

ARTIKEL PENELITIAN

Polimorfisme Gen M Sars-Cov-2 Pada Isolat Sumatera Barat

Fauzul Azhim¹, Desmawati², Elizabeth Bahar³, Andani Eka Putra⁴

1. Program Studi Ilmu Biomedis Program Magister, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 2. Bagian Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 3. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia; 4. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang, Indonesia.

Korespondensi: Desmawati, desmawati@med.unand.ac.id, 08527446779

Abstrak

Tujuan: Mengetahui polimorfisme gen M SARS-CoV-2 pada isolat Sumatera Barat; **Metode:** Penelitian dengan desain deskriptif menggunakan sampel koleksi Laboratorium Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang. Sampel dipreparasi untuk disekuensing lalu dianalisis menggunakan *software* CLC Genomics Workbench app; **Hasil:** Ditemukan 8 mutasi substitusi pada gen M SARS-CoV-2, yaitu A26528T, C26735T, G26763T, A26867G, C26895T, G26951T, A27019G dan G27088T serta 1 mutasi delesi, yaitu del27055–27059 (ATTAC); **Kesimpulan:** Mutasi C26735T merupakan mutasi *synonymous* yang paling banyak ditemukan pada isolat Sumatera Barat.

Kata kunci: polimorfisme; gen M; SARS-CoV-2

Abstract

Objectives: To determine the SARS-CoV-2 M gene polymorphism in West Sumatra isolates; **Methods:** Research with an exploratory descriptive design using a sample collection of the Laboratory of Central Diagnostics and Researches on Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Andalas University, Padang. Samples were prepared for sequencing and then analyzed using the CLC Genomics Workbench app; **Results:** Found 8 substitution mutations in the SARS-CoV-2 M gene, namely A26528T, C26735T, G26763T, A26867G, C26895T, G26951T, A27019G and G27088T and 1 deletion mutation, namely del27055–27059 (ATTAC); **Conclusion:** C26735T mutation is the most common *synonymous* mutation found in isolates from West Sumatra.

Keywords: polymorphism; M gene; SARS-CoV-2

PENDAHULUAN

Kemunculan *coronavirus disease-19* (Covid-19) di Wuhan Cina tahun 2019 lalu menyebar ke seluruh dunia menyebabkan *World Health Organization* (WHO) mengeluarkan status pandemi Covid-19 yang disebabkan oleh *severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2* (SARS-CoV-2).¹ Sejak kasus pertama di Wuhan dilaporkan, terjadi peningkatan kasus Covid-19 di Cina setiap harinya dan memuncak di antara akhir Januari dan awal Februari 2020. Kebanyakan laporan datang dari Hubei dan provinsi sekitar kemudian bertambah hingga ke provinsi lain dan seluruh Cina.² Sekitar 30 Januari 2020, telah terdapat 7.736 kasus terkonfirmasi Covid-19 di Cina dan 86 kasus lain dilaporkan dari berbagai negara.¹

Sementara itu, kasus Covid-19 pertama di Indonesia dilaporkan pada 2 Maret 2020,¹ sedangkan di Sumatera Barat kasus pertama kali dilaporkan pada 26 Maret 2020. Per 7 April 2021 dilaporkan total kasus positif di Sumatera Barat sebanyak 32.311 kasus dengan 1.264 (3,91 %) merupakan kasus aktif. Laporan tersebut menggambarkan 293 (0,91 %) orang berada dalam perawatan, 971 (3,01 %) orang diisolasi, 698 (2,16 %) orang meninggal, dan 30.349 (93,93 %) orang dinyatakan sembuh.³

Pandemi Covid-19 disebabkan oleh SARS-CoV-2 yang merupakan salah satu jenis *coronavirus*. *Coronavirus* adalah virus RNA dengan ukuran partikel 120-160 nm. *Coronavirus* yang menjadi etiologi Covid-19 termasuk dalam genus *Betacoronavirus*.

Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa virus ini masuk dalam subgenus yang sama dengan *coronavirus* yang menyebabkan wabah *severe acute respiratory syndrome* (SARS) pada tahun 2002-2004, yaitu *Sarbecovirus*. Berdasarkan hal ini International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) mengajukan nama SARS-CoV-2.^{4,5}

Patogenesis SARS-CoV-2 masih belum sepenuhnya dipahami, tetapi diduga tidak jauh berbeda dengan SARS-CoV yang sudah lebih banyak diketahui.⁶ *Coronavirus* pada manusia terutama menginfeksi sel-sel pada saluran napas yang melapisi alveoli.⁷⁻⁹

Virus SARS-CoV-2 akan berikatan dengan reseptor dan membuat jalan masuk ke dalam sel. Glikoprotein yang terdapat pada spike virus akan berikatan dengan reseptor *angiotensin converting enzyme-2* (ACE2) pada sel inang. Setelah terjadi ikatan tersebut SARS-CoV-2 akan masuk ke dalam sel inang lalu melakukan duplikasi materi genetik dan mensintesis protein-protein yang dibutuhkan kemudian membentuk virion baru yang muncul di permukaan sel.⁷⁻⁹

Struktur SARS-CoV-2 mempunyai protein *spike* (S) yang dikode oleh gen S dilaporkan sebagai determinan signifikan dalam masuknya virus ke dalam sel inang.¹ Protein S memiliki peran vital dalam patogenesis virus namun kemampuan virus dalam menghindari sistem imun merupakan peran keberadaan protein *membrane* (M). Protein M SARS-CoV-2 menghambat produksi dan menekan induksi interferon (IFN) tipe I dan III

sehingga kemudian melemahkan imunitas inang dan meningkatkan replikasi virus.¹⁰ Hal ini menunjukkan bahwa terdapat sinergisitas fungsi protein S dan protein M SARS-CoV-2 dalam proses memasuki sel inang. Selain itu protein M adalah protein *coronavirus* yang paling banyak dan terlibat dalam memberikan bentuk pada virus.¹¹

Sifat antigenik yang kuat dan keterlibatan dalam masuknya virion ke dalam sel inang pada protein M SARS-CoV-2 sehingga memiliki potensi untuk diagnostik dan desain vaksin.¹² Salah satu pengembang vaksin SARS-CoV-2 perusahaan OncoGen telah mengusulkan kandidat vaksin peptida panjang sintesis yang menargetkan protein S dan M dari SARS-CoV-2.¹³ Vaksin berbasis protein M dapat menginduksi titer respons antibodi yang tinggi pada hewan yang diimunisasi.¹⁴

Genom SARS-CoV-2 memiliki kemampuan bermutasi yang cepat saat virus menyebar.¹⁵ Mutasi tersebut menyebabkan peningkatan keragaman genetik,¹⁶ virulensi dan transmisibilitas virus.¹⁷ Potensi variasi genetik yang tinggi ini dapat terjadi pada gen M sehingga mempengaruhi peran protein M dalam patogenesis Covid-19.

Beberapa peneliti telah menemukan adanya variasi genetik protein M SARS-CoV-2. Hoq dan Joshi menemukan beberapa variasi genetik protein M SARS-CoV-2 dalam penelitian *whole genome sequencing* (WGS) yang mereka lakukan.^{18,19}

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen M SARS-CoV-2 pada isolat Sumatera Barat.

METODE

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi (PDRPI) Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia Jakarta. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Maret–September 2021.

Sampel pada penelitian ini adalah bahan biologis tersimpan dalam *viral transport medium* (VTM) hasil swab nasofaring yang dikoleksi di Laboratorium PDRPI FK Unand Padang. Sampel disimpan dalam *freezer* -80°C. Teknik pengambilan sampel menggunakan teknik *quota sampling* dengan kriteria inklusi volume sampel minimal 500 µL dan Ct *value* <30. Sampel pada penelitian ini berjumlah 94 sampel.

