

Uzamış SARS-CoV-2 PCR Pozitifliği Olan Olguda P323L Mutasyonu

P323L Mutation in a Case with Prolonged SARS-CoV-2 PCR Positivity

Ebru YÜCEBAĞ^{1,2}(ID), Neşe ARSLAN¹(ID), Yeşim TOK¹(ID), Okan Kadir NOHUT³(ID), Seda SALMAN YILMAZ⁴(ID), Mert Ahmet KUŞKUCU^{1,5}(ID), Kenan MİDİLLİ¹(ID)

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

² İstanbul Arel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² İstanbul Arel University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

³ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Fikret Biyal Merkez Araştırma Laboratuvarı, İstanbul.

³ İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Fikret Biyal Central Research Laboratory, İstanbul, Türkiye.

⁴ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Adli Tıp ve Adli Bilimler Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine and Forensic Sciences, İstanbul University, Türkiye.

⁵ Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Koç University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İstanbul, Türkiye.

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinin eş güdümlü projesi ile desteklenmiştir (Proje no: TSG-2020-34933).

Makale Atfı: Yücebağ E, Arslan N, Tok Y, Nohut OK, Salman Yılmaz S, Kuşkucu MA ve ark. Uzamış SARS-CoV-2 PCR pozitifliği olan olguda P323L mutasyonu. Mikrobiyol Bul 2023;57(3):490-497.

ÖZ

Koronavirüs hastalığı-2019 [Coronavirus disease-2019 (COVID-19)], 2019 yılının son aylarında ortaya çıkmış ve tüm dünyayı etkileyerek pandemiye neden olmuştur. COVID-19'un etkeni olan şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] ise ilk tanımlandığı günden itibaren uğradığı çeşitli mutasyonlarla değişerek pandeminin devam etmesine neden olmaktadır. COVID-19 için genel risk faktörleri olan yaş, erkek cinsiyet, obezite ve komorbidite aynı zamanda uzamış PCR pozitifliğine neden olabilmektedir. Bu raporda sunulan olgu, hastanemiz COVID-19 moleküler tanı laboratuvarında çalışan 37 yaşındaki erkek sağlık personelidir. Türkiye'de yürütülen aşılama programı kapsamında üç doz inaktif aşı olan CoronaVac (Sinovac Biotech, Beijing, Çin) ile aşılanmıştır. İlk SARS-CoV-2 kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)] pozitifliği son aşı uygulamasından dört ay sonra, 01.12.2021 tarihinde saptanmış ve iki-üç günlük aralıklarla yapılan testlerinde 39 günlük bir süre boyunca SARS-CoV-2 PCR pozitif saptanmaya devam etmiştir. Hastanın 20 paket/yıl sigara öyküsü mevcut olup COVID-19 geçirdiği dönemdeki vücut kütle indeksi [body mass index (BMI)] 29.8 kg/m²'dir. Sırt-baş ağrısı, öksürük, ateş (38.5°C), tat-koku kaybı şeklindeki semptomlar ile klinik olarak hafif şiddette COVID-19 olarak tanımlanmış olan olgu hastalık sürecinde ek bir komplikasyon ya da solunum sıkıntısı yaşamamıştır. Radyolojik incelemede akciğer olağan saptanmıştır. Hastaya taşıdığı kardiyo-

İletişim (Correspondence): Dr. Ebru Yücebağ, İstanbul Arel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerleşkesi, Merkez Efendi Mahallesi, Eski Londra Asfaltı Caddesi No: 1/3, 34010, Cevizlibağ-Zeytinburnu/İstanbul.

