



SEROLOGIC TESTING OF US BLOOD DONATIONS TO IDENTIFY SARS-COV-2 REACTIVE ANTIBODIES: DECEMBER 2019- JANUARY 2020

ARALIK 2019- OCAK 2020 TARİHLERİ ARASINDA ABD'DEKİ KAN BAĞIŞLARININ SARS-COV-2 AÇISINDAN SEROLOJİK OLARAK TEST EDİLMESİ

Alıntı: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33252659/>

Yazarlar: Basavaraju SV, Patton ME, Grimm K, Rasheed MAU, Lester S, Mills L, Stumpf M, Freeman B, Tamin A, Harcourt J, Schiffer J, Semenova V, Li H, Alston B, Ategbale M, Bolcen S, Boulay D, Browning P, Cronin L, David E, Desai R, Epperson M, Gorantla Y, Jia T, Maniatis P, Moss K, Ortiz K, Park SH, Patel P, Qin Y, Steward-Clark E, Tatum H, Vogan A, Zellner B, Drobeniuc J, Sapiano MRP, Havers F, Reed C, Gerber S, Thornburg NJ, and Stramer SL

Özetleyen: Dr. Şeyda YALÇINBAYIR

GİRİŞ:

Kullanılan simülasyon modellerinin COVID-19 vaka yükünü, verilecek sağlık hizmetini ve ölümleri doğru tahmin edebilmesi için, patojenin popülasyona giriş tarihinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi gereklidir. SARS-CoV-2'nin topluma tam olarak giriş zamanını belirlemek için klinik solunum yolu örneklerinin geriye dönük olarak moleküler incelenmesi, nükleik asit testi (NAT) ve bazı durumlarda filogenetik analizler gibi stratejiler geliştirilmiştir. Erken filogenetik analizler, SARS-CoV-2'nin Ekim-Aralık 2019 arasında ortaya çıktığını düşündürmektedir. Çin'den sonraki ilk vakanın Tayland'da çıktığı kaydedilmiş olsa da 27 Aralık 2019 da Fransa'da hastanede yatan bir hastanın solunum yolu örneklerinden geriye dönük olarak yapılan moleküler testlerde SARS-CoV-2 gösterilmiştir. Benzer şekilde Seattle, Washington bölgesinde 18 Ocak- 9 Şubat 2020 tarihleri arasındaki arşivlenmiş solunum yolu örneklerinden geriye dönük yapılan moleküler testlerde de SARS-CoV-2 gösterilmiştir.

Serolojik testler daha önce, HIV'de olduğu gibi viral enfeksiyonların topluma giriş zamanını belirlemek için kullanılmıştır. Geriye dönük yapılacak serolojik testler, solunum yolu örneklerinden yapılan moleküler test sonuçlarını güçlendirebilir. Bu çalışma, serolojik testlerle SARS-CoV-2 virüsünün ABD'ne giriş zamanını belirleyebilmek için planlanmış olup; 13.12.2019- 17.01.2020 tarihleri arasında Amerikan Kızıl Haç Kurumu tarafından kabul edilen kan bağışlarına ait şahit numunelerde SARS-CoV-2 reaktif antikorlarının serolojik çalışılması yoluyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Amerikan Kızıl Haç Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. ABD'deki gönüllülerden mobil ve yerleşik bağış yerlerinden kan toplanmaktadır. Şubat 2020'ye kadar normal sorgulamaya ek olarak SARS-CoV-2 açısından kan bağışçılarının Çin'e seyahat öyküsü irdelenmemiştir. Bağış öncesi bağışçıların tüm değerlendirmeleri yapılmış, bağışçı serumları FDA'nın belirlediği kurallar gereğince enfeksiyöz belirteçler açısından test edilmiş ve sonrasında transfüzyon ilişkili enfeksiyonların açısından "şahit numune" leri dondurulmuş ve arşivlenmiştir.

Çalışma kapsamında 7.389 bağışın şahit numuneleri kullanılmıştır. Bağışçı numuneleri 13 Aralık 2019 ve 17 Ocak 2020 tarihleri arasında ABD'deki 9 eyaletten (California, Connecticut, Iowa, Massachusetts, Michigan, Oregon, Rhode Island, Washington ve Wisconsin) toplanmış ve Atlanta'daki CDC merkezine gönderilmiştir.

