

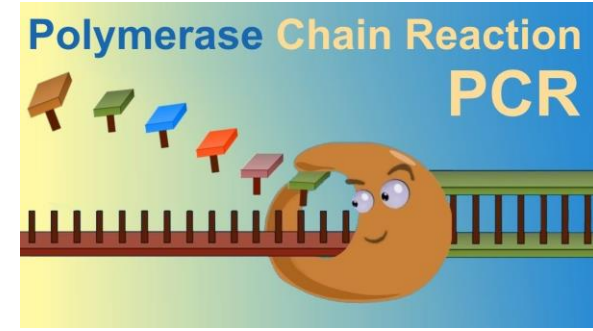
Evaluation of Minimally Invasive Clinical Samples for Molecular Diagnosis of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever: An Advantage for Dried Blood Spots*



UK Health
Security
Agency



Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Moleküler Tanısında Minimal İnvaziv Örneklerin Değerlendirilmesi: Kurutulmuş Kan Damlaları Avantajlı



Nazif Elaldı¹, Nadina Wand², Ayşe Nur Pektaş³, Binnur Köksal Bağcı⁴, Jake D'addiego²,

Gillian Slack², **Aysenur Çömez¹**, Ahmet Turan İnce¹, Murtaza Öz¹, Roger Hewson²

¹ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Sivas, Türkiye

² UK Health Security Agency, Science Group, Porton Down, Salisbury, United Kingdom

³ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Araştırma Merkezi (CUTAM), Sivas, Türkiye

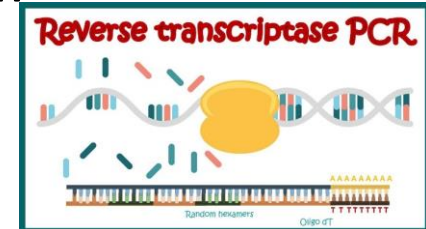
⁴ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sivas, Türkiye

* Bu çalışma İngiltere ve Türkiye arasındaki Newton- TÜBİTAK-Katip Çelebi Programı'nca desteklenmiştir (Proje no: 119N515)



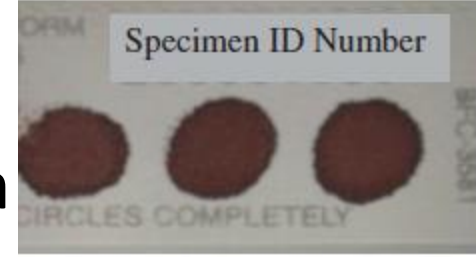
Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi ve Tanısı

- Akut Viral Kanamalı Ateş (VKA)
- Etken Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus
- KKKA'da erken tanı önemli !..
- Altın standart test yöntemi: RT-PCR
- KKKA kırsal alanlarda endemik
- KKKA takip eden hastanelerin çoğunda RT-PCR altyapısı yok !
- KKKA moleküler tanısı için Referans Viroloji Laboratuvarları var
 - Ankara, İstanbul, Samsun, Yozgat
- Serumlar Referans Viroloji Laboratuvarlarına gönderiliyor



Tanıda Minimal Invazif Yöntemler

- Moleküler testler sıklıkla venöz kan ile yapılır
- Minimal invazif yöntemler: Tükürük, idrar ve kurutulmuş kan damlası(DBS)
 - Birçok viral enfeksiyon tanısında örnek olarak denenmiş
 - Düşük gelirli ülkelerde viral enfeksiyon tanısı için iyi alternatif ?
- Tükürük, idrar ve DBS örnekleri KKKA'nın moleküler tanısında araştırıldı
- Referans serum CCHFV-RNA (kopya/mL) tükürük, idrar ve DBS örneklerindeki CCHFV-RNA (kopya/mL) ile karşılaştırıldı

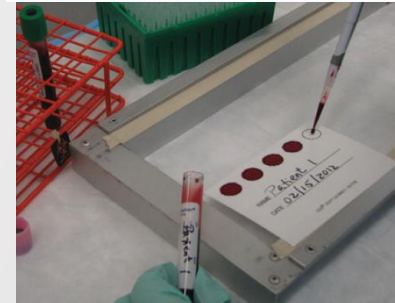
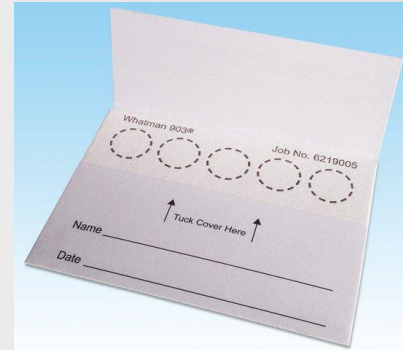


