

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

DR. FİRUZE SOYAK

ANTALYA-2024

Giriş

- Koronavirüs Hastalığı-2019' un (COVID-19) etkeni olan Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2),tespit edildikten kısa bir süre sonra saptanan varyantlar
 - Epidemiyolojik veriler
 - Klinik bulgular
 - Aşı seçenekleri
 - Tanı ve tedavi yöntemlerindedeğişikliklere neden olarak pandeminin seyrini değiştirmiştir.

Amaç

- Çalışmamızda farklı dönemlerde takip edilen belirli özelliklere sahip COVID-19 hastalarından izole edilen örneklerde tam genomik sekanslama yapılarak klinik seyir üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

- 2022 Ocak ve Kasım ayları arasında,
- Toplam 21 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.
- COVID-19 hastalarının nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örnekleri alınarak viral RNA'ları ekstrakte edilmiş ve tam genomik sekanslama analizi gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

2022 Ocak ve Kasım ayları arasında, tam genomik sekanslama yapılan 21 hasta çalışmaya dahil edildi.

Tablo 1: Hastaların demografik özellikleri ve servis yatış durumları

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

Bulgular

COVID-19'a karşı bağışıklanma durumları

Hasta no	Aşılanma Durumu
1	2 Sinovac-CoronaVac
2	2 Sinovac-CoronaVac
3	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
4	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
5	3 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
6	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
7	2 Sinovac-CoronaVac 3 Pfizer-BioNTech BNT162b2
8	2 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
9	4 Sinovac-CoronaVac
10	4 Sinovac-CoronaVac

Hasta no	Aşılanma Durumu
11	4 Sinovac-CoronaVac
12	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
13	AŞISIZ
14	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
15	3 Pfizer-BioNTech BNT162b2
16	4 Sinovac-CoronaVac
17	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2
18	3 Sinovac-CoronaVac
19	4 Sinovac-CoronaVac
20	4 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2
21	AŞISIZ

Bulgular

- En az iki Sinovac-CoronaVac ve en az iki Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile minimum dört doz aşılı hastalar tam aşılı olarak kabul edildi.
- Etkin antikor düzeylerine (ort: 15.480 AU/ml) ulaşan altı (%28,5) hasta, diğer hastalarla klinik durum açısından karşılaştırıldı. Aşı yanıtı oluşan hastalarda daha çok hafif klinik seyir ($p=0.031$) ve daha kısa PCR pozitiflik süresi saptanmıştır. ($p=0,04$)
- Uzamış PCR pozitifliği (dört haftanın üzerinde) saptanan hastalar diğer hastalarla karşılaştırıldığında, bu grupta daha fazla malign hastalık ($p=0,016$) ve lenfoma öyküsü olduğu ($p=0,006$), PCR süresi uzun süre pozitif kalan hastaların daha çok orta- ağır hastalık grubunda yer aldığı görülmüştür.

Bulgular

Klinik ve demografik veriler, aşılanma durumları ve ilk kez ülkemizden bildirim yapılan mutasyonlar

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Ek hastalıklar	Klinik Seyir	Aşılanma	İlk kez izole edilen mutasyonlar
1	Erkek	73	Lenfoma, HIV	Orta	2 Sinovac-CoronaVac	-
2	Erkek	54	Lenfoma	Ağır	2 Sinovac-CoronaVac	-
3	Kadın	79	KAH	Hafif	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2	-
4	Erkek	73	DM,obezite	Ağır	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2	-
5	Erkek	75	DM	Orta	3 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2	-
6	Erkek	78	DM, KAH, KBY	Hafif	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech BNT162b2	-
7	Kadın	30	-	Hafif	2 Sinovac-CoronaVac 3 Pfizer-BioNTech BNT162b2	Spike A263T
8	Erkek	76	Lenfoma	Ağır	2 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech BNT162b2	-
9	Erkek	75	DM, KBY, lenfoma	Orta	4 Sinovac-CoronaVac	-
10	Erkek	89	HT	Orta	4 Sinovac-CoronaVac	NSP2 L18I