Tel (Phone): 0850 850 2735-4097, **E-posta (E-mail):** ebruycbg@gmail.com/ebruyucebag@arel.edu.tr

vasküler risk nedeniyle profilaktik enoksaparin sodyum anti-xa IU/0.6 ml başlanmış, bunun dışında ek bir tedavi verilmemiştir. Olgunun uzamış SARS-CoV-2 PCR pozitifliği nedeniyle virüsün zaman içinde konakta uğradığı değişimi görebilmek amacıyla, hastadan enfeksiyonun başlangıç ve 16. gününde alınan nazofarengeal sürüntü örneklerinden tüm genom dizilemesi yapılmıştır. Tüm genom yeni nesil dizileme (YND) için kütüphane hazırlığı SARS-CoV-2 Panel, "Paragon CleanPlex" kiti (Paragon Genomics, ABD) ile, kütüphanenin indekslenmesi ise "Clean-Plex Dual-Indexed PCR Primers for Illumina Set B" kiti (Paragon Genomics, ABD) ile yapılmıştır. YND analizi Illumina Miniseq (Illumina, ABD) platformunda gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik değerlendirme sonucunda her iki örnek de SARS-CoV-2 Delta varyantı [Nextclade; 21J (Delta), Pango lineage; AY.43] olarak belirlenmiştir. On beş gün arayla alınan iki örnekteki SARS-CoV-2 dizilerinde dikkat çekici olarak; S geninde D614G, ORF 1b gen bölgesinde P323L, ayrıca Nsp3 gen bölgesinde P1228L olmak üzere çeşitli ortak mutasyonlar saptanmıştır. Bunun yanı sıra, ilk örnekle karşılaştırıldığında ikinci örneğin dizisinde, literatürde klinik önemleri henüz belirlenememiş, aminoasit değişikliğine yol açan ek üç mutasyon (P383L, P539S, L838I) olduğu görülmüştür. Aminoasit ifadesini değiştiren bu mutasyonların da saptanan diğer üç mutasyon gibi virüsün "fitness"ının iyileşmesine katkı sağlayarak uzamış COVID-19 PCR pozitifliğinden sorumlu faktörlerden olabilecekleri düşünülmüştür. İleri epidemiyolojik dizileme çalışmalarıyla elde edilecek ek veriler bu konuya ışık tutacaktır.

Anahtar kelimeler: Uzamış PCR pozitifliği; SARS-CoV-2; P323L; P1228L; tüm genom dizileme.

ABSTRACT

Coronavirus disease-2019 (COVID-19) emerged in the last months of 2019 and caused a pandemic effecting the whole world. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), the causative agent of COVID-19 has changed by various mutations since the day it was first identified, causing the pandemic to continue. Age, male gender, obesity, and comorbidity, which are general risk factors for COVID-19, can also cause prolonged PCR positivity. In this report, a case of 37-year-old male who is working in the hospital's COVID-19 molecular diagnostics laboratory was presented. He was vaccinated with three doses of inactivated vaccine, CoronaVac (Sinovac Biotech, Beijing-China), within the context of the vaccination program carried out in Türkiye. His first SARS-CoV-2 positivity was detected on 12.01.2021, four months after the last vaccination, and he continued to be detected positive for SARS-CoV-2 throughout a period of 39 days by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) tests performed with 2-3-day intervals. The patient has a 20-pack/year smoking history and his body mass index (BMI) was 29.8 kg/m² at the time of his COVID-19. The case, which was clinically defined as mild COVID-19 with symptoms including back and headache, cough, fever (38.5°C), and loss of taste-smell, and without any additional complications or respiratory distress during the disease process. In the radiological examination, the lung was found within normal ranges. Prophylactic enoxaparin sodium anti-xa IU/0.6 ml was administered to the patient due to his cardiovascular risk, and no additional treatment was given. Whole genome sequencing was performed from nasopharyngeal swab samples of the patient at the beginning and 16th day of the infection to investigate the the specific genomic features and mutation pattern of the virus in the host over time, due to the prolonged SARS-CoV-2 PCR positivity. Library preparation for the whole next-generation sequencing (NGS) was performed by the SARS-CoV-2 Panel, Paragon CleanPlex kit (Paragon Genomics, USA), and indexing of the library was done by Clean-Plex Dual-Indexed PCR Primers for Illumina Set B kit (Paragon Genomics, USA). NGS analysis was performed on the Illumina Miniseq (Illumina, USA) platform. As a result of the bioinformatics evaluation, both samples were determined as SARS-CoV-2 Delta variant (Nextclade; 21J-Delta variant, Pango lineage; AY.43). Remarkably, the SARS-CoV-2 sequences in the two samples taken 15 days apart; several identical mutations; such as D614G in the S gene, P323L in the ORF 1b gene region, and P1228L in the Nsp3 gene region, were detected. Besides that, when compared to the first sample, three additional mutations (P383L, P539S, L838I) were observed in the sequence of the second sample, which led to three amino acid changes, the clinical significance of which has not yet been determined in the literature. It is thought that; these mutations that change amino acid expression, as well as the other three mutations detected, may contribute to the improvement of the fitness of the virus and may be one of the factors responsible for the prolonged SARS-CoV-2 PCR positivity. Additional data to be obtained by further epidemiological sequencing studies will shed light on this issue.