CDC' ye ulaşan örneklerde öncelikle pan-Ig ELISA yöntemi ile S1 ve S2 domainlerini içeren spike proteini (S) taranmıştır. ELISA tekniğinde 1/100 dilüsyonda çalışılan numunelerin optik dansitesi (OD) 0,5 veya daha üstünde olanlar **ilk reaktif** numune olarak kabul edilmiştir. İlk reaktif numuneler 1/100 ve 1/400 dilüsyonda, aynı teknik kullanılarak tekrar çalışılmış ve doğrulaması yapılmıştır. Bunun sonucunda OD 0,4 de eşik oranı 1 ve üzerinde sinyal veren numuneler **doğrulanmış reaktif** olarak kabul edilmiştir. Düzeltilmiş OD nin 0,4 kabul edildiği 1/100 dilüsyonda, testin spesifitesi %99,3 sensitivitesi ise %96 olarak hesaplanmıştır. PCR ile doğrulanmış, sık görülen diğer corona virüs serumları da bu teknikle çalışılmış; 42 numunenin sadece 4 tanesi akut ve iyileşme dönemlerinde sinyal vermesine karşın, verdikleri sinyaller cut-off değerinin altında kalmıştır.

Doğrulanmış reaktif numunelere sonrasında canlı SARS-CoV-2USA-WA1/2020 ile mikronötralizasyon testi, SARS-CoV-1 S1 pan Ig ELISA (Ortho Clinical Diagnostic, Raritan NJ) testi ve serumun S reseptör bağlanma proteini (RBD) ile hücresel ACE2 reseptörü arasındaki bağlanmayı bloke etme kapasitesini ölçen surrogate nötralizasyon testi uygulanmıştır.

Mikronötralizasyon testi için, serumlar 1/20 ve 1/640 arasında her defasında ikiye katlanacak şekilde dilüe edilmiş ve virüsle 37 °C de 30 dakika inkübe edildikten sonra VeroCCL-81'e inoküle edilmiştir. 5 günlük inkübasyondan sonra canlı ve ölü hücreleri gözlemleyebilmek için formalin-kristal viyole ile fikse edilmiş ve boyanmıştır. Viral enfeksiyonun inhibe edildiği en yüksek serum dilüsyonu nötralizasyon titresi olarak belirlenmiş ve bu titrenin 1/40'dan büyük olması pozitif olarak kabul edilmiştir. SARS-CoV-1 S1 pan Ig ELISA ve surrogate nötralizasyon testi firmaların belirttiği prosedürler doğrultusunda yapılmıştır.

Bu çalışmanın istatistiksel analizi, bağışların bölgesi, tarihi ve bağışçıların yaşı ve cinsiyeti kullanılarak SAS versiyon 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) programı ile yapılmıştır.

SONUÇLAR

Çalışmada, CDC' ye Anti-SARS-CoV-2 testi için gönderilen 7.389 şahit numunenin 106 tanesinde pan-Ig S ELISA ile doğrulanmış pozitiflik tespit edilmiştir. Testin doğrulanması sırasında, 519 gerçek negatif serumdan 3'ü sinyalin üzerinde reaktivitelere sahipti. Bu gerçek negatif serumlar (n = 377), sağlıklı bireylerden, hanta virüsü hastalarından (n = 101), HIV pozitif bireylerden (n = 10), hepatit B pozitif bireylerden (n = 10) ve hepatit C pozitif bireylerden (n = 10) toplanmıştır. Gerçek pozitif 99 adet serum PCR ile doğrulanmış semptomatik COVID-19 hastalarından elde edilmiş ve bunların sinyal değerleri (0.11-6.99) ortalama 6,10 olarak hesaplanmıştır.

106 doğrulanmış reaktif serumdan 67'si, 1.0 ile 2.11 arasında eşik cut-off'unun üzerinde sinyal veren gerçek negatif serumlarla aynı aralıkta bulunmuştur. Buna rağmen 106 doğrulanmış reaktif numunenin 32 tanesinin cut-off' ları 2,12-4,08 ve 4 tanesinin de >4,30 olarak gerçek negatif numunelerin cut-off limitlerinin üzerinde bulunmuştur.