Sampel yang terpilih dalam penelitian ini diisolasi sesuai protokol QIAamp *Viral RNA Mini Kit*. Kit ini menggabungkan teknologi membran silika dengan sentrifugasi *microspin*.²⁰ Teknologi membran silika bersifat lebih stabil dan efisien dalam proses isolasi dibandingkan dengan teknik *chloroform* dan *isopycnic gradient*.²¹

Hasil isolasi akan segera diuji konsentrasinya menggunakan reagen Qubit™ RNA HS Assay. Reagen ini sangat

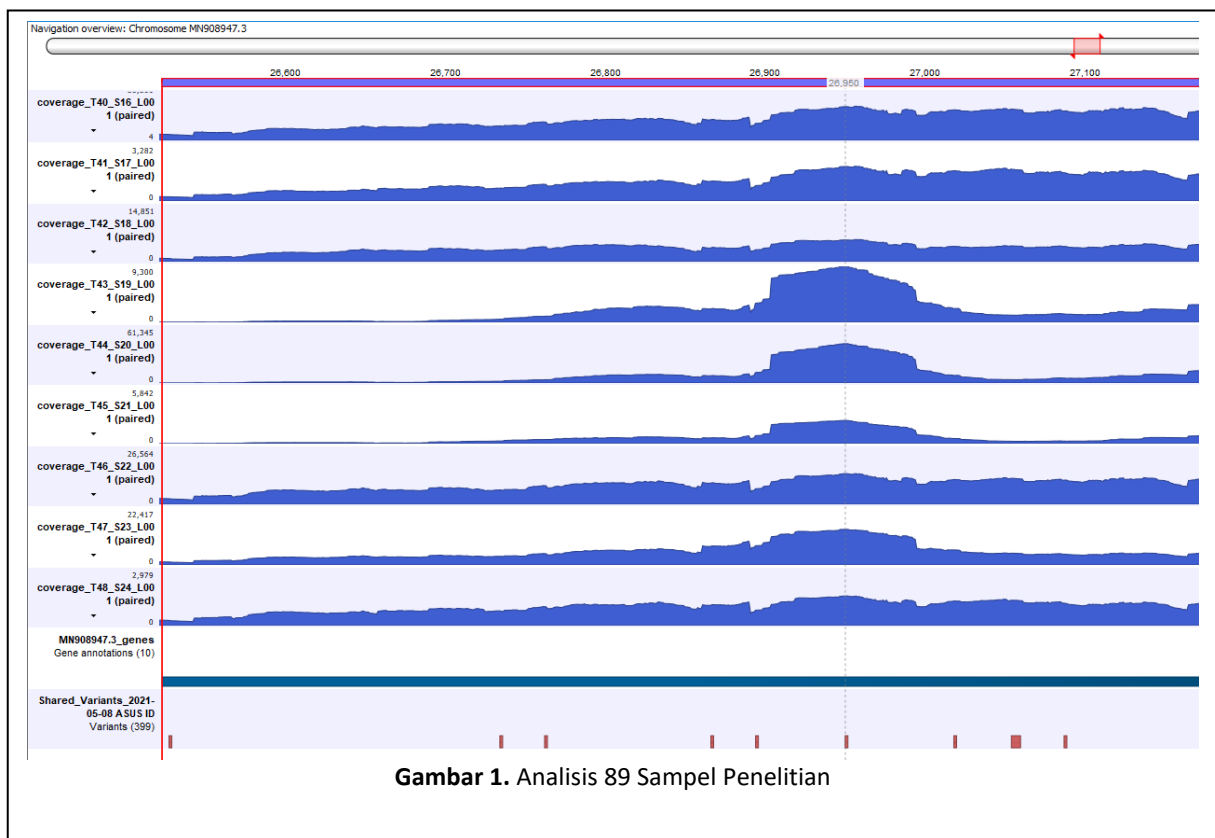
selektif dalam mendeteksi RNA yang bercampur dengan dsDNA dalam isolat dengan akurasi 250 pg/ul hingga 100 ng/ul. Selanjutnya, dilakukan amplifikasi RNA dengan metode qRT-PCR mengikuti protokol kit mBioCoV-19 RT-PCR.

