

# Türkiye’den Bildirilen Sars-CoV-2 İzolatlarında RT-PCR Primer/Prob Bağlanma Bölgelerindeki Nükleotit Değişimlerinin Analizi

## Analysis of Nucleotide Changes in RT-PCR Primer/Probe Binding Regions in SARS-CoV-2 Isolates Reported from Turkey

Ayşe Banu DEMİR<sup>1</sup>(ID), Alihan BULGURCU<sup>2</sup>(ID), Özgür APPAK<sup>3</sup>(ID), Ayça Arzu SAYINER<sup>3</sup>(ID)

<sup>1</sup> İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>1</sup> İzmir University of Economics Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Izmir, Turkey.

<sup>2</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>2</sup> Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey.

<sup>3</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>3</sup> Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

**Makale Atfı:** Demir AB, Bulgurcu A, Appak Ö, Sayiner AA. Türkiye’den bildirilen Sars-CoV-2 izolatlarında RT-PCR primer/prob bağlanma bölgelerindeki nükleotit değişimlerinin analizi. Mikrobiyol Bul 2021;55(3):311-326.

### ÖZ

COVID-19 salgınına neden olan SARS-CoV-2 virüsü, dünya genelinde 55 milyondan fazla olguya ve 1.5 milyona yakın ölüme neden olmuştur. Hastalığın mikrobiyolojik tanısında en geçerli yöntem, gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) ile viral genomun varlığının saptanmasıdır. Ancak RNA virüslerinin doğası gereği sıkça mutasyona uğramaları, PCR gibi virüsün genetik materyali üzerinde yapılan analizlerin duyarlılığını etkileyebilmektedir. Bu çalışmada, COVID-19 tanısında kullanılan rRT-PCR panellerinin primer-prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonların araştırılması amaçlanmıştır. Türkiye’deki COVID-19 olgularından izole edilen ve 17 Mart-14 Eylül 2020 tarihleri arasında, İstanbul (n= 78), Ankara (n= 58), Kars (n= 47), Bursa (n= 2), Adıyaman (n= 2), Erciyes (n= 1) ve Kocaeli (n= 1)’de bulunan merkezlerden GISAID veri tabanına yüklenen 194 adet SARS-CoV-2 tüm genom sekans verileri incelenmiştir. Nükleotit değişimlerinin belirlenmesi için, Türkiye’deki SARS-CoV-2 sekansları, “GenBank” sitesinde bulunan referans genom sekansı (NC\_045512.1) ile karşılaştırılmıştır. Oluşturulan veri seti MAFFT programı kullanılarak hizalanmış ve AliView programı kullanılarak, sekansların aynı çerçevede olduğu manuel olarak biçimlendirilerek kontrol edilmiştir. SARS-CoV-2 rRT-PCR tanısında kullanılmak üzere tanımlanmış, yedi farklı enstitüye ait (US CDC, China CDC, Charite CDC, Pasteur, HKU, Thailand, NIID) toplamda 13 adet PCR panelinin, primer-prob bağlanma bölgeleri, AliView programı ile belirlenmiş ve bu bölgelerdeki referans genoma göre değişiklik gösteren nükleotit değişimleri değerlendirilmiştir. Viral genomlardaki sekans çeşitliliği, pozisyonel nükleotit sayısal hesaplayıcı ve entropi hesaplayıcı modüller ile belirlenmiş ve her bir rRT-PCR paneli için, primer-prob bağlanma bölgelerindeki nükleotit ve entropi değişimleri incelenmiştir. On üç farklı primer-prob kombinasyonunun analizi sonucunda, yedi primer-prob panelinin hedef bölgelerinde nükleotit değişimleri olduğu belirlenmiştir. Primer-prob bağlanma bölgelerinde nükleotit değişimleri bulunan viral sekanslar incelendiğinde, en sık rastlanan değişimlerin, “China CDC” N-ileri primer ve “US CDC” N3-ileri primer bağlanma bölgelerinde olduğu gözlemlenmiş-

**İletişim (Correspondence):** Prof. Dr. Ayça Arzu Sayiner, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Viroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye.

**Tel (Phone):** +90 (232) 412 45 07, **E-posta (E-mail):** arzusayiner@yahoo.com

tir. Özellikle tanı testi olarak kullanılacak kitlerin, nükleotit değişimlerinin daha az olduğu bölgelere özgü tasarlanması önemlidir. Nükleotit değişimleri, PCR panellerinin çoğu için, DNA çoğalması açısından kritik olmayabilir ancak testin duyarlılığını etkileyebilme olasılığından ötürü dikkatle izlenmesi gerekmektedir. Tasarlanan bölgenin değişime uğrama riski fazla ise primer-prob bağlanma bölgelerinin sıklıkla kontrol edilmesi ve gerektiğinde güncellenmesi gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** SARS-CoV-2; COVID-19; mutasyon; rRT-PCR.

## ABSTRACT

The SARS-CoV-2 virus, which caused the COVID-19 epidemic, caused more than 55 million cases and nearly 1.5 million deaths worldwide. For the microbiological diagnosis of the disease, the most valid method is detecting the presence of the viral genome by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR). However, due to the nature of the RNA viruses, frequent mutations may affect the sensitivity of the analyses made on the genetic material of the virus, such as PCR. In this study, we aimed to investigate the mutations in the primer-probe binding regions of the rRT-PCR panels used in COVID-19 diagnosis. SARS-CoV-2 whole genome sequence data (n= 194) isolated from COVID-19 cases in Turkey and uploaded on GISAID database from the centers in İstanbul (n= 78), Ankara (n= 58), Kars (n= 47), Bursa (n= 2), Adıyaman (n= 2), Erciyes (n= 1) and Kocaeli (n= 1) between March 17-September 14, 2020 were analyzed. In order to determine the nucleotide changes, SARS-CoV-2 sequences from Turkey were compared to the reference genome sequence (NC\_045512.1) present in "GenBank" website. The constructed data set was aligned using the MAFFT program and was checked manually if the sequences were in the same frame by using the AliView program. Primer-probe binding sites of the thirteen SARS-CoV-2 rRT-PCR panels from seven different institutes (US CDC, China CDC, Charite CDC, Pasteur, HKU, Thailand, NIID) that are being used in COVID-19 diagnosis were evaluated in terms of nucleotide changes within the corresponding regions compared to the reference genome. Sequence diversities in the viral genomes were determined via positional nucleotide numerical calculator and entropy calculator modules and nucleotide and entropy changes in primer-probe binding regions for each rRT-PCR panel were examined. Among thirteen different primer-probe panels, nucleotide changes in the target regions of the seven primer-probe panels were determined. When viral sequences with nucleotide changes in the primer-probe binding regions were examined, the most common changes were observed in the "China CDC" N-forward primer and "US CDC" N3-forward primer binding regions. It is important that the kits to be used as diagnostic tests are designed specific to the regions with less nucleotide changes. Nucleotide changes may not be critical for DNA amplification for most PCR panels, but should be carefully monitored as they may affect the sensitivity of the assay. If the risk of alteration of the designed region is high, the primer - probe binding sites should be checked frequently and updated when necessary.

