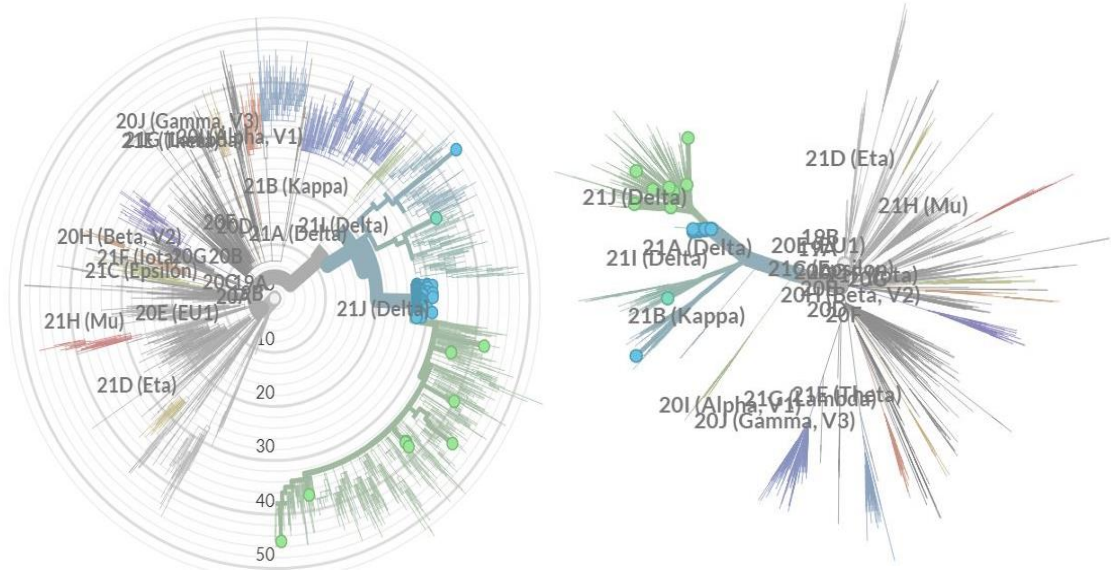
D63G, R203M, G215C, D377Y mutasyonları tüm izolatlarda saptandı. 9 izolatta, mevcut mutasyonlara ek olarak S232G, E253D mutasyonları bir arada saptandı.

D63G, L139S, R41Q, L139F, A119S, P46S mutasyonları, nükleokapsid proteinin N-NTD bölgesinde; E253D, A308S, R319H, A359S, A364L mutasyonları N-CTD bölgesinde; T24I mutasyonu IDR-1 bölgesinde; R203M, G215C, S232G, T205I, G243C mutasyonları IDR-2/LKR bölgesinde; D377Y mutasyonu IDR-3 bölgesinde bulunmaktadır.

Tablo 12. SARS-CoV-2 izolatlarının nükleokapsid gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar

Nükleotid mutasyonu	Aminoasit değişikliği	Mutasyon tipi	Görülen örnek sayısı	Görülme yüzdesi
A28461G	D63G	Nonsinonim	112	100,0%
G28881T	R203M	Nonsinonim	112	100,0%
G28916T	G215C	Nonsinonim	112	100,0%
G29402T	D377Y	Nonsinonim	112	100,0%
A28967G	S232G	Nonsinonim	9	8,0%
G29032T	E253D	Nonsinonim	9	8,0%
T29164C		Sinonim	6	5,3%
C28312T		Sinonim	5	4,4%
G29422T		Sinonim	5	4,4%
G29179A		Sinonim	4	3,5%
C28744T		Sinonim	3	2,6%
T28689C	L139S	Nonsinonim	2	1,7%
G29195T	A308S	Nonsinonim	2	1,7%
G29229A	R319H	Nonsinonim	2	1,7%
G28395A	R41Q	Nonsinonim	2	1,7%
C28344T	T24I	Nonsinonim	2	1,7%
C29200T		Sinonim	2	1,7%
A29113G		Sinonim	2	1,7%
G28396A		Sinonim	2	1,7%
G28690T	L139F	Nonsinonim	1	0,9%
C28887T	T205I	Nonsinonim	1	0,9%
G28628T	A119S	Nonsinonim	1	0,9%
G29000T	G243C	Nonsinonim	1	0,9%
G29348T	A359S	Nonsinonim	1	0,9%
C29364T	P364L	Nonsinonim	1	0,9%
C28409T	P46S	Nonsinonim	1	0,9%
G29260T		Sinonim	1	0,9%
A28699T		Sinonim	1	0,9%
G29332T		Sinonim	1	0,9%
G29227A		Sinonim	1	0,9%
C29167T		Sinonim	1	0,9%
C28585A		Sinonim	1	0,9%

Nextclade v1.7.1 (clades.nextstrain.org) ile referans izolatlarla karşılaştırılıp dendogram oluşturulduğunda 112 örneğin tamamı 21A (Delta) soyu ile gruplanmıştır.



Şekil 12. Nextclade v1.7.1 ile oluşturulan radyal ve 'unrooted' dendrogram (156)

5. TARTIŞMA

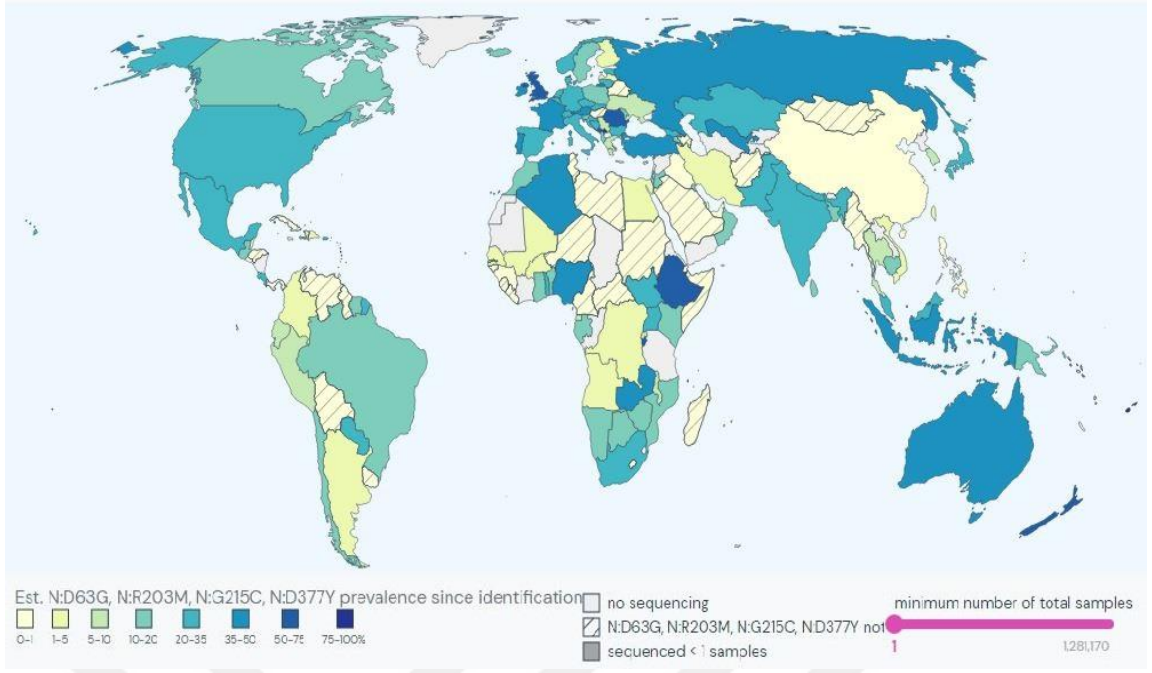
SARS-CoV-2 salgını 2019 Aralık ayında, Çin'in Wuhan şehrinden tüm dünyaya hızla yayılmıştır. 11 Mart 2020' de DSÖ tarafından pandemi ilan edildi ve bu tarihte Türkiye'de ilk SARS-CoV-2 vakası görülmüştür. Salgının başından bu yana COVID-19, 5 milyona yakın ölüme sebep olmuştur ve halen bu salgın ciddiyetini korumaktadır (34).

Tüm dünyadan SARS-CoV-2 kısmi veya tam genomları GISAID'e yüklenerek geniş çapta virolojik izlem yapılmaktadır. Bu izlem sayesinde, 2020'nin sonraki aylarında, artan bulaşıcılık, hastalık şiddeti ve hümmoral bağışıklıktan kaçış ile ilişkili yeni SARS-CoV-2 varyantları tespit edildi. Viral mutasyonlar halk sağlığı açısından çeşitli riskler oluşturmaktadır. Bu riskler, viral yayılımın ve bulaşıcılığın artması, atipik klinik seyir (örn. hastalığın şiddetinin artması, atipik belirti ve semptomlar), reenfeksiyon, bazı laboratuvar tanı testlerinin; özellikle de nükleik asit amplifikasyon testi gibi moleküler testlerin ve antijen saptayan tanı testlerinin performansının düşmesi, terapötiklere duyarlılığının azalması, doğal ve aşı ile kazanılmış bağışıklığın zayıflaması ve aşıya yanıtıslık olasılığının artmasıdır (157).

Yapılan çalışmaların çoğu konak hücreye viral girişi sağlayan S proteinine yöneliktir. Şimdiye kadar viral yaşam döngüsündeki diğer adımlara az sayıda vurgu yapılmıştır. Biz de çalışmamızda viral replikasyonda kritik rol oynayan N geninde ortaya çıkan mutasyonları saptamayı amaçladık.

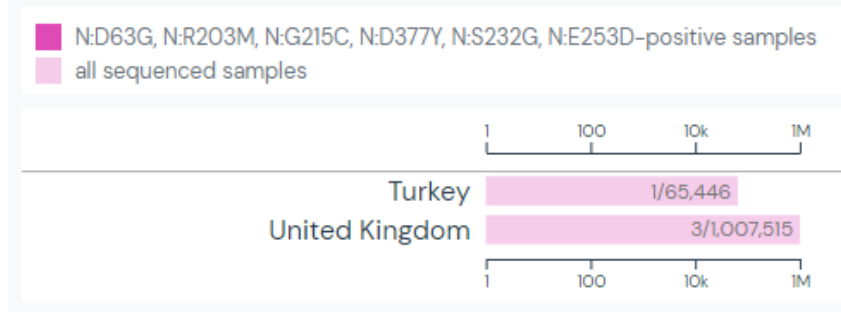
16 Ekim 2021 tarihi itibarıyla erişime açık GISAID veri tabanında Türkiyeden 65.446, dünya geneli ise 4.204.861 SARS-CoV-2 izolatının tüm genom dizisi bulunmaktadır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz mutasyonlar güncel olan bu verilerle kıyaslanmıştır.

Çalışmamızda tüm örneklerde (%100) bir arada görülen D63G, R203M, G215C, D377Y mutasyonları delta varyantına özgüdür (158). GISAID verilerine göre Türkiye'den gönderilen SARS-CoV-2 dizilerinin %50'sinde, dünya genelinde tüm dizilerin %36'sında görülmüştür (Şekil 13) (159). Çalışmamıza alınan tüm izolatlarda görülmesi il bazında bu varyantın yüksek yayılımına işaret etmektedir.



