



HANDLING AND PROCESSING OF BLOOD SPECIMENS FROM PATIENTS WITH COVID-19 FOR SAFE STUDIES ON CELL PHENOTYPE AND CYTOKINE STORM

HÜCRE FENOTİPİ VE SİTOKİN FIRTINASI ÜZERİNE GÜVENLİ ÇALIŞMALAR İÇİN COVID-19 HASTALARINDAN KAN ÖRNEKLERİNİN KULLANILMASI VE İŞLENMESİ

ALINTI: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24009>

YAZARLAR: Andrea Cossarizza, Lara Gibellini, Sara De Biasi, Domenico Lo Tartaro, Marco Mattioli, Annamaria Paolini, Lucia Fidanza, Caterina Bellinazzi, Rebecca Borella, Ivana Castaniere, Marianna Meschiari, Marco Sita, Gianrocco Manco, Enrico Clini, Roberta Gelmini, Massimo Girardis, Giovanni Guaraldi, Cristina Mussini

ÖZETLEYEN: Dr. Ece Gül İBRİŞİM

GİRİŞ:

Çalışma, Modena Covid-19 Çalışma Grubu (MoCo19) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bir kaç yıl önce Uluslararası Sitometri Gelişim Derneği “insan örneklerini güvenli bir şekilde analiz etmek ve sınıflandırmak” için kılavuzlar yayınlamış ve bu kılavuzlar bugünlerde tekrar gözden geçirilmiştir. Bu çalışmada İtalya’da ilk hasta ortaya çıktığından beri takip ettiğimiz prosedürler tarif edilmiştir. Bu prosedürler standart prosedürlerin biraz değiştirilmiş halidir.

Modena (İtalya)'da Mart 2020 sonunda 1.500'den fazla vaka tespit edilmiş ve yaklaşık beşte biri hastaneye kaldırılmıştır. Asemptomatik olanlar, yeni tedavi alanlar, yoğun bakım gerektiren hastalar dahil hastalığın farklı aşamalardaki hastaların bağışıklık sistemi gözlemlenebilmiştir. İzlem, T helper tip 1 veya T helper tip 2 farklılaşmasını doğru tanımlamak için birkaç fonksiyonel testle ve lenfosit fenotiplendirme analizleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Covid-19 hastalarının kan örneklerinde flow sitometri uygulaması yapan ekibin ilk deneyimleri anlatılmış ve enfekte periferik kan mononükleer hücrelerinin araştırılmasında kullanılan prosedürler tarif edilmiştir.

LABORATUVAR BİYOGÜVENLİĞİ

Risk değerlendirmesi: Güvenlik risklerini ele almak için yerel bir risk değerlendirmesi yapılmıştır. Riskler tanımlanmış, karakterize edilmiş ve bu doğrultuda hafifletici önlemler alınmıştır. Kullanılan yerler, prosedürler ve ekipman dahil tüm laboratuvar süreçleri tartışılmış ve tanımlanmıştır. Laboratuvar çalışanı olmayan ancak aynı alanda çalışan personele, güvenlik prosedürlerine nasıl uyulacağına açıklanması ve güvence verilmesi gerekmektedir.