Keywords: Prolonged PCR positivity; SARS-CoV-2; P323L; P1228L; full-length genome sequence.

GİRİŞ

Coronaviridae ailesi, *Betacoronavirus* cinsi üyesi olan şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)] tek sarmallı, pozitif polariteli RNA virüsüdür. Genomu, çoğu RNA virüsünün aksine uzundur ve yaklaşık 30 bin bazdır. Genomu yapısal ve yapısal olmayan proteinler kodlar. Dört yapısal proteini; spike (S), zarf (E), zar (M) ve nükleokapsid (N)'dir. Yapısal proteinlerin aralarına serpiştirilmiş olarak birkaç açık okuma çerçevesi [open reading frame (ORF)] bulunur ve bu ORF'lerden bazıları (ORF-3, ORF 6-10) aksesuar proteinleri kodlar. Yapısal olmayan proteinleri kodlamak üzere genomun ORF 1a ve ORF 1b kısmından iki büyük polipeptid (pp 1a/1b) kodlanır. Bu polipeptidin proteazlarca kesilmesi sonucu 16 tane yapısal olmayan protein (non-structural protein, Nsp) oluşur. ORF 1a, Nsp 1-11 arasını; ORF 1b, Nsp 12-16 arasını kodlar^{1,2}.

Koronavirüs hastalığı-2019 [Coronavirus disease-2019 (COVID-19), 2019 yılının son aylarından itibaren neden olduğu pandemiyle tüm dünya gündeminin merkezine yerleşmiştir³. COVID-19'un etkeni olan şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)]'nin tüm genom dizisi analiziyle genetik yapısı 2020 yılının ilk ayı içinde ortaya konmuştur⁴, ancak virüs genetik özellikleri nedeniyle tanımlandığı günden bugüne çeşitli mutasyonlara uğramıştır. Virüsün yüksek mutasyon hızına sahip olması nedeniyle birçok varyant ortaya çıkmış ve bu varyantlar pandemiyi yıllar boyunca sürmesine neden olmuştur⁵. Bu varyantlar (Alfa, Beta, Gama, Delta ve son olarak Omicron varyantı gibi) tanımlandıkları bölgelerde ve dünya geneline yayılımlarıyla birçok dalgaya neden olmuştur⁵. COVID-19'da yaş, erkek cinsiyet, vücut kütle indeksi ve böbrek, kalp ile nörolojik hastalığı gibi ek hastalıkları olan kişiler genellikle risk altındaki kişilerdir. Bu risk faktörleri aynı zamanda kişilerde uzamış polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] pozitifliğine neden olabilmektedir⁶. COVID-19'un PCR dinamiğine bakıldığında en yüksek SARS-CoV-2 viral yük seviyesinin genel olarak enfeksiyonun ilk yedi gününde olduğu gösterilmiştir, bu nedenle ilk yedi günden sonra bulaşmada azalma olması olasıdır⁷. PCR pozitifliği genelde 10 güne kadar devam edebilir⁸. Uzamış SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ise 4-6 haftaya kadar sürmektedir⁸.