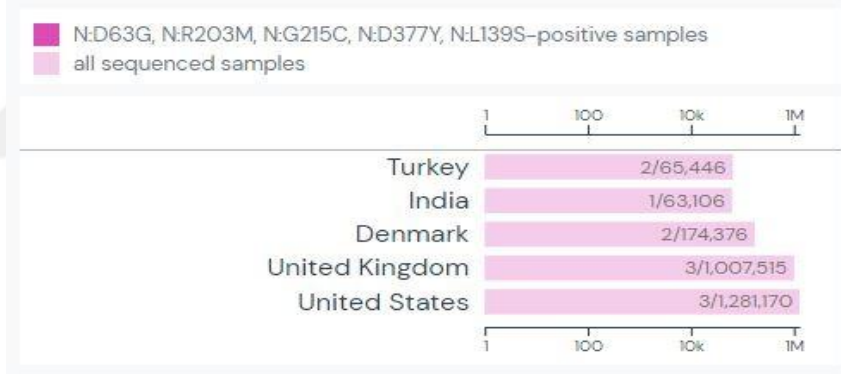
Şekil 13. D63G, R203M, G215C, D377Y mutasyonlarının dünya genelinde prevalansı (159)

Çalışmamızda 9 örnekte (%8); D63G, R203M, G215C, D377Y, S232G, E253D mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 1 izolatta, dünya genelinde sadece 4 izolatta görülmüştür. Diğer 3’ü, İngiltere’den gönderilen 1.007.515 izolat içinde tespit edilmiştir (159) (Şekil 14). Bu mutasyon serisinin görüldüğü izolatlar, İngiltere ile Türkiye arasında bir bağlantı yoluyla yayılmış olabilir veya spontan olarak ortaya çıkmış olabilir. Hasta bilgi formlarında yurtdışı ile ilgili kayıt bulunmadığından, yurtdışı temasa ilişkin bilgi edinilememiştir. Kahramanmaraş’tan alınan örneklerde, diğer bölgelere kıyasla oldukça yüksek oranda bu mutasyon birlikteliğinin tespit edilmesi, mutasyon analizlerinin yerel düzeyde incelenmesini ve takip edilmesinin önemini ortaya koymaktadır.



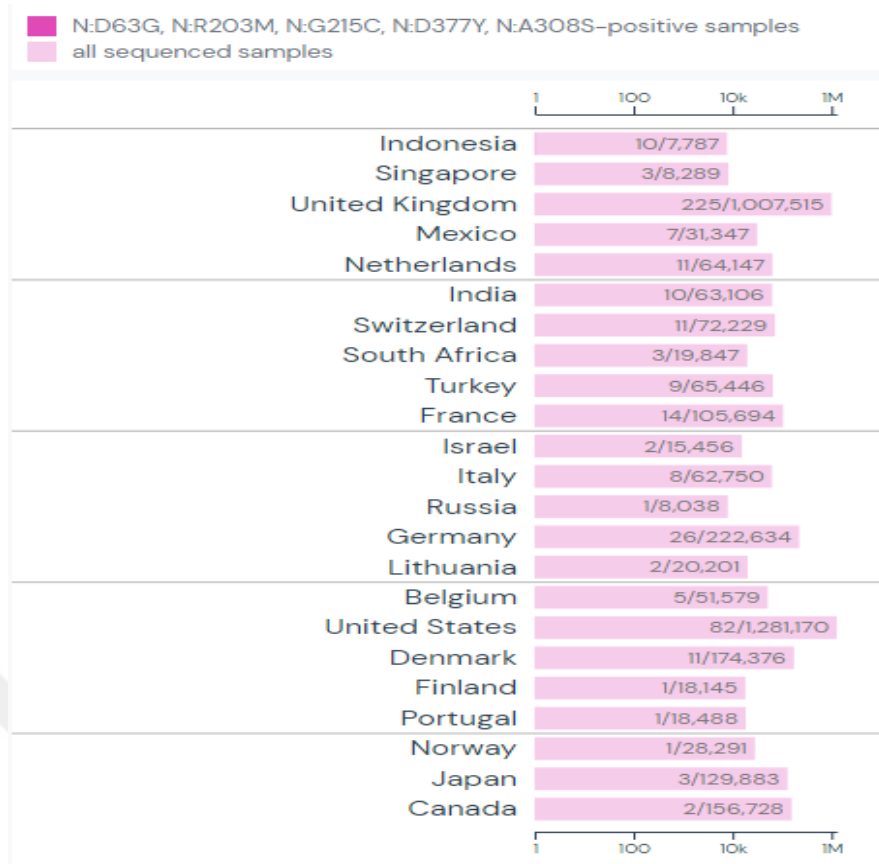
Şekil 14. D63G, R203M, G215C, D377Y, S232G, E253D mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 2 örnekte (%1,7); D63G, R203M, G215C, D377Y, L139S mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 2 izolatta, dünya genelinde sadece 11 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve görülme oranları Şekil 15’te gösterilmiştir.



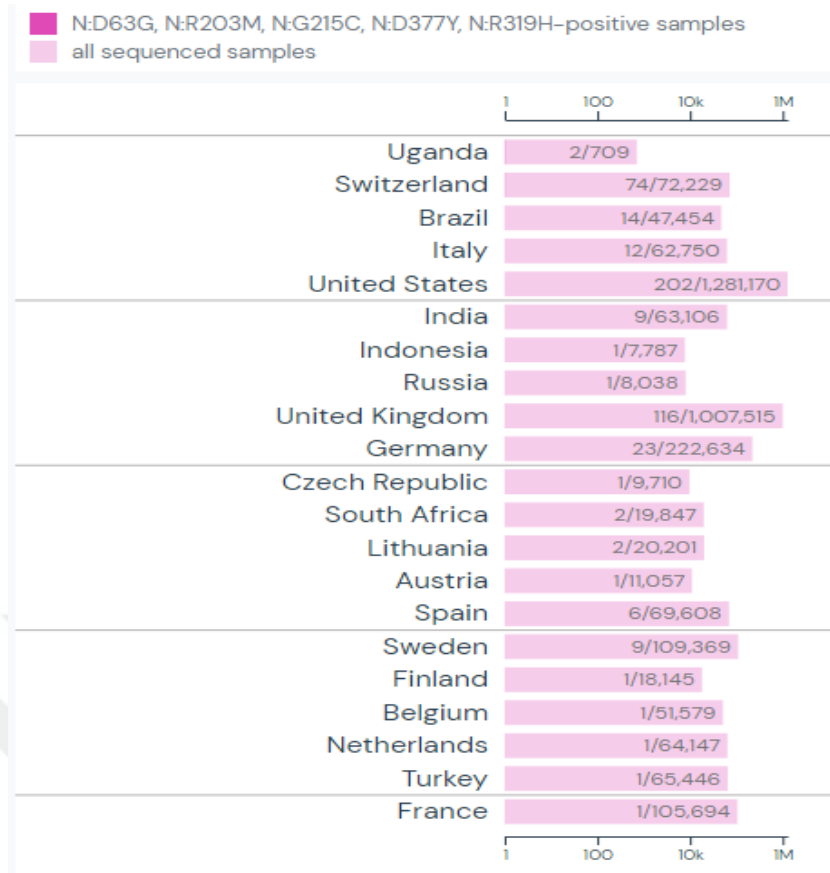
Şekil 15. D63G, R203M, G215C, D377Y, L139S mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 2 örnekte (%1,7); D63G, R203M, G215C, D377Y, A308S mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de 9 izolatta, dünya genelinde ise 448 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 16’da gösterildi.



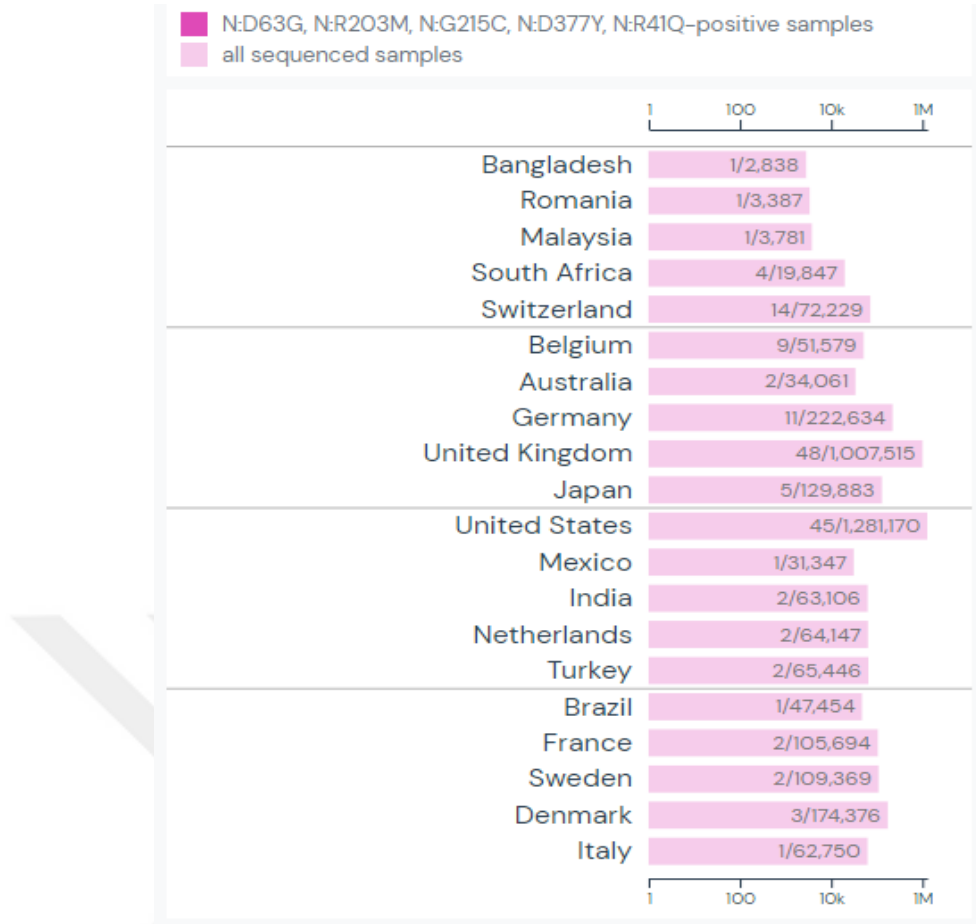
Şekil 16. D63G, R203M, G215C, D377Y, A308S mutasyonlarının prevelansı(159)

Çalışmamızda 2 örnekte (%1,7); D63G, R203M, G215C, D377Y, R319H mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 1 izolatta, dünya genelinde ise 480 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 17’de gösterildi.