**Keywords:** SARS-CoV-2; COVID-19; mutation; rRT-PCR.

## GİRİŞ

Koronavirüsler; zarflı, pozitif iplikli RNA virüsleridir. İnsanda hafif semptomlar gösterecek hastalık yapan dört koronavirüs türü HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 ve HCoV-HKU1'dir. Bunlara, 2002 yılında ortaya çıkan, ağır hastalık tablosuna yol açan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs (SARS-CoV) SARS-CoV ve 2012 yılında ortaya çıkan "Middle East Respiratory Syndrome, (MERS)"-CoV eklenmiştir<sup>1</sup>. Aralık 2019'da Çin'in Wuhan eyaletinde ortaya çıkan yeni tip koronavirüs, filogenetik analiz sonucu SARS-CoV ile %82'den fazla benzer olduğu için SARS-CoV-2 adını almıştır<sup>2,3</sup>. Ortaya çıkmasını takiben toplumda hızla yayılarak tüm dünyayı etkilemiştir. Dünya genelinde 55 milyondan fazla insan tanı almış, bir milyondan fazla insan ise hayatını kaybetmiştir. Diğer koronavirüsler gibi SARS-CoV-2 de en az altı açık okuma çerçevesine "open reading frame (ORF)" ve birçok yardımcı gene sahiptir<sup>4</sup>.

Aktif enfeksiyonun virolojik tanısında en geçerli yöntem, viral RNA'yı saptamaya yönelik gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR)'dur<sup>5</sup>. rRT-PCR analizinin gerçekleştirilmesi için hedef bölge olarak, virüs genomundaki RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp), ORF1ab, helikaz (Hel), nükleokapsit (N), transmembran (M), zarf (E), ve "spike" glikoproteinleri (S) gibi çeşitli bölgeler belirlenmiştir. Testin en önemli bileşenleri kullanılan primer ve prob lar olup Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) başta olmak üzere birçok kurum, kullanılabilecek dizileri ve PCR protokollerini tanımlamışlardır<sup>6,7</sup>. PCR, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntem olmakla birlikte örneğin alınması sırasındaki hatalar (doğru klinik bölgeden doğru zamanlama ile alınmaması vb.) ya da primer-prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir<sup>8,9</sup>.

SARS-CoV-2'de, diğer RNA virüslerine kıyasla daha az olmakla birlikte, mutasyonlar gelişmektedir<sup>10-12</sup>. Bunlardan S proteinindeki D614G değişimi, Haziran 2020 sonunda tüm dünyada hemen hemen tüm izolatlarda görülen en yaygın mutasyon olmuştur<sup>13</sup>. Avrupa'da ise A222V mutasyonunda artış saptanmaktadır. Bugüne dek yaklaşık 197000 tüm genom sekans analizi paylaşılmış ve bunlarda yaklaşık 23000 tek nükleotit mutasyonu saptanmıştır (www.gisaid.org).

Bu çalışmada, Türkiye'den izole edilip sekanslanan ve sekans verisi "Global Initiative on Sharing Avian Influenza Database (GISAID)" veri tabanına yüklenen toplam 194 adet SARS-CoV-2 tüm genomunun, Wuhan'da izole edilip sekanslanan ilk SARS-CoV-2 genomu esas alınarak incelenmesi ve Türkiye'deki SARS-CoV-2 izolatlarnın sık kullanılan rRT-PCR primer/prob bağlanma bölgelerindeki mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğünün onayı (Tarih: 09.12.2020) ve İzmir Ekonomi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Yerel Etik Kurulunun onayı (Karar No: B.30.İEÜSB.0.05.05-20-097 ve Tarih: 21.12.2020) ile gerçekleştirildi.

### Veri Setinin Oluşturulması

Bu çalışmada, Türkiye'deki COVID-19 olgularından izole edilen ve 17 Mart-14 Eylül 2020 tarihleri arasında, İstanbul (n= 78), Ankara (n= 58), Kars (n= 47), Bursa(n= 2), Adıyaman (n= 2), Erciyes (n= 1) ve Kocaeli (n= 1)'de bulunan merkezlerden GISAID veri tabanına yüklenen 194 SARS-CoV-2 tüm genom sekans verileri incelendi<sup>14,15</sup>. Referans olarak Wuhan'da izole edilen SARS-CoV-2 viral genom sekansı (NC\_045512.1) kullanıldı.

### Mutasyon Analizi

Nükleotit değişimlerinin belirlenmesi için, Türkiye'deki SARS-CoV-2 sekansları, "Gen-Bank" internet sitesinde bulunan referans genom sekansı (NC\_045512.1) ile karşılaştırıldı. Oluşturulan veri seti MAFFT programı kullanılarak hizalanmış ve AliView programı kullanılarak, sekansların aynı çerçevede olduğu manuel olarak biçimlendirilerek kontrol edildi. Nükleotit sayıları, sekans verilerinin 5'UTR bölgesinden başlayarak belirtildi. Nükleotit pozisyonları, referans sekans nükleotit pozisyonları (NC\_045512.1) ile doğrulandı.

SARS-CoV-2 rRT-PCR tanısında kullanılmak üzere tanımlanmış, yedi farklı enstitüye ait toplamda 13 adet PCR paneli seçildi (<https://primerscan.ecdc.europa.eu/?assay=Overview>) ve primer-prob bağlanma bölgeleri, AliView programı kullanılarak belirlendi. Bu bölgelerdeki referans genoma göre değişiklik gösteren nükleotit değişimleri değerlendirildi. İlgili bölgelerde en az bir nükleotit için sekans okuması bulunmayan 14 örnek, okunamamanın teknik bir durumdan kaynaklanması nedeni ile analiz dışında bırakıldı.

### Nükleotit Çeşitliliği

SARS-CoV-2 sekansının (n= 180) tüm genomundaki sekans çeşitliliği, Alignment Explorer internet sitesindeki pozisyonel nükleotit sayısal hesaplayıcı [Positional nucleotide numerical summary (PNNS)] ve entropi hesaplayıcı modülleri (<http://entropy.szu.cz:8080/EntropyCalcWeb/>) ile belirlendi. Sonrasında her bir rRT-PCR paneli için primer-prob bağlanma bölgelerindeki nükleotit ve entropi değişimleri incelendi.