Bu olgu sunumunda, komorbidite olarak sadece sigara kullanımı mevcut olan hastanemiz sağlık personelinin uzamış SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ve bundan sorumlu olabileceği düşünülen viral mutasyon birikimi irdelenerek literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

OLGU SUNUMU

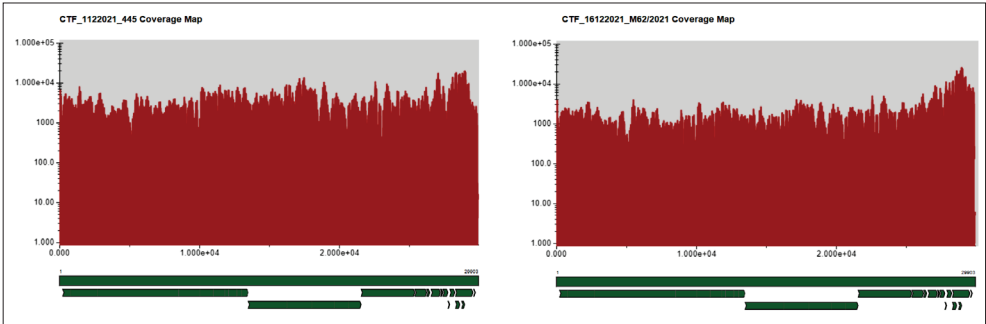
Bu çalışma, İÜ-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı (Tarih: 11.05.2020 ve Karar No: A-18).

Hastanenin COVID-19 moleküler tanı laboratuvarında çalışan 37 yaşındaki erkek sağlık personeli Türkiye'de yürütülen aşılama programı kapsamında üç doz inaktif aşı-CoronaVac

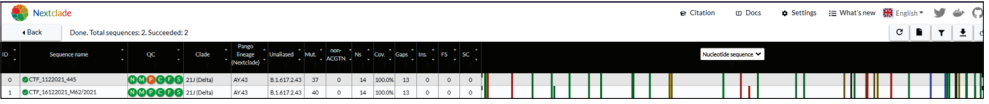
(Sinovac Biontech, Beijing, Çin) ile aşılandı (dozlar, sırasıyla 18.01.2021, 15.02.2021 ve 31.08.2021 tarihlerinde uygulandı). İlk SARS-CoV-2 revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu [quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)] pozitifliği son aşı dozundan dört ay sonra, 01.12.2021 tarihinde saptandı ve iki-üç günlük aralıklarla yapılan PCR testlerinde 39 günlük bir süre boyunca SARS-CoV-2 pozitif bulundu. İlk yapılan SARS-CoV-2 PCR testine göre Ct değeri 28, 39. gün ise 33 bulundu. Hastanın 20 paket/yıl sigara öyküsü mevcut olup COVID-19 geçirdiği dönemdeki vücut kütle indeksi [body mass index (BMI)] 29.8 kg/m² saptandı. Hastalığın olası kaynağının, olgunun yine sağlık çalışanı olan eşi olduğu düşünüldü. Sırt-baş ağrısı, öksürük, ateş (38.5°C), tat-koku kaybı şeklindeki semptomlar ile klinik olarak hafif şiddette COVID-19 olarak tanımlanmış olan olguda hastalık sürecinde ek bir komplikasyon ya da solunum sıkıntısı yaşanmadı^{9,10}.

Biyokimya laboratuvar sonuçlarına göre; C-reaktif protein (CRP)'de artış (60.31 mg/L referans değer: < 5), lökositoz (beyaz kan hücresi= 11.5 x 10³/μl, referans değer= 4.3-10.3; nötrofil= 9.1 x 10³/μl, referans değer= 2.1-6.1; monosit= 1.1 x 10³/μl, referans değer= 0.3-0.9), lenfopeni (lenfosit= 1.2 x 10³/μl, referans değer= 1.3-3.5), koagülasyon belirteçlerinde bozulma (fibrinojen= 641.09 mg/dl, referans değer= 180-350; D-dimer= 0.72 mg/L, referans değer= 0-0.5), karaciğer fonksiyon testlerinde hafif yükseklik (alanin-aminotransferaz= 63.8 IU/L, referans değer= < 41; aspartat-aminotransferaz= 45 IU/L, referans değer= < 40) saptandı. Akciğerler radyolojik incelemede olağan olarak saptandı. Hastaya olası kardiyovasküler komplikasyonlar açısından profilaktik enoksaparin sodyum anti-xa IU/0.6 ml başlandı, bunun dışında ek bir tedavi verilmedi.