Tahap selanjutnya adalah *library preparation* yang merupakan persiapan sampel sebelum *sequencing* sesuai protokol kit Illumina RNA *prep with enrichment* (L) *tagmentation*. Sampel dengan konsentrasi seragam kemudian didilusi hingga nilai sesuai protokol. Proses sekuensing mengikuti *Miseq system guide* di bawah bimbingan teknisi terlatih Illumina. Analisis data hasil sekuensing dilakukan menggunakan *software* CLC *Genomics Workbench app* dengan sekuens referensi MN908947.3.

Penelitian ini telah mendapat izin dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Nomor 664/UN.16.2/KEP-FK/2022.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat 5 sampel penelitian yang dieksklusikan dari penelitian karena memiliki nilai *coverage depth* <50 pada tahap analisis bioinformatika sehingga total 89 sampel yang dilanjutkan ke tahap analisis data. *Coverage depth* merupakan rata-rata jumlah *read* yang disejajarkan dengan sekuens referensi. Kemungkinan kesalahan dalam penyusunan konsensus akan menurun jika nilai *coverage depth* semakin tinggi.



Gambar 1. Analisis 89 Sampel Penelitian

Menggunakan program CLC *Genomics Workbench app* dapat diketahui persentase homologi dan variasi molekuler pada sekuens sampel, yaitu berupa *single nucleotida polymorphism* (SNPs), seperti insersi, substitusi maupun delesi. Titik mutasi yang terjadi sepanjang gen M ditandai dengan bar warna merah pada Gambar 1. Terdapat 9 bar yang menunjukkan terjadinya mutasi pada 9 titik sepanjang gen M yang dianalisis menggunakan MN908947.3 sebagai *reference*.

Tabel 1 menunjukkan bahwa jenis mutasi yang terjadi pada gen M SARS-CoV-2 adalah substitusi dan delesi. Substitusi merupakan jenis mutasi yang paling banyak ditemukan pada gen M SARS-CoV-2.

Tabel 1. Jenis mutasi gen M SARS-CoV-2

Jenis Mutasi	Jumlah Titik Mutasi Gen M SARS-CoV-2
Inseri	-
Substitusi	8
Delesi	1

Substitusi yang terjadi pada gen M disajikan dalam Tabel 2, yaitu A26528T, C26735T, G26763T, A26867G, C26895T, G26951T, A27019G, dan G27088T. Terdapat satu jenis mutasi delesi pada penelitian ini, yaitu delesi pada urutan nukleotida 27055–27059 (ATTAC). Mutasi yang dominan ditemukan, yaitu C26735T pada 64 sekuens (71,9 %) dan mutasi ini ditemukan pada setiap sampel mutan.

Penelitian ini memiliki sampel yang tidak mengalami mutasi (*wild type*) berjumlah 25 sampel. Hal ini dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 2 yang

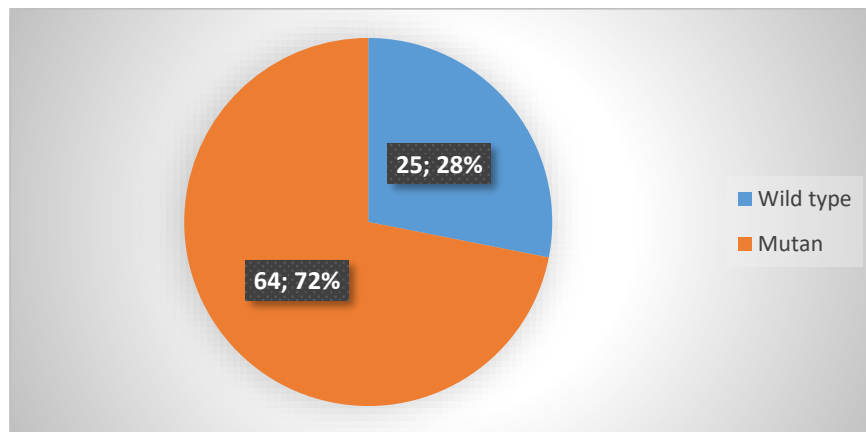
memperlihatkan proporsi *wild type* sebanyak 28% dan mutan sebanyak 72%.