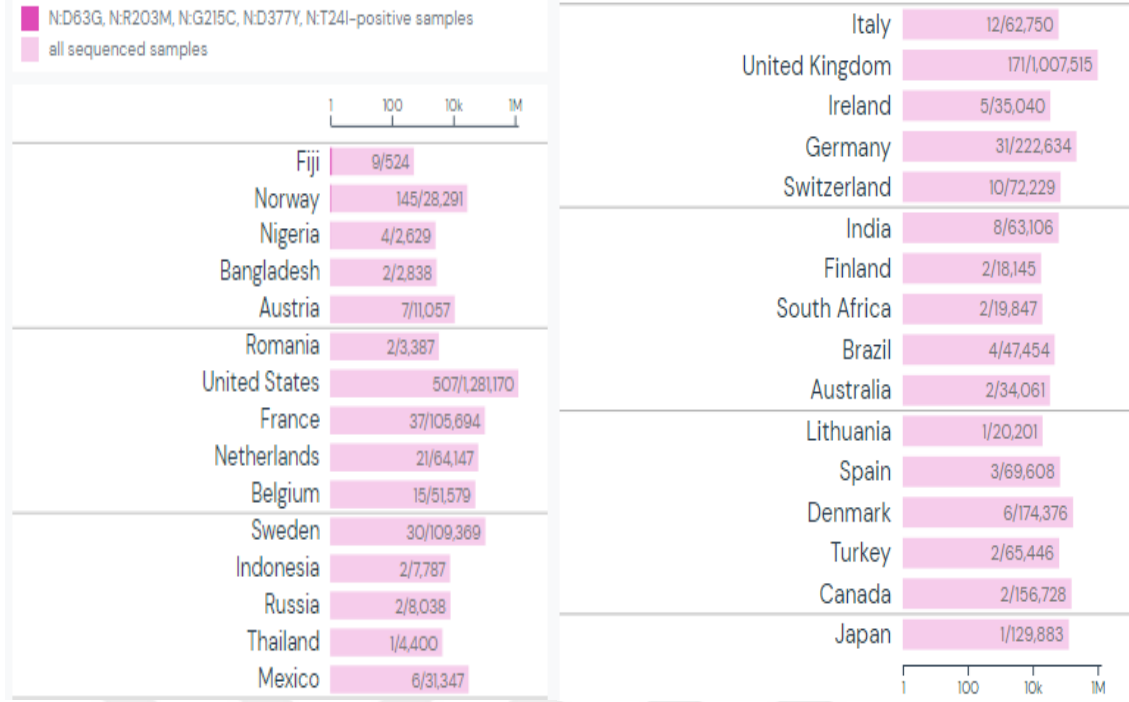
Şekil 17. D63G, R203M, G215C, D377Y, R319H mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 2 örnekte (%1,7); D63G, R203M, G215C, D377Y, R41Q mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 2 izolatta, dünya genelinde ise 157 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 18’de gösterildi.



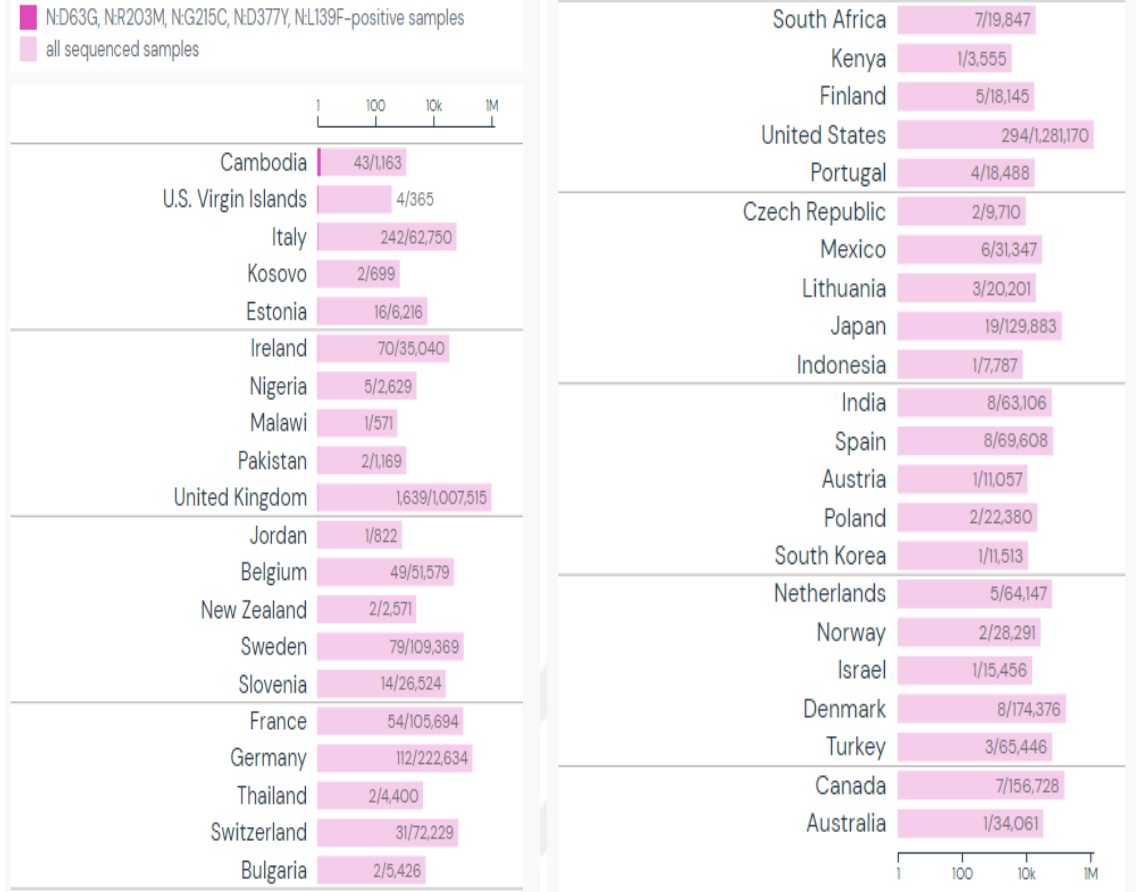
Şekil 18. D63G, R203M, G215C, D377Y, R41Q mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 2 örnekte (%1,7); D63G, R203M, G215C, D377Y, T24I mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 1 izolatta, dünya genelinde ise 1052 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 19’da gösterildi.



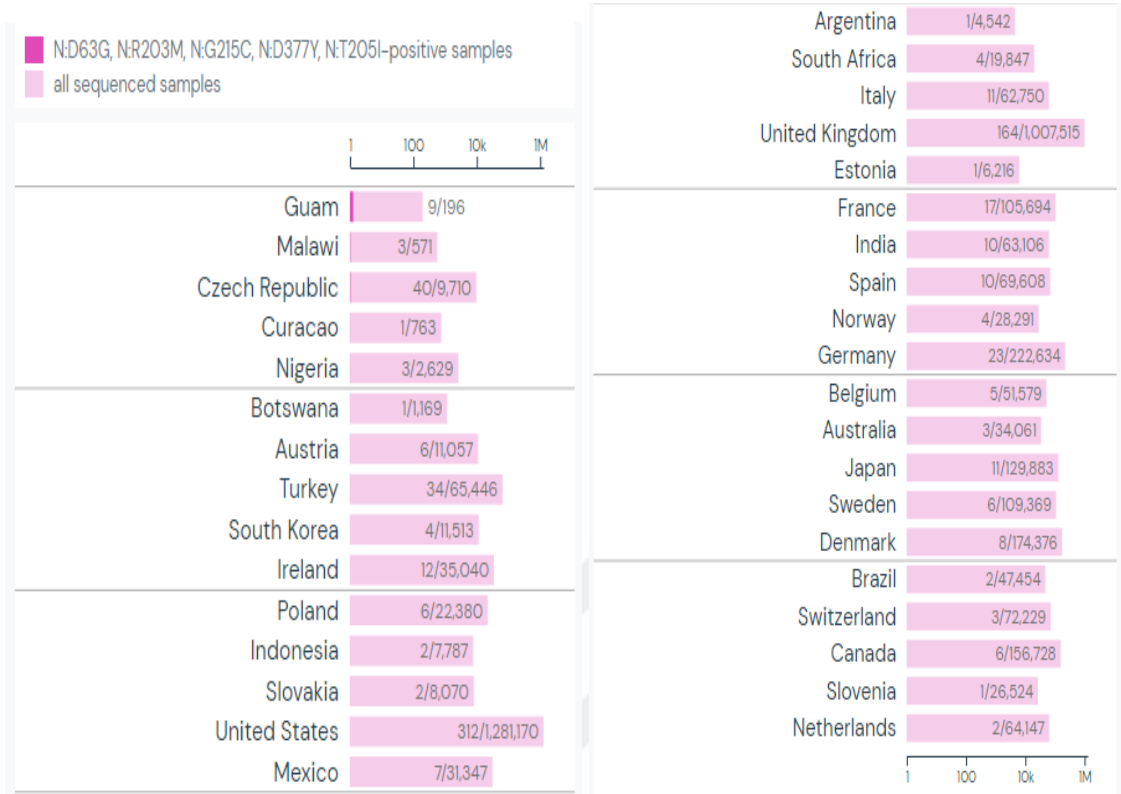
Şekil 19. D63G, R203M, G215C, D377Y, T24I mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, L139F mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 3 izolatta, dünya genelinde ise 2759 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 20’de gösterildi.



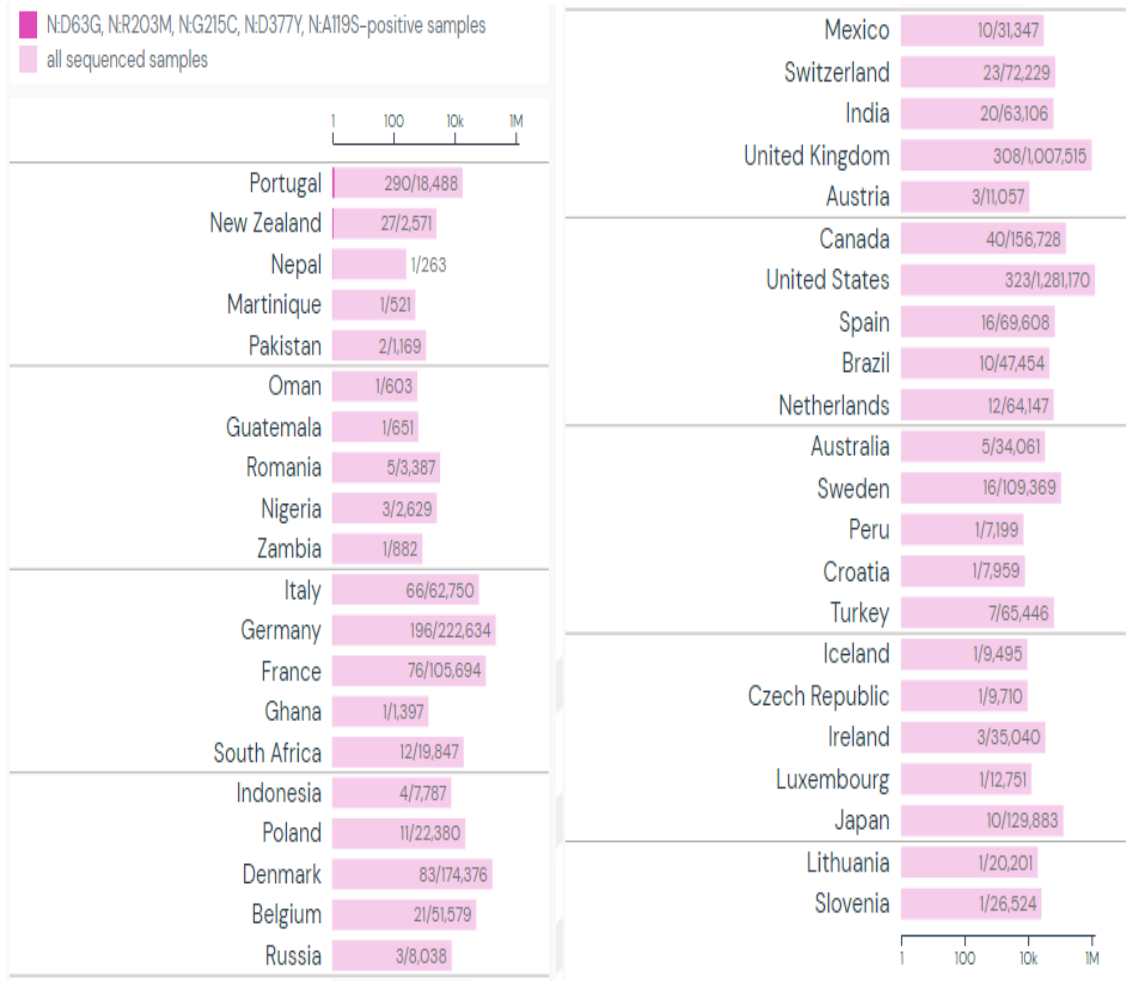
Şekil 20. D63G, R203M, G215C, D377Y, L139F mutasyonlarının prevalansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, T205I mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de 34 izolatta, dünya genelinde ise 734 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevalansı şekil 21’de gösterildi.