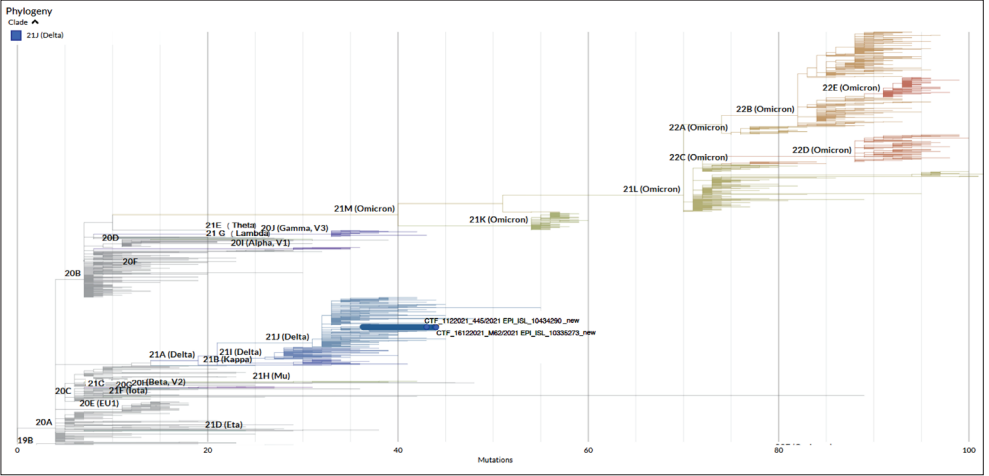
SARS-CoV-2 moleküler tanısında "GeneMAP 2019-nCoV (SARS-CoV-2) Detection Kit V.3 (Genmark Sağlık Ürünleri, Türkiye)" kullanıldı. Tüm genom yeni nesil dizileme (YND) iş akışında; kütüphane hazırlığı SARS-CoV-2 Panel, "Paragon CleanPlex" kiti (Paragon Genomics, ABD) ile, kütüphanenin indekslenmesi ise "Clean-Plex Dual-Indexed PCR Primers for Illumina Set B" kiti (Paragon Genomics, ABD) ile yapıldı. YND analizi Illumina Miniseq (Illumina, ABD) platformunda gerçekleştirildi. Ham verinin değerlendirilmesi için çevrim içi biyoinformatik araçları (<https://www.genomedetective.com/>) kullanıldı (Şekil 1). Aynı zamanda elde edilen nükleotit dizilerinin hizalanmış dosyası hem Nextstrain (<https://clades.nextstrain.org/>) hem de GISAID (<https://www.gisaid.org/>) veri tabanına eklendi (Şekil 2, 3).



Şekil 1. Yeni nesil dizileme kapsayıcılık (coverage) verisi.



Şekil 2. Nextstrain veri tabanı analiz sonucu.



Şekil 3. Nextstrain veri tabanı sonucuna göre çizilen filogenetik ağaç.