### BULGULAR

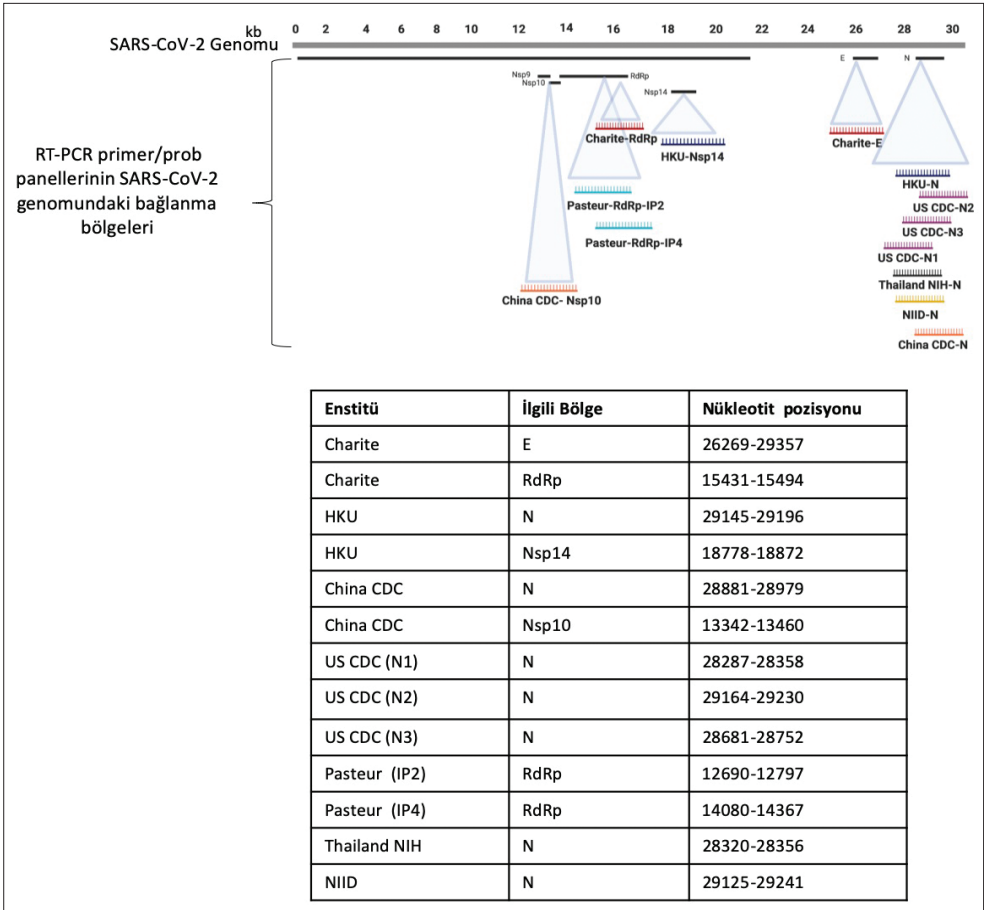
SARS-CoV-2 rRT-PCR için tanımlanmış ve bu çalışmada değerlendirilen 13 adet PCR paneline ait sekansların, viral genom üzerindeki bağlanma yerleri belirlenmiştir (Şekil 1). Bu panellerin hedeflediği bölgeler arasında zarf "envelope (E)", RNA polimeraz (RdRp), Nsp10, Nsp14 ve nükleokapsit (N) bölgeleri bulunmaktadır. Panellerin yedi tanesi, nükleokapsit geninin bulunduğu bölgeye özgü tasarlanmıştır.

İncelenen 180 farklı SARS-CoV-2 genomu üzerindeki primer-prob bağlanma bölgeleri analiz edildiğinde, bazı panellerin bağlanma bölgelerinde nükleotit değişimleri olduğu belirlenmiş (Tablo I) ve bu örnekler listelenmiştir (Tablo II). Ayrıca 180 örneğin pozisyonel nükleotit varyasyon sayıları ve primer-prob dizilerinin bağlandığı bölgelerde, her bir pozisyonadaki sekans varyasyon miktarını özetleyen entropi değişimleri hesaplanmış ve rRT-PCR panellerine göre değerlendirilmiştir. Yedi farklı panelde hedef olarak kullanılan 11 bölgenin nükleotit değişimi bulunan pozisyonlardaki entropi değişimleri (H(i)) Şekil 2'de gösterilmiştir.

Primer-prob bağlanma bölgelerinde nükleotit değişimleri bulunan viral sekanslar incelendiğinde, en sık "China CDC" N-ileri primer ve "US CDC" N3-ileri primer bağlanma bölgelerinde değişimler bulunduğu, mutasyonlu sekans sayısının sırasıyla 89/180 (%49.4) ve 24/180 (%13.3) olduğu belirlenmiştir (Tablo I, Tablo II). Bağlanma bölgelerinde mutasyonu olan sekansların veri tabanına yüklenme zamanları incelendiğinde değişimlerin, zaman ile doğrudan ilişkili olmadığı görülmüştür (Şekil 3, Şekil 4).

### TARTIŞMA

COVID-19 salgınına neden olan SARS-CoV-2 virüsü, 10 ay gibi bir sürede, dünya genelinde 43.5 milyona yakın olguya ve 1.5 milyona yakın ölüme sebebiyet vermiştir. Enfeksiyonun yayılmasını önlemede, aktif hastalığı olan olguların doğru tespit edilmesi önemlidir; bu da ancak duyarlı ve güvenilir tanı testleri ile mümkün olabilmektedir. RNA virüsü salgınlarında virüs sıklıkla viral RNA'nın rRT-PCR yöntemi ile belirlenmektedir<sup>16</sup>. SARS-CoV-2'ye yönelik PCR temelli testler, semptomatik hastaların tanısında ve asemptomatik kişilerin taranmasında kullanılmaktadır<sup>16</sup>. rRT-PCR tanı kitleri, salgının baş-



**Şekil 1.** COVID-19 rRT-PCR panellerindeki primer-prob dizilerinin SARS-CoV-2 genomundaki bağlanma bölgeleri (Kaynak: <https://primerscan.ecdc.europa.eu/?assay=Overview>) (©Biorender 2020 programı ile çizilmiştir.).

langıcında Wuhan'da izole edilen virüslerin tüm genom sekanslarının belirlenmesinden sonra oluşturulan referans genoma (NC\_045512) göre tasarlanmıştır<sup>17</sup>. Tasarlanan tanı kitlerinin performanslarının da, mutasyona uğrayan viral suşlar nedeniyle farklı olduğu görülmüştür<sup>18,19</sup>. Mutasyonlar sonucu bazı testlerde duyarlılığın düşük olması ve yanlış-negatif sonuç alınması mümkündür.

