



NEUTRALISING ANTIBODIES TO SARS CORONAVIRUS 2 İN SCOTTISH BLOOD DONORS – A PILOT STUDY OF THE VALUE OF SEROLOGY TO DETERMINE POPULATION EXPOSURE

İSKOÇYALI KAN BAĞIŞÇILARINDA SARS CORONAVİRÜS 2' YE KARŞI NÖTRALİZAN ANTİKOR - TOPLUM MARUZİYETİNDE SEROLOJİNİN DEĞERİNİ ÖLÇMEDE ÖNCÜ ÇALIŞMA

ALINTI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.13.20060467>

YAZARLAR: Thompson C, Grayson N, Paton R, Lourenco J, Penman B, Lee L, Odon V, Mongkolsapaya J, Chinnakannan S, Dejnirattisai W, Edmans M, Fyfe A, Imlach C, Kooblall K, Lim N, Liu C, Lopez-Camacho C, McNally C, Ramamurthy N, Ratcliff J, Supasa P, Wang B, Mentzer A, Turner M, Semple M.G, Baillie JK, ISARIC4C Investigators, Harvala H, Screatton GR, Temperton N, Klenerman P, Jarvis, LM, Gupta S, Simmonds P

ÖZETLEYEN: Dr. Nesrin Gareayaghi

GİRİŞ

İskoçyalı kan bağışçılarında serolojik bir çalışmayla SARS CoV 2'ye karşı gelişmiş antikorları saptanmaya ve SARS-CoV-2 maruziyeti tahmin edilmeye çalışılmıştır. 17, 21, 22 ve 23 Mart 2020 tarihlerinde kan bağışçılardan yaşları 18-75 yaş arası değişenler çalışmaya dahil edilmiştir. Psödoplelendirilmiş SARS-CoV-2 virüsü mikronötralizasyon (pMN) deney formatı, SARS CoV-2 nötralizan antikorları açısından incelenmiştir. Bu format daha önce SARS-CoV-1 ve Ebola Virüs seroepidemiolojik çalışmaları için de kullanılmıştır. Daha sonra ELISA yöntemi ile antikorların spike proteinleri saptanarak doğrulama yapılmış, böylece nötralizan antikorların sıklığı ve tahmini popülasyon maruziyeti sonuçları değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnekler: 17 Mart 2020'de toplanan 500 plazma örneği ayrıca 21-23 Mart 2020 tarihleri arasında toplanan toplam 500 plazma örneği analiz edilmiştir. Negatif kontrol grubu olarak henüz SARS CoV-2 Çin'de tespit edilmemişken, Eylül 2018 ve Aralık 2019 (IRAS Proje No. 18005) tarihlerinde toplanmış 100 farklı donör örneği İskoçya Ulusal Kan Transfüzyon Servisi (SNBTS) anonim arşivinden çalışılmıştır. Donör seçim kriterlerine göre Suppl. Data. SNBTS kan bağışçuları virolojik testler açısından tam aydınlatılmış onam vermektedir. Kan bağışları SNBTS Kan Kuruluşu Yönetimi'nde yapılmış ve çalışma SNBTS Araştırma ve Örnek Yönetim Komitesi tarafından onaylanmıştır. 7 adet temas takipli hasta numunesi PCR ile konfirme edilmiş ve SARS CoV-2 pozitif enfekte hasta örnekleri çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif serum örneği alınan bireylerin hepsinde asemptomatik SARS CoV-2 enfeksiyonu vardı ve Birleşik Krallık ISARIC WHO Klinik Karakterizasyon Protokol (CCP-UK) taburculuk işleminden 28 gün sonraki zaman diliminde alınmışlardı. Örnekler serolojik test öncesi 30 dakika boyunca 56°C'de ısı ile inaktive edilmişlerdir.