Bulgular

Klinik ve demografik veriler, aşılanma durumları ve ilk kez ülkemizden bildirimi yapılan mutasyonlar

Hasta no	Cinsiyet	Yaş	Ek hastalıklar	Klinik Seyir	Aşılanma	İlk kez izole edilen mutasyonlar
11	Kadın	66	HT, KAH, KOAH, KBY, obezite	Ağır	4 Sinovac-CoronaVac	-
12	Erkek	85	DM, HT, KBY	Orta	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech	NSP2 V599I
13	Kadın	97	HT	Orta	Aşısız	NSP14 V40I
14	Erkek	32	-	Hafif	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech	-
15	Erkek	50	HT	Hafif	3 Pfizer-BioNTech	-
16	Erkek	70	DM, KAH	Ağır	4 Sinovac-CoronaVac	-
17	Kadın	26	-	Hafif	2 Sinovac-CoronaVac 2 Pfizer-BioNTech	-
18	Erkek	70	KAH, lenfoma	Orta	3 Sinovac-CoronaVac	NSP2 F156L
19	Kadın	80	DM, HT	Ağır	4 Sinovac-CoronaVac	-
20	Kadın	67	HT, KAH, obezite	Ağır	4 Sinovac-CoronaVac 1 Pfizer-BioNTech	-
21	Kadın	28	SLE	Ağır	Aşısız	-

Bulgular

- Çalışmada **12 hastada** Omicron BA.2, **dört hastada** Omicron BA.1, **dört hastada** Omicron BA.5 alt varyantları ve **bir hastada** Delta varyantı saptandı.
- Hastalardan izole edilen örneklerde tespit edilen mutasyonlar ile bu mutasyonların tüm dünyada aynı sekansta görülme sıklıkları Pearson korelasyon testi ile karşılaştırıldığında, bu değişkenler arasında **yüksek derecede pozitif bir ilişki** bulunmuştur ($r(163)=0.81, p<0.001$).