Bu çalışmada, Türkiye'den izole edilen viral genom (n= 194) üzerinde, COVID-19 tanısında kullanılan 13 farklı rRT-PCR panelinin primer-prob bağlanma bölgelerindeki nükleotit değişimleri araştırılmıştır. Analiz edilen örneklerden, ilgili bölgelerde sekans okuması bulunmayan 14 örnek, ileri analizlerden dışlanmış ve 180 örneğin detaylı mutasyon ve entropi analizleri gerçekleştirilmiştir. Yedi farklı panele ait primer-prob bağlanma bölgelerinde nükleotit değişimi olduğu saptanmıştır. Bu nükleotit değişimleri, primer-prob bağlanma bölgelerinde yanlış eşleşmelere neden olmaktadır. Yanlış eşleşmelerin etkileri ise pozisyonlarına, sayılarına ve primerlerin uzunluğuna göre farklılık gösterebilmektedir<sup>19,20</sup>. Örneğin,

**Tablo 1. İncelenen PCR Panelleri ve Primer/Prob Bağlanma Bölgelerinde Saptanan Nükleotit Değişimleri**

Enstitü	Primer/Prob	Bağlanma bölgesindeki nükleotit değişimi	Analiz edilen gruptaki sıklığı
US CDC	N1-İleri Primer	28.290 (C→A)	4/180
	N2-İleri Primer	29.171 (C→T)	2/180
	N3-İleri Primer	28.688 (T→C)	<b>24/180</b>
	N3-İleri Primer	28.690 (G→T)	1/180
	N1-Prob	28.311 (C→T)	1/180
	N2-Prob	29.197 (C→T)	1/180
China CDC	N-İleri Primer	28.881 (GGG→AAC)	<b>89/180</b>
Charite CDC	E-Prob	26.340 (C→T)	1/180
Pasteur RdRp IP2	RdRp IP2 12759 Geri Primer	12.781 (C→T)	2/180
	RdRp IP2 12669 İleri Primer	12.695 (C→T)	1/180
Pasteur RdRp IP4	RdRp IP4 14084 Prob	14.120 (C→T)	1/180
	RdRp IP4 14084 Prob	14.122 (G→T)	1/180
	RdRp IP4 14146 Geri Primer	14178 (C→T)	2/180

3' ucuna yakın olan yanlış eşleşmeler, PCR çoğalmasını önemli derecede etkilerken, orta kısımlardaki yanlış eşleşmelerin reaksiyon performansını orta ya da az derecede etkilediği ya da etkisinin olmadığı bilinmektedir<sup>21-23</sup>. Primerlerin yanı sıra prob bölgesindeki yanlış eşleşmeler de önemlidir çünkü bunlar, prob bağlanmasını engelleyerek floresan ışımaya bozabilmekte, primerler viral bölgeyi çoğaltsa bile yanlış-negatif sonuca yol açabilmektedir<sup>24,25</sup>.

DNA polimerazlar, nükleotitleri zincirin 3'-OH ucuna eklemektedir. Bu nedenle 3' ucundaki yanlış eşleşmeler, DNA polimerazın işlevini daha çok etkileyebilmektedir. Örneğin; bir primerin 3' ucuna doğru olan ikinci yarısındaki yanlış eşleşmelerin, belirlenen gen kopya sayısını 1000 kata kadar azaltabileceği gösterilmiştir<sup>26</sup>. PCR verimliliği ve doğruluğu; primerlerin bağlanma derecesine, ikincil yapıların varlığına ve primerler ile hedeflenen DNA arasındaki uyuma bağlıdır. Hedef DNA ve primerler arasındaki yanlış eşleşme, DNA dupleks stabilitesini etkileyerek DNA'nın çoğalmasını engelleyebilir. Yapılan bazı çalışmalar, C-C, A-A, G-A yanlış eşleşmelerinin reaksiyonu en fazla engelleyen eşleşmeler olduğunu; G-T, C-A yanlış eşleşmelerinin ise reaksiyon üzerindeki etkilerinin az olduğunu göstermiştir<sup>21,27</sup>. SARS-CoV-2 genomuna bakıldığında, C > T nükleotit değişimi genomda en sık görülen nükleotit değişimidir<sup>11</sup>. Bu değişimi sırasıyla A > G (%13.9), G > T (%11.1) ve G > A (%10.1) değişimleri izlemektedir. Analiz edilen viral sekanslardaki primer-prob bağlanma bölgelerindeki değişimlere baktığımızda, Charite E-prob, US CDC N2 ileri primer ve probu, US CDC N3 ileri primeri, Pasteur IP2 ileri ve geri primerleri ile Pasteur IP4 prob ve geri primerindeki nükleotit değişimleri, genel olarak T-G, T-C, C-A, C-T yanlış eşleşmelerine neden olmaktadır. Bu eşleşmeler, reaksiyona az etki eden değişimler arasındadır. Ancak yanlış eşleşmelerin pozisyonlarına bakıldığında bir kısmının primer/probun 3' ucuna yakın olduğu görülmektedir. Örneğin, Pasteur IP4 probundaki

**Tablo II.** Türkiye'den İzole Edilen 180 SARS-CoV-2 Viral Sekansın, Primer/Prob Bağlanma Bölgelerindeki Nükleotit Değişim Durumları