Yöntemler

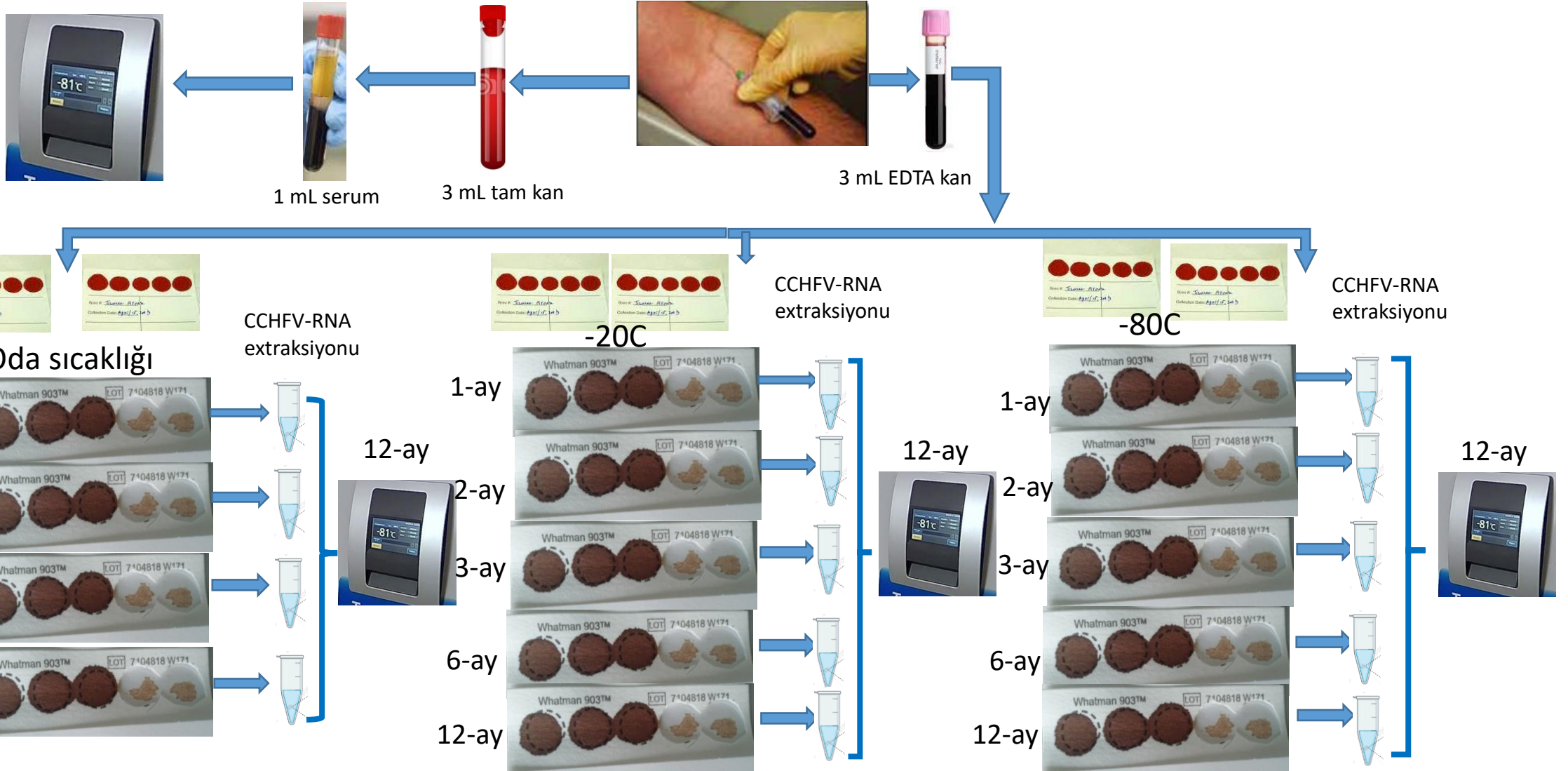
- Nisan ve Temmuz 2020 arasında Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi'ne yatarak takip edilen erişkin akut dönem KKKA hastaları çalışmaya alındı
- Prospektif bir çalışma
- KKKA tanısı RT-PCR test kiti (Altona Diagnostics) ile yapıldı
- İki farklı kohort çalışmaya alındı
- İlk kohort 22 hasta
 - Eşlik serum, tükürük ve idrar örnekleri çalışması
- İkinci kohort 24 hasta
 - Eşlik serum ve kan damlaları (DBS) çalışması

Yöntemler

- İlk kohort için eşlik serum, idrar ve tükürük -80C'de 12 ay saklandı
- İkinci kohortta 24 hastadan 6 mL venöz kan alınarak EDTA'lı tüp ve biyokimya tüplerine (her biri 3 mL) bölündü
- EDTA'lı tüpteki tam kandan toplam 30 damla (her biri 70 μ L) 6 filtre kağıdına (Whatman #903) aktarılarak DBS hazırlandı
- DBS'ler oda sıcaklığında (48 saat, 72 saat, 7 gün 12 ay), -20C ve -80C'de 1-ay, 2-ay, 3-ay, 6-ay ve 12-ay süreyle muhafaza edildi



DBS çalışması akış şeması (Grafik özet)

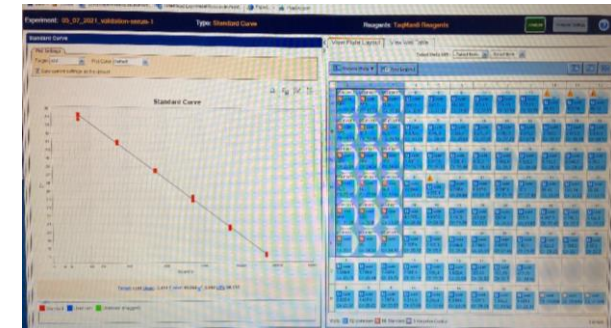


Real Time RT-PCR

- 12 aylık süre sonunda kohortlara ait referans serum örnekleri, ilk kohorta ait idrar ve tükürük örneklerinden CCHFV-RNA ekstrakte edilerek -80C'de muhafaza edildiler
- CCHFV-RNA ekstraksiyon işlemi bittiğinde her bir DBS örneklerinden elde edilip -80C'de muhafaza edilen RNA örnekleriyle RT-PCR çalışıldı
- Çalışmada İngiliz proje ekibi tarafından geliştirilen evrensel in-house RT-PCR test kitleri kullanıldı
- Örneklerdeki CCHFV-RNA genomu kopya/mL olarak hesaplanıp her bir örnek için kaydedildi