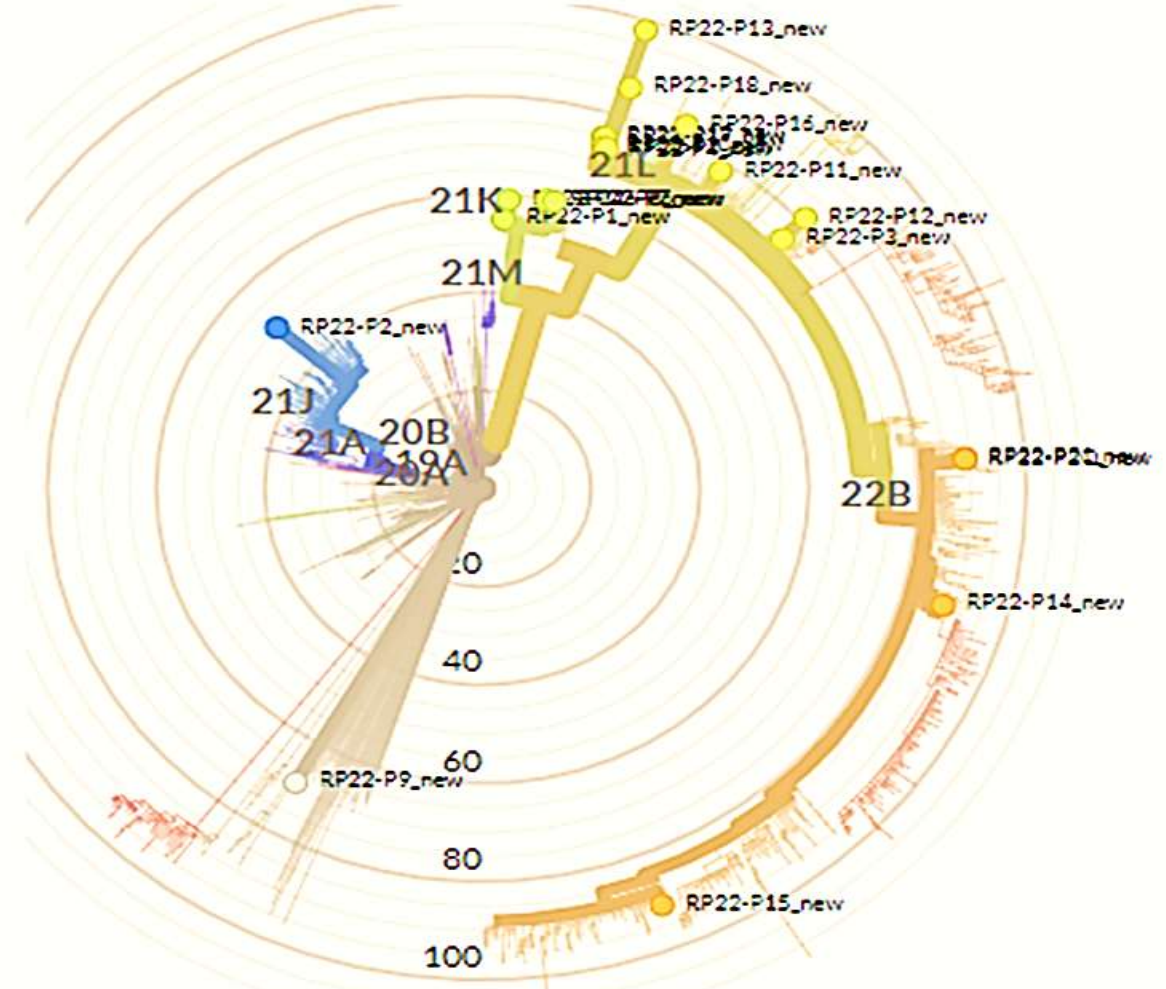
Bulgular

Phylogeny

Clade ^

- 21J
- 21K
- 21L

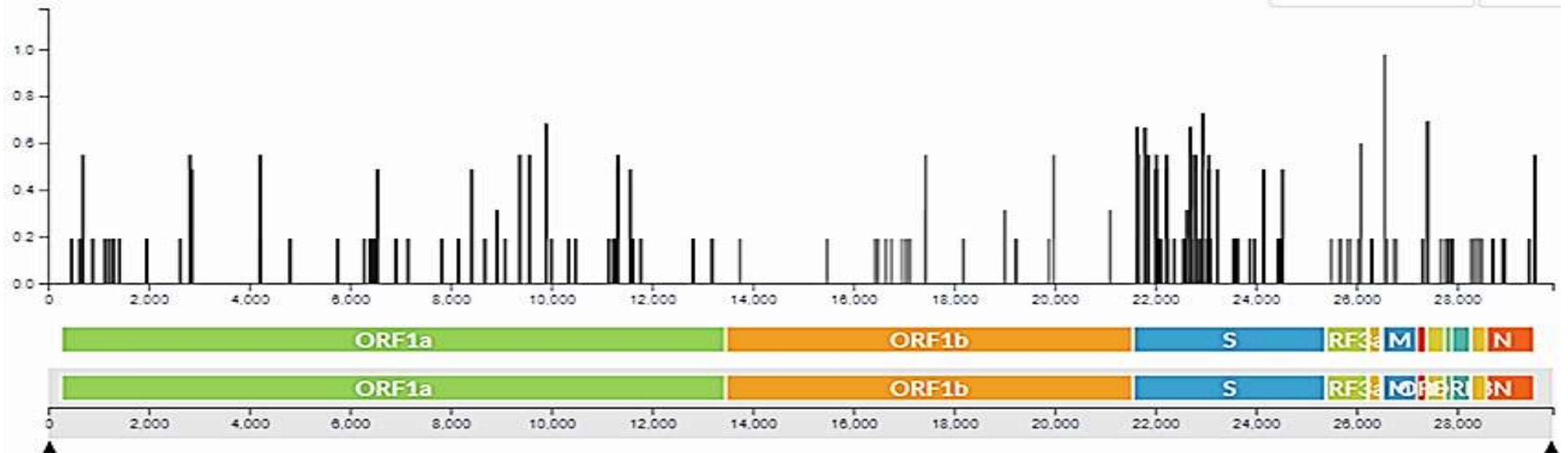
- 22B