Yapılan YND analizine göre her iki örnek de SARS-CoV-2 Delta varyantı (Nextclade; 21J-Delta, Pango lineage; AY.43) olarak belirlendi (Şekil 2). Olgudan alınan ilk nazofarengeal örnekteki SARS-CoV-2 dizi analizinde (hCoV-19/Turkey/CTF_1122021_445/2021 EPI_ISL_10434290 Ct değeri= 28.10) saptanan mutasyonlar; Spike A1020S, Spike D614G, Spike D950N, Spike E156G, Spike F157del, Spike L452R, Spike N137S, Spike P681R, Spike R158del, Spike S810L, Spike T19R, Spike T478K, Spike T1117I, M I82T, N D63G, N D377Y, N G215C, N L113P, N R203M, N Y112stop, NS3 Q57H, NS3 S26L, NS3 T271S, NS7a T120I, NS7a V82A, NS7b T40I, NS8 P85H, NSP3 A488S, NSP3 H1841Y, NSP3 P1228L, NSP3 P1469S, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 A2V, NSP7 D77N, NSP12 G671S, NSP12 P323L, NSP13 P77L, NSP13 P529L, NSP14 A394V olarak sıralandı. Olgudan alınan ikinci nazofarengeal örnekteki SARS-CoV-2 dizi analizinde (ilk SARS-CoV-2 PCR pozitifliğinden 15 gün sonra alınan örnek) (hCoV-19/Turkey/CTF_16122021_M62/2021 EPI_ISL_10335273 Ct değeri= 29.89) saptanan mutasyonlar ise; Spike D614G, Spike D950N, Spike E156G, Spike F157del, Spike L452R, Spike P681R, Spike R158del, Spike T19R, Spike T478K, M I82T, N D63G, N D377Y, N G215C, N P383L, N Q9L, N R203M, NS3 S26L, NS7a T120I, NS7a V82A, NS7b T40I, NSP2 G339S, NSP3 A488S, NSP3 P539S, NSP3 P841L, NSP3 P1228L, NSP3 P1469S, NSP4 T492I, NSP4 V167L, NSP6 T77A, NSP12 G671S, NSP12 L838I, NSP12 P323L, NSP13 P77L, NSP14 A394V olarak belirlendi.

İlk ve ikinci dizileme sonucu karşılaştırıldığında ikinci dizilemede üç aminoasit değişikliğine neden olan ek üç mutasyon olduğu görüldü. Bu mutasyonlar sırasıyla; N: P383L, ORF1a-Nsp3: P539S, ORF1b-RdRp: L838I şeklinde tespit edildi. Yapılan YND'nin kalitesinin göstergesi olan "coverage (kapsayıcılık)" verileri Şekil 1'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Bazı COVID-19 hastalarında diğer hastalardan farklı olarak SARS-CoV-2 PCR pozitifliklerinin normalden daha uzun sürdüğü görülmüştür. PCR pozitifliği genelde 10 ± 3 güne kadar devam edebilmektedir. Bununla beraber Eser ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁸, 14 günden daha fazla PCR pozitifliği olan hastalar ile 14 günden kısa PCR pozitifliği olan hastalarda hastalık şiddeti açısından fark bulunmamıştır. Bu olguda qRT-PCR pozitifliği 39 gün sürmüştür ve hastalık şiddeti bakımından hafif şiddette enfeksiyon olup ciddi komplikasyonları olmamıştır. Bu olguya benzer bir sonuç Motoc ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada⁶, hafif ve orta şiddetli COVID-19 geçiren hastalarda da bulunmuştur. Özellikle erkek cinsiyet, artmış vücut kütle indeksi uzamış PCR pozitifliğinde görülebilmektedir.

Ayrıca olgunun 39. günde yapılan PCR sonucuna göre Ct değeri 33 bulunmuştur. Kantitatif gerçek zamanlı PCR [quantitative real-time PCR (qRT-PCR)]'de Ct değeri ile viral yük ters orantılı olarak değerlendirilir. Bu nedenle 16. günden sonra alınan örneklerde yüksek Ct (düşük viral yük) bulunması ve bu örneklerden dizileme için güvenli veri elde edilemeyebileceğinden ileri günlere ait dizi analizi yapılamamıştır.