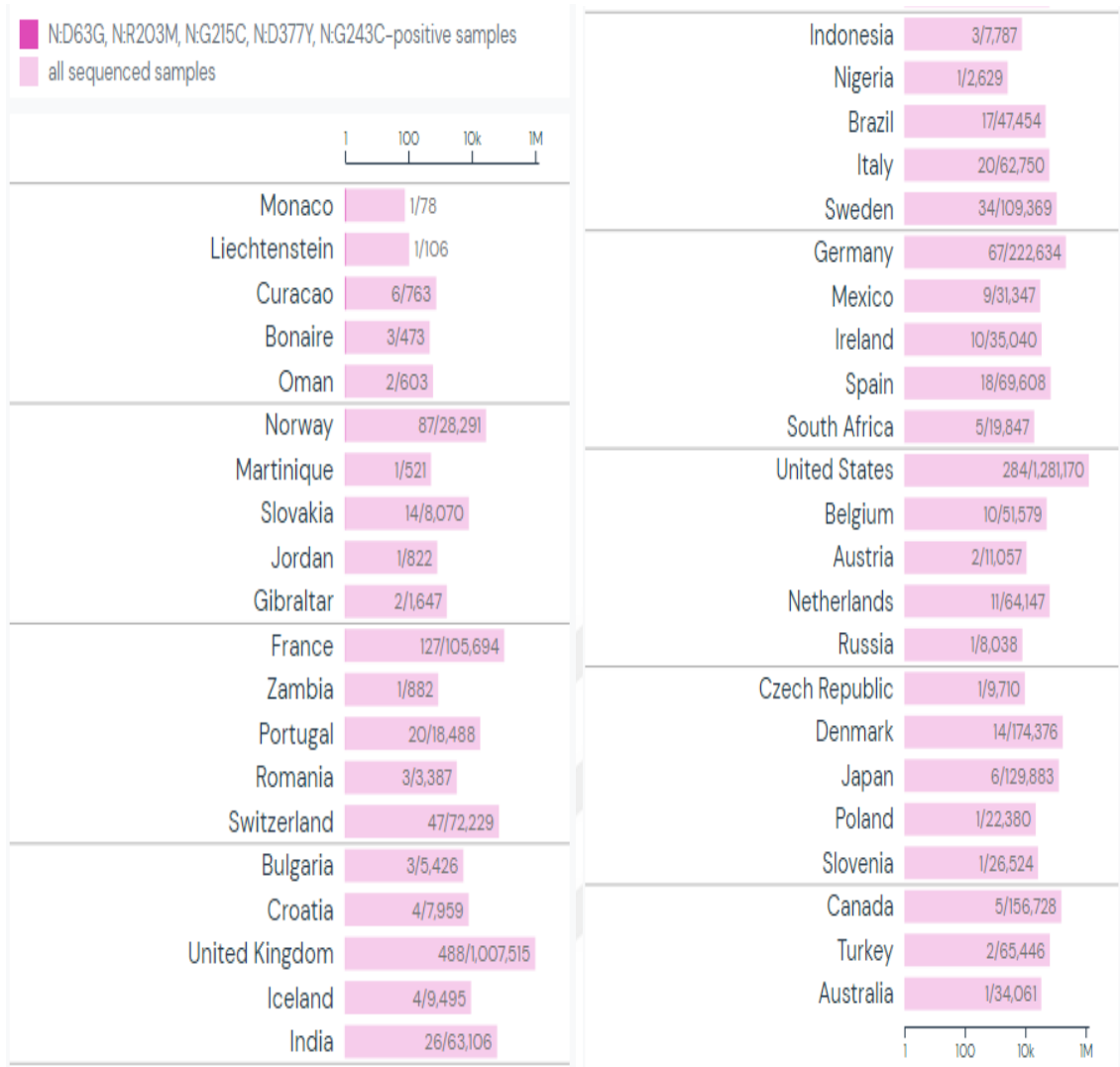
Şekil 21. D63G, R203M, G215C, D377Y, T205I mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, A119S mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de 7 izolatta, dünya genelinde ise 1618 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 22’de gösterildi.



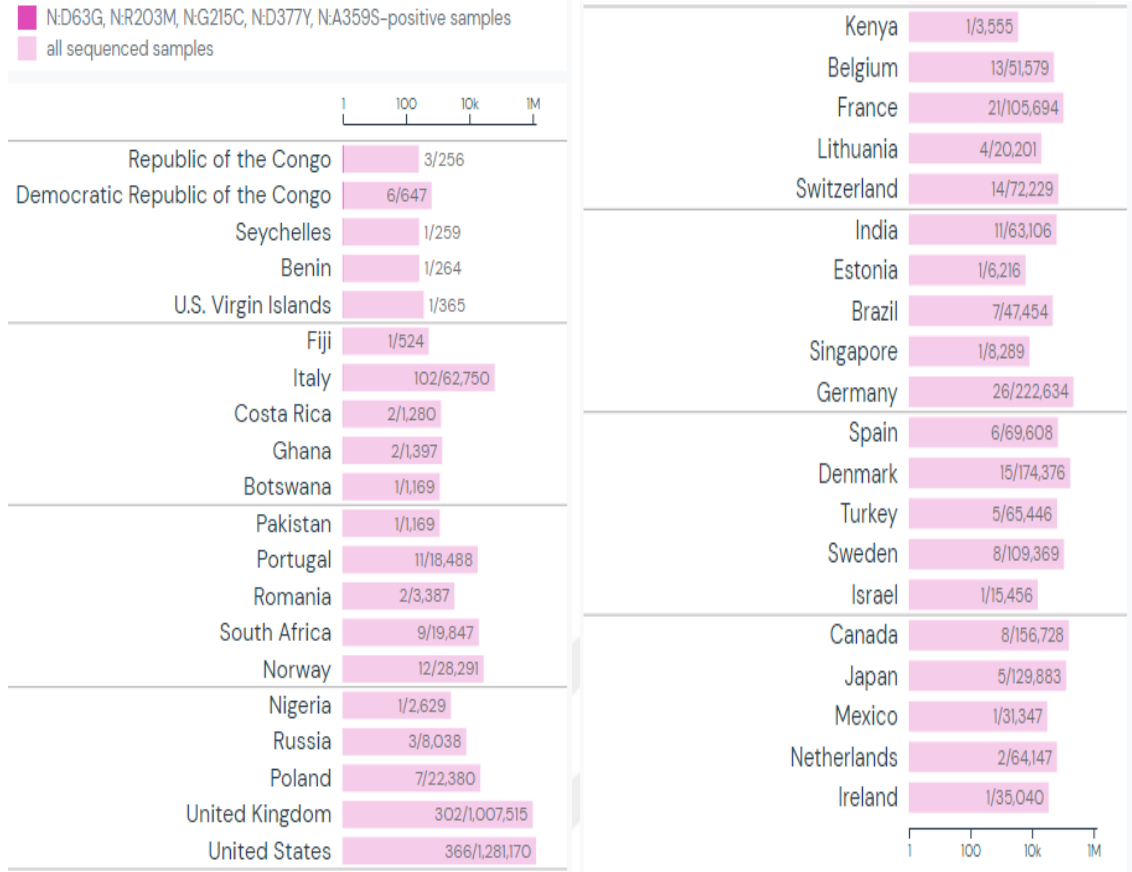
Şekil 22. D63G, R203M, G215C, D377Y, A119S mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, G243C mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 2 izolatta, dünya genelinde ise 1364 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 23’de gösterildi.



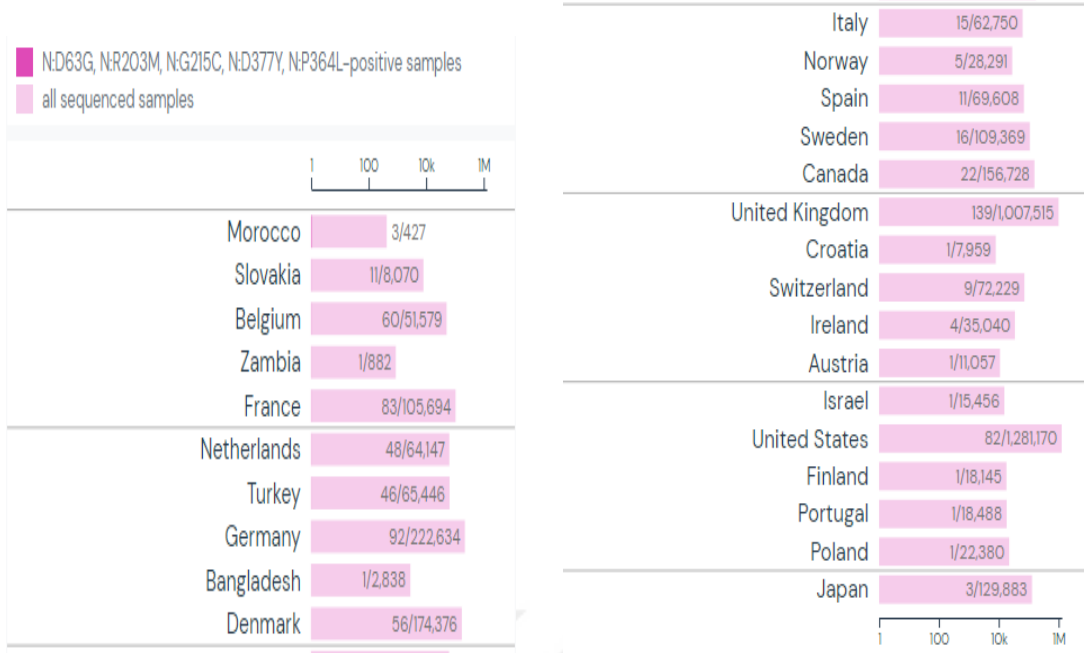
Şekil 23. D63G, R203M, G215C, D377Y, G243C mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, A359S mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de 5 izolatta, dünya genelinde ise 985 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 24’de gösterildi.