- recombinant



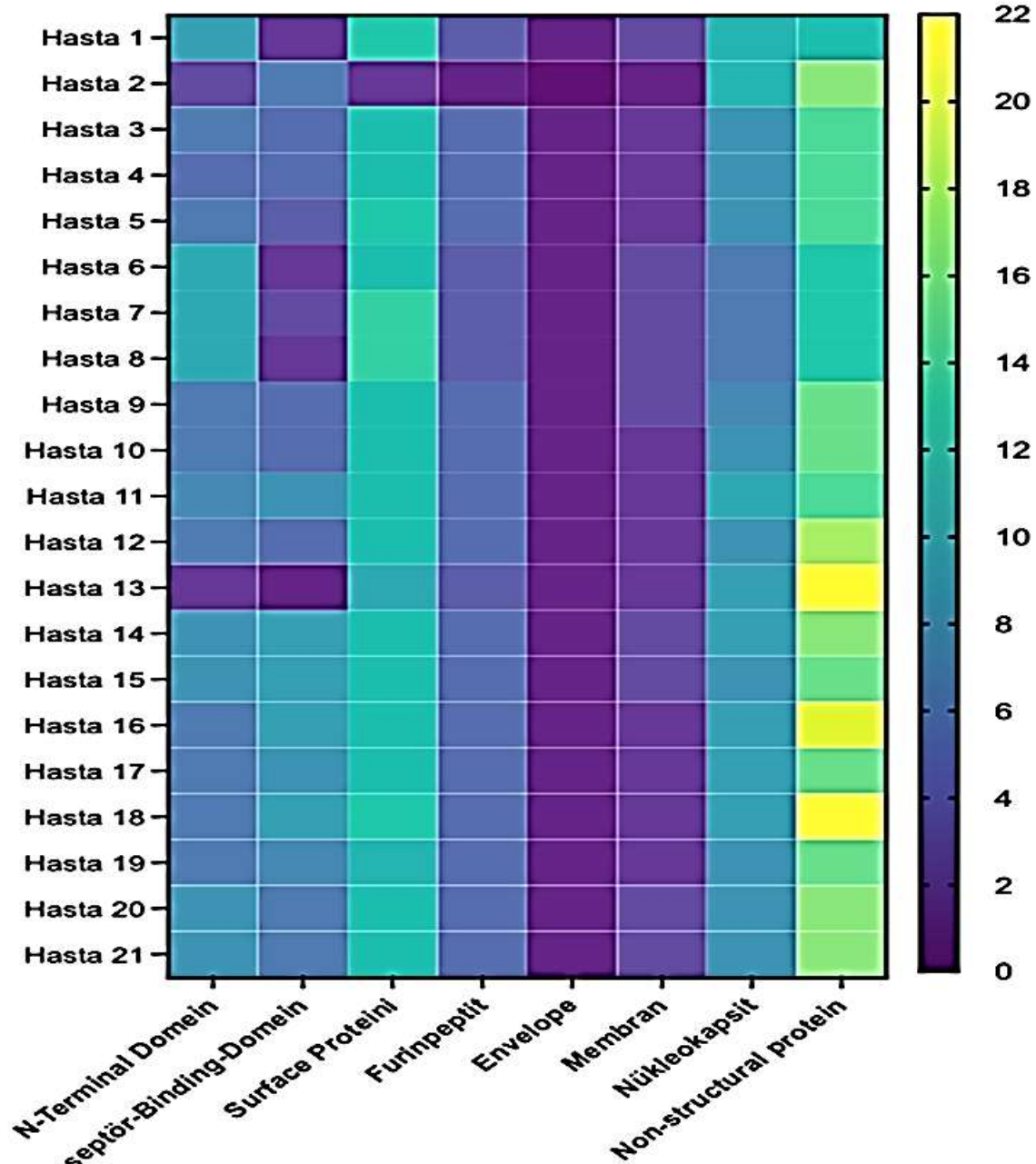
Şekil 8: Örneklerin ait oldukları soylara göre filogenetik analiz grafiği