Solunum örnekleri, dışkı, kan, idrar gibi farklı numunelerde SARS-CoV-2 RNA varlığı RT-PCR ile araştırılmıştır. Kan örneklerinin küçük bir yüzdesinde (% 1) viral RNA tespit edilmiştir. Bildirilen ortalama PCR döngüsü eşik değeri 34.6 (aralık: 34.1-35.4,% 95 güven aralığı [CI]: 0.0-36.4)'dır, bu da kanda düşük konsantrasyonda viral RNA bulunduğunu düşündürmektedir. Prensipite, bir sıvıda viral RNA bulunması, RNA'nın enfektif olduğu ya da olmadığı anlamı taşımaz. Kandaki enfektif SARS-CoV-2 partiküllerinin saptanması veya plazmada mevcut olan viral RNA'nın gerçek anlamı hakkında şu anda hiçbir kesin bilgi mevcut değildir. Enfeksiyon öncelikle doğrudan temas yoluyla veya enfekte olmuş kişilerden öksürme ve hapşırma yoluyla yayılan damlacıklar yoluyla ortaya çıkmaktadır. Laboratuvar enfeksiyonları ile ilgili herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Ancak, yakın tarihli bir çalışma, asemptomatik bir hastadan gelen burun ve boğaz çubuklarındaki viral yükün, semptomatik hastalarinkiyle benzer olduğunu ve asemptomatik enfekte kişilerin aynı enfektiviteye sahip virüsü bulaştırabildiğini bildirmektedir. Yine SARS-CoV-2'nin stabilitesini ve bulaşıcılığını, aerosollerde saatlerce, yüzeylerde ise günlerce sürdürebildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla yüzeylerin hipoklorit ve etanol ile doğru bir şekilde temizlenmesi gerekmektedir.

Laboratuvarda çalışmalar sırasında eğer bireyler birbirine yakınlarsa veya aynı odada birden fazla kişi varsa, herkes her zaman basit bir cerrahi maske (FFP2 maske olmamalı) takmalıdır.

Laboratuvar Çalışma Alanları: Covid-19 hastalarından alınan kan örneklerinin her türlü eldesi, işlenmesi ve test edilmesi, daha önce teknik ve güvenlik prosedürleri konusunda eğitilmiş yetkili personel tarafından uygun şekilde donatılmış laboratuvarlarda gerçekleştirilmelidir. Laboratuvar biyogüvenliği ile ilgili ulusal kılavuzlara uyulmalıdır ve genel bilgiler Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Laboratuvar Biyogüvenlik Kılavuzu'nda da mevcuttur. Modena'da, Covid-19 hastalarından alınan kan örnekleri Biyolojik Güvenlik Seviye 2 (TYD) laboratuvarda Class II biyolojik güvenlik kabinleri (BSC)'de işlenmektedir. Bu kabinler günlük olarak kirlenmiş biyolojik materyalin atıldığı dahili bir atık sistemi ile (% 0.5 çamaşır suyu içerir) donatılmıştır.

Tüm Laboratuvar çalışanları kişisel koruyucu ekipman giymelidir. Laboratuvar alanında çalışırken, personelin istenmeyen damlacıkların yayılmasını önlemek için gerekli olan tek kullanımlık eldiven, laboratuvar önlüğü ve cerrahi maske takması gerekir. Bu önlem, bir araştırmacının asemptomatik olarak enfekte olması durumunda enfeksiyonun yayılmasını önlemek için de önemlidir. Laboratuvar giysileri laboratuvarda muhafaza edilir ve asla dışarıda kullanılmamalıdır.

Devam eden tüm deneyler sırasında laboratuvar kapıları kapalı tutulur. Laboratuvar içindeki insanlar arasında en az 1 metrelik bir mesafe bulunmalıdır. Mümkünse her odada yalnızca bir kişi bulunmalı, bu mümkün değilse, aynı cihazda iki kişi çalışmamalıdır.

COVID-19 Hastalarından Kan, Analiz ve PBMC'lerin Yönetimi

Paketleme ve Taşıma: Doğrulanmış COVID-19 vakalarından, koruyucu önlemlerini almış eğitimli kişilerce hasta yatağında alınmış kan numuneleri, UN3373, “Biyolojik Madde, kategori B” olarak laboratuvarlara ve laboratuvarlar arasında taşınır ve kırılma ihtimalini en aza indirmek için iki tane ikincil kaba yerleştirilir. Kapların açılması ise, istenmeyen bir numune salımına maruz kalma riskini azaltacak şekilde sertifikalı bir Sınıf II BSC içinde gerçekleştirilir.

