

SARS-COV-2 RNA DETECTED IN BLOOD SAMPLES FROM PATIENTS WITH COVID-19 IS NOT ASSOCIATED WITH INFECTIOUS VIRUS

COVID-19 HASTALARININ KAN ÖRNEKLERİNDE SAPTANAN SARS-COV-2 RNA, ENFEKTİF VİRÜSLE İLİŞKİLİ BULUNMADI

YAZARLAR: Monique I Andersson, Carolina V Arancibia-Cárcamo, Kathryn Auckland, J Kenneth Baillie, Eleanor Barnes, Tom Beneke, Sagidi Bibi, Miles Carroll, Derrick Crook, Kate Dingle, Christina Dold, Louise O Downs, Laura Dunn, David W Eyre, Javier Gilbert Jaramillo, Heli Harvala, Sarah Hoosdally, Samreen Ijaz, Tim James, William James, Katie Jeffery, Anita Justice, Paul Klenerman, Julian Knight¹, Michael Knight, Xu Liu, Sheila F Lumley, Philippa C Matthews, Anna L McNaughton, Alexander J Mentzer, Juthathip Mongkolsapaya, Sarah Oakley, Marta S Oliveira, Timothy Peto, Rutger J Ploeg, Jeremy Ratcliff, David J Roberts, Justine Rudkin, Gavin Screatton, Malcolm G Semple, Donal Skelley, Peter Simmonds, Nicole Stoesser, Lance Turtle, Sue Wareing, Maria Zambon

ALINTI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.21.20105486>

ÖZETLEYEN: Dr. Ufuk ŞAHBAZ

GİRİŞ

SARS-CoV-2 tanısında solunum yolu örneklerinde virüsün kendisi tespit edilemediği için PCR ile viral RNA taranmaktadır. Başka örnek tiplerinde de SARS-CoV-2 RNA saptanmıştır ancak kan örneklerinde tespit edilmesinin klinik önemi tam anlaşılamamıştır. Sağlık çalışanlarını korumak amacıyla örneklerde virüs yükünü azaltan yöntemler (kimyasal, ısı uygulamaları) süreci uzatmakta ve tetkiklerin duyarlılığını düşürmektedir. Alternatif olarak biyogüvenlik düzeyi 3 kabinler kullanılabilir ama bunlar masraflı ve özel eğitim gerektirmektedir. Bu çalışmada vRNA sıklığıyla klinik bulgular arasında bir ilişki saptamak amacıyla bir meta-analiz çalışması yapılmıştır. Ek olarak başka bir kohort çalışmasındaki kan örnekleri RT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Yine ayrıca, vRNA pozitifliğinin hücre hasarı ile ilişkisini göstermek amacıyla da bir hücre kültürü çalışması yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM:

Meta Analizde; Kanda viral RNA varlığını gösteren kanıtlar ve buna bağlı klinik semptomların tespit edilmesi için literatür taranmıştır. Kriterlere uygun 22 çalışma belirlenmiştir. Bu çalışmalarda alınan kan, plazma ve serum örneklerinde vRNA prevalansına bakılmış, vRNA sonuçlarının klinik ve laboratuvar ile uyumu incelenmiştir.

Kohort Çalışmasındaki örnekler toplam 384 kişiden alınan 429 örnektir. Örneklerin 212'si Oxford Üniversite Hastanesinden, 217'si Ulusal Kan Hizmet Biriminden alınmıştır. Oxford Üniversite Hastanesi örneklerinin;

- N=139 örnek, hastaneye yatırılmış 94 Covid-19 hastalarından alınmıştır. Örnekler hastaneye veya yoğun bakıma yatıştan 1-5 gün, semptomların ortaya çıkışından 1-37 gün içerisinde alınmıştır.
- N=41 örnek, Covid-19 geçirmiş 41 sağlık çalışanından alınmıştır. Örnekler tanı koyulup en az 7 gün işten uzak durduktan sonra alınmıştır.
- N=32 örnek, Covid-19'u geçirmiş 31 kişiden semptomların ortaya çıkışından 31-62 gün sonra alınmıştır.

İngiliz Ulusal Kan Hizmet Biriminden alınan örneklerin;

- N=212 örnek, 212 konvalesan plazma bağışçılarından, belirtilerin kaybolmasından en az 28 gün sonra alınmıştır.
- N=5 örnek, 5 sağlıklı bağışçıdan alınmıştır.

Tüm kohort çalışma örneklerinde RT-PCR yapılmış ancak protokoller hastane ve hasta gruplarında farklılıklar göstermiştir. Yüksek döngü eşikleri (<37) anlamsız kabul edilmiştir.

Hücre Kültürü; Viral hücre kültürü için 20 örnek rastgele seçilmiş, VC01 ve VC-20 arası olarak kodlanmıştır. VC01 ile VC-16 arası PCR pozitif akut ve iyileşmiş COVID-19 hastalarından alınmış, VC17 ile VC20 arası pandemi öncesi hastalardan alınmış ve kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Örnekler hücre kültürüne ekilmiştir. Ayrıca hasta örneği olmadan 2 örneğe kontrol amaçlı 1×10^8 vRNA eklenmiştir. 3 gün boyunca hücre hasarı takip edilmiş, 3 günün sonunda qRT-PCR ile vRNA elde edilmesi için örnek alınmıştır. 4. günde hücreler pasajlanmış, bir 3 gün daha beklenip hücre hasarı tekrar değerlendirilmiştir.