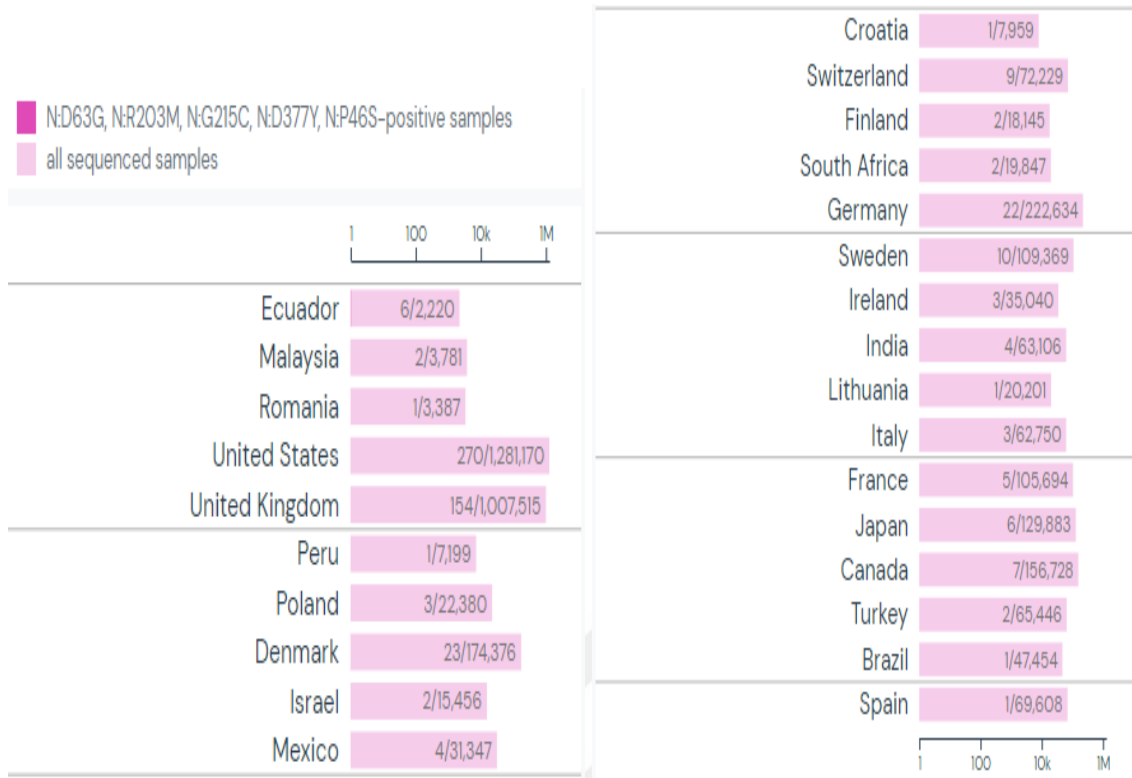
Şekil 24. D63G, R203M, G215C, D377Y, A359S mutasyonlarının prevalansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, P364L mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de 46 izolatta, dünya genelinde ise 713 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevalansı şekil 25’de gösterildi.



Şekil 25. D63G, R203M, G215C, D377Y, P364L mutasyonlarının prevelansı (159)

Çalışmamızda 1 örnekte (%0,9); D63G, R203M, G215C, D377Y, P46S mutasyonları bir arada görüldü. GISAID veri tabanında Türkiye’de sadece 2 izolatta, dünya genelinde ise 545 izolatta görülmüştür (159). Mutasyonların görüldüğü diğer ülkeler ve prevelansı şekil 26’da gösterildi.



Şekil 26. D63G, R203M, G215C, D377Y, P46S mutasyonlarının prevelansı (159)

25 Mart ile 22 Mayıs 2020 tarihleri arasında Türkiye’den 62 SARS-CoV-2 genomunun analiz edildiği bir çalışmada, 21 izolatta N proteininde R203K, G204R, S194L, S188P mutasyonları tespit edilmiştir (160). Bu çalışma Türkiye’deki ilk vakaların görüldüğü dönemde yapılmıştır ve bu mutasyonlara çalışmamızda rastlanmamıştır.

Salgının başından itibaren 1 Haziran 2020 ye kadar toplanan 15140 SARS-CoV-2 genomunun incelendiği bir çalışmada N geninde en sık tespit edilen mutasyonların, R203K, G204R, P13L, D128D, L139L, S188L, S202N, D103Y ve I292T olduğu görülmüştür. Popülasyon düzeyinde N genindeki nükleotitlerin %40’ında mutasyon belirlenmiştir (161). Bizim çalışmamızda bu mutasyonların hiçbiri saptanmamıştır.

7 Haziran 2020 tarihine kadar, NCBI virüs veri tabanına Hindistandan bildirilen 175 SARS CoV-2 N dizisinin analiz edildiği bir çalışmada N geninde yirmi mutasyon ortaya çıkarılmıştır. Bunlardan altı pozisyonadaki mutasyon, N proteininin sekonder yapısında değişikliklere yol açmıştır. Ayrıca bu mutasyonların N proteininin yapısını ve stabilitesini büyük olasılıkla etkilediği sonucuna varılmıştır. En sık S194L ve P13L saptanmıştır. N proteininin NTD ve CTD bölgesinde bulunan mutasyonların sekonder

yapıda değişikliğe yol açtığı görülmüştür (162). Çalışmamızda NTD ve CTD bölgesinde mutasyonlar saptanmıştır; fakat bu çalışmada görülen en sık mutasyonlar çalışmamızda görülmemiştir.

NCBI virüs veri tabanına 23 Haziran 2020 tarihine kadar ABD’den bildirilen 4.163 SARS-CoV-2 izolatının incelendiğı bir çalışmada N proteininde 107 mutasyon tespit edilmiştir. Bu çalışmada en çok gözlemlenen ilk 10 mutasyonun; R203K, G204R, E62V, A208G, S183Y, S194L, T362I, T205I, P13L ve R185C olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu mutasyonların potansiyel olarak N proteinin dinamik stabilitesini değiştirebileceğı gösterilmiştir. Daha önceki çalışmalar, serin ve arginin açısından zengin bağlayıcı bölgenin (IDR2/LKR), esas olarak serin kalıntılarında fosforilasyon yoluyla hücre içi sinyalleşme olaylarında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, serin rezidülerinin bu mutasyonlarının fosforilasyon sinyalini değiştirmiş olabileceğı düşünülmektedir. N proteinin, hızla değişen SARS-CoV-2'nin mutasyonel etkin nokta proteinlerinden biri olduğu ve bu mutasyonların, RNA ile etkileşimi, oligomerizasyon ve sinyalleşme dahil olmak üzere N protein fonksiyonlarının çeşitli yönlerine potansiyel olarak müdahale edebileceğine dikkat çekilmiştir (163). Çalışmamızda IDR-2/LKR bölgesinde; R203M, G215C, S232G, T205I, G243C mutasyonları tespit edildi. Bu çalışmada tespit edilen ilk 10 mutasyon arasındaki T205I mutasyonu sadece 1 örneğimizde tespit edilmiştir.

Haziran 2020’de yapılan bir çalışmada, yedi Güney Amerika ülkesinden (Arjantin, Brezilya, Şili, Ekvador, Peru, Uruguay ve Kolombiya) SARS-CoV-2'nin S ve N proteinlerinin toplam 504 aminoasit ve nükleotid dizisi incelenmiştir. N genindeki R203K, G204R mutasyonları Güney Amerika’da en sık görülenler olup dizilerin %34’ünde gözlenmiştir. N geninde en sık, R203K (%34,5), G204R (%34,3), I292T (%15,8) ve S197L(%3,3) mutasyonları görülmüştür. COVID-19 pandemisi sırasında S ve N proteinlerinin, serolojik ve moleküler testlerde en çok hedeflenen bölgeler olduğu düşünüldüğünde, nükleotid ve aminoasit değişikliklerinin ve bunların sıklıklarının belirlenmesinin aşı, tanı testleri ve terapötik bileşiklerin geliştirilmesinde faydalı olabileceğine dikkat çekilmiştir (8). Salgının erken dönemlerinde yapılan bu çalışmada sık görülen mutasyonlara çalışmamızda rastlanmamıştır.

Salgının başından 17 Temmuz 2020’ye kadar GISAID’e bildirilen 61.485 SARS-CoV-2 N genindeki sinonim ve nonsinonim mutasyonların incelendiğı bir çalışmada, N geninde dünya çapında toplam 1034 farklı nükleotid mutasyonu tanımlanmıştır. Bu

mutasyonlardan 367'si, tanısal moleküler testlerde hedeflenen primer bağlanma bölgelerinde görülmüştür. 317 pozisyonda 684 aminoasit mutasyonu tespit edilmiştir. SARS-CoV-2'nin N proteininin izolat başına ortalama 1,2 mutasyon içerdiği görülmüştür. Bu oran MERS ve SARS'ta sırasıyla 4,4 ve 0,4'tür. Bu çalışmada, profilaktik ve tanısal müdahaleler için SARS-CoV-2 N geninin evrimsel değişiminin sürekli olarak izlenmesini gerektiğine dikkat çekilmiştir (164). Bu çalışmada N geninin NTD bölgesinde tespit edilen L139F, A119S ve CTD bölgesinde tespit edilen R319H, A359S, P364L mutasyonları bizim çalışmamızda da görülmüştür.

23 Temmuz 2020'ye kadar toplanan 31.421 SARS-CoV-2 genom örneğinin incelendiği bir çalışmada, mevcut COVID-19 tanı hedeflerinin tamamının mutasyona uğradığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca COVID-19 tanısı koymak için dünya çapında yaygın olarak kullanılan SARS-CoV-2'nin çeşitli N gen hedef primer ve prob bölgelerinin en fazla mutasyona uğradığı gösterilmiştir (165).

Dünya çapında 117 ülkeden 29 Aralık 2019'dan 12 Eylül 2020'ye kadar toplam 105.276 SARS-CoV-2 genomunun incelendiği bir çalışmada, S, E, M ve N proteinlerinin aminoasit koruma derecesi ve epidemiyolojik haftaya göre küresel ve bölgesel zamansal değişimi araştırılmıştır. 99.657 N dizisi analiz edilmiş ve N proteinindeki 419 aminoasitin 359'unda (%85,7) 890 aa değişikliği bulunmuştur. N proteini diğer yapısal proteinlere göre düşük koruma oranını (%99,7) gösterdiği görülmüştür. Bölgesel analizde en sık görülen N mutasyonları: Avrupa'da D103Y, S194L ve S197L (%3,2, %2,8 ve %2,3); Kuzey Amerika'da S194L (%4,3); Asya'da P13L, S194L ve S202N (%15, %6,4 ve %2,5); Okyanusya'da P13L, S197L ve L230F (sırasıyla %5,7; %4,8 ve %2,7); Güney Amerika'da I292T (%25) ve Afrika'da Q384H ve S202N (%7 ve %3,8) (166). Bahsedilen çalışma salgının başlarında yapılmış ve çalışmamızda bu mutasyonlara rastlanmamıştır. Bu da N geninde görülen mutasyonların değişim gösterdiğini düşündürmektedir.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2 nükleokapsid proteini mutasyonlarının farklı izolatların yayılım, enfektivite ve virülansında önemli rol oynadığına dair artan kanıtlar vardır.

Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, SARS-CoV-2 N proteinindeki iki ardışık mutasyonun (R203K-G204R) COVID-19 hastalarında daha yüksek viral yüklerle ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu mutasyonların, düzensiz interferon

yanıtına yol açarak konak immün yanıtını modüle ettiği gösterilmiştir. N proteininin potansiyel bir ilaç hedefi olabileceği belirtilmiştir (167). Bir diğer çalışmada, N proteinindeki immundominant N4P5 epitopunun yüksek duyarlılık (>%96) ve özgüllükte (%100) IgG yanıtı oluşturduğu tespit edilmiştir (168).

Çin’de yapılan bir çalışmada, 203K-204R mutasyonlarının, SARS-CoV-2’nin artan bulaşma ve virölansına katkı sağladığı görülmüştür. S proteinindeki mutasyonlara ek olarak, nükleokapsid proteinindeki mutasyonların viral yayılım için önemli olduğu gösterilmiştir (169).

GISAID’ten 4566 SARS-CoV-2 nükleotid dizisinin incelendiği bir çalışmada N geninde S197L mutasyonu hafif hastalıkla; P13L, S194L, R203K, G204R ve I292T mutasyonları ise ciddi hastalıkla ilişkilendirilmiştir (170).

Delta varyantlarının incelendiği bir çalışmada, bu varyantın yüksek yayılımının bilindiği gibi S proteini mutasyonlarından daha çok N:G215C mutasyonundan kaynaklandığı gösterilmiştir (171). Bu mutasyon çalışmamızdaki tüm örneklerde saptanmıştır.