106 doğrulanmış reaktif numunenin 90 tanesine izotip- spesifik spike protein ELISA testleri, Ortho pan-Ig S1 testi, mikronötralizasyon testi ve surrogate nötralizasyon testi yapılabilmıştır. Mikronötralizasyon testinde 90 serumun 84'ünde son titre >40 bulunmuştur. Anti-spike protein izotip cevabında, 90 numunenin 39 unda (%43,3) S-reaktive hem IgG hem de IgM pozitif, 8'inde IgM pozitif, 29 unda IgG pozitif ve kalan 14'ünde pan IgG ile test edildiğinde pozitif sonuç alınmıştır. Ortho S1 pan Ig testiyle sadece tek bir serum 1.89 eşik cut-off da sinyal vermiştir. Ve son olarak surrogate nötralizasyon ile 21 serumda %20-30, 1 serumda %45 ve 1 serumda %71 inhibisyon gösterilmiştir. Tüm test sonuçları her bir numune ile karşılaştırıldığında, numuneler arasında testlerde pozitiflik oluşması yönünde belli bir patern gösterilememiş, her bir bağış numunesinin kendine özgü test sonuçları olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, potansiyel reaktif numunelerle, SARS-CoV-2 enfekte kişilerin numuneleri arasında net bir şemanın kurulamayacağını gösteriyor olabilir.

Tekrarlayan reaktivitede bağışçıların ortalama yaşı 52 olarak bulunmuştur. Çalışmanın tarih aralığında erkek bağışçı sayısı (ortalama %54,35) kadın bağışçı sayısından fazlalık göstermiş ve yine çalışmada erkek bağışçılardaki reaktiflik oranı ortalama %1.85 iken kadın bağışçılarda ortalama %1.05 olarak bulunmuştur. Çalışmadaki 13-16 Aralık 2019 tarihlerinde California,

Washington ve Oregon eyaletlerinde reaktivitenin çoğunlukla 40 yaş üstü bağışçılarda bulunduğu gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışma sonucunda, 13-16 Aralık 2019 tarihlerinde başlıca California, Washington ve Oregon eyaletlerinde olmak üzere, 106 serum örneğinde SARS-CoV-2 reaktif antikorlarının tespit edildiği gösterilmiştir. Bu pozitiflik ABD'nin batı kısımlarında resmi olarak belirtilen pozitiflik tarihinden önce SARS-CoV-2 enfeksiyonu bulunduğunu ya da popülasyonun az bir kısmında daha önce bulunan bir antikorun SARS-CoV-2 S'e bağlanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde Connecticut, Iowa, Massachusetts, Michigan, Rhode Island ve Wisconsin'de de 2020 Ocak ayının başlarında SARS-CoV-2 reaktif antikorları tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun resmi olarak açıklanan 19 Ocak 2020 tarihinden önce de ABD'nde bulunup bulunmadığını sorgulatmaktadır.

COVID-19 epidemisinin görülmesiyle, bu enfeksiyonun daha önceden geçirilip geçirilmediğini tespit etmek amacıyla SARS-CoV-2'ye yönelik pek çok serolojik test geliştirilmiştir. Yakın zamandaki bir çalışmada, serum SARS-CoV-2 antikorları ile özellikle OC43 olmak üzere sık görülen insan corona virüslerinin az bir kısmında ELISA testlerinde cross-reaktivite ve yine bu diğer corona virüsleri ile daha önceden enfekte olmuş kişilerin serumlarıyla SARS-CoV-2'nin özellikle S proteininin S2 kısmına karşı nötralizan aktivite gösterilmiştir.