Bulgular

- İncelenen tüm izolatlarda
 - c.1841A>G Spike D614G,
 - c.425G>A Spike G142D,
 - c.9764C>T NSP4 T492I,
 - c.14144C>T NSP12 P323L mutasyonları saptandı.
- Varyantların çoğu Surface Glikoprotein ve ORF1ab'de tespit edildi.



Bulgular



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

Tartışma

- Çalışmamızda dört doz ve üzeri aşılama öyküsü olan hastalardaki suşlarda **Spike Q493R** mutasyonu anlamlı olarak daha fazla meydana gelmiştir ($p=0,043$).
- Psödoviral nötralizasyon testlerinde Spike Q493R, bamlanivimab ve etesevimab duyarlılığını 100 kat azalttığı gösterilmiştir*.
- Aşı ile oluşan bağışıklık yanıtının varyant virüsün kontrolünde yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir.

* Phillips, C. (n.d.). Emergency Use Authorization (EUA) for Bamlanivimab 700 mg and Etesevimab 1400 mg IV Administered Together Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Review Identifying Information Application Type (EUA or Pre-EUA) If EUA, designate whether pre-event or intra-event EUA request. EUA EUA Application Number(s) 1 EUA 000094 Sponsor (entity requesting EUA or Eli Lilly and Company pre-EUA consideration), point of.

Tartışma

- Omicron BA.1 varyantı izole edilen bir hastada görülen **Spike A263T** nadir görülen (tüm dünyada 457 kez, Spike dizisine sahip tüm numunelerin %0,01'i) ve ülkemizden ve komşu ülkelerden bildiri yapılmayan bir mutasyondur
- Çalışmamızda saptanan tek olgumuz **komorbiditesi olmayan, hafif klinik seyir ile 30 yaş kadın hastadır. İki doz Sinovac-CoronaVac ve üç doz Pfizer-BioNTech BNT162b2 ile bir ay öncesinde aşılanmış olup yüksek antikor düzeyine sahip (30024 Au/ml)'tir.**
- Olgunun tek olması, genç olması ve komorbiditesinin olmaması ve mutasyonunun nadir görülmesi nedeniyle, klinik etkisinin infektivite ve bulaştırıcılıktan çok, antikor yanıtından kaçış ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Tartışma

- Çalışmamızda **Omicron BA.2** varyantı hastaları arasında,
 - Geçirilmiş COVID-19
 - Dört doz Sinovac-Coronovac aşılması
 - Yaygın akciğer tutulumu
 - Gastrointestinal bulgular
 - Ağır klinik seyir gösteren ve mortal seyreden hastada nadir olarak görülen **Spike R21T** mutasyonu saptanmıştır.
- Çalışmalarda Spike R21T mutasyonunun, virüsün insan ve bağırsak hücrelerine geçişi ve infektiviteyi artırdığı ve monoklonal antikor Bamlanivimab'a dirençli olduğu gösterilmiştir*.