683 COVID-19 hastasının dahil edildiği bir vaka-kontrol çalışmasında, endoRNazda (nsp15) bulunan N73N sinonim mutasyonu ve N proteininde R203K, R203S ve G204R nonsinonim mutasyonlarının hastalığın şiddeti ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu araştırma, nükleokapsid proteininin sitokin fırtınasını ve hastaneye kaldırılan şiddetli COVID-19’u tetiklemedeki potansiyel işlevsel rolüne işaret etmektedir. Çalışma ayrıca klinik durumla korelasyon içinde viral dizilerin izlenmesi ve analiz edilmesi gerekliliğini vurgulamıştır (172).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda bahsedildiği üzere, nükleokapsid geninin beklenilenin aksine yüksek oranda mutasyona uğradığı görülmüştür. Ayrıca SARS-CoV-2’nin diğer yapısal proteinlerine kıyasla en korumasız bölge olduğu saptanmıştır (161,165,173). Nükleokapsid geninde meydana gelen mutasyonların virölansı artırdığı, COVID-19 kliniğini olumsuz yönde etkilediği ve bulaşı artırdığı ortaya konmuştur. Salgının başından itibaren tanı testlerinde hedef olarak kullanılan bu proteinde yüksek oranda mutasyon görülmesi, bu testlerin güvenilirliğini tehlikeye atmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SARS-CoV-2'nin sadece nükleokapsid gen bölgesini hedefleyen çalışmamız az sayıda örnekle ve kısa bir zaman diliminde yapılmasına karşın yüksek oranda ve farklılıkta nükleokapsid mutasyonları ortaya çıkarmış ve varyant tayinine olanak sağlamıştır.

SARS-CoV-2 mutasyonlarının sürekli takip edilerek viral değişimin izlenmesi gerekmektedir. Nükleokapsid geninin diğer bölgelere göre kısa uzunlukta (1260 bp) olması, mutasyonların daha kısa sürede ve daha kolay tespitine olanak sağlamaktadır. Ayrıca maliyet etkin hale getirmektedir. Varyantlara özgü nükleokapsid mutasyonları görülmektedir ve bu veriler sürekli olarak güncellenmektedir. Dolaşımda olan viral varyantların tespiti için nükleokapsid geninin kullanılabilirliğinin araştırılması gerekmektedir. Yerel ölçekte (il düzeyinde) yapılacak benzer çalışmaların ulusal sürveyansa katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Farklı bölgelerde, salgının epidemiyolojik yayılımının izlenmesi, patojenin evrimini ve ilerlemesini takip etmek ve tanı, tedavi, aşı çalışmalarına katkı sağlamak için gen analizlerinin yapılması son derece önemlidir. Nükleokapsid geni ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamız nükleokapsid geni araştırmalarına katkı sağlamakta ve nükleokapsid geni analizlerine dikkat çekmektedir. Devam eden COVID-19 pandemisinin ciddiyeti göz önüne alındığında, SARS-CoV-2 araştırmalarının artarak devam etmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 1-14.
2. Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., ... & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878.
3. Demir, A. B., Benvenuto, D., ABACIOĞLU, Y. H., Angeletti, S., & Ciccozzi, M. (2020). Identification of the nucleotide substitutions in 62 SARS-CoV-2 sequences from Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 44(SI-1), 178-184.
4. Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., ... & Reggiori, F. (2020). Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *Journal of virology*, 94(4), e01925-19.
5. Sheikh, A., Al-Taher, A., Al-Nazawi, M., Al-Mubarak, A. I., & Kandeel, M. (2020). Analysis of preferred codon usage in the coronavirus N genes and their implications for genome evolution and vaccine design. *Journal of virological methods*, 277, 113806.
6. Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., ... & Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 527(3), 618-623.
7. Ye, Q., West, A. M., Silletti, S., & Corbett, K. D. (2020). Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science*, 29(9), 1890-1901.
8. Franco-Muñoz, C., Álvarez-Díaz, D. A., Laiton-Donato, K., Wiesner, M., Escandón, P., Usme-Ciro, J. A., ... & Mercado-Reyes, M. (2020). Substitutions in Spike and Nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 circulating in South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104557.
9. Mercatelli, D., & Giorgi, F. M. (2020). Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations.

10. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.
11. Yesudhas, D., Srivastava, A., & Gromiha, M. M. (2021). COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*, 49(2), 199-213.
12. Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 104502.
13. Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418-423.
14. Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 221-236.
15. Chen, J. (2020). Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—a quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes and infection*, 22(2), 69-71.
16. Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., ... & Ziebuhr, J. (2020). The species severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 5: 536–544.
17. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., ... & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 395(10224), 565-574.
18. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.
19. Nakagawa, S., & Miyazawa, T. (2020). Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. *Inflammation and regeneration*, 40(1), 1-7.

20. Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2020). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.
21. Rahimi, A., Mirzazadeh, A., & Tavakolpour, S. (2020). Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*.
22. Hasöksüz, M., Kiliç, S., & Saraç, F. (2020). Coronaviruses and sars-cov-2. *Turkish journal of medical sciences*, 50(SI-1), 549-556.
23. Yin, C. (2020). Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. *Genomics*, 112(5), 3588-3596.
24. Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10.
25. Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., ... & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of molecular biology*, 433(2), 166725.
26. Yoshimoto, F. K. (2020). The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19. *The protein journal*, 39, 198-216.
27. Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, 16(1), 1-22.
28. Rahman, M. S., Hoque, M. N., Islam, M. R., Islam, I., Mishu, I. D., Rahaman, M. M., ... & Hossain, M. A. (2021). Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene reports*, 22, 100997.
29. McBride, R., Van Zyl, M., & Fielding, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses*, 6(8), 2991-3018.
30. Yang, M., He, S., Chen, X., Huang, Z., Zhou, Z., Zhou, Z., ... & Kang, S. (2021). Structural Insight Into the SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein C-Terminal Domain Reveals a Novel Recognition Mechanism for Viral Transcriptional Regulatory Sequences. *Frontiers in chemistry*, 8, 1238.

31. Romano, M., Ruggiero, A., Squeglia, F., Maga, G., & Berisio, R. (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9(5), 1267.
32. Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of basic Microbiology*, 61(3), 180-202.
33. Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends in immunology*.
34. <https://covid19.who.int/>
35. <https://covid19.saglik.gov.tr/>
36. <https://covid19asi.saglik.gov.tr/>
37. Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135.
38. Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192.
39. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 579(7798), 270-273.
40. Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., ... & Shi, W. (2020). A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Current Biology*, 30(11), 2196-2203.
41. Lau, S. K., Luk, H. K., Wong, A. C., Li, K. S., Zhu, L., He, Z., ... & Woo, P. C. (2020). Possible bat origin of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1542.
42. Wong, M. C., Cregeen, S. J. J., Ajami, N. J., & Petrosino, J. F. (2020). Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019. *BioRxiv*.
43. Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., ... & Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 282-285.

44. Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., ... & Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), 286-289.
45. Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., ... & Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020.
46. Chen, H., Guo, J., Wang, C., Luo, F., Yu, X., Zhang, W., ... & Zhang, Y. (2020). Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The lancet*, 395(10226), 809-815.
47. Ortiz-Prado, E., Simbaña-Rivera, K., Gómez-Barreno, L., Rubio-Neira, M., Guaman, L. P., Kyriakidis, N. C., ... & López-Cortés, A. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 98(1), 115094
48. Salzberger, B., Buder, F., Lampl, B., Ehrenstein, B., Hitzenbichler, F., Holzmann, T., ... & Hanses, F. (2020). Epidemiology of SARS-CoV-2. *Infection*, 1-7.
49. Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., ... & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*, 1-17.
50. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
51. Triggie, C. R., Bansal, D., Ding, H., Islam, M. M., Farag, E. A. B. A., Hadi, H. A., & Sultan, A. A. (2021). A comprehensive review of viral characteristics, transmission, pathophysiology, immune response, and management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a basis for controlling the pandemic. *Frontiers in immunology*, 12, 338.
52. Zarandi, P. K., Zinatizadeh, M. R., Zinatizadeh, M., Yousefi, M. H., & Rezaei, N. (2021). SARS-CoV-2: from the pathogenesis to potential anti-viral treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111352.

53. Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*, 324(8), 782-793.
54. Lotfi, M., & Rezaei, N. (2020). SARS-CoV-2: A comprehensive review from pathogenicity of the virus to clinical consequences. *Journal of medical virology*, 92(10), 1864-1874.
55. Khosroshahi, L. M., Rokni, M., Mokhtari, T., & Noorbakhsh, F. (2021). Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview. *International Immunopharmacology*, 93, 107364.
56. García, L. F. (2020). Immune response, inflammation, and the clinical spectrum of COVID-19. *Frontiers in immunology*, 11, 1441.
57. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.-C., Uhl S., Hoagland D., Möller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*. 2020.
58. Galani IE, Rovina N., Lamprooulou V., Triantafyllia V., Manioudaki M., Pavlos E., Koukaki E., Fragkou PC, Panou V., Rapti V. Temporal tip I/ III interferon kalıpları ve grip karşılaştırması. *Nat. immünol.* 2021; 22 :32–40.
59. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*.
60. Kumar, S., Nyodu, R., Maurya, V. K., & Saxena, S. K. (2020). Host immune response and immunobiology of human SARS-CoV-2 infection. In *Coronavirus disease 2019 (COVID-19)* (pp. 43-53). Springer, Singapore.
61. Rokni, M., Ghasemi, V., & Tavakoli, Z. (2020). Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. *Reviews in medical virology*, 30(3), e2107.
62. Toor, S. M., Saleh, R., Sasidharan Nair, V., Taha, R. Z., & Elkord, E. (2021). T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology*, 162(1), 30-43.
63. Wu, Y. C., Chen, C. S., & Chan, Y. J. (2020). The outbreak of COVID-19: an overview. *Journal of the Chinese medical association*, 83(3), 217.

64. Yuki, K., Fujiogi, M., & Koutsogiannaki, S. (2020). COVID-19 pathophysiology: A review. *Clinical immunology*, 108427.
65. Liu, Y., Mao, B., Liang, S., Yang, J. W., Lu, H. W., Chai, Y. H., ... & Xu, J. F. (2020). Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *European Respiratory Journal*, 55(5).
66. Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., & Langlois, M. A. (2020). Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. *Frontiers in immunology*, 11.
67. Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W. (2020). Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *Journal of clinical microbiology*, 8(6), e00512-20.
68. Younes, N., Al-Sadeq, D. W., Al-Jighefee, H., Younes, S., Al-Jamal, O., Daas, H. I., ... & Nasrallah, G. K. (2020). Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 582.
69. Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., Nikpour, B., ... & Jahanshahi-Anbuhi, S. (2021). Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3), e00228-20.
70. Chan, J. F. W., Yip, C. C. Y., To, K. K. W., Tang, T. H. C., Wong, S. C. Y., Leung, K. H., ... & Yuen, K. Y. (2020). Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 58(5), e00310-20.
71. Li, C., Zhao, C., Bao, J., Tang, B., Wang, Y., & Gu, B. (2020). Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 510, 35.
72. Salian, V. S., Wright, J. A., Vedell, P. T., Nair, S., Li, C., Kandimalla, M., ... & Kandimalla, K. K. (2021). COVID-19 transmission, current treatment, and future therapeutic strategies. *Molecular pharmaceutics*, 18(3), 754-771.