Yakalama antijeni olarak SARS-CoV-2 spike proteinini içeren pan-Ig ELISA testlerinde reaktif örnekleri daha iyi karakterize etmek ve bunları çapraz reaktiviteden yaygın koronavirüsleri ayırmak için daha spesifik SARS-CoV-2 testi yapılmıştır. Serolojik testlerde antijen olarak S1 proteinin tüm S proteinine göre daha spesifik olduğu gösterilmiştir. Yine yakın zamanda yapılan çalışmalarda COVID-19 geçirdiği doğrulanan hastaların serumlarının sadece SARS-CoV-2 S- spesifik IgG antikorları içerdiği, IgM ve IgA içermediği; bu serumlardaki nötralizan aktivitenin spike proteinin sadece S2 kısmına karşı olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten IgM ve IgA antikorlarının bulunması ve S1 spesifik bağlanma aktivitesi SARS-CoV-2 antikorlarını diğer corona virüs antikorlarından ayırt etmeye yardımcı olabilir.

Bu çalışmada 90 reaktif serumun 84 ü (%93) SARS-CoV-2 virüsa karşı nötralizan aktivite, 39 (%44,3) serumda hem IgG hem de IgM SARS-CoV-2 S spesifik antikorları, 2 (%2,2) serumda surrogate nötralizan aktivite ve 1 (%1,1) serumda da SARS-CoV-2 S1 spesifik Ig gösterilmiştir.

Toplu olarak bu veriler, reaktif kan bağışçı serumlarının en azından bir kısmının önceki SARS-CoV-2 enfeksiyonundan kaynaklanabileceğini göstermektedir. Connecticut'ta 10 Ocak 2020'de toplanan bir serum, 320 nötrleştirme titresi, 6,75 sinyal eşik oranı ve yedek nötrleştirme aktivitesi ile %70 inhibisyon aktivitesi göstermiş, ancak Ortho S1 reaktif tespit edilmemiştir. Bu veriler, bağışın muhtemelen geçmiş veya aktif SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan bir kişiden geldiğini göstermektedir.

SARS-CoV-2 dışındaki diğer insan corona virüs enfeksiyonlarıyla çapraz reaktivite olasılığından dolayı bu çalışmadaki verilerde aşağıda belirtilen kısıtlamalar bulunmaktadır.

1. Hiçbir serum "gerçek pozitif" olarak kabul edilemez. Gerçek pozitif serumlar ya pozitif moleküler testi olan kişilerden ya da akut ve iyileşme dönemlerinde toplanmış olup çift serum örneğinde titre artışı olmalıdır.
2. Bu çalışmadaki bağışlar belirtilen eyaletlerdeki tüm bağışları göstermemektedir ve bu sebepten elde edilen sonuçlar çalışma tarih aralığında yapılan tüm bağışlar için genelleştirilemez.
3. SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı bazı serumlarda saptanan antikorların toplum kökenli mi yoksa seyahat kökenli mi olduğu sonucu çıkarılamamaktadır.
4. Her ne kadar yüksek spesifitesi olan test kullanılsa da özellikle düşük prevalanslı yerlerde yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir.

Bununla birlikte, bu çalışmada tanımlanan reaktif örneklerin sayısı, pan Ig spike ELISA'nın özgüllüğü göz önüne alındığında beklenenden daha yüksektir. Ayrıca, mikro nötralizasyon, SARS-CoV-2'ye özgü IgG ve IgM'nin tespiti ve SARS-CoV-2 S1'e özgü Ig reaktivitesi gibi ek kanıtlar, tüm reaktif numunelerin yanlış pozitifleri temsil etme olasılığını çok düşük kılmaktadır. Aralık 2019'un ortalarında ABD'nde SARS-CoV-2'ye özgü antikorların varlığını öne süren mevcut bulguları daha da desteklemek için insan örneklerinin moleküler veya serolojik yöntemlerle retrospektif analizlerini içeren daha ileri çalışmalar gereklidir.

Bu çalışma aynı zamanda kan bağışlarının SARS-CoV-2 sürveyans çalışmaları için de ne kadar önemli bir kaynak olduğunu göstermektedir. CDC, ABD genelinde birden fazla bölgede SARS-CoV-2 enfeksiyonunda kan bağışları ve klinik laboratuvar örnekleri kullanarak sürekli gözetim yapmak için federal ve hükümet dışı ortaklarla birlikte çalışmaya devam etmektedir. Elde edilecek ilerlemeler, bu yeni virüsün epidemiyolojisinin anlaşılmasını pekiştirecek ve COVID-19 ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi azaltmak için gerekli müdahaleleri iyileştirecektir.