SARS-CoV-2 Psödötıp Mikronötralizasyon (pMN) Deneyi: Sentetik kodon uygun hale getirilerek kullanılan ve yüzeyinde dikensi çıkıntıları olan lentivirüs bazlı bir SARS-CoV-2 psödovirüs partikülü yapılmıştır (Sayı No: YP_009724390.1). Bu metot daha önce psödotiendirilmiş SARS-CoV-1, MERS-CoV ve Ebola Virüs yapımında kullanılmıştır. Virüs enfektivitesi HEK 293T ACE2 plazmid transenfekte hücrelerin titrasyonuna göre belirlenmiştir (Nie et al, 2020). Nötralizan antikor titreleri (Nab) iki katlı sonlanım noktalı bir dizi seyreltinin, 10^5 bağıl ışık birimi (RLU) psödotiendirilmiş virüs ile karıştırılması ve 37°C 'de iki saat inkübe edildikten sonra 10^4 HEK 293T ACE2-transenfekte hücre ile karıştırılması sonucu belirlenmiştir. Levhalar 37°C 'de 72 saat inkübe edilmiş ve daha sonra hücreler eritilerek lusiferaz ekspresyonu için tayin edilmiştir. Nötralizasyon titreleri IC_{50} değerleri olarak verilmiştir. Deney sırasında levhalar barkodlanmış ve kontroller aralıklı olarak yapılmıştır.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Trimer S proteinin antikorları ELISA ile saptanmıştır. MAXISORP immün levhalar (442404; NUNC) StrepMAB-Classic (2-1507-001;iba) ile kaplanmıştır. Levhalar %2 yağsız süt ile PBS içinde bir saat bloklandıktan sonra 0.125ug çözünebilir SARS-CoV-2 trimer Spike protein veya PBS içinde %2 yağsız süt ile inkübe edilmiştir. Bir saat sonra 1:50 dilüsyonda plazma eklenmiş, bunu 1:10.000 dilüsyonda ALP ile konjuge edilmiş anti-human IgG (A9544; Sigma) veya 1:5.000 dilüsyonda ALP ile konjuge edilmiş anti-human IgM (A9794; Sigma) izlemiştir. Reaksiyon PNPP substratı eklenmesi ile gerçekleştirilmiş ve NaOH eklenmesi ile sonlandırılmıştır. Bir saat sonra absorbans 405nm olarak ölçülmüştür.

Analizin İstatistiği ve Modellenmesi: Örnekler SciPy eğri uygulaması kullanılarak, Ferrara & Temperton protokolünde özetlendiği şekilde analiz edilmiştir. Her levha (V) için değerler, 6 negatif kontrol kuyucuğunun (\bar{n}) ortalamasının çıkartılmasıyla düzeltilmiştir. Her bir örnek değerinin (S) standardize nötralizasyon yüzdesi, her bir levha (p) için 6 teknik pozitif kontrolün ortalamalarının karşılaştırıldığı denklemlerle hesaplanmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Seroloji Testleri: 1000 kan bağışçısı ve 100 pandemi öncesi kontrol kanından (2019 senesinden) serum pMN deneyi ile anti-SARS-CoV-2 nötralizan antikoru açısından incelenmiştir. Test örnekleri içinden randomize bir şekilde 17 Mart 2020'de alınanlar (sayı:500), 21-23 Mart 2020 tarihleri arasında alınanlar (sayı:500) ve pandemi öncesi dönemde Eylül 2018-Aralık 2019 arasında alınanlar (sayı:100) seçilmiştir. Kan örnekleri tüm İskoçya'da kentler ve köyler dahil edilerek toplanmıştır. Donörler arasında cinsiyet kadın ve erkek olarak eşit dağılmış fakat yaş grupları 18 ve 75 arasında zorunlu tutulmuştur; bu durum İskoçya'da yaşı 75'ten büyük popülasyon için belirsizlik yaratmıştır.

2019 ve 2020 haftalarından gelen örneklerin hepsi pMN tahliliyle 1:20- 1:640 dilüsyonda iki seyreltme serisi plazma kullanılarak çalışılmıştır. Psödotiendirilmiş replikasyonun %50 bilyonunu (IC_{50}) sağlayan dilüsyonun tahmini için her bir dilüsyonda antikora bağlanan lusiferaz sinyal azalması eğriye uydurulmuştur. İkinci bir ölçü derecesi ise, dilüsyon serilerinin data noktalarından tahmini sigmoid eğriye kadar uyum için kullanılan sığdırma derecesidir ve R^2

olarak ifade edilir. Spesifik olmayan giriş engelleyici örnekleri (konsantrasyona bağlı olmayan) düşük bir R^2 değeri gösterecektir. 7 pozitif kontrol örneğinden, 6 tanesi saptanabilen nötralizan eğilim göstermiş ve bunlar pandemi öncesi örneklerin üzerinde kalmış ve iyi eği uyumu göstermişlerdir (IC_{50} aralığı: 83.18-323.59 ve R^2 aralığı: 0.79-0.96; Resim 2). İkinci hafta bakılan örneklerden toplam 5 tanesi nötralizan antikor eğilimi göstermiştir (IC_{50} aralığı: 78.42-3434.90 ve R^2 aralığı: 0.64-0.95). 2020'ye ait diğer tüm örnekler düşük IC_{50} değeri, düşük R^2 değeri veya vakaların çoğunda ikisinde de düşük değerler göstermişler ve negatif olarak sınıflandırılmışlardır.