Tabel 2. Variasi gen M SARS-CoV-2

Jenis mutasi	Posisi	n	(%)
SNPs A/T	26528	1	1,12
SNPs C/T	26735	64	71,9
SNPs G/T	26763	1	1,12
SNPs A/G	26867	1	1,12
SNPs C/T	26895	1	1,12
SNPs G/T	26951	2	2,24
SNPs A/G	27019	2	2,24
SNPs G/T	27088	1	1,12
DelATTAC	27055–27059	2	2,24

Variasi yang terjadi pada titik A26528T, C26735T, G26763T, A26867G, C26895T, G26951T, A27019G dan G27088T merupakan mutasi tipe *synonymous*. Mutasi *synonymous* merupakan mutasi yang tidak mengakibatkan perubahan asam amino pada protein yang disandikan.²² Setiap sampel ditemukan 1 hingga 3 titik mutasi.

Substitusi merupakan jenis mutasi yang paling banyak ditemukan pada penelitian ini. Koyama meneliti 10.022 sampel yang menunjukkan hasil yang sama, yaitu ditemukan substitusi pada 95% sampel dan 5% berupa delesi.²³ Sejalan dengan penelitian Zekri yang menemukan mutasi substitusi sebesar 91% dan delesi 9%.²⁴ Penyebab mutasi substitusi paling banyak ditemukan masih belum dapat dijelaskan.



Gambar 2. Proporsi *wild type* dan mutan gen M SARS-CoV-2

Titik mutasi yang paling banyak ditemukan adalah SNPs C26735T yang terjadi pada 64 (71,9 %) sekuens. Posisi basa 26735 terjadi perubahan basa sitosin (C) menjadi timin (T). Penemuan mutasi C26735T di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Gunadi yang menemukan mutasi tersebut pada 3 dari 4 sampel penelitian di Yogyakarta.²⁵ Hoq meneliti sekuens lengkap genom SARS-CoV-2 dari seorang pasien Covid-19 di daerah Khagrachari Bangladesh.¹⁸ Mereka menemukan mutasi C26735T pada sekuens gen M SARS-CoV-2. Joshi juga menemukan mutasi C26735T pada 277 sekuens dari 502 sekuens di Gujarat India.¹⁹ Penemuan Hoq dan Joshi sejalan dengan penelitian ini. Mutasi C26735T juga ditemukan di Algeria dan Myanmar.^{26,27} Hal ini menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 yang tersebar di Indonesia, Bangladesh, India, Algeria dan Myanmar sudah mengalami mutasi C26735T. Tidak tertutup kemungkinan virus dengan mutasi tersebut juga dapat ditemukan di negara lain. Transmisi ini diduga berkaitan dengan lalu lintas internasional sehingga SARS-

CoV-2 dengan mutasi tersebut dapat ditemukan di berbagai negara.

Semua studi yang menemukan mutasi C26735T memberikan informasi bahwa sampel-sampel tersebut tersebut masuk ke dalam varian GH. Berdasarkan *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) varian GH memiliki mutasi pada gen ORF3a: Q57H, gen NSP12b: P314L dan gen S: D614G.²⁸ Hal yang sama ditemukan pada penelitian ini adalah mutasi pada gen S: D614G yang terdapat pada 86 sampel namun peneliti belum dapat menentukan apakah sampel tersebut masuk ke dalam varian GH seperti yang ditemukan pada studi sebelumnya.