Enstitü	Primer/Prob Adı	Primer/prob bağlanma bölgesinde nükleotit değişikliği içeren örneklerin GISAID kodu	Viral izolatın GISAID sitesine yüklenme tarihi	İlgili pozisyonda etkilenen nükleotitler
Charite	E Prob	EPI_ISL_429865	2020-03-18	1 nükleotit değişimi (nt.26340 (C>T))
China CDC	N-İleri primer	EPI_ISL_429864	2020-03-22	
		EPI_ISL_429870	2020-03-22	
		EPI_ISL_437305	2020-03-27	
		EPI_ISL_437311	2020-03-27	
		EPI_ISL_437313	2020-03-27	
		EPI_ISL_437308	2020-03-25	
		EPI_ISL_429873	2020-03-23	
		EPI_ISL_437333	2020-03-25	
		EPI_ISL_495435	2020-05-05	
		EPI_ISL_428368	2020-04-16	
		EPI_ISL_480230	2020-04-13	
		EPI_ISL_480236	2020-04-22	
		EPI_ISL_480248	2020-04-26	
		EPI_ISL_480262	2020-05-01	
		EPI_ISL_480272	2020-05-07	
		EPI_ISL_480253	2020-05-01	5' ucunda ilk 3 Nükleotit değişimi (nt.28.881 (GGG > AAC))
		EPI_ISL_480279	2020-05-07	
		EPI_ISL_480281	2020-05-05	
		EPI_ISL_480269	2020-05-04	
		EPI_ISL_480282	2020-05-09	
		EPI_ISL_480229	2020-04-13	
		EPI_ISL_480243	2020-04-23	
		EPI_ISL_480244	2020-04-23	
		EPI_ISL_480268	2020-04-05	
		EPI_ISL_480259	2020-05-03	
		EPI_ISL_480266	2020-05-04	
		EPI_ISL_480290	2020-05-09	
		EPI_ISL_480249	2020-04-30	
		EPI_ISL_480264	2020-04-20	
		EPI_ISL_480285	2020-05-09	
		EPI_ISL_480261	2020-05-03	
		EPI_ISL_480242	2020-04-29	
		EPI_ISL_480250	2020-05-02	

**Tablo II.** Türkiye'den İzole Edilen 180 SARS-CoV-2 Viral Sekansın, Primer/Prob Bağlanma Bölgelerindeki Nükleotit Değişim Durumları (devamı)

Enstitü	Primer/Prob Adı	Primer/prob bağlanma bölgesinde nükleotit değişikliği içeren örneklerin GISAID kodu	Viral izolatin GISAID sitesine yüklenme tarihi	İlgili pozisyonda etkilenen nükleotitler
		EPI_ISL_480232	2020-04-17	
		EPI_ISL_480233	2020-04-17	
		EPI_ISL_480238	2020-04-22	
		EPI_ISL_480258	2020-05-03	
		EPI_ISL_480287	2020-05-09	
		EPI_ISL_480288	2020-05-09	
		EPI_ISL_480260	2020-05-04	
		EPI_ISL_480292	2020-05-10	
		EPI_ISL_480283	2020-05-08	
		EPI_ISL_460617	2020-04-16	
		EPI_ISL_468066	2020-04-16	
		EPI_ISL_460619	2020-04-16	
		EPI_ISL_460618	2020-04-15	
		EPI_ISL_480267	2020-05-04	
		EPI_ISL_480273	2020-05-05	
		EPI_ISL_480275	2020-05-07	
		EPI_ISL_480270	2020-05-06	
		EPI_ISL_480286	2020-05-10	
		EPI_ISL_495432	2020-04-27	5' ucunda ilk 3 Nükleotit değişikimi (nt.28.881 (GGG > AAC))
		EPI_ISL_510534	2020-06-24	
		EPI_ISL_495411	2020-05-19	
		EPI_ISL_495416	2020_05-22	
		EPI_ISL_495418	2020-05-16	
		EPI_ISL_495422	2020_05-21	
		EPI_ISL_495444	2020-05-20	
		EPI_ISL_495450	2020-05-24	
		EPI_ISL_495420	2020-05-17	
		EPI_ISL_495425	2020-05-27	
		EPI_ISL_495452	2020-05-17	
		EPI_ISL_495453	2020-05-23	
		EPI_ISL_495433	2020-06-06	
		EPI_ISL_495438	2020-05-28	
		EPI_ISL_495421	2020-06-06	
		EPI_ISL_495412	2020-05-20	
		EPI_ISL_495447	2020-05-20	



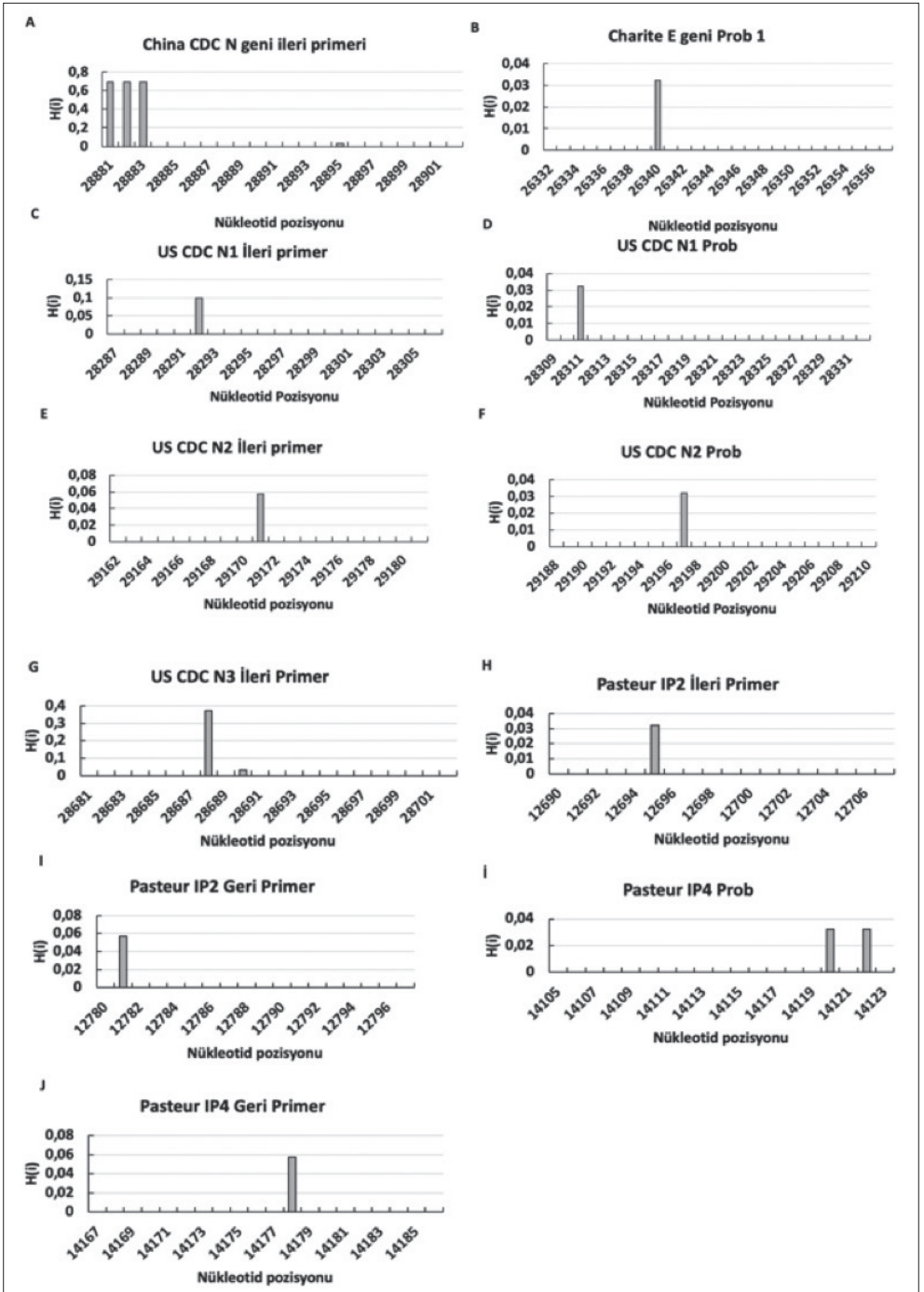
**Tablo II.** Türkiye'den İzole Edilen 180 SARS-CoV-2 Viral Sekansın, Primer/Prob Bağlanma Bölgelerindeki Nükleotit Değişim Durumları (devamı)

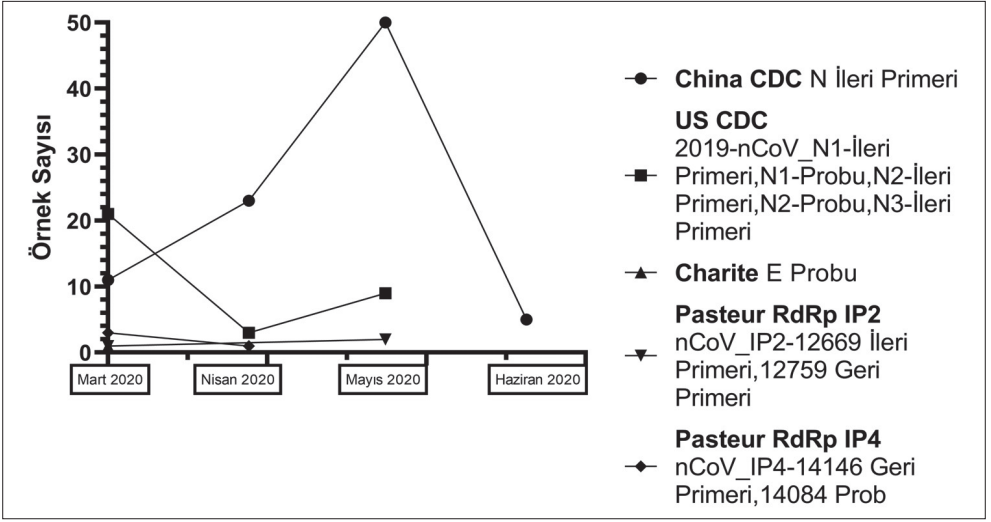
Enstitü	Primer/Prob Adı	Primer/prob bağlanma bölgesinde nükleotit değişikliği içeren örneklerin GISAID kodu	Viral izolatin GISAID sitesine yüklenme tarihi	İlgili pozisyonda etkilenen nükleotitler
		EPI_ISL_495424	2020-05-21	
		EPI_ISL_495454	2020-05-17	
		EPI_ISL_495431	2020-05-25	
		EPI_ISL_495415	2020-05-28	
		EPI_ISL_495436	2020-06-03	
		EPI_ISL_495446	2020-05-21	
		EPI_ISL_495449	2020-05-26	
		EPI_ISL_495414	2020-05-22	
		EPI_ISL_495441	2020-04-28	5' ucunda ilk 3 Nükleotit değişimi (nt.28.881 (GGG > AAC))
		EPI_ISL_495423	2020-05-08	
		EPI_ISL_480240	2020-04-22	
		EPI_ISL_480284	2020-05-09	
		EPI_ISL_491476	2020-03-17	
		EPI_ISL_500716	2020-03-17	
		EPI_ISL_510533	2020-06-24	
		EPI_ISL_495456	2020-05-26	
		EPI_ISL_480265	2020-05-04	
		EPI_ISL_509416	2020-04-22	
		EPI_ISL_435057	2020-04-09	
		EPI_ISL_480263	2020-05-03	5' ucunda ilk 3 Nükleotit değişimi (nt.28.881 (GGG > AAC)) + Nükleotit değişimi (nt.28.895 (G>T))
US CDC	2019-nCoV_N1-F	EPI_ISL_480259	2020-05-03	
		EPI_ISL_480266	2020-05-04	Nükleotit değişimi (nt.28.2902 C > A)
		EPI_ISL_480290	2020-05-09	
		EPI_ISL_480284	2020-05-09	
US CDC	2019-nCoV_N1-Prob	EPI_ISL_455719	2020-04-09	Nükleotit değişimi (nt. 28.311 C > T)
US CDC	2019-nCoV_N2-F	EPI_ISL_495441	2020-04-28	Nükleotit değişimi (nt. 29.171 C > T)
US CDC	2019-nCoV_N2-P	EPI_ISL_495423	2020-05-08	
US CDC	2019-nCoV_N3-F	EPI_ISL_480261	2020-05-03	Nükleotit değişimi (nt. 29.197 C > T)

**Tablo II.** Türkiye'den İzole Edilen 180 SARS-CoV-2 Viral Sekansın, Primer/Prob Bağlanma Bölgelerindeki Nükleotit Değişim Durumları (devamı)