*World Health Organization. (2021). Weekly epidemiological update on COVID-19- 11 May 2021. Retrieved from <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20210511-weekly-epi-update-39.pdf>

Tartışma

- Omicron BA.2 subvaryantı hastaları arasında mortal seyreden diğer olguda ise farklı olarak **Spike L452M** mutasyonu saptanmıştır. Hasta hiperinflamatuvar klinik seyir sonrası, IL-1 blokörü (Anakinra) tedavisine yanıt vermeyen bir olgudur.
- Spike L452M mutasyonunun
 - ACE-2-RBD bağlanma afinitesini geliştirdiği,
 - Güçlendirilmiş virüs-hücre bağlanması
 - SARS-CoV-2'nin bulaşıcılığının ve/veya patojenitesinin arttırdığı gösterilmiştir.
- Mutasyonun RBD-ACE-2 arasında artan etkileşimi ve virüsün aşırı ekspresyonunun olguda görülen aşırı immün yanıt, hiperinflamasyon ve ağır klinik seyir ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür*.

*Khairnar, K., et al. (2023). L452M in spike glycoprotein indicative of zoonotic links of SARS-CoV-2 XBC.1. Authorea Preprints. doi: 10.22541/AU.167357764.45753521/V1. Retrieved from <https://www.authorea.com/doi/full/10.22541/au.167357764.45753521/v1?commit=5f41fa653ab666cc5340323cc67a5940eb734c13>

Tartışma

- Çalışmamızda **Omicron BA.2 varyantı izole edilen** ve 134 gün uzamış PCR pozitifliği saptanan hastada **M D3G** ve **NSP4 T114I** mutasyonları saptanmıştır.
- **NSP4 T114I** mutasyonunu toplamda çalışmada iki hastada görülmüş olup diğer hastanın da benzer şekilde uzamış PCR pozitifliğinin görülmesi (29 gün) nedeniyle mutasyon sonucu *viral replikasyonda artış/viral klerenste azalış* olabileceği düşünülmüştür.

Tartışma

- Çalışmamızda bir olguda **Delta (B.1.617.2)** varyantı saptanmıştır.
 - Hastamız 54 yaşında olup,
 - Lenfoma tanılı
 - ARDS benzeri akciğer tutulumu olan,
 - İki doz Sinovac-CoronaVac ile bir yıl öncesinde aşılanmış ve
 - 64 gün PCR pozitifliği sonrasında
 - Mortal seyreden olgudur.