Kullanım ve İşleme: Sınıf II BSC'de numune çalışılmasında, personel iki çift tek kullanımlık eldiven, laboratuvar önlüğü, cerrahi maske ve göz koruması kullanır. İki çift eldiven kullanılması zorunludur. Böylece BSC'deki çalışmalarda, işlemin sonunda, dış eldiven tabakası çıkarılır ve BSC'nin içindeki atığa atılır. FFP-2 maskeleri hücre sınıflandırması veya canlı hücrelerin uyarılması/aktivasyonu dahil belirli prosedürler sırasında personelin korunması için kullanılır. Bu prosedürlerin tek başına uygulanması daha uygun olduğu için bu tür maske kullanılabilir.

WHO Laboratuvarı Biyogüvenlik Kılavuzuna göre, aerosol/damlacık (örn. Vorteksleme, karıştırma, sonikasyon veya santrifüjleme) üretme olasılığı yüksek olan prosedürler için sertifikalı bir Sınıf II Tip A1 veya A2 BSC kullanılmalıdır. Periferik kandan PBMC'lerin izolasyonu işlemi sırasında, santrifüjleme aşamaları nedeniyle aerosol/damlacık oluşturma riski yüksektir. Bu nedenle santrifüj kovaları santrifüjleme için kapatılır ve örnekler Sınıf II BSC'ye yüklenen kapalı polipropilen tüplerde santrifüjlenir. Ek önlem olarak, prosedürün her adımı, istenmeyen bir örnek salınımının engellenmesi için Sınıf II BSC'de gerçekleştirilir. Sadece tek kullanımlık plastik malzemeler ve pipetler kullanılır ve dahili atık sisteminde dekontamine edilerek atılırlar. İş bittikten sonra, iç atık kapatılır ve bir biyogüvenlik atığına atılır. Yüzeyler % 0.5 ağartıcı ve daha sonra % 70 etanol ile dekontamine edilir.

Fenotip Analizi için PBMC'lerin Kullanımı: Şimdiye kadar, SARSCoV-2'nin PBMC'leri enfekte etme kabiliyeti hakkında veri mevcut değildir. Eğer SARS-CoV-2 diğer solunum yolu virüsleri gibi davranıyorsa, Covid-19 hastalarından alınan kan enfektif partiküller içermemelidir. Yine de, plazmanın ve kandan elde edilen mononükleer hücrelerin bulaşıcı enfeksiyöz ajanlar içerebileceği hesaba katılarak, standart önlemlere uyulmalı, bu örnekler Sınıf II BSC' de işleme koyulmalıdır.

Bildiğimiz gibi, hücre fenotipinin akış sitometrisiyle analizi için örnek hazırlama; PMBC'lerin izolasyonunu, monoklonal antikolarla (mAb) boyanmasını, kısa bir süre inkübasyonu, yıkamayı ve fiksasyonu içerir. Daha sonra, fikse edilmiş örnekler, kilitli bir BLS-2 odasında bulunan bir alet kullanılarak alınır. Numune hazırlamada yer alan personel, PBMC numunelerini bir sınıf II BSC'de işler ve laboratuvar önlüğü, eldiven, cerrahi maske ve göz koruması kullanır.

Bunlara ek önlem olarak, gerekli olmasa bile, numune alımında yer alanlar cerrahi maske yerine FFP2 bile takabilirler. Kullanımdan sonra, akış sitometresi % 0.5 ağartıcı ile 15 dakika, temizleme çözeltisi ile 15 dakika ve son olarak deiyonize su ile 15 dakika yıkanır. Kullanımın sonunda, tüm çalışma alanı dezenfektan çözelti (hacmen 1/10 seyreltilmiş 0.71 M sodyum hipoklorit, sonra %70 etanol) kullanılarak temizlenir. Tek kullanımlık malzemeler (toplama tüpleri, eldivenler, pipetler, uçlar) hipokloritli uygun biyolojik tehlike konteynırlarına atılır ve tüm çalışma yüzeyleri silinir.