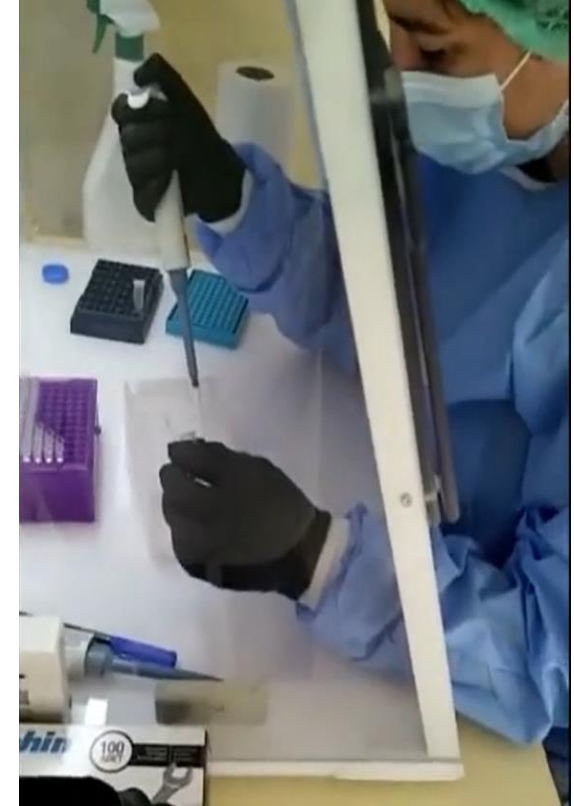


Thermal cycler
(Applied biosystems)



Real Time RT-PCR için Primerler

Primer/Probe	Sequence 5'-3'
BA_CCHF_F_1 (10 μ M)	CCTTTCTTGA ACTCTTCAAACC
BA_CCHF_F_3 (10 μ M)	CCCTTTTTAAACTCCTCAAACC
BA_CCHF_F_5 (10 μ M)	CCTTTTTTAAACTCCTCAAACC
BA_CCHF_PRB_4 (10 μ M)	(FAM)ACTCAAGAGA AACTGTGGGCGTAAG (BHQ1)
BA_CCHF_S1R (10 μ M)	TCTCAAAGAAACACGTGCC



İstatistik Analizleri

- Spearman korelasyon katsayısı (r , S), referans serum, tükürük, idrar ve DBS arasındaki CCHFV titrelerinin korelasyonları için hesaplandı:
 - 0.00-0.10 ihmal edilebilir korelasyon
 - 0.10-0.39 zayıf korelasyon
 - 0.40-0.69 orta derecede korelasyon
 - 0.70-0.89 güçlü korelasyon
 - 0.90–1.00 çok güçlü korelasyon olarak kabul edildi

Birinci kohort (N = 22) için serum, tükürük ve idrar CCHFV titreleri (kopya/mL)

PID Yaş (y) / Cinsiyet	Örnekleme günü	CCHFV-RNA (kopya / mL)		
		Serum	Tükürük	İdrar
P01/23/Male	1	1,65E+07	1,05E+06	< LOD
P02/64/ Male	1	1,15E+07	3,27E+06	< LOD
P03/47/Male	4	3,86E+07	2,85E+06	3,96E+03
P04/18/Male	5	3,80E+08	2,33E+07	< LOD
P05/54/Female	5	2,28E+07	2,03E+06	< LOD
P06/48/Female	1	2,01E+07	3,39E+07	1,55E+04
P07/43/Male	3	6,15E+07	6,65E+05	1,67E+04
P08/70/Male	5	1,75E+05	2,36E+06	7,24E+03
P09/40/Male	8	5,16E+06	1,18E+06	1,02E+04
P10/43/Female	6	9,40E+07	8,75E+07	2,21E+04
P11/53/Female	4	2,82E+05	3,42E+06	< LOD
P12/49/Male	6	2,82E+08	3,26E+06	< LOD
P13/50/Male	7	5,39E+05	8,02E+06	4,94E+03
P14/46/Male	6	1,58E+06	4,21E+05	8,37E+03
P15/60/Male	8	8,02E+04	5,72E+06	6,98E+02
P16/23/Male	1	2,90E+06	4,43E+06	< LOD
P17/48/Male	2	8,92E+06	1,58E+06	3,07E+04
P18/51/Male	7	7,88E+04	7,21E+05	5,66E+04
P19/28/Male	1	4,63E+06	5,38E+06	4,12E+03
P20/38/Male	2	2,68E+08	4,85E+05	1,63E+04
P21/50/Male	4	1,55E+06	1,32E+08	1,88E+04
P22/28/Male	3	1,61E+09	8,64E+05	< LOD

- 22 KKKA hastasının (Kadın, 4; Erkek, 18) medyan (IQR) yaşı 47.5 (35,5 – 51,5) yıl
- Semptomların başlamasından sonraki medyan (IQR) örnekleme süresi 4 (1,8 – 6) gün
- 22 tükürük örneğinin tümünde CCHFV-RNA tespit edildi (7,88+E04 - 1,32+E08) kopya/mL
- 8/22 (%36.4) idrar örneğinde CCHFV-RNA saptanamadı

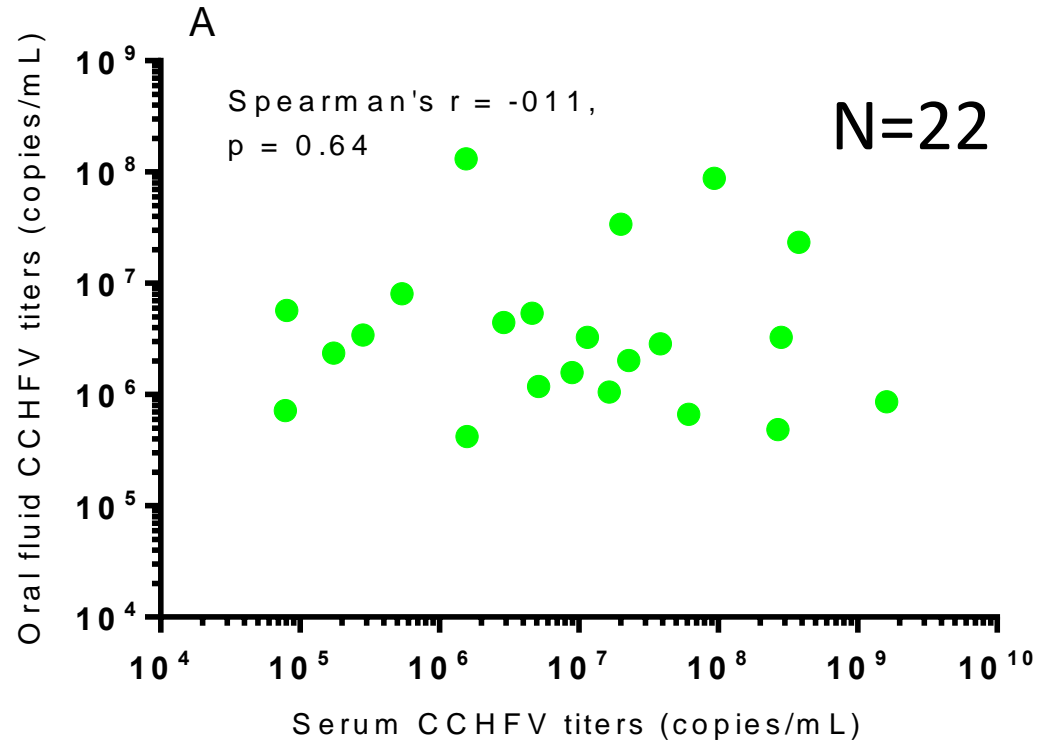
İkinci kohort (N = 24) için serum ve DBS CCHFV titreleri (kopya/mL)

Patient characteristics		Storage time points, conditions and CCHFV titers (copies / mL)														
		Control serum	Dried blood spots													
		- 80 °C	Room temperature (20 – 25 °C)					- 20 °C					- 80 °C			
PID Age (y) / Gender	Sampling days*	12 months	48 hours	72 hours	7 days (n=8)	12 months (n=7)	1 month	2 months	3 months	6 months	12 months	1 month	2 months	3 months	6 months	12 months
P01/39/Male	4	7,16E+06	1,04E+06	9,39E+05			1,89E+05	3,53E+05	6,65E+05	7,61E+05	9,47E+05	3,00E+05	3,68E+05	2,17E+05	1,42E+06	2,02E+06
P02/81/Female	6	1,71E+07	2,21E+06	2,11E+06			1,08E+06	1,28E+06	3,24E+06	5,77E+04	4,53E+06	1,43E+06	5,57E+05	9,35E+05	3,70E+06	2,11E+07
P03/18/Male	8	2,59E+04	4,13E+04	9,34E+04			6,94E+03	5,05E+04	8,10E+04	8,33E+04	1,00E+05	5,33E+04	8,46E+03	2,52E+04	3,30E+04	3,14E+06
P04/30/Male	5	5,15E+03	2,40E+04	4,39E+04			1,52E+04	1,63E+04	9,83E+03	2,81E+04	1,28E+05	8,43E+03	2,73E+04	6,69E+03	3,59E+04	2,29E+05
P05/22/Male	4	1,20E+06	2,26E+05	6,66E+04			3,28E+04	7,72E+04	3,07E+04	3,28E+04	2,61E+07	4,91E+04	8,86E+04	4,75E+04	4,38E+04	1,15E+06
P06/46/Female	4	1,17E+05	1,11E+04	1,23E+04			4,86E+03	3,59E+04	2,73E+04	1,98E+04	8,47E+04	9,88E+03	2,20E+04	5,23E+03	2,74E+04	1,70E+05
P07/19/Male	7	1,61E+04	1,08E+04	1,66E+04			4,49E+03	1,36E+04	1,09E+04	< LOD	3,37E+06	4,21E+03	2,43E+04	7,99E+03	9,41E+03	4,54E+04
P08/25/Male	3	2,49E+07	3,63E+06	6,56E+06			1,73E+06	3,33E+05	1,39E+06	2,08E+06	6,02E+04	1,24E+06	1,03E+06	9,17E+05	2,60E+06	8,48E+06
P09/41/Female	4	1,00E+07	1,49E+06	1,14E+06			5,67E+05	3,67E+05	5,13E+05	1,81E+05	3,10E+06	5,96E+05	6,59E+05	2,34E+05	1,94E+05	4,76E+06
P10/55/Female	7	9,76E+04	1,81E+04	3,13E+04	1,56E+04		8,63E+03	1,82E+04	1,03E+04	8,70E+03	2,00E+04	9,84E+03	1,42E+04	4,56E+03	3,82E+04	1,02E+05
P11/44/Male	4	1,64E+06	1,79E+05	2,77E+05	1,42E+05		5,88E+04	7,60E+04	1,31E+05	9,10E+04	3,94E+05	4,08E+04	5,52E+04	6,86E+04	8,69E+04	5,11E+05
P12/23/Male	4	4,50E+08	5,47E+07	2,72E+07	3,04E+07		1,38E+07	1,49E+07	1,70E+07	7,34E+07	7,41E+07	3,34E+07	2,97E+07	1,56E+07	4,64E+07	7,47E+07
P13/41/Female	6	3,19E+07	7,31E+06	8,12E+06	7,23E+06		5,84E+06	8,38E+05	2,11E+06	1,97E+06	2,61E+07	5,12E+06	2,73E+06	2,14E+06	1,29E+06	1,84E+07
P14/59/Female	5	1,46E+07	1,59E+06	1,79E+06	2,26E+06		9,51E+05	4,33E+05	5,97E+05	3,33E+05	7,54E+06	7,40E+05	9,68E+05	6,85E+05	4,19E+06	8,19E+06
P15/32/Female	4	1,26E+07	1,05E+06	3,40E+06	2,76E+06		7,66E+05	7,73E+05	1,24E+06	9,91E+05	7,53E+06	9,77E+05	1,36E+06	1,25E+06	2,06E+06	1,13E+07
P16/71/Male	4	1,81E+07	9,44E+05	3,21E+06	1,56E+06		7,58E+05	6,38E+05	5,44E+05	5,19E+05	4,51E+06	1,45E+06	4,96E+05	5,94E+05	5,32E+05	5,42E+06
P17/45/Male	3	8,58E+06	4,96E+05	1,13E+06	1,60E+06		3,46E+05	2,17E+05	2,46E+05	2,94E+05	4,14E+06	3,67E+05	4,54E+05	2,05E+05	5,20E+05	6,15E+06
P18/65/Male	4	3,83E+07	1,11E+06	3,44E+06		2,28E+06	1,71E+06	1,53E+06	4,10E+06	4,00E+06	5,51E+06	1,98E+06	2,32E+06	5,19E+05	2,36E+06	1,96E+06
P19/63/Female	5	8,98E+07	6,93E+06	6,85E+06		1,89E+07	4,89E+06	3,05E+06	6,06E+06	3,47E+06	1,39E+07	2,76E+06	4,78E+06	1,12E+06	3,09E+06	1,70E+07
P20/34/Male	2	2,02E+08	3,23E+07	4,94E+07		1,43E+08	1,82E+07	8,00E+06	3,20E+07	1,87E+07	3,14E+08	1,26E+07	4,28E+07	1,12E+07	6,27E+06	2,39E+08
P21/29/Male	4	4,02E+04	2,44E+04	2,51E+04		9,60E+04	1,22E+04	4,45E+04	1,49E+04	5,56E+04	9,04E+04	1,98E+04	1,37E+04	1,43E+04	1,86E+04	1,48E+05
P22/35/Male	4	1,83E+06	1,24E+05	1,80E+05		2,38E+05	3,77E+04	8,59E+04	1,57E+05	6,59E+04	6,57E+05	6,39E+04	1,41E+05	3,69E+04	8,82E+04	1,08E+05
P23/75/Male	5	1,72E+05	1,84E+04	1,99E+04		1,23E+05	1,53E+04	1,17E+04	3,51E+04	1,76E+04	5,08E+04	1,77E+04	3,83E+04	1,98E+04	3,91E+04	1,33E+04
P24/58/Male	3	6,02E+06	9,04E+05	3,25E+05		2,98E+06	4,67E+05	3,32E+05	9,60E+05	1,34E+06	1,92E+06	2,05E+05	5,53E+05	1,32E+05	2,92E+05	5,72E+06

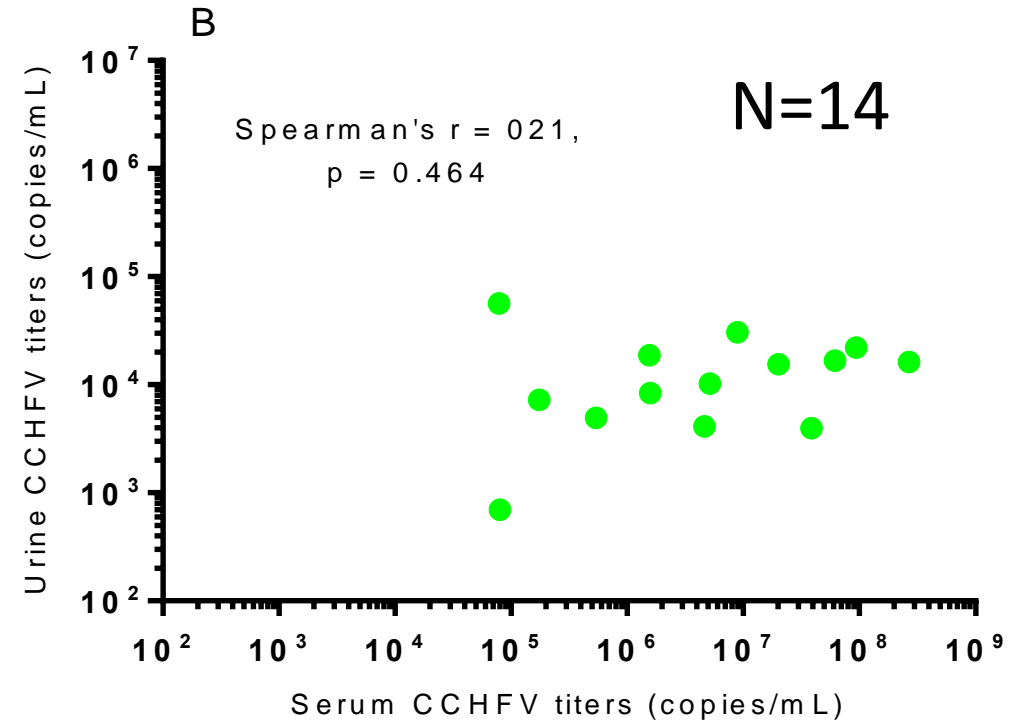
Bulgular

- DBS kohortundaki 24 KKKA hastasının (Kadın, 8; Erkek, 16) medyan (IQR) yaşı 41 (29,3 – 58,8) yıl
- Semptomların başlamasından sonraki medyan (IQR) örnekleme süresi 4 (4 – 5) gün
- -20C'de 6 ay muhafaza edilen bir DBS örneği hariç tüm DBS örneklerinde CCHFV-RNA tespit edildi

İlk kohort için serum ile tükürük ve idrar örnekleri arasındaki korelasyon analizleri

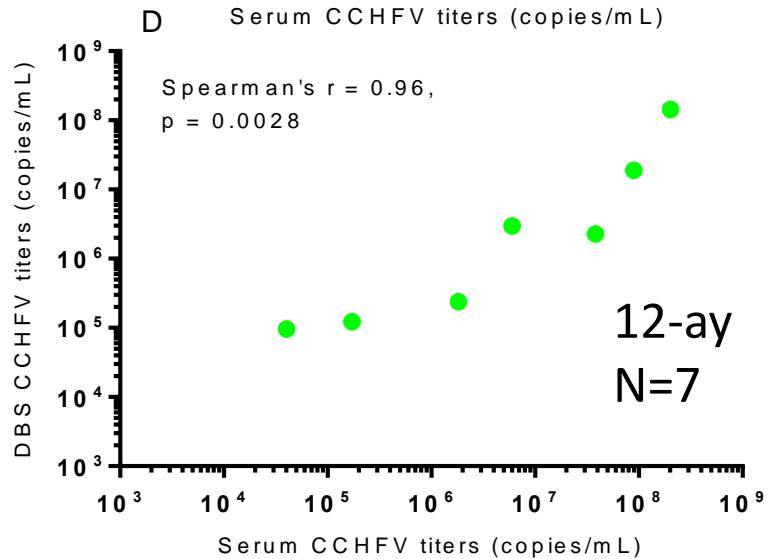
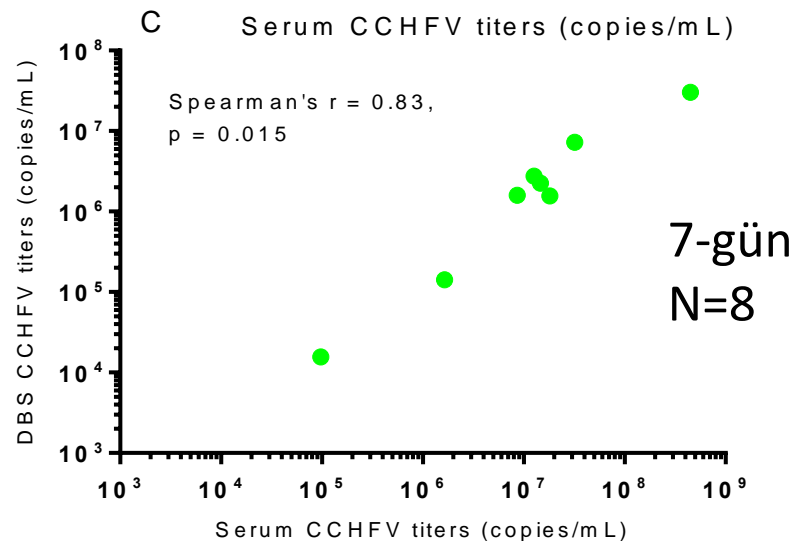
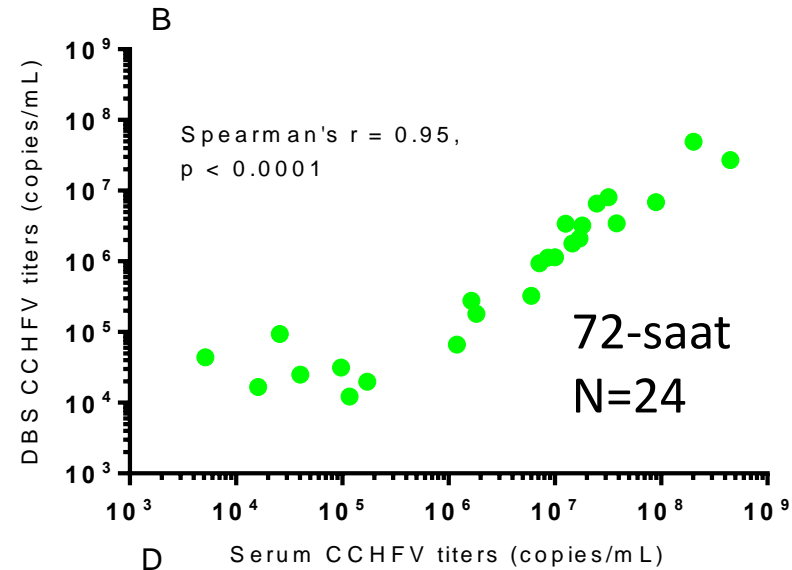
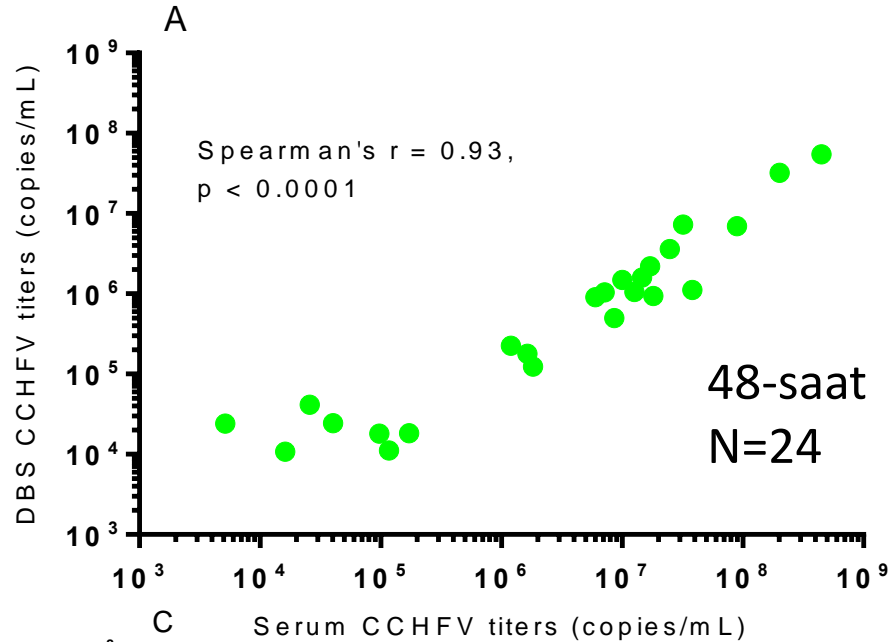


Tükürük örnekleri (-80C'de 1 yıl) N=22

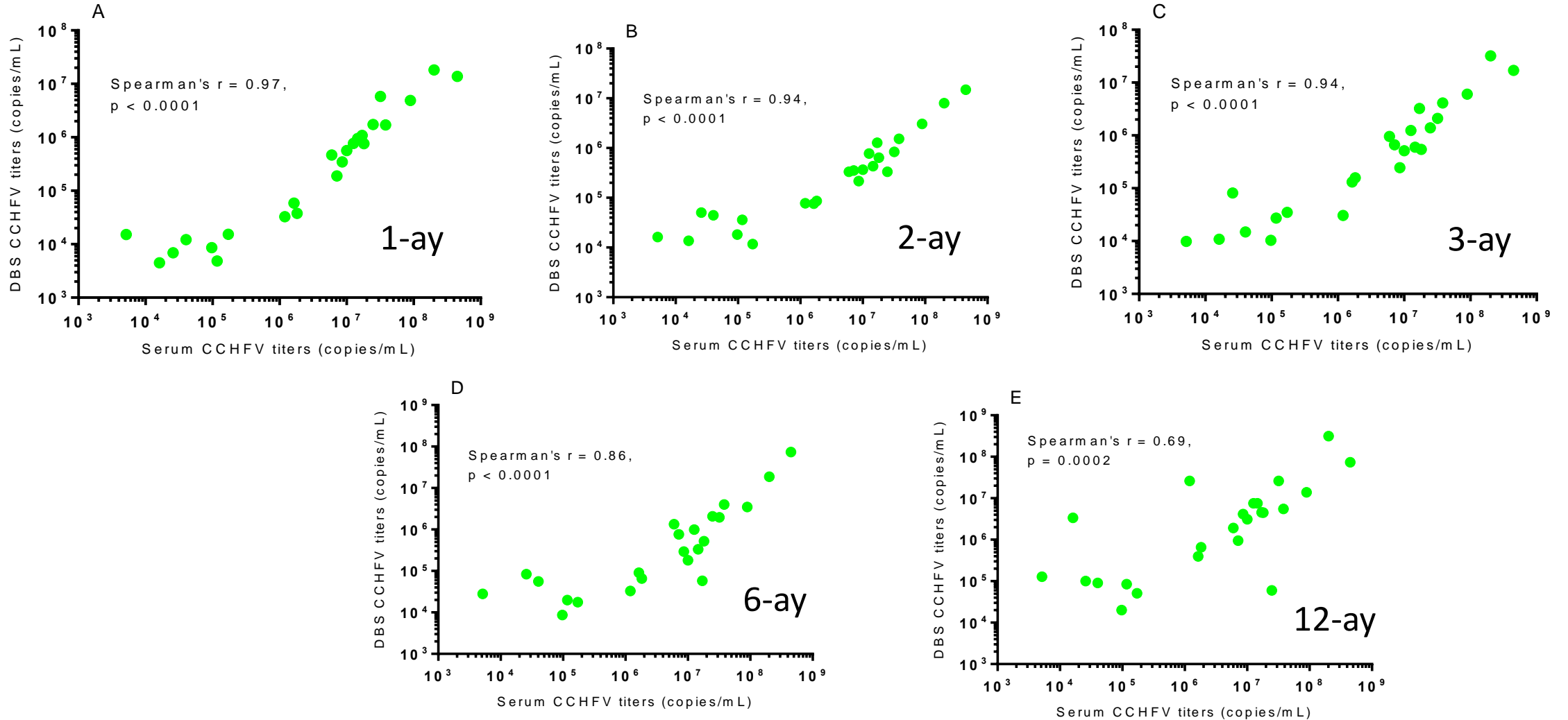


İdrar örnekleri (-80C'de 1 yıl) N=14

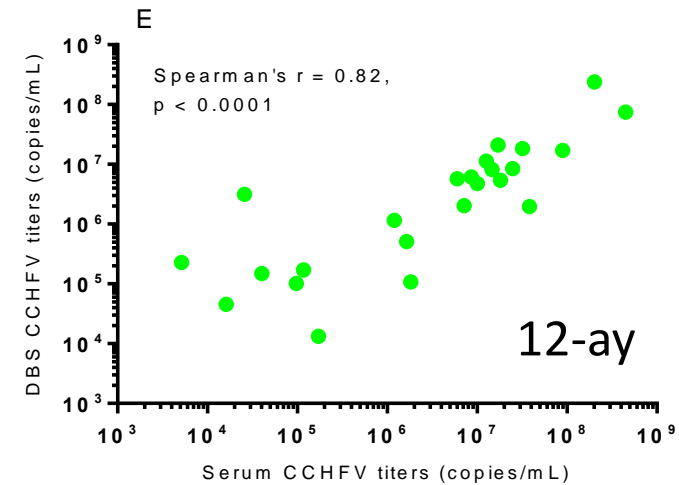
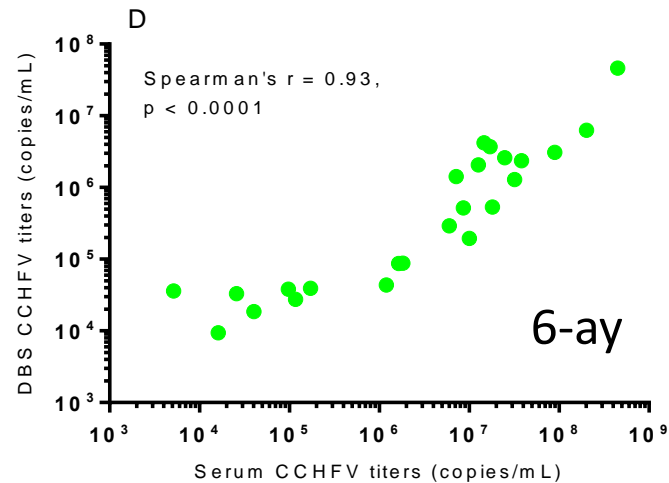
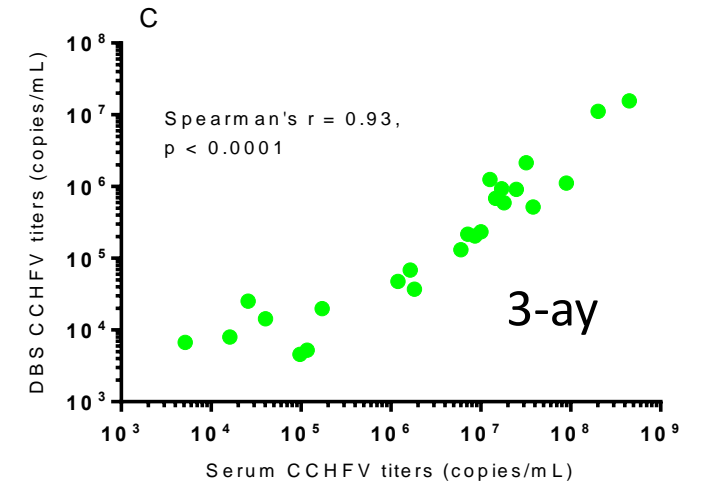
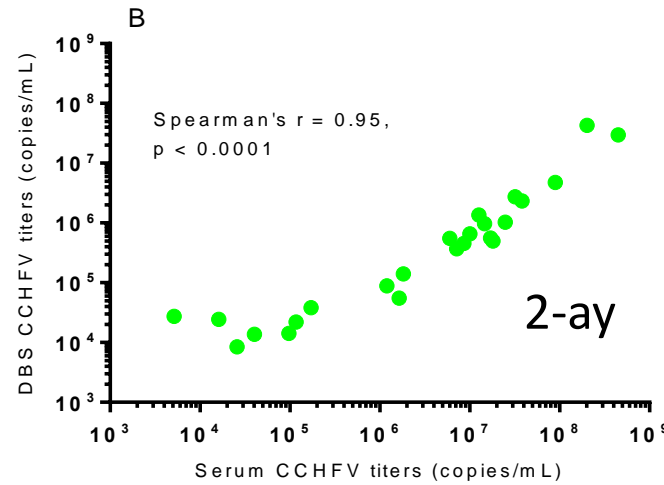
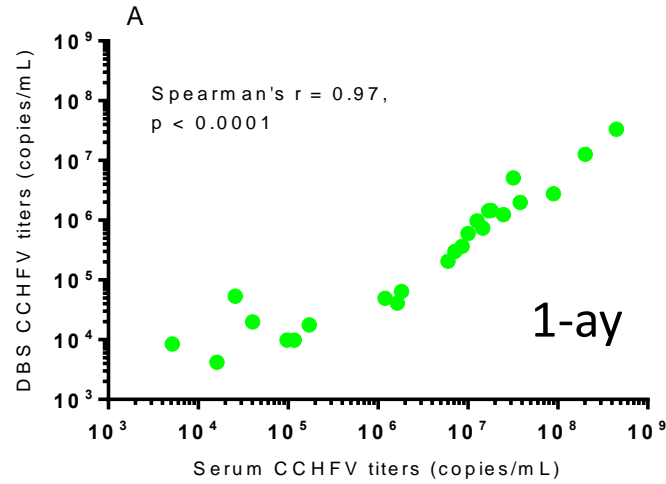
İkinci kohort için serum ile DBS örnekleri arasındaki korelasyon analizleri (Oda sıcaklığı)



İkinci kohort için serum ile DBS örnekleri arasındaki korelasyon analizleri (-20C) (N=24)



İkinci kohort için serum ile DBS örnekleri arasındaki korelasyon analizleri (-80C) (N=24)



Sonuçlar

- Çalışma verileri KKKA'nın moleküler tanısında DBS ve tükürük örneklerinin venöz kana alternatif örnek toplama yöntemleri olarak kullanılabileceğini gösteriyor!..
- CCHFV-RNA genomunu oda sıcaklığında en az 12 ay stabilize edebilmesi ve ortam koşullarında taşınabilmesi nedeniyle DBS tükürüğe göre avantajlı!..
- Ayrıca;
 - DBS işlemi nispeten ağrısız ve kan miktarı az,
 - Santrifüje gerek yok,
 - Bozulma riski yok,
 - Nispeten ucuz (1.5-2 USD)

TEŐEKKÜR EDERİM..