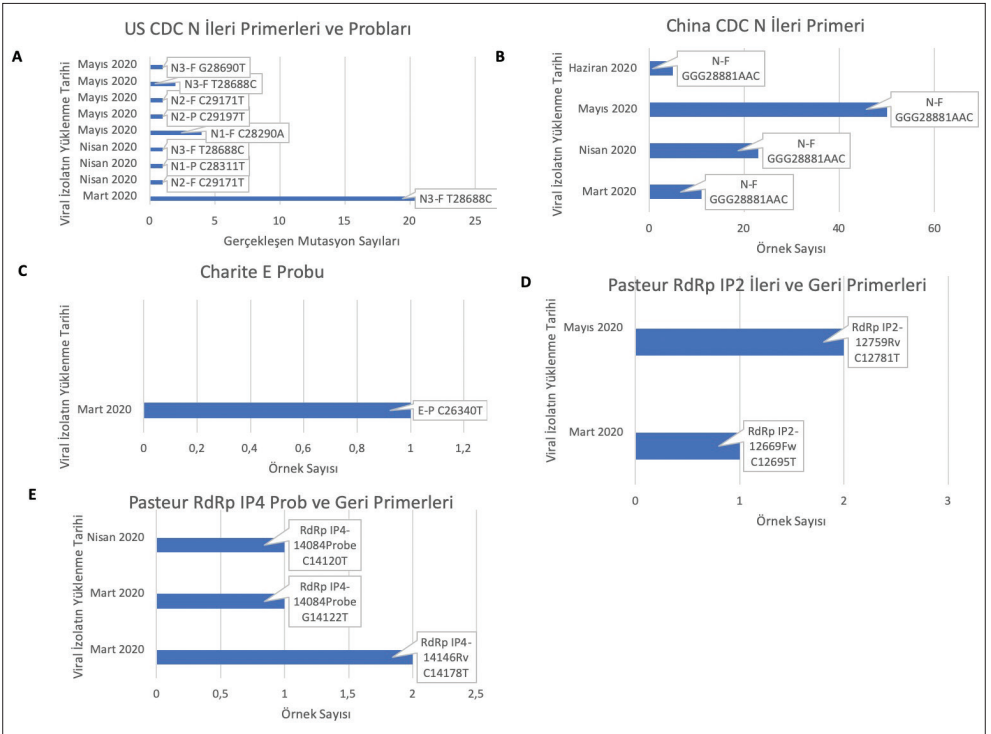
Enstitü	Primer/Prob Adı	Primer/prob bağlanma bölgesinde nükleotit değişikliği içeren örneklerin GISAID kodu	Viral izolatin GISAID sitesine yüklenme tarihi	İlgili pozisyonda etkilenen nükleotitler
US CDC	2019-nCoV_N3-F	EPI_ISL_428713	2020-03-18	Nükleotit değişimi (nt. 28.688 T > C)
		EPI_ISL_428722	2020-03-22	
		EPI_ISL_429872	2020-03-25	
		EPI_ISL_429868	2020-03-17	
		EPI_ISL_429865	2020-03-18	
		EPI_ISL_437306	2020-03-27	
		EPI_ISL_437412	2020-03-25	
		EPI_ISL_437314	2020-03-26	
		EPI_ISL_437318	2020-03-19	
		EPI_ISL_437307	2020-03-25	
		EPI_ISL_437319	2020-03-19	
		EPI_ISL_437320	2020-03-19	
		EPI_ISL_437321	2020-03-19	
		EPI_ISL_437327	2020-03-19	
		EPI_ISL_437325	2020-03-19	
		EPI_ISL_437334	2020-03-24	
		EPI_ISL_437322	2020-03-19	
		EPI_ISL_437323	2020-03-19	
		EPI_ISL_437324	2020-03-19	
		EPI_ISL_480276	2020-05-05	
EPI_ISL_424366	2020-03-17			
EPI_ISL_480246	2020-04-26			
EPI_ISL_480256	2020-05-03			
EPI_ISL_417413	2020-03-17			
		EPI_ISL_495451	2020-05-25	Nükleotit değişimi (nt.28.690 G > T)
Pasteur RdRp IP2	nCoV_IP2- 12669Fw	EPI_ISL_437331	2020-03-25	Nükleotit değişimi (nt.12.695 C > T)
		EPI_ISL_480255	2020-05-02	Nükleotit değişimi (nt.12.781 C > T)
		EPI_ISL_480278	2020-05-07	Nükleotit değişimi (nt.14.122 G > T)
Pasteur RdRp IP4	nCoV_IP4- 14084Probe	EPI_ISL_428718	2020-03-19	Nükleotit değişimi (nt.14.122 G > T)
		EPI_ISL_480245	2020-04-26	Nükleotit değişimi (nt.14.120 C > T)
		EPI_ISL_428715	2020-03-18	Nükleotit değişimi (nt.14.178 C > T)
		EPI_ISL_428721	2020-03-21	Nükleotit değişimi (nt.14.178 C > T)

Sadece incelenen primer-prob bağlanma bölgelerinde değişiklik içeren örnekler listelenmiştir.

Şekil 2. Primer-prob bağlanma bölgelerindeki nükleotit değişimlerinin pozisyonel entropi ( $H(i)$ ) değerleri.



Şekil 3. Analiz edilen viral sekans içerisinde (n= 180), farklı primer-prob panellerinin bağlanma bölgelerinde mutasyon taşıyan örnek sayılarının zaman içindeki değişimi.



Şekil 4. Analiz edilen viral sekans içerisinde (n= 180), A. US CDC B. China CDC C. Charite CDC D. Pasteur RdRp IP2 E. Pasteur RdRp IP4 Enstitüleri tarafından üretilen primer-prob bağlanma bölgelerinde oluşan mutasyonları barındıran örnek sayılarının zaman içerisindeki değişimi.

iki yanlış eşleşme, 3' ucundan sırasıyla 2 ve 4 baz uzaklıktadır. Dolayısıyla reaksiyonu etkilemesi açısından değerlendirilmelidir. İncelenen 180 örnekten sadece bir tanesi bu bağlanma bölgesinde mutasyon göstermektedir.

China CDC N-ileri primerine bakıldığında, primerin 5' ucuna yakın olan bağlanma bölgesinde arka arkaya bulunan üç nükleotit değişimi, üç yanlış eşleşmeye neden olmaktadır. Bunlardan ilk ikisi A-C yanlış eşleşmesi iken, üçüncüsü C-C yanlış eşleşmesidir. C-C yanlış eşleşmesi, PCR verimliliğinde ciddi etkisi olan değişimler arasındadır. 3' ucuna yakın olmaması nedeniyle, bu değişimin etkisinin daha az olabileceği de olasılıklar arasındadır ancak çoklu yanlış eşleşmelerin reaksiyon hassasiyetini ve verimliliğini düşürdüğü de göz önünde bulundurulmalıdır. Yüz seksen örneğin 89 tanesi bu bölgedeki üçlü değişimi barındırmaktadır. China CDC N paneli, SARS-CoV-2 tanısında en sık kullanılan primer-prob panellerindedir. Bu panelin bağlanma bölgesindeki mutasyonlar, salgının erken dönemlerinde ortaya çıkmıştır. Kitlerde gerekli değişiklikler yapılmadan önce özellikle Çin'de kullanılan bazı tanı kitlerindeki düşük verimliliğin nedenlerinden biri bu olabilir<sup>19</sup>. US CDC N1 ileri primerinde bulunan A-G yanlış eşleşmesi de yine PCR üzerinde ciddi etkisi olan değişimlerdendir. Bu yanlış eşleşme incelenen 180 örneğin 4 tanesinde saptanmıştır.