Enfeksiyöz materyale potansiyel bir maruziyet veya herhangi bir kaza, değerlendirilmek üzere derhal laboratuvar sorumlusuna bildirilmelidir. Çalışma alanlarında yeme, içme, sigara içme, kontakt lens kullanımı, kozmetik uygulama, telefonla oynama veya sosyal medyada sohbet etme gibi aktiviteler yasaktır. Tablo 1'de, ana kişisel koruyucu ekipman ve kolektif koruma cihazları özetlenmiştir.

SİTOKİN FIRTINASINDAN SORUMLU HÜCRELERİN TESPİTİ

Kısa süreli uyarım, Covid-19 ile mücadelede artık çok önemli bir öneme sahiptir. Gerçekten de, bazı raporlar, SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hastalarda bakteriyel sepsistekine benzer şekilde, "sitokin fırtınası" olarak tanımlanan plazmada anormal derecede artmış sitokin düzeyleri oluştuğunu göstermiştir. Bu durum iltihaplanmanın hem nedeni hem de sonucudur. İnterlökin (IL)-1, tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa ve özellikle IL-6 gibi moleküller çeşitli hücreler tarafından güçlü bir şekilde üretilir. Çoğu hastanın enfeksiyonu asemptomatik geçirmesinden yola çıkılarak her hastada bu durumun gerçekleşmediği söylenebilir. İlginç bir şekilde, çocukların ve hamile kadınların tamamen asemptomatik olmasa da genellikle hafif bir Covid-19 formu geçirdikleri bilinmektedir. Bu kişilerde, T helper tip 2 aktivitesi ile IL-4 ve IL-10 gibi sitokinlerin üretimi ile karakterize bağışıklık tepkisi oluşur. Normalde yukarıda adı geçen enflamatuar sitokinlerin üretimi, T helper tip 1 hücrelerinin bir özelliğidir. Bu nedenle, bağışıklık hücrelerinin TH1 veya TH2 tip sitokinleri üretme yeteneklerine göre incelenmesi COVID-19 hastalarının tedavisinde faydalı olabilir. Bu in vitro analiz, PBMC'lerin izolasyonuna, farklı uyarımlarla (yani miristat asetat plus iyonimisin, peptid havuzları ve Staphylococcus aureus enterotoksinler gibi anti-CD3/CD28 süperantijenleri) uyarılmalarına ve hücre içi sitokinlerin kantitatif ölçümüne dayanır.

Son haftalarda grup çalışmamızda bu tahlil CD4+ ve CD8+ T hücrelerini incelemek için yaygın olarak kullanılmıştır. İzlediğimiz prosedürler; PBMC'lerin %5 CO₂ ile nemlendirilmiş bir atmosferde 37°C'lik inkübatörde birkaç saat (veya bazı durumlarda 2 gün boyunca) muhafaza edilmesini gerektirir. Hücre içi sitokin üretiminin saptanmasıyla çok işlevliliği analiz edebilmek için, PBMC'ler kapaklı tüplerde farklı uyarımlarla inkübe edilir. Bu koşullarda, tüpün içinde aerosol parçacıkları/damlacıklar üretilebilir. Tüpler Sınıf II BSC'ye yüklenir, inkübatöre aktarılır, birkaç saat bekletilir, boşaltılır ve daha önce açıklandığı gibi BSC kapsamında Brefeldin A ile işleme tabi tutulur ve yeniden inkübe edilir. Son inkübasyondan sonra, tüpler BSC'ye boşaltılır.