Antikor sonuçlarını doğrulamak için, pozitif örnekler ve pMN deneyinde pozitif sınıra yakın olanlar da dahil olmak üzere negatif örneklerden bir kısım ile 1:50 dilüsyonda anti-spike protein ELISA'da IgG ve IgM antikorları açısından test edilmiştir. ELISA analizi pMN tahlilinde kesin pozitif sonuç vermeyen ileri antikor pozitiflikleri belirlenmiştir (IC_{50} : 2.55; R^2 : 0.32; Resim 2'de sol aşağıda gösterilmiştir). Optik dansiteler (ODs) pozitif kontroller ve kan bağıışı örneklerinden pMN tahlilinde pozitif olanları kaydetmiş ve IgG ELISA'da nötralizan antikorlar ile arasında iyi bir korelasyon saptanmıştır (Resim 3). pMN yönteminde zayıf pozitif olan iki örnek ELISA testinde de kesin olarak reaktif bulunmuş ve bu çalışmada pozitif olarak değerlendirilmiştir. Diğer tüm örnekler negatif idi. Düşük veya saptanamayan IgM titreleri ELISA ile saptanmıştır (Data verilmemiştir).

Sonuç olarak, İskoçya'da yapılan bu çalışmada edinilen ham seroprevalans tahminleri, Mart 2020 ortalarının iki örnekleme noktasında 0/500 ve 6/500 olarak saptanmıştır. Mart 21-23 aralığında toplanan örneklerden 6 donör örneği anti-SARS-CoV-2 açısından pozitif, bir önceki haftadan ve 2019'dan toplanan tüm bağıışı örnekleri ise negatif bulunmuştur. Pozitif donörler 20-60 yaş aralığında, Edinburgh Health Board (sayı=4), Grampian (sayı=1) ve Ayrshire & Arran (sayı=1) çevresinden köken almaktaydı. Bu tahminler kan bağıışlayan popülasyonda önceden SARS-CoV-2'ye maruziyetinin sonraki dönemlerdeki yansımaları göstermiştir. Ayrıca bu ve daha geniş topluluklarda SARS-CoV-2'nin geçmiş enfeksiyon sıklığının tahmin edilmesine ve gelecekteki çalışmalarında çözülmesi gereken belirsizlikler içerdiğini göstermektedir. Buna rağmen, bu çalışma SARS-CoV-2 gibi epidemilerin yayılımının izlenmesi açısından yeni bir metot gözükmektedir ve bekleyen benzeri tehditlerin acil cevabında rutin bir bileşen olarak dikkatle kullanılmalıdır.

FIGURE 1

SAMPLING DISTRIBUTION OF THE SCOTTISH BLOOD DONORS

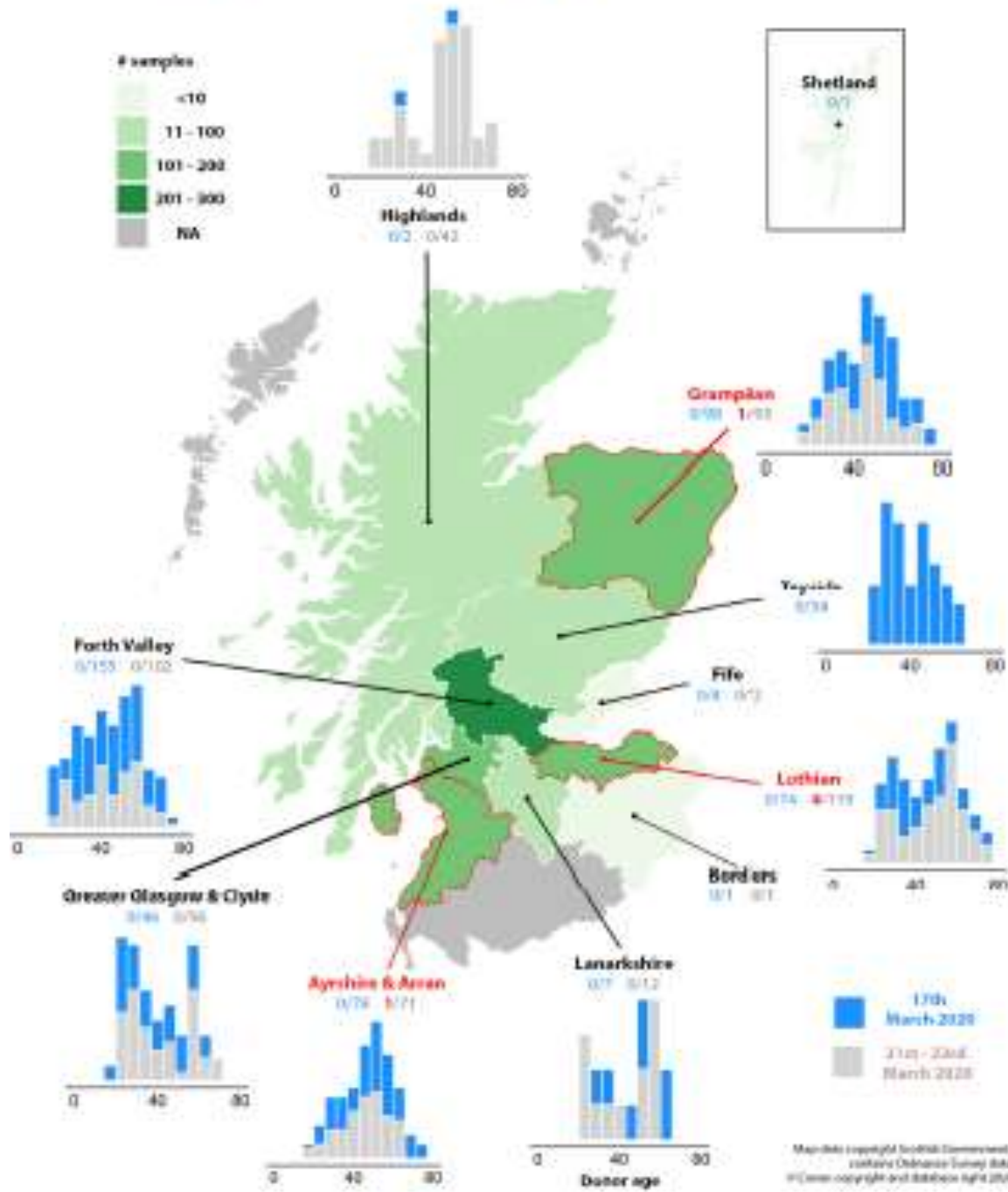


FIGURE 2

ASSOCIATION OF IC_{50} (NEUTRALISING ANTIBODY) VALUES AND R^2 (GOODNESS OF CURVE FITS) OF THE TEST SAMPLES

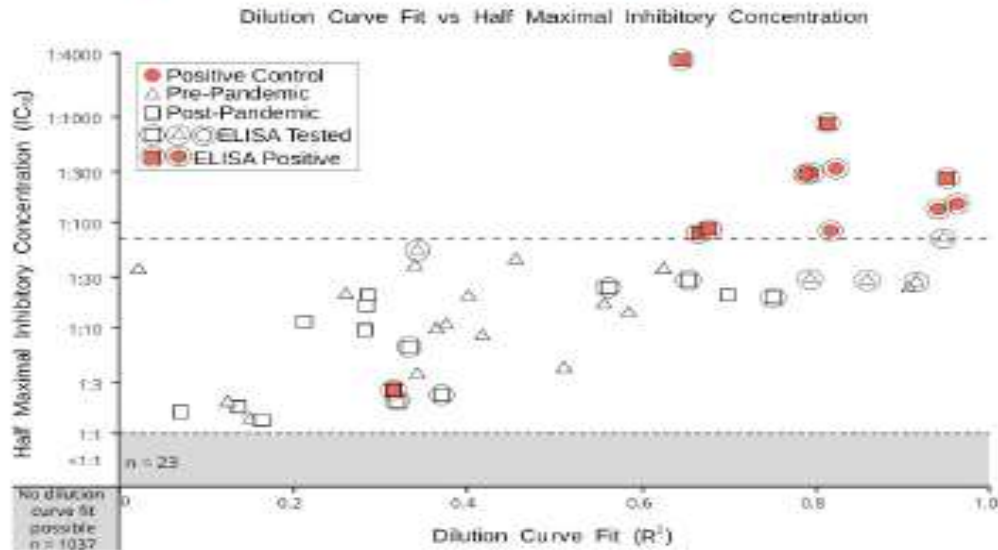


FIGURE 3

RELATIONSHIP BETWEEN IC_{50} AND ELISA REACTIVITY OF POSITIVE SAMPLES