Peneliti paling banyak menemukan mutasi C26735T. Berbeda dengan penemuan Kim yang meneliti 4.254 sekuens lengkap genom SARS-CoV-2 yang diunduh dari GISAID. Mereka menemukan pada gen M terdapat 28 titik mutasi tipe *synonymous* pada 147 sekuens dan 21 titik mutasi tipe *nonsynonymous* pada 251 sekuens. Mutasi terbanyak yang terjadi, yaitu T175M dan D3G.²⁹ Sejalan dengan penemuan ini, Troyano-Hernaez meneliti

103.419 sekuens gen M dari 117 negara yang diproses dari sekuens lengkap yang diunduh dari GISAID. Mereka menemukan mutasi terbanyak yang terjadi pada gen M adalah T175M dan D3G. Mutasi T175M terbanyak ditemukan di Eropa, sedangkan mutasi D3G terbanyak ditemukan di Afrika dan Amerika Selatan. Mutasi terbanyak pada penelitian tersebut menunjukkan terjadinya perubahan asam amino yang diekspresikan sehingga mengakibatkan perubahan struktur protein M. Mutasi T175M menunjukkan perubahan *threonine* menjadi *methionine* pada urutan asam amino ke-175 protein M. Mutasi D3G merupakan perubahan *aspartic acid* menjadi *glycine* pada urutan asam amino ke-3 protein M.^{29,30}

Koyama meneliti 10.022 sekuens lengkap genom SARS-CoV-2 dari 68 negara yang diunduh dari berbagai database online. Mereka menemukan 53 titik mutasi *missense* dan 71 titik mutasi *synonymous* pada sekuens gen M SARS-CoV-2. Mutasi *missense* terbanyak berupa mutasi C27046T (T175M) ditemukan pada 221 sekuens. Mutasi *synonymous* terbanyak berupa mutasi T26729C ditemukan pada 106 sekuens.²³

Nguyen meneliti 6.324 sekuens lengkap genom SARS-CoV-2 dari 45 negara diunduh dari NCBI GenBank. Mereka menemukan mutasi substitusi tipe *nonsynonymous* sebanyak 37 titik, di antaranya adalah A2S (5 sekuens), D3G (20 sekuens), V70F (13 sekuens), V70I (9 sekuens), R146H (8 sekuens) dan T175M (18 sekuens). Mutasi T175M dan D3G merupakan mutasi terbanyak yang

ditemukan pada gen M oleh Nguyen. Mutasi D3G ditemukan pada sekuens yang berasal dari USA dan Cina, sedangkan mutasi T175M ditemukan pada sekuens yang berasal dari USA, Australia, Republik Czech, Rusia, Hongkong, Jerman dan Perancis.³¹

Beberapa penelitian tersebut sama-sama menemukan mutasi *missense* terbanyak berupa mutasi D3G dan T175M. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi T175M dan D3G pada SARS-CoV-2 sudah tersebar di berbagai negara di dunia. Peneliti tidak menemukan mutasi tersebut dari sampel yang telah diteliti. Hal ini diduga karena perbedaan referensi, virus dengan mutasi tersebut belum menyebar ke Indonesia atau tidak dapat bertahan di Indonesia atau mungkin terdapat pada sampel lain yang tidak termasuk dalam penelitian ini.

Peneliti belum menemukan laporan sebelumnya terkait mutasi A26528T, G26763T, C26895T, G26951T, A27019G dan G27088T sehingga memungkinkan ini merupakan mutasi substitusi pada gen M SARS-CoV-2 yang pertama kali diidentifikasi. Sementara itu penemuan mutasi A26867G pertama kali dilaporkan oleh Gunadi pada 2 dari 4 sampel penelitian. Sampel diambil pada bulan Juni-Agustus 2020 di Yogyakarta.²⁵ Sampel penelitian dengan mutasi A26867G berasal dari Sumatera Barat dan masuk pada Desember 2020. Hal ini menimbulkan dugaan kemungkinan SARS-CoV-2 menyebar dari Yogyakarta ke Sumatera Barat.