73. Sheahan, T. P., Sims, A. C., Graham, R. L., Menachery, V. D., Gralinski, L. E., Case, J. B., ... & Baric, R. S. (2017). Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Science translational medicine*, 9(396).
74. Martinez, M. A. (2020). Compounds with therapeutic potential against novel respiratory 2019 coronavirus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(5), e00399-20.
75. Warren, T. K., Jordan, R., Lo, M. K., Ray, A. S., Mackman, R. L., Soloveva, V., ... & Bavari, S. (2016). Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. *Nature*, 531(7594), 381-385
76. Wang, M., Cao, R., Zhang, L., Yang, X., Liu, J., Xu, M., ... & Xiao, G. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell research*, 30(3), 269-271.
77. de Wit, E., Feldmann, F., Cronin, J., Jordan, R., Okumura, A., Thomas, T., ... & Feldmann, H. (2020). Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(12), 6771-6776.
78. Sheahan, T. P., Sims, A. C., Leist, S. R., Schäfer, A., Won, J., Brown, A. J., ... & Baric, R. S. (2020). Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nature communications*, 11(1), 1-14.
79. Grein, J., Ohmagari, N., Shin, D., Diaz, G., Asperges, E., Castagna, A., ... & Flanigan, T. (2020). Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 382(24), 2327-2336.
80. Parasher, A. (2021). COVID-19: Current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. *Postgraduate Medical Journal*, 97(1147), 312-320.
81. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Schinazi, R. F., & Götte, M. (2021). Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *Journal of Biological Chemistry*, 100770.

82. Kabinger, F., Stiller, C., Schmitzová, J., Dienemann, C., Kokic, G., Hillen, H. S., ... & Cramer, P. (2021). Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis. *Nature structural & molecular biology*, 28(9), 740-746.
83. <https://www.merck.com/news/merck-and-ridgebacks-investigational-oral-antiviral-molnupiravir-reduced-the-risk-of-hospitalization-or-death-by-approximately-50-percent-compared-to-placebo-for-patients-with-mild-or-moderat/>
84. <https://www.merck.com/news/merck-and-ridgeback-announce-submission-of-emergency-use-authorization-application-to-the-u-s-fda-for-molnupiravir-an-investigational-oral-antiviral-medicine-for-the-treatment-of-mild-to-moderate-c/>
85. AbbVie Inc; North Chicago, IL: December 2019. Kaletra (lopinavir and ritonavir) tablets and oral solution [prescribing information]
86. Yao, T. T., Qian, J. D., Zhu, W. Y., Wang, Y., & Wang, G. Q. (2020). A systematic review of lopinavir therapy for SARS coronavirus and MERS coronavirus—A possible reference for coronavirus disease-19 treatment option. *Journal of medical virology*, 92(6), 556-563.
87. Cao, B., Wang, Y., Wen, D., Liu, W., Wang, J., Fan, G., ... & Wang, C. (2020). A trial of lopinavir–ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *New England Journal of Medicine*.
88. Amanat, F., & Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines: status report. *Immunity*, 52(4), 583-589.
89. Best, K., Guedj, J., Madelain, V., de Lamballerie, X., Lim, S. Y., Osuna, C. E., ... & Perelson, A. S. (2017). Zika plasma viral dynamics in nonhuman primates provides insights into early infection and antiviral strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(33), 8847-8852.
90. Madelain, V., Guedj, J., Mentré, F., Nguyen, T. H. T., Jacquot, F., Oestereich, L., ... & Raoul, H. (2017). Favipiravir pharmacokinetics in nonhuman primates and insights for future efficacy studies of hemorrhagic fever viruses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(1), e01305-16.
91. Oestereich, L., Rieger, T., Lüdtke, A., Ruibal, P., Wurr, S., Pallasch, E., ... & Günther, S. (2016). Efficacy of favipiravir alone and in combination with ribavirin

- in a lethal, immunocompetent mouse model of Lassa fever. *The Journal of infectious diseases*, 213(6), 934-938.
92. Fischer 2nd, W. A., Vetter, P., Bausch, D. G., Burgess, T., Davey Jr, R. T., Fowler, R., ... & Jacobs, M. (2018). Ebola virus disease: an update on post-exposure prophylaxis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(6), e183-e192.
 93. Westover, J. B., Sefing, E. J., Bailey, K. W., Van Wettere, A. J., Jung, K. H., Dagley, A., ... & Gowen, B. B. (2016). Low-dose ribavirin potentiates the antiviral activity of favipiravir against hemorrhagic fever viruses. *Antiviral research*, 126, 62-68.
 94. Cai, Q., Yang, M., Liu, D., Chen, J., Shu, D., Xia, J., ... & Liu, L. (2020). Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study. *Engineering*, 6(10), 1192-1198.
 95. Dauby, N., Van Praet, S., Vanhomwegen, C., Veliziotis, I., Konopnicki, D., & Roman, A. (2021). Tolerability of favipiravir therapy in critically ill patients with COVID-19: A report of four cases. *Journal of medical virology*, 93(2), 689-691.
 96. Reddy, O. S., & Lai, W. F. (2020). Tackling COVID-19 Using Remdesivir and Favipiravir as Therapeutic Options. *ChemBioChem*.
 97. Kadam, R. U., & Wilson, I. A. (2017). Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), 206-214.
 98. Vankadari, N. (2020). Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein. *International journal of antimicrobial agents*, 56(2), 105998.
 99. Lian, N., Xie, H., Lin, S., Huang, J., Zhao, J., & Lin, Q. (2020). Umifenovir treatment is not associated with improved outcomes in patients with coronavirus disease 2019: a retrospective study. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7), 917-921.
 100. Huang, D., Yu, H., Wang, T., Yang, H., Yao, R., & Liang, Z. (2021). Efficacy and safety of umifenovir for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *Journal of medical virology*, 93(1), 481-490.

101. Mair-Jenkins, J., Saavedra-Campos, M., Baillie, J. K., Cleary, P., Khaw, F. M., Lim, W. S., ... & Jenkins, Y. F. (2015). The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *The Journal of infectious diseases*, 211(1), 80-90.
102. Cheng, Y., Wong, R., Soo, Y. O. Y., Wong, W. S., Lee, C. K., Ng, M. H. L., ... & Cheng, G. (2005). Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(1), 44-46.
103. Roback, J. D., & Guarner, J. (2020). Convalescent plasma to treat COVID-19: possibilities and challenges. *Jama*, 323(16), 1561-1562.
104. Duan, K., Liu, B., Li, C., Zhang, H., Yu, T., Qu, J., ... & Yang, X. (2020). Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9490-9496.
105. Shen, C., Wang, Z., Zhao, F., Yang, Y., Li, J., Yuan, J., ... & Liu, L. (2020). Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *Jama*, 323(16), 1582-1589.
106. U.S. Food & Drug Administration. Investigational COVID-19 Convalescent Plasma - Emergency INDs. 2021. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/investigational-covid-19-convalescent-plasma>
107. COVID-19 Treatment Guidance Writing Group. JHMI clinical guidance for available pharmacologic therapies. 2020. <https://aslm.org/wp-content/uploads/2020/06/1589560108-Clinical-guidance-on-COVID19-therapies-JHU.pdf?x32865>
108. Al-Bari, M. A. A. (2017). Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacology research & perspectives*, 5(1), e00293.
109. Vincent, M. J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B. R., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., ... & Nichol, S. T. (2005). Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology journal*, 2(1), 1-10.

110. Sanofi-Synthelabo, Inc.; New York, NY: 2001. Aralen (chloroquine) [prescribing information]
111. Sanofi-Aventis US, LLC; Bridgewater, NJ: April 2012. Plaquenil (hydroxychloroquine) [prescribing information]
112. Hernandez, A. V., Roman, Y. M., Pasupuleti, V., Barboza, J. J., & White, C. M. (2020). Hydroxychloroquine or chloroquine for treatment or prophylaxis of COVID-19: a living systematic review. *Annals of internal medicine*, 173(4), 287-296.
113. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Revokes Emergency Use Authorization for Chloroquine and Hydroxychloroquine (June 15,2020) <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-revokes-emergency-use-authorization-chloroquine-and>
114. Ramamoorthy, S., & Cidlowski, J. A. (2016). Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. *Rheumatic Disease Clinics*, 42(1), 15-31.
115. Siddiqi, H. K., & Mehra, M. R. (2020). COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. *The journal of heart and lung transplantation*, 39(5), 405.
116. Shang, L., Zhao, J., Hu, Y., Du, R., & Cao, B. (2020). On the use of corticosteroids for 2019-nCoV pneumonia. *The Lancet*, 395(10225), 683-684.
117. Stockman, L. J., Bellamy, R., & Garner, P. (2006). SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS medicine*, 3(9), e343.
118. Arabi, Y. M., Mandourah, Y., Al-Hameed, F., Sindi, A. A., Almekhlafi, G. A., Hussein, M. A., ... & Fowler, R. A. (2018). Corticosteroid therapy for critically ill patients with Middle East respiratory syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(6), 757-767.
119. Fernandez-Cruz, A., Ruiz-Antorán, B., Munoz-Gomez, A., Sancho-Lopez, A., Mills-Sanchez, P., Centeno-Soto, G. A., ... & Avendaño-Solá, C. (2020). Impact of glucocorticoid treatment in SARS-COV-2 infection mortality: a retrospective controlled cohort study. *medRxiv*.
120. Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., ... & Song, Y. (2020). Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in

- patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA internal medicine*, 180(7), 934-943.
121. Villar, J., Confalonieri, M., Pastores, S. M., & Meduri, G. U. (2020). Rationale for prolonged corticosteroid treatment in the acute respiratory distress syndrome caused by coronavirus disease 2019. *Critical care explorations*, 2(4).
 122. Zhao, J. P., Hu, Y., Du, R. H., Chen, Z. S., Jin, Y., Zhou, M., ... & Cao, B. (2020). Expert consensus on the use of corticosteroid in patients with 2019-nCoV pneumonia. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 43(3), 183-184.
 123. Cain, D. W., & Cidlowski, J. A. (2020). After 62 years of regulating immunity, dexamethasone meets COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 587-588.
 124. Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The lancet*, 395(10229), 1033-1034.
 125. Gong, J., Dong, H., Xia, S. Q., Huang, Y. Z., Wang, D., Zhao, Y., ... & Lu, F. (2020). Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19 pneumonia. *MedRxiv*.
 126. Gao, Y., Li, T., Han, M., Li, X., Wu, D., Xu, Y., ... & Wang, L. (2020). Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *Journal of medical virology*, 92(7), 791-796.
 127. Chi Zhang, M. D., Zhao Wu, P. D., & Jia-Wen Li, M. D. (2020). The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor antagonist Tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents*, 105954(10.1016).
 128. Zhao, M. (2020). Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. *International journal of antimicrobial agents*, 55(6), 105982.
 129. Somers, E. C., Eschenauer, G. A., Troost, J. P., Golob, J. L., Gandhi, T. N., Wang, L., ... & Pogue, J. M. (2021). Tocilizumab for treatment of mechanically