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı tarafından satın alınarak yetkili laboratuvarlara dağıtılan üç farklı üreticinin ticari SARS-CoV-2 rRT-PCR kiti bulunmaktadır (BioSpeedy, Bioeksen AR&GE Teknolojileri, Diagnovital, RTA Laboratuvarları, Coronex, DS Bio ve Nano Teknoloji). Bu kitlerin kitapçıkları incelendiğinde her üçünde de hedef bölgenin viral ORF1ab ve N geni olduğu görülmektedir ancak primer-prob dizileri verilmemiştir. Bu çalışmada incelenen rRT-PCR panellerinin de çoğu N (nükleokapsit) bölgesine özgü tasarlanmıştır. N genini hedef alan primer-prob bölgelerindeki yanlış eşleşmelerin diğer gen bölgelere göre daha sık olduğu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında saptanan nükleotit değişimlerinin PCR panellerinin çoğu için, performans açısından kritik etkisi olmayabileceği düşünülmektedir<sup>16</sup>. Yine de testin duyarlılığını etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. İdeal olarak, tanı testlerinde viral genoma bağlanma bölgelerinde yanlış eşleşmelerin olmaması istenir. Yanlış eşleşmelerin pozisyonuna ve türüne bağlı olarak sonuçları farklı olmakla birlikte rRT-PCR performansını etkilerler<sup>28</sup>. Yanlış eşleşmelerin varlığı, PCR deneylerinde saptanan gen kopya sayısının daha düşük olması nedeniyle bir yanlışlık da oluşturabilir. Özellikle tanı testi olarak kullanılacak kitlerin, nükleotit değişimlerinin daha az olduğu bölgelere özgü tasarlanması, testin duyarlılığı, özgüllüğü ve kesinliği açısından önemlidir. Tasarlanan bölgenin değişime uğrama riski fazla ise primer-prob bağlanma bölgelerinin sıklıkla kontrol edilmesi ve gerektiğinde güncellenmesi gerekmektedir. Ayrıca testlerin duyarlılık ve doğruluğunun gerçek izolatlarla düzenli olarak kontrol edilmesi, olası yanlış negatif sonuçların önlenmesi açısından önemlidir.

## TEŞEKKÜR

Numunelerin elde edilmesinden sorumlu kaynak laboratuvarların ve genom verilerinin oluşturulduğu ve bu araştırmanın dayandırılıp GISAID aracılığıyla paylaşıldığı gönderici laboratuvarlarının aşağıda adı geçen yazarlarına teşekkür ederiz. Veri gönderen tüm kişilerle [www.gisaid.org](http://www.gisaid.org) aracılığıyla doğrudan iletişime geçilebilir.



## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü'nün onayı (Tarih: 09.12.2020) ve İzmir Ekonomi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Yerel Etik Kurulunun onayı (Karar No: B.30.İEÜSB.0.05.05-20-097 ve Tarih: 21.12.2020) ile gerçekleştirildi. Bu çalışmanın yazarları arasında yayın kurulu üyesi de bulunmaktadır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17(3): 181-92.
2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; 5(4): 536-44.
3. Chan JF, Kok K. Correction to: Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9(1): 540.
4. Malik YS, Sircar S, Bhat S, Sharun K, Dhama K, Dadar M, et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)—current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. *Vet Q* 2020; 40(1): 68-76.
5. Xu Y, Xiao M, Liu X, Xu S, Du T, Xu J, et al. Significance of serology testing to assist timely diagnosis of SARS-CoV-2 infections: implication from a family cluster. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9(1): 924-7.
6. World Health Organization (WHO). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. WHO 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Acceptable Alternative Primer and Probe Sets. CDC 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/List-of-Acceptable-Commercial-Primers-Probes.pdf>
8. Mathuria JP, Yadav R, Rajkumar. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *J Infect Public Health* 2020; 13(7): 901-5.
9. Álvarez-Díaz DA, Franco-Muñoz C, Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Franco-Sierra ND, Flórez-Sánchez AC, et al. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect Genet Evol* 2020; 84: 104390.
10. 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.
11. Wang C, Liu Z, Chen Z, Huang X, Xu M, He T, et al. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *J Med Virol* 2020; 92(6): 667-74.
12. Kim JS, Jang JH, Kim JM, Chung YS, Yoo CK, Han MG. Genome-wide identification and characterization of point mutations in the SARS-CoV-2 genome. *Osong Public Heal Res Perspect* 2020; 11(3): 101-11.
13. Callaway E. Making sense of coronavirus mutations. *Nature* 2020; 585(7824): 174-7.
14. Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Euro Surveill* 2017; 22(13): 2-4.
15. Elbe S, Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health. *Glob Chall* 2017; 1(1): 33-46.

16. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao SN, Juanola-Falgarona M, Manissero D, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis* 2020; 97: 225-9.
17. Chan JFW, Yip CCY, To KKW, Tang THC, Wong SCY, Leung KH, et al. 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. *J Clin Microbiol* 2020; 58(5): 1-10.
18. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nat Microbiol* 2020; 5(10): 1299-305.
19. Wang R, Hozumi Y, Yin C, Wei GW. Mutations on COVID-19 diagnostic targets. *Genomics* 2020; 112(6): 5204-13.
20. Khan KA, Cheung P. Presence of mismatches between diagnostic PCR assays and coronavirus SARS-CoV-2 genome: Sequence mismatches in SARS-CoV-2 PCR. *R Soc Open Sci* 2020; 7(6): 200636.
21. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes THM, Schutten M. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagnostics* 2010; 12(1): 109-17.
22. Whiley DM, Sloots TP. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol* 2005; 34(2): 104-7.
23. Lefever S, Pattyn F, Hellemans J, Vandesompele J. Single-nucleotide polymorphisms and other mismatches reduce performance of quantitative PCR assays. *Clin Chem* 2013; 59(10): 1470-80.
24. Armstrong PM, Prince N, Andreadis TG. Development of a multi-target TaqMan assay to detect eastern equine encephalitis virus variants in mosquitoes. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2012; 12(10): 872-6.
25. Brault AC, Fang Y, Dannen M, Anishchenko M, Reisen WK. A naturally occurring mutation within the probe-binding region compromises a molecular-based west nile virus surveillance assay for mosquito pools (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 2012; 49(4): 939-41.
26. Bru D, Martin-Laurent F, Philippot L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(5): 1660-3.
27. Rejali NA, Moric E, Wittwer CT. The effect of single mismatches on primer extension. *Clin Chem* 2018; 64(5): 801-9.
28. Persson S, Karlsson M, Borsch-Reniers H, Ellström P, Eriksson R, Simonsson M. Missing the match might not cost you the game: primer-template mismatches studied in different hepatitis a virus variants. *Food Environ Virol* 2019; 11(3): 297-308.