Terdapat satu jenis mutasi delesi pada penelitian ini, yaitu delesi pada

urutan nukleotida 27055–27059 (ATTAC). Peneliti belum menemukan laporan sebelumnya terkait mutasi del27055-27059 sehingga memungkinkan ini merupakan mutasi delesi pada gen M SARS-CoV-2 yang pertama kali diidentifikasi. Mutasi ini merupakan mutasi *frameshift* yang mengakibatkan pengurangan panjang sekuens gen M. Sekuens dengan mutasi ini memiliki panjang gen M 664 bp karena kehilangan 5 basa nukleotida (ATTAC). Mutasi *frameshift* adalah penyisipan atau penghapusan satu atau sejumlah kecil pasangan basa yang mengubah pembacaan kodon.³² Hasil mutasi *frameshift* adalah perubahan lengkap dari urutan asam amino polipeptida. Polipeptida yang dihasilkan dapat memendek atau panjangnya tidak normal dan kemungkinan besar tidak akan berfungsi.³³

Penemuan mutasi gen M yang mengekspresikan protein M SARS-CoV-2 dapat menjadi landasan dalam pembuatan vaksin. Salah satu pengembang vaksin SARS-CoV-2 perusahaan OncoGen telah

mengusulkan kandidat vaksin peptida panjang sintetis yang menargetkan protein S dan M dari SARS-CoV-2.¹³ Vaksin berbasis protein M ternyata dapat menginduksi titer respons antibodi yang tinggi pada hewan yang diimunisasi.¹⁴

SIMPULAN

Jenis mutasi gen M SARS-CoV-2 yang ditemukan pada sekuens sampel penelitian, yaitu SNPs A26528T, C26735T, G26763T, A26867G, C26895T, G26951T, A27019G, G27088T serta del27055–27059 (ATTAC). Mutasi C26735T merupakan mutasi *synonymous* yang paling banyak ditemukan pada isolat Sumatera Barat.

DUKUNGAN FINANSIAL

Tidak ada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Tidak ada.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada.

DAFTAR PUSTAKA

1. Susilo A, Rumende CM, Pitoyo CW, Santoso WD, Yulianti M, Herikurniawan, et al. Coronavirus disease 2019: tinjauan literatur terkini. *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 2020;7(1):45–67.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y, Wang W, Song Z, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9.
3. Corona.sumbarprov. Pemprov Sumbar turut prihatin, 5 orang positif terkena wabah Covid-19 [Internet]. 2020 [cited 2020 April 10]. Available from: https://corona.sumbarprov.go.id/details/detail_master_berita/15

4. Riedel S, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, et al. *Jawetz melnick & adelbergs medical microbiology*, 28th edition. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
5. Li D, Zhang J, Li J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emerging coronavirus SARS-CoV-2. *Theranostics*. 2020;10(16):7150–62.
6. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of covid-19. *J Pharmaceut Anal*. 2020;10(2):102–8.
7. Liu J, Xing Z, Qiaoxia T, Wei L, Baoju W, Sutter K, et al. Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J Med Virol*. 2020;92(5):491–4.
8. Yuliana Y. Corona virus diseases (covid-19): sebuah tinjauan literatur. *Wel Heal Mag*. 2020;2(1):187–92.
9. Zang R, Castro MFG, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol*. 2020;5(47):eabc3582.
10. Zheng Y, Zhuang M, Han L, Zhang J, Nan M, Zhan P, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Sig Transduct Targ Ther*. 2020;5(299):1–13.
11. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution. pathogenesis and therapies: structural genomics approach. *BBA - Mol Bas Dis*. 2020;1866(10):1–16.
12. Lopandic Z, Protic-Rosic I, Todorovic A, Glamoclija S, Gnjatovic M, Cujic D, et al. IgM and IgG immunoreactivity of SARS-CoV-2 recombinant M protein. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9):4951.
13. Malik JA, Mulla AH, Farooqi T, Potto FH, Anwar S, Rengasamy KRR. Targets and strategies for vaccine development against SARS-CoV-2. *Biomed Pharmacother*. 2021;137:111254.
14. Yen-Der L, Wei-Yu C, Jun-Han S, Ferrall L, Chien-Fu H, Wu TC. Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to covid-19. *J Biomed Sci*. 2020;27(104):1–23.
15. Lu R, Xiang Z, Juan L, Peihua N, Bo Y, Honglong W, et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;395(10224):565–74.
16. Walls AC, Young-Jun P, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, function, and

- antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281–92.
17. Roy C, Mandal SM, Mondal SK, Mukherjee S, Mapder T, Ghosh W, et al. Trends of mutation accumulation across global SARS-CoV-2 genomes: implications for the evolution of the novel coronavirus. *Genom*. 2020;112(6):5331–42.
 18. Hoq MI, Bhuiyan RH, Rahman MKR, Hossen I, Rudra S, Hossain MA, et al. Genome sequence of a SARS-CoV-2 strain from a covid-19 clinical sample from the Khagrachari District of Bangladesh. *Microbiol Resour Announc*. 2021;10(13):e00189–21.
 19. Joshi M, Puvar A, Kumar D, Ansari A, Pandya M, Raval J, et al. Genomic variations in SARS-CoV-2 genomes from Gujarat: underlying role of variants in disease epidemiology. *Front Genet*. 2021;12(586569):1–13.
 20. Monleau M, Montavon C, Laurent C, Segondy M, Montes B, Delaporte E, et al. Evaluation of different RNA extraction methods and storage conditions of dried plasma or blood spots for human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance testing. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1107–18.
 21. Liu X, Harada S. RNA Isolation from mammalian samples. *Curr Prot Mol Bio*. 2013;4.16.1–4.16.10.
 22. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12:683–91.
 23. Koyama T, Platt D, Parida L. Variant analysis of SARS-CoV-2 genomes. *Bull World Health Organ*. 2020;98(7):495–504.
 24. Zekri ARN, Easa Amer K, Hafez MM, Hassan ZK, Ahmed OS, Soliman HK, et al. Genomic characterization of SARSCoV-2 in Egypt. *J Adv Res [Internet]*. 2021 May;30:123–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.11.012>
 25. Gunadi, Wibawa H, Marcellus, Hakim MS, Daniwijaya EW, Rizki LP, et al. Full-length genome characterization and phylogenetic analysis of SAR-CoV-2 virus strains from Yogyakarta and Central Java, Indonesia. *Peer J*. 2020;8:e10575.
 26. Zeghib S, Somogyi BA, Zana B, Kemenesi G, Herczeg R, Derrar F, et al. The Algerian chapter of SARS-CoV-2 pandemic: an evolutionary, genetic, and epidemiological prospect. *Vir*. 2021;13(8):1–20.
 27. Nyunt MH, Soe HO, Aye KT, Aung WW, Kyaw YY, Kyaw AK, et al. Surge of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infections linked to single introduction of a virus strain in Myanmar 2020. *Sci Rep*. 2021;11(10203):1–6.
 28. Sengupta A, Hassan SS, Choudhury PP. Clade GR and clade GH isolates

- of SARS-CoV-2 in Asia show highest amount of SNPs. *Infect genet evol.* 2021;89(104724).
29. 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 Health and Res Perspect.* 2020;11(3):101–111.
30. Troyano-Hernaez P, Reinoso R, Holguin A. 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. *Vir.* 2021;13(2):243.
31. Nguyen TT, Pathirana PN, Nguyen T, Nguyen QVH, Bhatti A, Nguyen DC, et al. Genomic mutations and changes in protein secondary structure and solvent accessibility of SARS-CoV-2 (covid-19 virus). *Sci Rep.* 2021;11(3487):1–16.
32. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gan A, Levine M, Losick R. The genetic code. In: *Molecular biology of the gene*. Seventh edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2014. p. 583.
33. Nature. Frameshift mutation / frame-shift mutation; frameshift [Internet]. 2014 [cited 2021 September 20]. Available from: <https://www.nature.com/scitable/definition/frameshift-mutation-frame-shift-mutation-frameshift-203/>