BULGULAR:

Meta-Analiz: RNA-emi sıklığı ile klinik bulgular arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla yapılan literatür taramasında, çalışmalarda alınan örneklerin %0-76'sı gibi çok geniş bir aralıkta RNA tespit edilmiştir. Semptomatik enfeksiyonu takip eden 28 günde kan örneklerinde vRNA prevalansı %10 bulunmuştur. Bazı çalışmalarda, kanda viral RNA varlığı ciddi enfeksiyon ile (akut klinik kötüleşme, yoğun bakım ihtiyacı) ilişkili bulunmuştur. Bir çalışmada diğer örneklere göre daha düşük RNA düzeyi saptanmış, diğer çalışmalarda ise RNA düzeyleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Küçük bir grup çalışma ise eşik döngü değeri yüksek bulunmuş ancak bu çalışmaların birbirinden farklı değerleri eşik kabul ettikleri görülmüştür.

Kohort Çalışma Örneklerinde vRNAemi Düzeyleri: Tüm gruplardan alınan örnekler göz önüne alındığında ilk 13 günde alınan örneklerin %17.6' sında, 14-27. günlerde alınan örneklerin %10'unda vRNA tespit edilmiş, 28 günden sonra alınan örneklerde vRNA tespit edilmemiştir. Dolayısıyla ilk bulgunun ortaya çıkışının üzerinden geçen zaman arttıkça vRNA pozitifliği ihtimalinin düştüğü görülmüştür. RNA pozitifliği daha şiddetli hastalık tablosuyla ilişkili bulunmuştur. PCR testlerinde, pozitif vakalardaki eşik döngü değeri yüksek bulunmuş, bu durum RNA kopyalanmasının düşük olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Kültürde Hücre Hasarı: Referans virüsle yüksek konsantrasyonda (78 ve 7.8 pfu) inoküle edilen Vero hücrelerin hepsi hücre hasarlanması belirtileri göstermişlerdir (yuvarlaklaşma ve yüzeyden/ diğer hücrelerden ayrılma). VC01 ile VC20 arası vRNA pozitif hasta plazma örnekleriyle ve düşük konsantrasyonda (0.078 pfu) referans virüsle inoküle edilen hücrelerde 4. günde tipik hücre hasarlanması gözlenmemekle birlikte farklı hücre anormallikleri ve jel oluşumu gözlenmiştir. İkinci pasajda 7. günde incelenen hücrelerde herhangi bir hücre hasarı bulgusu gözlenmemiştir.

Kültürde vRNA Pozitifliği: İnokülasyonun 3. gününde kültür süpernatantlarında vRNA değerleri incelenmiştir. Referans virüsle yüksek konsantrasyonda (78 ve 7.8 pfu) inoküle edilen hücre grubunda $\geq 10^5$, referans virüsle düşük konsantrasyonda (0.078 pfu) inoküle edilen hücre grubunda düşük seviye vRNA tespit edilmiştir. vRNA tespiti için 3 farklı test kullanılmış (CDC NP1, CDC NP2 and HKU ORF1b), bu testlerden CDC NP1 ve CDC NP2'de tüm örneklerde <100 vRNA tespit ederken, HKU IRF1b'de hiç vRNA tespit edilememiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ:

28. güne kadarki Covid-19 vakalarında düşük viral yükte RNA tespit edilmiştir. Bu pozitifliklerin çoğu da erken dönemde ve daha şiddetli vakalardadır. vRNA PCR pozitif olsa da klinik örneklerin hepsi enfektif eşiğin altında bulunmuştur.

Hem literatür hem de kohort çalışmasından elde edilen örneklerde döngü eşiğinin yüksek olması virüsün düşük sayıda kopyası olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkılarak klinikte kullanılan tetkiklerin pozitifliklerinde genom parçalarının tespit edildiği veya çoğalabilen bir virüse ait olsa bile bunların immün kompleks gibi bir mekanizmayla etkisizleştirildiği düşünülmüştür.

Solunum yolu örneklerinde viral yükün hastalık şiddetiyle ilişkili olduğu zaten bilinmektedir. Dolayısıyla ciddi vakalarda kan örneklerinde vRNA tespit edilmesi akciğerlerdeki yüksek viral yükün kana taşması, akciğer hücrelerinin yıkılmasıyla virüsün kana salınmasından kaynaklanıyor olabilir. Yüksek döngü eşiği değerleri nedeniyle şu an için kandaki virüsün tespit edilmesi spesifik bir değer taşımamaktadır.

Çalışmamız COVID-19 hastalarında örneklerin çok azında RNA tespit edilebildiğini, tespit edilenlerde de RNA miktarının çoğu laboratuvarın eşik değerinin altında kalacak kadar az olduğunu göstermiştir. RNA pozitif olan örneklerde çoğalabilen virüs tespit edilememiş, dolayısıyla bu örneklerden bulaş ihtimalinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu kanısına varılmıştır.