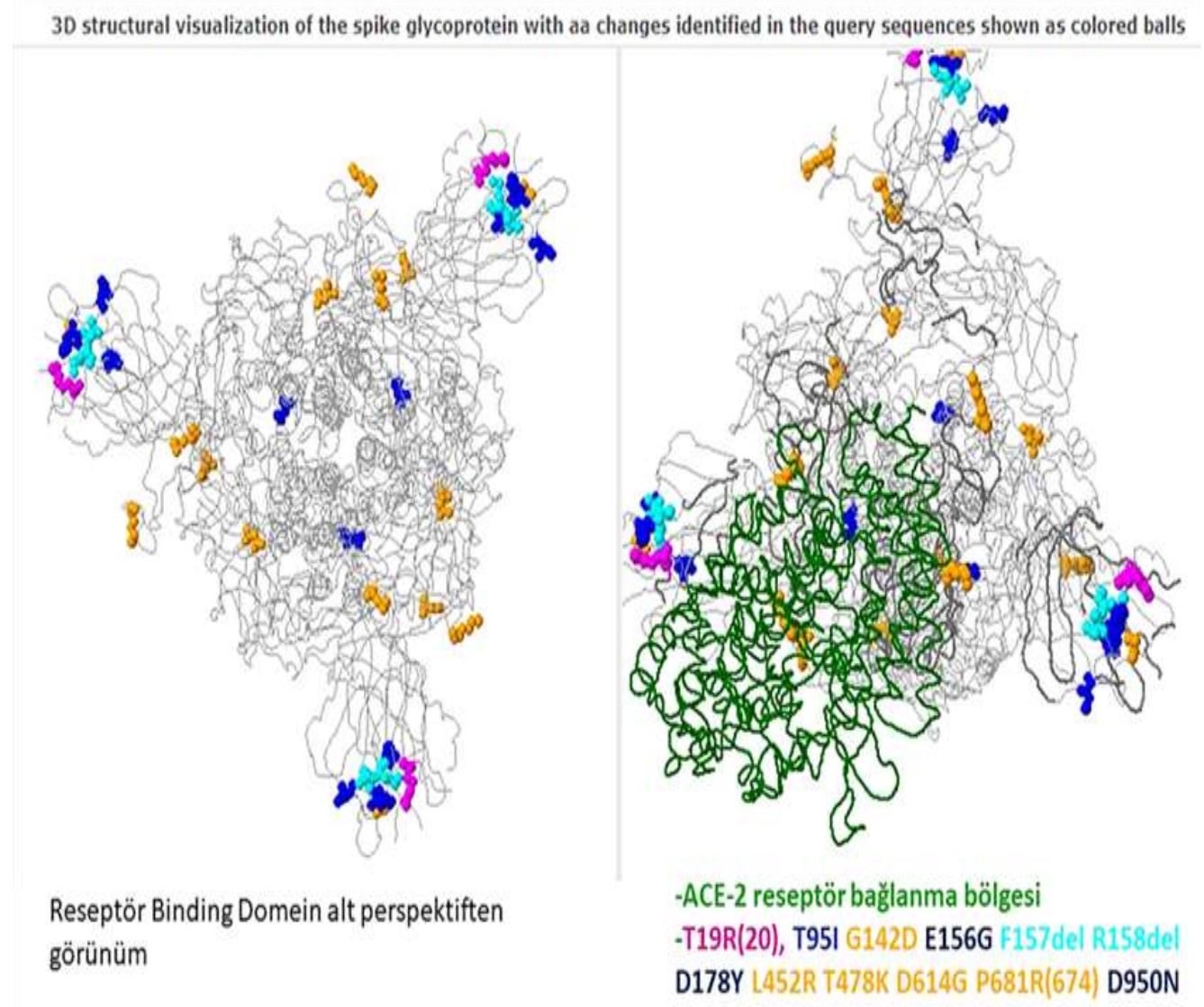
Tartışma

- Delta varyantında mutasyonlar ile ilgili yapılan bir çalışmada, Spike protein NTD spesifik **E156G/del157-158** ve **L452R** kombinasyonunu taşıyan psödotipli virüsler, artan enfektivite, aşı ile ortaya çıkan poliklonal antikörlara direnç ve artmış hücreden hücreye füzyon göstermiştir*.
- Çalışmada sadece bu olguda gördüğümüz **E156G/del157-158** ve **L452R** kombinasyonunun sinerjik şekilde, hastanın immunsupresyon kliniği ve eksik aşılama durumu ile ağır klinik durumuna neden olabileceği düşünülmüştür.

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

Tartışma

- Yine sadece bu olgumuzda gördüğümüz Spike T19R, P681R ve D950N mutasyonlarının ACE-2 reseptör bağlanımı ve S1/S2 bölünmesini artırarak replikasyonu artırdığı, bulaştırıcılığı ve infektiviteyi artırdığı başka bir çalışmada gösterilmiştir. Olgumuzda 64 gün PCR pozitifliğinin bu klinik yansımanın sonucu olduğu düşünülmüştür.



Şekil 6: Delta varyantının Spike Protein 3D görünümü ve aminoasit değişikliklerinin renklerle gösterimi

Tartışma

- Omicron BA.5 subvaryantı saptanan ağır klinik seyir gösteren, ARDS benzeri akciğer tutulumu olan 28 yaşında kadın hastada hiperinflamasyon kliniği görülmüştür (IL-6: 125 Au/ml).
- Sistemik Lupus Eritamozise bağlı kronik böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz desteği alan aşısız kadın hastada, **NSP13 A389V, NSP14 M315I, NSP16 T140I** mutasyonları diğer hastalardan farklı olarak saptanmıştır.

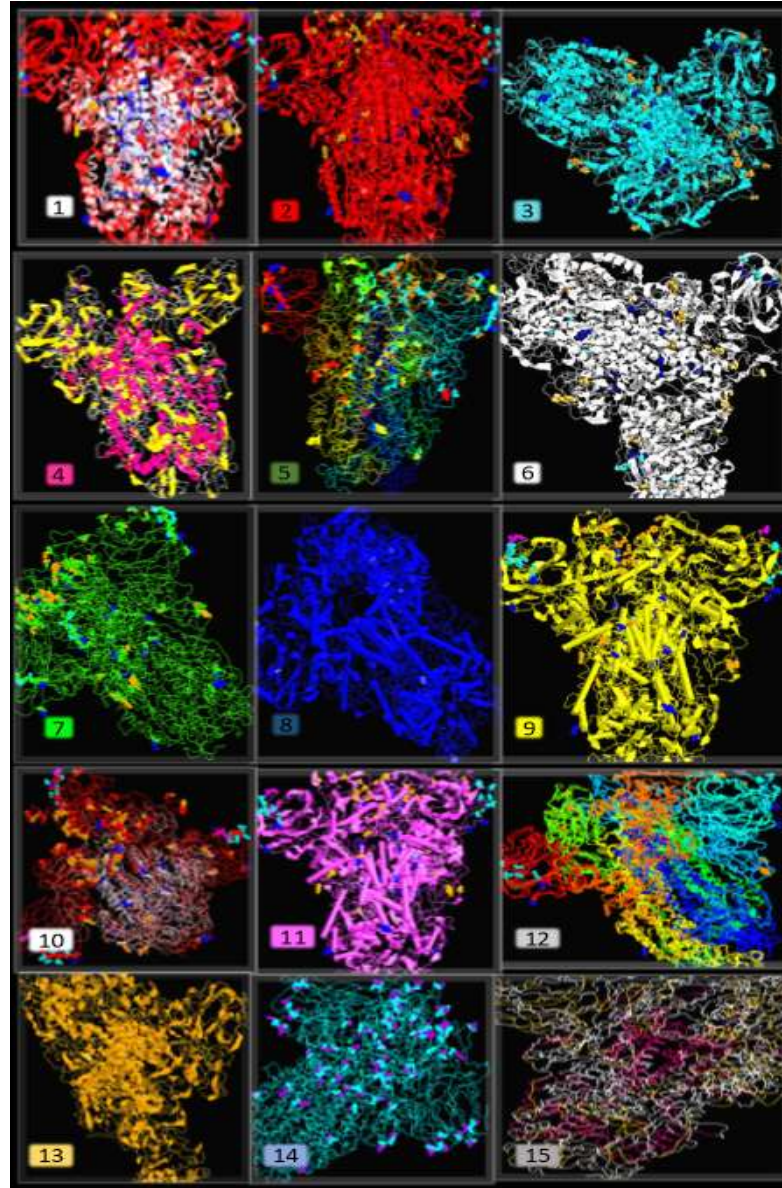
Tartışma

- Mutasyonların IFN üretimini erken dönemde etkili bir şekilde baskıladığı ve sonrasında gecikmiş IFN sinyal üretiminin, abartılı inflamatuvar yanıtta ve ciddi akciğer immünopatolojisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.
- Hastamızda KBY, SLE gibi komorbiditelerin bulunması ve aşısız olmasının yanı sıra bu varyant nedeniyle de hiperinflamasyon kliniği ve ARDS benzeri akciğer tutulumu geliştiği düşünülmüştür.

Sonuç

- SARS-CoV-2'nin evrimini ve yayılımını izlemede en önemli yöntem olan genomik sekanslama virüsün bulaştırıcılığı, hastalıkla ilişkili semptomları ve COVID-19 aşılarının etkililiğini saptamada oldukça önemli olup, sonuçların klinik bulgularla analiz edilmesi pandeminin kontrolünü sağlamada yardımcı olacaktır.

Bulgular



Hastaların Spike proteinlerinin 3D görünümü