- ventilated patients with COVID-19. *Clinical Infectious Diseases*, 73(2), e445-e454.
130. Cellina, M., Orsi, M., Bombaci, F., Sala, M., Marino, P., & Oliva, G. (2020). Favorable changes of CT findings in a patient with COVID-19 pneumonia after treatment with tocilizumab. *Diagnostic and interventional imaging*, 101(5), 323.
 131. Gavriatopoulou, M., Ntanasis-Stathopoulos, I., Korompoki, E., Fotiou, D., Migkou, M., Tzanninis, I. G., ... & Dimopoulos, M. A. (2021). Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. *Clinical and experimental medicine*, 21(2), 167-179.
 132. Cui, S., Chen, S., Li, X., Liu, S., & Wang, F. (2020). Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(6), 1421-1424.
 133. Klok, F. A., Kruip, M. J. H. A., Van der Meer, N. J. M., Arbous, M. S., Gommers, D. A. M. P. J., Kant, K. M., ... & Endeman, H. (2020). Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thrombosis research*, 191, 145-147.
 134. Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., ... & Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The lancet*, 395(10229), 1054-1062.
 135. Deng, Y., Liu, W., Liu, K., Fang, Y. Y., Shang, J., Zhou, L., ... & Liu, H. G. (2020). Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. *Chinese medical journal*, 133(11), 1261.
 136. Tang, N., Li, D., Wang, X., & Sun, Z. (2020). Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 18(4), 844-847.
 137. World Health Organization . Clinical management of severe acute respiratory infection when COVID-19 is suspected. 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332299>

138. Thachil, J., Tang, N., Gando, S., Falanga, A., Cattaneo, M., Levi, M., ... & Iba, T. (2020). ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 18(5), 1023-1026.
139. Corti, D., Purcell, L. A., Snell, G., & Veessler, D. (2021). Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*.
140. Marovich, M., Mascola, J. R., & Cohen, M. S. (2020). Monoclonal antibodies for prevention and treatment of COVID-19. *Jama*, 324(2), 131-132.
141. Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., & Kennedy, R. B. (2020). SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *The Lancet*.
142. Chakraborty, S., Mallajosyula, V., Tato, C. M., Tan, G. S., & Wang, T. T. (2021). SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: Where do we stand. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
143. Li, L., Guo, P., Zhang, X., Yu, Z., Zhang, W., & Sun, H. (2021). SARS-CoV-2 vaccine candidates in rapid development. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 17(3), 644-653.
144. Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., Li, C., Hu, Y., Chu, K., ... & Zhu, F. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet infectious diseases*, 21(2), 181-192.
145. Wu, Z., Hu, Y., Xu, M., Chen, Z., Yang, W., Jiang, Z., ... & Yin, W. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(6), 803-812.
146. Yang, S., Li, Y., Dai, L., Wang, J., He, P., Li, C., ... & Gao, G. F. (2021). Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *The Lancet Infectious Diseases*.
147. Chen, Y., Shen, H., Huang, R., Tong, X., & Wu, C. (2021). Serum neutralising activity against SARS-CoV-2 variants elicited by CoronaVac. *The Lancet Infectious Diseases*.

148. Tanriover, M. D., Doğanay, H. L., Akova, M., Güner, H. R., Azap, A., Akhan, S., ... & Aksu, K. (2021). Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet*, 398(10296), 213-222.
149. Soleimanpour, S., & Yaghoubi, A. (2021). COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go?. *Expert Review of Vaccines*, 20(1), 23-44.
150. Reynolds, C. J., Pade, C., Gibbons, J. M., Butler, D. K., Otter, A. D., Menacho, K., ... & Boyton, R. (2021). Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose. *Science*.
151. Woldemeskel, B. A., Garliss, C. C., & Blankson, J. N. (2021). SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce broad CD4+ T cell responses that recognize SARS-CoV-2 variants and HCoV-NL63. *The Journal of clinical investigation*, 131(10).
152. Mahase, E. (2020). Covid-19: Pfizer and BioNTech submit vaccine for US authorisation.
153. Lustig, Y., Zuckerman, N., Nemet, I., Atari, N., Kliker, L., Regev-Yochay, G., ... & Mandelboim, M. (2021). Neutralising capacity against Delta (B. 1.617. 2) and other variants of concern following Comirnaty (BNT162b2, BioNTech/Pfizer) vaccination in health care workers, Israel. *Eurosurveillance*, 26(26), 2100557.
154. Paden, C. R., Tao, Y., Queen, K., Zhang, J., Li, Y., Uehara, A., & Tong, S. (2020). Rapid, sensitive, full-genome sequencing of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Emerging infectious diseases*, 26(10), 2401.
155. Moniruzzaman, M., Hossain, M. U., Islam, M. N., Rahman, M. H., Ahmed, I., Rahman, T. A., ... & Salimullah, M. (2020). Coding-complete genome sequence of SARS-CoV-2 isolate from Bangladesh by sanger sequencing. *Microbiology Resource Announcements*, 9(28), e00626-20.
156. <https://clades.nextstrain.org/>
157. https://www.who.int/publications/i/item/WHO_2019-nCoV_surveillance_variants
158. <https://outbreak.info/situation-reports?pango=B.1.617.2>
159. <https://outbreak.info>

160. Demir, A. B., Benvenuto, D., ABACIOĞLU, Y. H., Angeletti, S., & Ciccozzi, M. (2020). Identification of the nucleotide substitutions in 62 SARS-CoV-2 sequences from Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 44(SI-1), 178-184.
161. Wang, R., Hozumi, Y., Yin, C., & Wei, G. W. (2020). Decoding SARS-CoV-2 transmission and evolution and ramifications for COVID-19 diagnosis, vaccine, and medicine. *Journal of chemical information and modeling*, 60(12), 5853-5865.
162. Azad, G. K. (2021). The molecular assessment of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Phosphoprotein variants among Indian isolates. *Heliyon*, 7(2), e06167.
163. Azad, G. K. (2021). Identification and molecular characterization of mutations in nucleocapsid phosphoprotein of SARS-CoV-2. *PeerJ*, 9, e10666.
164. Rahman, M. S., Islam, M. R., Alam, A. R. U., Islam, I., Hoque, M. N., Akter, S., ... & Hossain, M. A. (2021). Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences. *Journal of medical virology*, 93(4), 2177-2195.
165. Wang, R., Hozumi, Y., Yin, C., & Wei, G. W. (2020). Mutations on COVID-19 diagnostic targets. *Genomics*, 112(6), 5204-5213.
166. Tporoyano-Hernández, P., Reinos, R., & Holguín, Á. (2021). Evolution of SARS-CoV-2 envelope, membrane, nucleocapsid, and spike structural proteins from the beginning of the pandemic to September 2020: a global and regional approach by epidemiological week. *Viruses*, 13(2), 243.
167. Mourier, T., Shuaib, M., Hala, S., Mfarrej, S., Alofi, F., Naeem, R., ... & Pain, A. (2021). Saudi Arabian SARS-CoV-2 genomes implicate a mutant Nucleocapsid protein in modulating host interactions and increased viral load in COVID-19 patients.
168. Amrun, S. N., Lee, C. Y. P., Lee, B., Fong, S. W., Young, B. E., Chee, R. S. L., ... & Ng, L. F. (2020). Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine*, 58, 102911.
169. Wu, H., Xing, N., Meng, K., Fu, B., Xue, W., Dong, P., ... & Zhu, Z. (2021). Nucleocapsid Mutations R203K/G204R Increase the Infectivity, Fitness and Virulence of SARS-CoV-2. *Fitness and Virulence of SARS-CoV-2*.

170. Nagy, Á., Pongor, S., & Györffy, B. (2021). Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome. *International journal of antimicrobial agents*, 57(2), 106272.
171. Marchitelli, V., Troise, C., Parisi, A., Bianco, A., Del Sambro, L., Somma, R., ... & De Natale, G. (2021). Evidence for the dependence of the SARS-Cov-2 Delta high diffusivity on the associated N: G215C nucleocapsid mutation.
172. Zhao, L. P., Roychoudhury, P., Jerome, K., Gilbert, P., Schiffer, J., Lybrand, T., ... & Geraghty, D. (2021). Variants in nucleocapsid protein and endoRNase are found to associate with severe COVID-19 in a case-control study in Washington State, USA.
173. Badua, C. L. D., Baldo, K. A. T., & Medina, P. M. B. (2021). Genomic and proteomic mutation landscapes of SARS-CoV-2. *Journal of medical virology*, 93(3), 1702-1721.

8. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İnsan koronavirüslerinin taksonomik sınıflandırması ve filogenetik ağaç analiz	5
Şekil 2. SARS-CoV-2 nin transmisyon elektron mikroskobu ile görünümü	6
Şekil 3. SARS-CoV-2'nin referans dizisine (EPI_ISL_412026) dayalı yapısının ve genom organizasyonunun şematik sunumu	7
Şekil 4. SARS-CoV-2 yaşam döngüsü	12
Şekil 5. SARS-CoV-2, SARSr-CoV'ler ve diğer betakoronavirüslerin tam uzunluktaki genom dizilerinin filogenetik ağacı	15
Şekil 6. SARS-CoV-2 bulaşma yolları	16
Şekil 7. Çeşitli farmakolojik ajanların hücresel düzeydeki etki mekanizmaları	29
Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	48
Şekil 9. Sequencher 5.4.6 programında konsensüs dizilerin belirlenmesi	51
Şekil 10. Nextclade v1.7.1 ile oluşturulan 'rectangular' dendogram	54
Şekil 12. Nextclade v1.7.1 ile oluşturulan radyal ve 'unrooted' dendogram	55
Şekil 13. D63G, R203M, G215C, D377Y mutasyonlarının dünya genelinde prevelansı	57
Şekil 14. D63G, R203M, G215C, D377Y, S232G, E253D mutasyonlarının prevelansı	58
Şekil 15. D63G, R203M, G215C, D377Y, L139S mutasyonlarının prevelansı	58
Şekil 16. D63G, R203M, G215C, D377Y, A308S mutasyonlarının prevelansı	59
Şekil 17. D63G, R203M, G215C, D377Y, R319H mutasyonlarının prevelansı	60
Şekil 18. D63G, R203M, G215C, D377Y, R41Q mutasyonlarının prevelansı.....	61
Şekil 19. D63G, R203M, G215C, D377Y, T24I mutasyonlarının prevelansı	62
Şekil 20. D63G, R203M, G215C, D377Y, L139F mutasyonlarının prevelansı.....	63
Şekil 21. D63G, R203M, G215C, D377Y, T205I mutasyonlarının prevelansı	64
Şekil 22. D63G, R203M, G215C, D377Y, A119S mutasyonlarının prevelansı	65
Şekil 23. D63G, R203M, G215C, D377Y, G243C mutasyonlarının prevelansı.....	66
Şekil 24. D63G, R203M, G215C, D377Y, A359S mutasyonlarının prevelansı	67
Şekil 25. D63G, R203M, G215C, D377Y, P364L mutasyonlarının prevelansı.....	68
Şekil 26. D63G, R203M, G215C, D377Y, P46S mutasyonlarının prevelansı.....	69

9. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. SARS-CoV-2'deki yapısal olmayan proteinlerin listesi ve moleküler işlevleri	10
Tablo 2. SARS-CoV-2'nin epidemiyolojik parametreleri (48)	17
Tablo 3. Endişe Uyandıran Varyantlar (VOC) (50).....	18
Tablo 4. Dikkate alınması gereken Varyantlar (VOI) (50)	19
Tablo 5. COVID-19 hastalarının sınıflandırılması (64).	25
Tablo 6. Revers transkripsiyon kiti bileşenleri	46
Tablo 7. cDNA kiti bileşenleri	47
Tablo 8. Nükleokapsid Primer Dizileri (154,155)	47
Tablo 9. PCR Isı Döngü Aşamaları.....	48
Tablo 10. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit bileşenleri ve miktarları..	49
Tablo 11. Cycle sequencing ısı döngü protokolü.....	50
Tablo 12. SARS-CoV-2 izolatlarının nükleokapsid gen bölgesinde tespit edilen mutasyonlar.....	53

10. EKLER DİZİNİ

EK-1. Etik Kurulu Karar Formu.....	95
EK-2. İntihal Raporu	96