Daha sonra hücreler fikse edilir, geçirgen hale getirilir, mAb'ler ile boyanır ve cihazdan alınır. Şekil 1'de bildirilen vakada (10 Mart 2020'de "Area Vasta Emilia Nord" Etik Komitesi tarafından onaylanan bir çalışmadan), Attune NxT akustik akış sitometresi (ThermoFisher Scientific, Eugene, OR) kullanılmıştır. Bu analiz için ilk olarak hücre içi boyama ve nadir olay tespiti için klasik yöntemler uygulanmıştır. Daha sonra, COVID-19 pnömonisi olan bir hasta ile yaş ve cinsiyet uyumlu bir donörün CD8 T hücrelerinin sitokin üretimleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Hastadan alınan CD8 T hücrelerinin çoğu Granzim B üretebilirken interferon-Gamma veya TNF-Alfa üretememiş ve CD107a negatif bulunmuştur. Bu tahlil, HIV gibi viral enfeksiyonlarda savunmada büyük rol oynayan çoklu fonksiyonel yanıtların klinik önemini ve enfeksiyon seyrinin kısmen tahmininde önemini anlamak için derinlemesine araştırılmaktadır.

Son olarak, Covid-19 hastalarından alınan hücrelerin sınıflandırılmasının tamamen farklı bir yaklaşım gerektirdiğinin altını çizilmektedir. Aslında, yukarıda tarif edilen basit prosedürler, hücre fenotipi, hücre içi moleküllerin tespiti gibi hücrelerin fikse edildiği deneylerde uygulanabilir. Fikse edilmemiş canlı hücreler için (örneğin, farklı organellerin veya kalsiyum akışlarının işlevselliğinin analizi gibi çalışmalarda) hücre sınıflandırması için aynı yöntemlerin kullanılması önerilmektedir. Bu bağlamda, ISAC Biyogüvenlik Komitesi, yakın zamanda NIH-CoV-2 hücre sınıflandırması için Kurumsal Biyogüvenlik Komitesi tarafından onaylanan yeni prosedürleri yayınlamıştır (26 Mart 2020). Prosedürler son derece açık ve iyi yazılmıştır ve ilgilenenler ISAC web sitesi ziyaret edilebilir (<https://isac-net.org/page/Biosafety>).

Modena Covid-19 Çalışma Grubu (MoCo19) aşağıdaki isimlerden oluşmaktadır.

Cristina Mussini, Giovanni Guaraldi, Erica Bacca, Andrea Bedini, Vanni Borghi, Giulia Burastero, Federica Carli, Giacomo Ciusa, Luca Corradi, Gianluca Cuomo, Margherita Digaetano, Giovanni Dolci, Matteo Faltoni, Riccardo Fantini, Giacomo Franceschi, Erica Franceschini, Vittorio Iadisernia, Damiano Larné, Marianna Menozzi, Marianna Meschiari, Jovana Milic, Gabriella Orlando, Francesco Pellegrino, Alessandro Raimondi, Carlotta Rogati, Antonella Santoro,

Roberto Tonelli, Marco Tutone, Sara Volpi, Dina Yaacoub (Infectious Diseases Clinics, University Hospital and AOU Policlinico, Modena, Italy).

Massimo Girardis, Alberto Andreotti, Emanuela Biagioni, Filippo Bondi, Stefano Busani, Giovanni Chierago, Marzia Scotti, Lucia Serio (Department of Anesthesia and Intensive Care, University Hospital and AOU Policlinico, Modena, Italy).

Enrico Clini, Riccardo Fantini, Roberto Tonelli, Ivana Castaniere, Luca Tabbi (Respiratory Diseases Unit, AOU Policlinico and University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy).

Tommaso Trenti, Mario Sarti, Marisa Meacci, Monica Pecorari (Department of Laboratory Medicine and Pathology, Azienda USL of Modena, Italy).

Roberta Gelmini, Gianrocco Manco (Department of Surgery, University Hospital and AOU Policlinico, Modena, Italy).

Andrea Cossarizza, Caterina Bellinazzi, Rebecca Borella, Sara De Biasi, Anna De Gaetano, Lucia Fidanza, Lara Gibellini, Anna Iannone, Domenico Lo Tartaro, Marco Mattioli, Milena Nasi, Annamaria Paolini, Marcello Pinti (Chair of Pathology and Immunology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy)