

COVID-19 Geçiren Sağlık Çalışanlarında Anti-SARS-CoV-2 Antikor Düzeylerinin Periyodik Değerlendirilmesi ve Temsili Virüs Nötralizasyonu Ölçümü

Periodic Evaluation of Anti-SARS-CoV-2 Antibody Levels and Determination of Surrogate Virus Neutralization in Healthcare Workers with COVID-19

Yeşim TUYJİ TOK¹(ID), Mert Ahmet KUŞKUCU¹(ID), Devrim SARIBAL²(ID), Seda SALMAN YILMAZ³(ID), Okan Kadir NOHUT⁴(ID), Gökhan AYGÜN¹(ID), Kenan MİDİLLİ¹(ID)

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

² İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul.

² Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Biophysics, Istanbul, Turkey.

³ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Adli Tıp ve Adli Bilimler Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine and Forensic Sciences, Istanbul, Turkey.

⁴ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Istanbul, Turkey.

Makale Atfı: Tuyji Tok Y, Kuşkucu MA, Saribal D, Salman Yılmaz S, Nohut OK, Aygün G ve ark. COVID-19 geçiren sağlık çalışanlarında anti-SARS-CoV-2 antikor düzeylerinin periyodik değerlendirilmesi ve temsili virüs nötralizasyonu ölçümü. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):507-518.

ÖZ

Aralık 2019'da, Çin'in Wuhan şehrinde ilk tespitinden bu yana, koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19) bir pandemiye dönüşerek dünya çapında yüksek oranda ölüm ve ekonomik kayıplara neden olmuştur. Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) zoonotik, pozitif polariteli bir RNA virüsü olup, viral enfeksiyon ve replikasyonda rol oynayan proteinleri hedef alan ve nötralizan antikorların üretimini de kapsayan bir immün yanıt başlatır ki oluşan antikorlar aylarca plazmada saptanın düzeyde kalır, virüs antijenlerine hızlı ve kuvvetli bir şekilde bağlanarak hücrel infiltrasyonu ve replikasyonu bloke eder. Total antikor ve virüs nötralizasyonu ölçümü, popülasyondaki virüsle karşılaşma ve enfeksiyon oranının belirlenmesi gibi epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmasının yanı sıra hastalığın ağırlığı ve tekrar enfeksiyon geçirme riski konusunda da ipucu sağlar. Bu çalışmada, semptomatik veya asemptomatik olarak COVID-19 geçirdiği dokümanite edilmiş sağlık çalışanları periyodik olarak izlenerek total antikorların plazmadan kaybolma zamanının belirlenmesi, ayrıca temsili virüs nötralizasyonunun ölçülmesiyle re-enfeksiyon riskinin ve aşılama gereksiniminin öngörülmesi amaçlanmıştır. Hastanemizin bulaş riski açısından farklı alanlarında görevli 123 sağlık çalışanından, COVID-19 hastalık tanısından 30-45 gün sonra (akut dönemde); 3, 6 ve 9. aylarda alınan periferik kan numunelerinde, serolojik yöntemlerle SARS-CoV-2 N antijenine

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Yeşim Tuyji Tok, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34093, Fatih, İstanbul. **E-posta (E-mail):** dr.yesimtok@gmail.com

karşı oluşan total antikor düzeyi ve temsili virüs nötralizasyon ölçümü yapılmıştır. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile ilk pozitiflik saptandıktan sonra, SARS-CoV-2-spesifik anti-nükleokapsit total antikorların 30-45 gün arası tepe seviyeye ulaştığı (80.37 COI + 37.26) ve olguların büyük kısmında (111/123, %90.2) altı ay süreyle pozitif kaldığı görülmüştür. Tepe anti-nükleokapsit antikor titresinin daha yüksek oluşu, antikorun daha uzun süre saptanmasıyla ilişkili bulunmuştur ($r=0.745$, $p<0.02$). Yaşın artışı, hastalığın daha semptomatik geçirilmesi, virüs ile tekrarlayan temas riskinin yüksek ve RT-PCR Ct değerinin daha düşük oluşuyla ilişkili olarak daha yüksek antikor titreleri saptanmış ve bu antikorların kandan kaybolma süresi de daha uzun olmuştur ($p<0.02$). Temsili virüs nötralizasyonu %97.8 olguda (90/92) hastalığın akut döneminde %70'in üzeri bulunmuştur.

SARS-CoV-2 anti-nükleokapsit total antikor düzeyi dinamiktir ve aylar içinde plazmadan kaybolur; bu süre tepe antikor titresini daha düşük olanlarda, gençlerde, asemptomatik geçirenlerde ve virüsle tekrarlayan karşılaşma riski düşük olanlarda daha kısadır. Virüs nötralizasyonu da daha düşüktür. Antikor seviyesinin takibi, SARS-CoV-2'ye karşı oluşan immün yanıt hakkında yol göstericidir ve bu sonuçlar re-enfeksiyon hakkında bilgi verecektir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2; COVID-19; ecia; nötralizasyon.

ABSTRACT

Since its first detection in Wuhan, China, in December 2019, coronavirus disease-2019 (COVID-19) has turned into a pandemic, causing high rate of death and economic losses worldwide. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is a zoonotic, positive-polar RNA virus and initiates an immune response that targets proteins involved in viral infection and replication and includes the production of neutralizing antibodies. Antibodies remain detectable in the plasma for months, binding to virus antigens quickly and strongly and they block infiltration and replication. The detection of total antibody and virus neutralization provides clues about the severity of the disease and the risk of re-infection, as well as being used in epidemiological studies such as virus exposure and determination of infection rate in the population. In this study, it was aimed to determine the disappearance time of total antibodies from the plasma by periodically monitoring the healthcare workers who have been documented as symptomatically or asymptotically infected with COVID-19 and also to predict the risk of re-infection and the need for vaccination by measuring surrogate virus neutralization. After 30-45 days from the diagnosis of COVID-19 disease (in the acute period), in the 3rd, 6th and 9th months peripheral blood samples were taken from 123 healthcare professionals working in different areas of our hospital in terms of transmission risk and total antibody levels were measured against the SARS-CoV-2 N antigen and surrogate virus neutralization by serological methods. After the first reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) positivity, SARS-CoV-2-specific anti-nucleocapsid total antibody concentrations were reached to a peak value between 30-45 days (80.37 COI + 37.26) and persisted as positive in most of the participants (111/123, 90.2%) up to six months. Higher peak anti-nucleocapsid antibody titers were associated with longer detection of the antibody ($r=0.745$, $p<0.02$). The higher antibody titers were also found to be associated with increased age, more symptomatic disease, higher risk of recurrent virus exposure and lower RT-PCR Ct values and the time for these antibodies to disappear from the blood was also longer ($p<0.02$). Surrogate virus neutralization were over 70% in 97.8% (90/92) of the participants in the acute period of infection. The SARS-CoV-2 anti-nucleocapsid total antibody level is dynamic and disappears from the plasma within months, this period is shorter in young people, those with asymptomatic patients, those with lower antibody titer and low frequency of virus exposure and also the neutralization of the virus is much more lower. Monitoring of the antibody levels will guide about the immune response against SARS-CoV-2 and these results will give information about re-infection.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; ecia; neutralization

GİRİŞ

Aralık 2019'da, Çin'in Wuhan şehrinde ilk tespitinden bu yana, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) etkeni olan ağır solunum sendromu koronavirüsü-2 (SARS-CoV-2),

tüm kıtalara insandan insana bulaşarak yayılmış ve 11 Mart 2020'de pandemi olarak kabul edilmiştir^{1,2}. SARS-CoV-2; zoonotik, pozitif polariteli bir RNA virüsü olup viral enfeksiyon ve replikasyonda rol oynayan diken (S), zarf (E), membran (M), nükleokapsit (N) olmak üzere yapısal ve ayrıca 16 yapısal olmayan proteinleri mevcuttur^{3,4}. SARS-CoV-2 enfeksiyonu bu proteinleri hedef alan ve nötralizan antikorların üretimini de kapsayan bir immün yanıt başlatır ki oluşan antikorlar aylarca plazmada saptanır düzeyde kalır, virüs antijenlerine hızlı ve kuvvetli şekilde bağlanarak hücrel infiltrasyonu ve replikasyonu bloke eder⁵⁻⁷. SARS-CoV-2 çoğu hastada kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyon oluşturur ve antijenlerin kanda belirmesinden kısa bir süre sonra, ortalama 1-3 hafta içinde, antikorlar da serolojik olarak plazmada saptanır düzeye ulaşır⁸⁻¹¹. Anti-SARS-CoV-2 total antikor düzeyi ölçümü ve dinamik olan titrenin periyodik takibi, popülasyondaki virüsle karşılaşma ve enfeksiyon oranının belirlenmesi, sürü bağışıklığı oluşumunun takibi gibi epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmasının yanı sıra hastalığın ağırlığını belirlemek ve tekrar enfeksiyon geçirme riski konusunda da koruyucu önlemleri tasarlamak açısından büyük önem taşımaktadır¹².

Toplumdan seçilen kohortlarda yapılan önceki çalışmalarda antikorların ortalama dört aylık bir sürede kaybolduğu gösterilmiştir^{13,14}. Ancak sağlık çalışanları, toplumdan edinilen COVID-19 hastalığından farklı olarak hastaneye yatış gerektiren daha ağır hastalarla dolayısıyla daha yüksek viral yüklerle defalarca karşılaşmaktadır. Bu çalışmada COVID-19 hastalığı geçirmiş sağlık çalışanlarında oluşan total antikor düzeylerinin periyodik olarak değerlendirilmesiyle ve temsili virüs nötralizasyonu ölçümü ile antikorların kaybolma zamanının, re-enfeksiyon riskinin ve aşılama gereksiniminin öngörülmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, T.C. Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu (Başvuru No: 2020-12-20T22_52_22) ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.01.2021 ve Karar No: A-62).

Hasta Seçimi

Bu tek merkezli, prospektif çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde görevli, nazal ve orofarengeal sürüntü örneğinden yapılan SARS-CoV-2 RT-PCR ile ve/veya klinik olarak COVID-19 hastalık tanısı almış, yaşları 19-65 arasında değişen, 63 kadın/60 erkek olmak üzere 123 gönüllü dahil edildi. Hazırlanan forma yaş, cinsiyet, görev yeri gibi demografik veriler ile ek hastalık/ilaç kullanımı öyküsü, semptom ve tedavileri kaydedildi. Hastane bilgi sisteminden taranarak biyokimyasal [eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), lökosit, hemoglobin, trombosit sayıları, koagülasyon, karaciğer enzimleri, D-dimer, C-reaktif protein] ve radyolojik [akciğer grafisi/bilgisayarlı tomografi (BT)] tetkik sonuçları kaydedildi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri; RT-PCR ve/veya klinik olarak COVID-19 hastalık tanısı almış olmak, 18-65 yaş aralığında olmak, sağlık çalışanı olmak, ilk tanıdan itibaren 45 gün içinde ilk kan örneğini olmak üzere bir kereden fazla antikor ölçümü için örnek vermeyi kabul etmek şeklinde belirlendi. Çalışmaya dahil edi-

len olgular görevli oldukları alanlara göre; i) düşük riskli (lojistik ve idari görevde bulunanlar), ii) orta riskli (diğer servis ve polikliniklerde çalışanlar) ve iii) yüksek riskli (COVID-19 yoğun bakım ünitesi, servis ve polikliniğinde çalışanlar) olarak üç gruba ayrıldı. Geçirilen COVID-19'un şiddeti Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre belirlenerek hastalar asemptomatik/semtomatik (hafif-ağır) olarak ayrı ayrı değerlendirildi¹⁵.

Laboratuvar Çalışılması

Hastalardan, asemptomatik veya semptomatik olarak geçirilmiş COVID-19 tanısından 30-45 gün sonra (akut dönemde); 3, 6 ve 9. aylarda etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li tüpe alınan periferik kan numuneleri santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma, -80°C'de çalışılacağı güne kadar saklandı. SARS-CoV-2 N antijenine karşı oluşan total antikor düzeyi ECLIA (Elektro kemi-lüminesans immünoassay) temelli, yarı kantitatif Elecsys anti-N serolojik testi (Roche Diagnostics, Rotkreuz, İsviçre) ile Cobas e601 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, İsviçre) cihazında ölçüldü. Sonuçlar, COI (cut-off index) olarak ifade edildi ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda bir üzeri (> 1 COI) değerler reaktivite olarak değerlendirildi. Temsili virüs nötralizasyonu ölçümü için 96 kuyucuklu U-tabanlı plaklara kaplanmış ACE-2 ile SARS-CoV-2'den saflaştırılmış konjuge RDB arasındaki etkileşimin hasta plazması eklenmesiyle izlendiği, yarışmalı "enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)" yöntemi (Elise CoV-2 IMMUN, Smartdiags, Fransa) kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için "Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22.0" programı kullanıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilks testi ile analiz edildi. Grup varyanslarının homojenliği Levene's testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren ve grup varyanslarının homojen olduğu parametrelerde iki grup ortalaması arasındaki farkın anlamlılığı Student's t-testi ile değerlendirildi, sonuçlar ortalama ve standart sapma ile ifade edildi. Parametrik olmayan verilerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testi kullanıldı; sonuçlar, medyan ve en küçük ve en büyük değerleri (medyan, min-maks) olarak ifade edildi. Spearman korelasyon analizi ile değişkenler arasındaki ilişkilere bakıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmada, 20 Mart 2020 tarihinden itibaren yaş ortalaması 38.51 (+11.37) olan, 63 kadın ve 60 erkek olmak üzere toplam 123 olgu, ortalama 272 gün (180-298) süreyle serolojik olarak izlenmiştir. Diğer demografik veriler, komorbidite ve klinik bulguları Tablo I'de özetlenmiştir.

Yaş artışıyla antikorların plazmada kalma süresi ve tepe antikor titresi pozitif ilişkili bulunmuştur ($r = 0.613$, 0.736 , $p < 0.002$); her 10 yıllık artışta tepe antikor seviyesi ve antikor pozitiflik süresi, sırasıyla 1.03 COI (0.07-1.25) ve 4.5 gün (2.65-4.82) artış göstermiştir. Cinsiyetin antikorların plazmada kalma süresi ve tepe antikor titresi üzerine bir etkisi saptanmamıştır. Hastaların %81.3 (100/123)'ü, COVID-19 için bilinen bir komor-

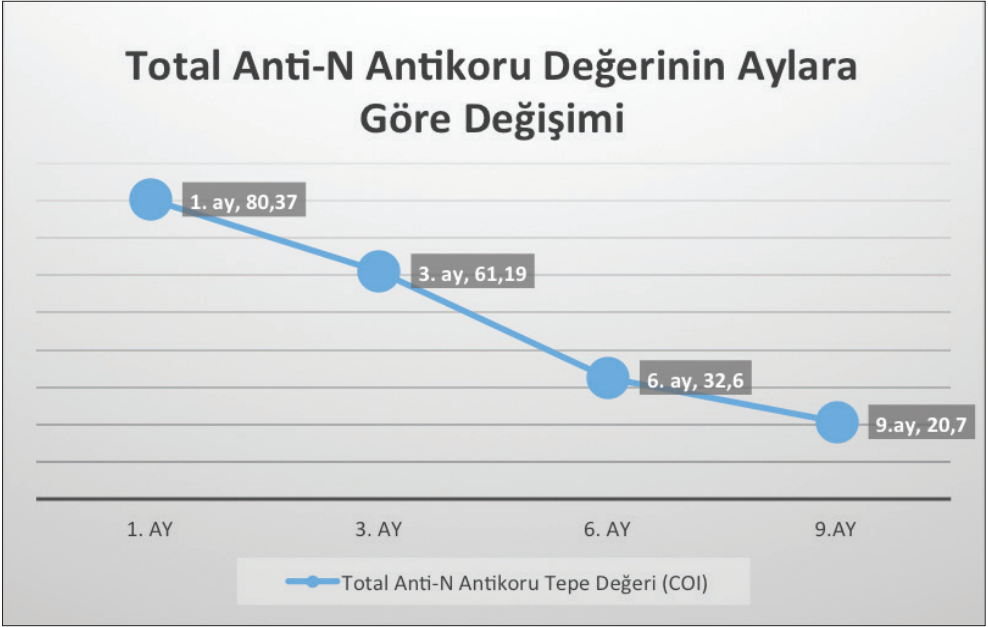
Tablo 1. Hastaların Demografik Verileri, Komorbidite Durumları ve Semptomları

	Tüm hastalar (n= 123)
Yaş	38.51 (±11.37)
Cinsiyet	63 kadın/60 erkek
Hasta tarafından ifade edilen semptom varlığı	43 (34.95)
Virüs ile temas riski mevcut alanda çalışan olgu sayısı (%)	83 (%67.4)
Komorbiditeler	
Hipertansiyon, n (%)	9 (%7.3)
Diyabetes mellitus, n (%)	5 (%4)
Koroner arter hastalığı, n (%)	5 (%4)
Astım/KOAH, n (%)	3 (%2.4)
Otoimmün hastalıklar, n (%)	2 (%1.6)
Semptomlar	
Halsizlik, n (%)	71 (%57.7)
Miyalji, n (%)	46 (%37.3)
Baş ağrısı, n (%)	42 (%34.1)
Ateş, n (%)	38 (%30.8)
Öksürük, n (%)	30 (%24.3)
Tat-koku kaybı, n (%)	29 (%23.5)
Boğaz ağrısı, n (%)	25 (%20.32)
Nefes darlığı, n (%)	7 (%5.6)

biditeye sahip bulunmamıştır. Kırk üç hasta COVID-19'u semptomatik (%34.95) geçirirken, hastaların en sık bulguları sırasıyla halsizlik (n= 71, %57.7), miyalji (n= 46, %37.3), baş ağrısı (n= 42, %34.1), ateş (n= 38, %30.8), öksürük (n= 30, %24.3), tat-koku kaybı (n= 29, %23.5), boğaz ağrısı (n= 25, %20.32) ve nefes darlığı (n= 7, %5.6) olarak bulunmuştur. Laboratuvar bulguları medyan değerleri; lökosit= $7.89 \times 10^9/L$, prokalsitonin= 0.09 ng/dl, C-reaktif protein (CRP)= 7.2 mg/L, kreatinin kinaz miyokard bandı (CK-MB)= 25 U/L, aspartat amino transferaz (AST)= 29.3 U/L, alanin aminotransferaz (ALT)= 19.4 U/L, laktat dehidrojenaz (LDH)= 23.5 U/L ve D-dimer= 0.51 µg/ml olarak bulunmuştur.

COVID-19 semptomlarının başlangıcından veya ilk RT-PCR pozitifliği saptanmasından itibaren 30-45 günden başlayarak, her hastadan ortalama üç (2-5) plazma örneği alınmıştır. En yüksek titrelere semptomların başlangıcından 30-45 gün sonra ulaşıldığı (80.37 ± 37.26), 1-3 ay arasında hastaların %31'inde antikor titresini artarken, %54'ünde stabil seyrettiği ve %15'inde de azaldığı görülmüştür. Özellikle üçüncü aydan sonra antikor titresinde anlamlı düşüş olduğu ve altıncı ay kontrolünde hastaların %60'ının antikorlarında en az iki kat azalma olduğu (32.6 ± 31.65) görülmüş, 12 hasta altıncı ay ölçümünde seronegatifleştiği için takipten çıkarılmıştır. Dokuzuncu ayda 38 hastanın antikorları halen pozitif bulunmuştur (20.70 ± 23.32) (Şekil 1).

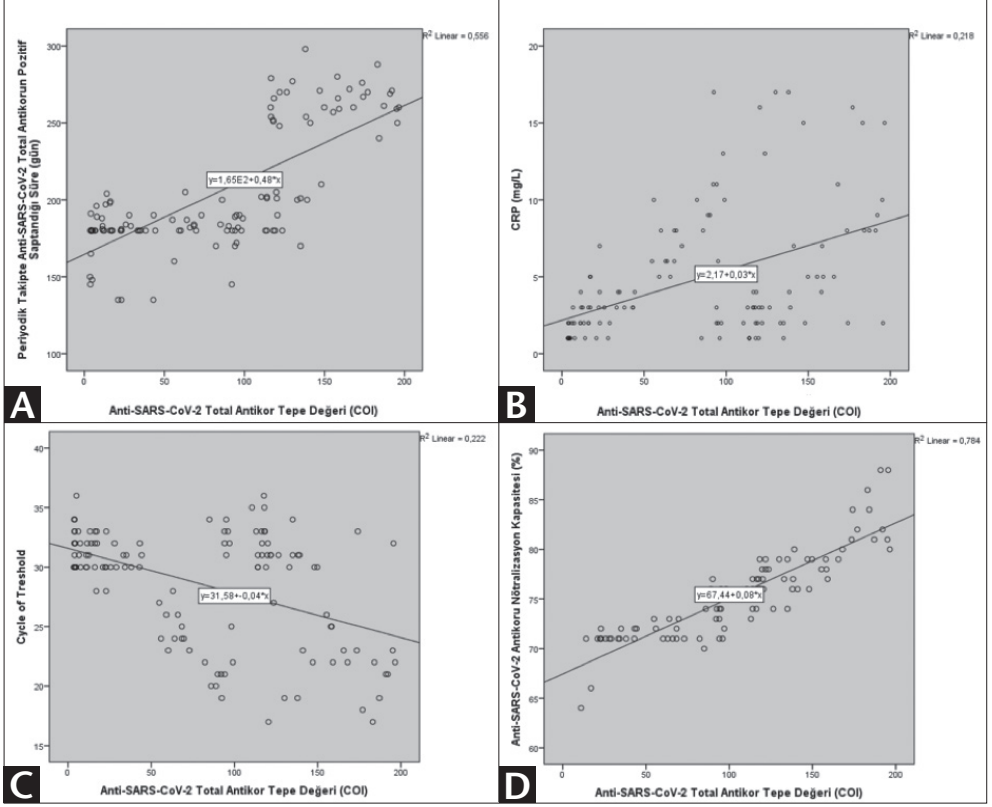
Anti-SARS-CoV-2 total antikor tepe değeriyle antikorların plazmada daha uzun süre saptanması arasında güçlü korelasyon görülmüştür ($r = 0.745$, $p < 0.001$) (Şekil 2A).



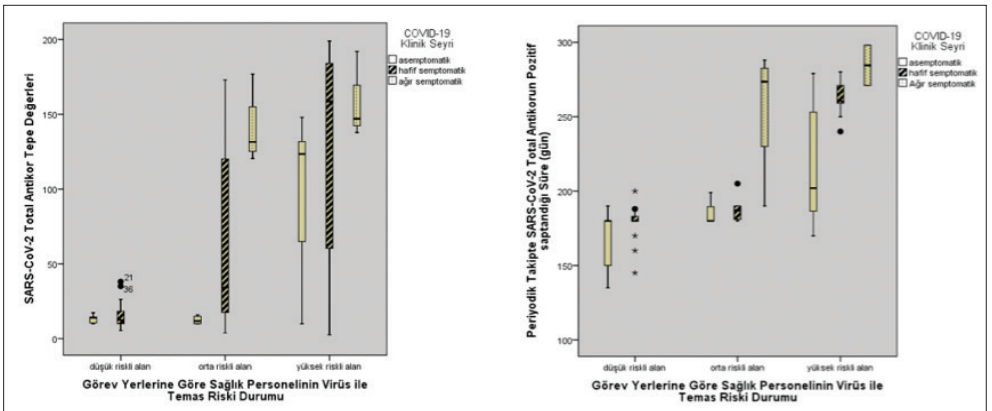
Şekil 1. Periyodik takipte anti-SARS-CoV-2 total antikor düzeyinin değişimi.

COVID-19 yoğun bakım ve acil serviste görevli olan üç hastanın ise titresi yüksek seyretmeye devam ettiği için istatistiksel analizlere dahil edilmemiştir. Çalışmaya dahil edilen olgular görev yerlerine göre virüs ile temas riski durumu ayrı ayrı değerlendirildiğinde, yüksek riskli alanlarda çalışanlarda antikor seviyelerinin daha uzun süre (246 gün $\pm$ 17.63) saptanmaya devam ettiği görülmüştür ($p < 0.02$) (Şekil 3). Hastaneye yatarak tedavi gören, radyolojik bulguların eşlik ettiği, oksijen desteği gereken ve CRP, D-dimer gibi hastalığın prognozuyla ilişkili laboratuvar parametrelerinin daha yüksek seyrettiği ağır semptomatik hastalarda antikor seviyeleri hastalığı asemptomatik geçirenlere göre daha uzun süreyle (258 gün $\pm$ 9.06) ve daha yüksek titrede (116 COI $\pm$ 23.27) ($p < 0.02$) sebat etmiştir. (Şekil 3). Serum CRP düzeyleri ile anti-SARS-CoV-2 total antikor tepe değerleri arasında pozitif ilişki görülmüştür ($r = 0.467$, $p < 0.02$) (Şekil 2B). Tüm anti-nükleokapsit total antikor pozitif olguların 17 (%13.8)'sinde RT-PCR ile virüs tespit edilemediği, klinik ve radyolojik olarak tanı konduğu izlenmiştir. Ancak, akut dönemde RT-PCR ile tanı konulanlarda "cycle of threshold (Ct)" ile serokonversiyon görülen hastaların anti-SARS-CoV-2 total antikor tepe değeri arasında zıt ilişki görülmüştür ($r = 0.571$, $p < 0.02$) (Şekil 2C). Ct değerleri daha düşük (yüksek viral yük) olan bireylerde dokuzuncu ay kontrolünde antikor titresi hala kesim değerin üzerinde saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen bireylerin 30-45 gün arası dönemde alınan plazmalarından ölçülen temsili virüs nötralizasyonu değerlendirildiğinde, 92 olgunun 90 (%97.8)'inde %70 üzerinde aktivite saptanmış, RBD-ACE2 bağlanma inhibisyonu ile antikor titresi arasında güçlü korelasyon izlenmiştir ($r = 0.886$, $p < 0.001$) (Şekil 2D).



Şekil 2. (A) Periyodik takipte anti-SARS-CoV-2 total antikoru pozitif saptandığı süre, (B) serum CRP düzeyi, (C) RT-PCR Ct değeri ve (D) anti-SARS-CoV-2 antikoru virüs nötralizasyon aktivitesi ile anti-SARS-CoV-2 total antikoru tepe değeri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi.



Şekil 3. Görev yerlerine göre sağlık personeli virüs ile temas risk durumuna düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç gruba ayrıldığında ve her grup içinde seymptomların varlığına göre ayrı değerlendirme yapıldığında; anti-SARS-CoV-2 total antikoru tepe değerlerinin ve periyodik takibinde pozitif saptandığı sürelerin karşılaştırılması.

TARTIŞMA

Epidemiyolojik araştırmalar göstermiştir ki mevsimsel koronavirüslerde aynı yıl içinde re-enfeksiyon mümkünken, SARS-CoV ve MERS-CoV enfeksiyonlarında antikorlar 1-3 yıl koruyuculuk sağlamaktadır^{16,17}. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonucu gelişen hücresel ve humoral immün yanıtın da aylarca süren bir bağışıklık sağladığı bilinmektedir. Ancak aynı yıl içinde re-enfeksiyonlar bildirilmeye başlanmıştır. Hastalığa karşı gelişen bağışıklığın ne kadar süreceği ve aşılama periyotları konusu halen belirsizdir.

Bu çalışmada, semptomatik veya asemptomatik olarak COVID-19 geçirdiği dokümanite edilmiş 123 sağlık çalışanını dokuz ay süreyle izleyerek total antikorların plazmadan kaybolma zamanını, ayrıca antikorların virüs nötralizasyon aktivitelerini ölçerek oluşan immün yanıtın koruyuculuk düzeyi araştırılmıştır.

Anti-SARS-CoV-2 antikorlarının kısa sürede kaybolması, özellikle asemptomatik geçiren genç bireyler aracılığıyla tespit edilmeden re-enfeksiyonlara ve toplumda virüsün pandemi koşullarında daha fazla dolaşımda olmasına yol açması yönünden önemlidir. Yaş artışının SARS-CoV-2'ye karşı oluşan immün yanıtla ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalarla uyumlu olarak, her 10 yıllık artışta tepe antikor seviyesinin ve antikor pozitiflik süresinin artış gösterdiği izlenmiştir¹⁷⁻²⁰. Yaşlılarda daha uzun süre antikorların yüksek seyretmesinden, coğrafyada mevcut diğer insan koronavirüslerine karşı oluşturdıkları antikorlarla oluşan çapraz immün yanıt sorumlu tutulabilirken, SARS-CoV ve MERS-CoV için aynı durum çok olası görünmemektedir^{21,22}. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları meta-analizde²³, en sık görülen komorbiditelerin bulgularımızla benzer şekilde hipertansiyon, diyabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar ve solunum sistemi hastalıkları olduğu bildirilmiştir.

L'Huillier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada²⁴ en sık görülen semptomlar; halsizlik (%87), miyalji (%73.5), baş ağrısı (%71), tat-koku kaybı (%69), öksürük (%63) ve ateş (%61) olarak bildirilirken, Wei-Jie Guan ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada²⁵, semptomlar; öksürük (%67), ateş (%43), yorgunluk (%38), balgam (%33), nefes darlığı (%18) ve baş ağrısı (%13) olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda da hastalarda en sık rastlanan semptomlar sırasıyla; halsizlik (%57), miyalji (%37), baş ağrısı (%34), ateş, öksürük, tat-koku kaybı ve boğaz ağrısıydı. Samira Fafi-Kremer ve arkadaşlarının COVID-19 geçiren hastane personeline yapmış olduğu çalışmada²⁶, iki olguda yoğun bakım ihtiyacı gelişirken, %96.9 (155/162) olgunun hastalığı semptomatik olarak geçirdiği bildirilmiştir. Bu çalışma verileriyle uyumlu olarak, toplumdan edinilen SARS-CoV-2 (%15 semptomatik) ile karşılaştırıldığında çalışmamıza dahil edilen sağlık çalışanları daha yüksek oranla (43/123, %34.9), COVID-19'u semptomatik geçirmiştir. Topluma oranla semptomatik hasta yüzdesinin daha yüksek oluşunun, sağlık çalışanlarının hastalıkla ilgili bilgi düzeylerinin ve farkındalıklarının yüksek olmasıyla da ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yine hastaların semptomlarının ağırlığıyla antikor yüksekliliği arasındaki pozitif korelasyonun gösterildiği çalışmalarla uyumlu olarak, semptomların ağırlığı ile antikor tepe değerleri ilişkili bulunmuştur^{17,19}. SARS-CoV-2 N bölgesine karşı oluşan antikorların plazmada anti-Spike antikorlarından daha önce ortaya çıkıp daha erken kaybolduğu önceki çalışmalarla gösterilmiştir^{17,19}. Buna rağmen, hastalığı semptomatik geçirenlerde anti-N antikorlarının kandan kaybolma sürelerinin, asemptoma-

tik geçirenlerle karşılaştırıldığında, ortalama 258 gün gibi uzun bir süre oluşu dikkat çekici bulunmuştur.

Geniş hasta gruplarıyla yapılmış çalışmalarda, anti-SARS-CoV-2 antikorların dört ay boyunca kanda saptanır düzeyde kaldığı bildirilmişken, son zamanlarda hafif semptomlarla COVID-19 geçiren sağlık çalışanlarında yapılan çalışmada bu sürenin altı ay olduğu belirtilmiştir^{7,26,27}. Çalışma bulgularımızda, özellikle 3-6 ay arası dönemde antikorların hızla düşerek yanlandığı gösterilmiştir. Ayrıca kandaki total antikor tepe noktasının 30-45. günler arasında gerçekleştiği gözlenmiştir. Bulgularımız, sürenin daha kısa olduğunu saptayan çalışmalarla uyumsuz olup, bu durumun sebebinin bizim IgG değil, total antikor düzeyi ölçmemizle ilişkili olabileceği düşünülmüştür^{26,28,29}. COVID-19 yoğun bakım ve acil serviste görevli olan üç hastanın ise titresinin yüksek seyretmeye devam etmesi yüksek viral yükte tekrarlayan karşılaşma olarak yorumlanmıştır. Sarı humma sonrası benzer sonuçların gözlemlendiğini belirten çalışmada, afinite olgunlaşması nedeniyle serum nötralizasyon titrelerinde hafif bir düşüşe rağmen antikorların 6-9 ay boyunca arttığı ifade edilmiştir³⁰. Anti-N antikorlarının güçlü kalıcılığının, zaman içinde giderek daha yüksek afiniteli antikorların tespitini yansıtır olması olasıdır. Bireyler arasında farklılıklar olmakla birlikte sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2 ile tekrarlayan karşılaşma riski yüksek olanlarda bile 9 ay itibarıyla antikorların büyük ölçüde kanda kaybolduğu görülmüştür.

CRP değerinin COVID-19 için hastalığın ağırlığını gösterebilecek bağımsız prediktif belirteç olabileceğinin gösterildiği çalışmalarla paralel olarak, hastaneye başvurularında yapılmış kan tetkiklerinde tepe antikor değeri yüksek hastalarda CRP değerleri daha yüksek seyretmiştir ve bakılan diğer biyokimyasal belirteçlere nazaran daha yüksek korelasyon saptanmıştır^{31,32}.

Tümü anti-nükleokapsit total antikor pozitif olguların 17 (%13.8)'sinde RT-PCR ile pozitiflik saptanamamış, klinik ve radyolojik olarak tanı konmuştur. Yalancı RT-PCR negatifliği, özellikle pandeminin ilk aylarındaki uygun olmayan örnek alımı ve transport koşulları, hastalık semptomlarının çok iyi bilinmemesi nedeniyle hastaneye başvuruda gecikme ve merkez sayısının azlığı nedeniyle daha az sayıda SARS-CoV-2 RT-PCR testi yapılıyor olması, ayrıca COVID-19 moleküler laboratuvarların ve testlerinin optimizasyon süreciyle ilgili olduğu düşünülmüştür. Yine de, RT-PCR ile pozitiflik saptanmış hastalarda, yapılmış diğer çalışma bulgularıyla uyumlu olarak düşük RT-PCR Ct değerleri tepe antikor seviyesiyle ilişkili bulunmuştur^{18,19}.

Nötralizan antikorlar, virüsün hücreye girişini bloke edebilir ve bu antikorların varlığı fonksiyonel antikorların göstergesidir, ancak hangi titrede hastalıktan koruyucu oldukları konusu halen belirsizdir. Çalışmamızda, antikorların virüs nötralizasyon aktivitesiyle tepe antikor titresi (30-45 gün arası ölçülen) arasında belirgin ilişki saptanmıştır. Bu çalışmada, antikorların virüs nötralizasyon ativitesinin tespiti için, RBD'ye yönelik oluşan antikorların temsili virüs nötralizasyon aktivitesini ölçen, ancak S proteininin S2 veya N-terminal alanını hedeflemeyen bir yöntem kullanılmıştır. Bununla birlikte çalışmalar, hücre bazlı nötralizasyon analizleri ile bu çalışmada kullanılan test arasında duyarlılık ve özgüllüğü açısından yüksek uyum göstermiştir³³.

Sonuç olarak, yetişkin yaştaki sağlık çalışanlarını ortalama dokuz ay süreyle izleyerek, COVID-19 hastalığının ağırlığıyla oluşan antikor seviyesi ve dolaşımdaki saptanma süresinin ilişkili olduğu görülmüştür; ayrıca yaş, komorbidite, tekrarlayan maruziyetle de antikor seviyesinin korelasyon gösterdiği, antikor tepe değerinin virüs nötralizasyon aktivitesi hakkında fikir verebileceği gözlenmiştir. Belirli aralıklarla antikor titrelerinin takibinin, kişilerin yeniden enfeksiyon geçirme riskinin başlayacağı ve aşılama ihtiyacının doğacağı sürenin belirlenmesinde yol gösterici olacağı kanaatine varılmıştır.

COVID-19 geçiren sağlık çalışanlarının büyük kısmında, enfeksiyondan altı ay sonra antikorlarının korunduğu görülmektedir. Bu güven verici olsa da, bu çalışmada bağışıklığın kalıcılığına katkı sağlayan bellek B ve T hücrelerinin varlığı araştırılamamıştır. Bu nedenle yeniden enfeksiyona ve/veya hastalığa karşı korumada hücresel ve humoral aracılı korumanın gösterilmesine yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, TC Sağlık Bakanlığı Bilimsel Araştırma Platformu (Başvuru No: 2020-12-20T22_52_22) ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 05.01.2021 ve Karar No: A-62).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Del Rio C, Malani PN. COVID-19: new insights on a rapidly changing epidemic. JAMA 2020; 323(14): 1339-40.
2. Sharfstein JM, Becker SJ, Mello MM. Diagnostic testing for the novel coronavirus. JAMA 2020; 323(15): 1437-8.
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. bioRxiv 2020.
4. Erensoy S. SARS-CoV-2 and microbiological diagnostic dynamics in COVID-19 pandemic. Mikrobiyol Bul 2020; 54(3): 497-509.
5. National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. Lancet Infect Dis 2020; 20(12): 1390-400.
6. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis 2020; 20(5): 565-74.
7. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. Sci Immunol 2020; 5(52): eabe0367.
8. Ju B, Zhang Q, Ge J, Wang R, Sun J, Ge X, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. Nature 2020; 584(7819): 115-9.
9. Suhandynata RT, Hoffman MA, Kelner MJ, McLawhon RW, Reed SL, Fitzgerald RL. Longitudinal monitoring of SARS-CoV-2 IgM and IgG seropositivity to detect COVID-19. J Appl Lab Med 2021; 6(2): 565.

10. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020; 71(8): 1930-4.
11. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; 26(6): 845-8.
12. Adams ER, Ainsworth M, Anand R, Andersson MI, Pauckland K, Baillie JK, et al. Antibody testing for COVID-19: A report from the National COVID Scientific Advisory Panel. *Wellcome Open Res* 2020; 5: 139.
13. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020; 383(18):1724-34.
14. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol* 2020; 5(12): 1598-1607.
15. Clinical Management of COVID-19. WHO/2019-nCoV/clinical/2020:5.
16. Edridge AWD, Kaczorowska J, Hoste ACR, Bakker M, Klein M, Loens K, et al. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nat Med* 2020; 26(11): 1691-3.
17. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, Yang B, Katzelnick LC, Rattigan SM, et al. A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat Commun* 2020; 11(1): 4704.
18. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; 26(8): 1200-04.
19. Lumley SF, Wei J, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, et al. Oxford University Hospitals Staff Testing Group. The duration, dynamics and determinants of SARS-CoV-2 antibody responses in individual healthcare workers. *Clin Infect Dis* 2021; 73(3): e699-e709.
20. Moderbacher CR, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* 2020; 183(4): 1-17.
21. Lipsitch M, Grad YH, Sette A, Crotty S. Cross-reactive memory T cells and herd immunity to SARS-CoV-2. *Nat Rev Immunol* 2020; 20(11): 709-13.
22. Iyer AS, Jones FK, Nodoushania A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* 2020.
23. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J of Infect Dis* 2020; 94: 91-5.
24. L'Huillier AG, Meyer B, Andrey DO, Arm-Vernez I, Baggio S, Didierlaurent A, et al. Antibody persistence in the first 6 months following SARS-CoV-2 infection among hospital workers: a prospective longitudinal study. *Clinical Microbiol Infect* 2021; 27(5): 784.e1-784.e8.
25. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020; 382(18): 1708-20.
26. Fafi-Kremer S, Bruel T, Madec Y, Grant R, Tondeur L, Grzelak L, et al. Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBio Medicine* 2020; 59: 102915.
27. Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020; 383(18) :1724-34.
28. Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur J Immunol* 1996; 26(2): 444-8.
29. Ibarondo FJ, Fulcher JA, Goodman-Meza D, Elliott J, Hofmann C, Hausner MA, et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383(11): 1085-7.
30. Wec AZ, Haslwanter D, Abdiche YN, Shehata L, Pedreno-Lopez N, Moyer CL, et al. Longitudinal dynamics of the human B cell response to the yellow fever 17D vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(12): 6675-85.

31. Luo X, Zhou W, Yan X, Guo T, Wang B, Xia H, et al. Prognostic value of C-reactive protein in patients with Coronavirus 2019. Clin Infect Dis 2020; 71(16): 2174-9.
32. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. Clin Chem Lab Med 2020; 58(7): 1131-4.
33. Tan CW, Chia WN, Qin X, Liu P, Tiu C, Hu Z, et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction. Nat Biotechnol 2020; 38(9): 1073-8.