Yapılan dizi analizlerine bakıldığında SARS-CoV-2 tanımlandığı günden günümüze kadar birçok mutasyon geçirmiştir ve virüs, mutasyonlara uğrayarak varlığını devam ettirmektedir. Özellikle genomun S geninde D614G mutasyonu çok sık görülmüştür ve varyantlarda baskın hale gelmiştir^{2,11-13}. Bu değişimle birlikte sık görülen başka bir mutasyon da P323L'dir. Bu mutasyon viral RNA bağımlı RNA polimerazın (RdRp) kodlandığı Nsp12'de görülür^{2,14}.

Olguda yapılan iki YND analizine bakıldığında 16. günde alınan örnekteki SARS-CoV-2'de üç ek mutasyon (P383L, P539S, L838I) tespit edilmiş ancak literatürde bu üç mutasyonun klinik önemi üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dikkat çekici bir bulguysa her iki dizi sonucunda da yukarıda bahsedilen S geninde D614G mutasyonu ile birlikte ORF 1b gen bölgesinin 14408. nükleotit pozisyonundaki C/T değişiminin neden olduğu P323L mutasyonudur. Dong ve arkadaşlarının çalışmasında¹⁵, P323L mutasyonu, iki primat modelinde (sinomolgus-Macaca fascicularis ve rhesus-Macaca mulatta makakları kullanılmıştır), hücre kültüründe daha büyük sitopatik plak oluşumuyla/fenotipiyle ilişkili bulunmuştur. Spike proteindeki D614G mutasyonuna eşlik eden P323L değişikliğinin virüsün "fitness"ına avantaj sağladığı gösterilmiştir^{13,15}. Başka bir çalışmada, P323L mutasyonunun, salgının erken dönemlerinde Avrupa'daki izolatlarda tespit edilen, artan nokta mutasyonlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, RdRp'deki mutasyonların, çok sayıda SARS-CoV-2 varyantının ortaya çıkmasına neden olabilecek, "proof-reading" aktivite (SARS-CoV-2'de diğer RNA virüslerinin aksine

3'→5' ekzonukleaz aktivitesi vardır) düşüşü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir¹⁶. Biswas ve arkadaşları çalışmalarında¹², D614G ve P323L mutasyonlarının çok ciddi hastalık ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu iki mutasyon, COVID-19'dan hafif derecede etkilenen grupta < %46, ciddi şekilde etkilenen grupta > %82 bulunmuş ($p < 0.001$), viral "fitness"la ilgili bilgi verilmemiştir. Omais ve arkadaşları çalışmalarında¹⁷, P323L mutasyonunun tespit edildiği İran, Irak, Suriye gibi sınırimızdaki ülkelerin de içinde bulunduğu Doğu Akdeniz Bölgesinde, daha yüksek vaka ölüm oranları ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir.

Her iki dizide de görülen bir başka mutasyon ise Nsp3 gen bölgesindeki P1228L değişimidir. Nsp3 viral replikasyonda önemli görevleri olan büyük bir multidomain proteini kodlar¹⁸. Nsp3 proteini, olgunlaşma için Nsp1 ile 3'ün proteolitik ayrılmasından sorumlu 'papain-like cysteine protease' görevi görür. Ayrıca yapılan bir çalışmada Nsp3 proteininin, IRF3 (interferon-regulatory factor 3) yolağını etkileyerek interferon yanıtının baskılanmasında görev aldığı gösterilmiştir¹⁹. P1228L mutasyonunun ise viral "fitness"ın iyileştirilmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir¹⁸.

Bu olguda, iki mutasyon dışında saptanmış olan, klinik önemi henüz belirlenememiş mutasyonların da aminoasit dizisinde değişikliğe neden olabileceği ve bu aminoasit değişikliklerinin de virüsün ürettiği proteinlerin üç boyutlu yapısında veya fonksiyonunda değişikliğe neden olabileceği düşünülmüştür. Bunun sonucu olarak da virüsün "fitness"ının iyileştirilmesine katkı sağlayarak uzamiş SARS-CoV-2 PCR pozitifliğine neden olabileceği düşünülmüştür. Yapılacak daha ileri epidemiyolojik amaçlı dizileme çalışmalarıyla elde edilecek ek veriler, bu konunun aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Aydınlatılmış Onam

Bu çalışma için hastadan aydınlatılmış onam belgesi alınmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: Knowns and unknowns. *Front Immunol* 2021; 12: 2698. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>
2. Majumdar P, Niyogi S. SARS-CoV-2 mutations: The biological trackway towards viral fitness. *Epidemiol Infect* 2021; 149. <https://doi.org/10.1017/S0950268821001060>
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. Brief report: A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020; 382(8): 727. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
4. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(9): 1629-35. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03899-4>
5. CoVariants. Overview of Variants/Mutations. Available from: <https://covariants.org/variants> (Accessed date: 03.06.2022).

6. Motoc NS, Ruta VM, Man MA, Ungur RA, Ciortea VM, Irsay L, et al. Factors associated with prolonged RT-PCR SARS-CoV-2 positive testing in patients with mild and moderate forms of COVID-19: A retrospective study. *Medicina (B Aires)* 2022; 58(6). <https://doi.org/10.3390/medicina58060707>
7. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, Aldali J, Mutair AA, Alhumaid S, et al. Viral dynamics and real-time RT-PCR Ct values correlation with disease severity in COVID-19. *Diagnostics* 2021; 11(6): 1091. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11061091>
8. Eser F, Kayaaslan B, Güner R, Hasanoğlu I, Kaya Kalem A, Aypak A, et al. The effect of prolonged PCR positivity on patient outcomes and determination of isolation period in COVID-19 patients. *Int J Clin Pract* 2021; 75(5): e14025. <https://doi.org/10.1111/ijcp.14025>
9. World Health Organization. Guideline clinical management of COVID-19 patients: Living guideline, 18 November 2021.
10. Clinical Spectrum. COVID-19 Treatment Guidelines. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/> (Accessed date: 24.10.2022).
11. Plante JA, Liu Y, Liu J, Xia H, Johnson BA, Lokugamage KG, et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* 2021; 592(7852): 116-21. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
12. Biswas SK, Mudi SR. Spike protein D614G and RdRp P323L: The SARS-CoV-2 mutations associated with severity of COVID-19. *Genomics Inform* 2020; 18(4): 1-7. <https://doi.org/10.5808/GI.2020.18.4.e44>
13. Ilmjärv S, Abdul F, Acosta-Gutiérrez S, Estarellas C, Galdadas I, Casimir M, et al. Concurrent mutations in RNA-dependent RNA polymerase and spike protein emerged as the epidemiologically most successful SARS-CoV-2 variant. *Sci Reports* 2021; 11: 13705. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91662-w>
14. Sahin E, Bozdayi G, Yigit S, Muftah H, Dizbay M, Tunccan OG, et al. Genomic characterization of SARS-CoV-2 isolates from patients in Turkey reveals the presence of novel mutations in spike and nsp12 proteins. *J Med Virol* 2021; 93(10): 6016. <https://doi.org/10.1002/jmv.27188>
15. Dong X, Goldswain H, Penrice-Randal R, Shawli GT, Prince T, Williamson MK, et al. Rapid selection of P323L in the SARS-CoV-2 polymerase (NSP12) in humans and non-human primate models and confers a large plaque phenotype. *bioRxiv* 2021; 2021.12.23.474030. <https://doi.org/10.1101/2021.12.23.474030>
16. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* 2020; 18(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
17. Omais S, Kharroubi S, Zaraket H. No association between the SARS-CoV-2 variants and mortality rates in the Eastern Mediterranean Region. *Gene* 2021; 801: 145843. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145843>
18. Yang XJ. SARS-COV-2 C.1.2 variant is highly mutated but may possess reduced affinity for ACE2 receptor. *bioRxiv* 2021; 10(16): 464644. <https://doi.org/10.1101/2021.10.16.464644>
19. Van De Leemput J, Han Z. Understanding individual SARS-CoV-2 proteins for targeted drug development against COVID-19. *Mol Cell Biol* 2021; 41(9). <https://doi.org/10.1128/MCB.00185-21>