

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε. Ι. ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΣ-ΜΠΟΥΡΜΠΟΥΛΗΣ

ΤΣΑΚΙΡΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ-ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΙΪΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΙ ΕΚΒΑΣΗ COVID-19»

ΑΘΗΝΑ 2021

Σύντομο Βιογραφικό

Γεννήθηκα στον Αρχάγγελο της Ρόδου το 1993. Ολοκλήρωσα τις προπτυχιακές σπουδές μου το 2017 στο Πανεπιστήμιο της Κρήτης με βαθμό Λίαν Καλώς. Κατόπιν υπηρέτησα τη στρατιωτική μου θητεία αρχικά στο Ναύπλιο και στη συνέχεια στο σεισμόπληκτο χωριό της Βρίσας στη Λέσβο τελώντας χρέη αγροτικού ιατρού. Παρέμεινα μετά το τέλος της θητείας μου έως το διορισμό μου στο Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο της Νίκαιας. Ως ειδικευόμενος της Γ' Παθολογικής Κλινικής είχα την τιμή και την χαρά να έχω ως διευθυντή μου τον Θεόδωρο Πέππα, ο οποίος με βοήθησε να αντιληφθώ την ομορφιά της Λοιμωξιολογίας. Από το 2019 είμαι φοιτητής στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών "ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ" υπεύθυνος του οποίου είναι ο καθηγητής Ευάγγελος Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης. Αν και μεγάλο μέρος του μεταπτυχιακού προγράμματος πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πανδημίας και κάτω από δύσκολες συνθήκες, μπορέσα να εργαστώ και να συνεισφέρω σε σημαντικά ερευνητικά πρωτόκολλα όπως η "ACHIEVE", η "SAVE" και η "SAVE MORE" που οργανώθηκαν και χρηματοδοτήθηκαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Μελέτης της Σήψης. Έχω 2 ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις και 11 γραπτές ανακοινώσεις σε ελληνικά επιστημονικά συνέδρια.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της. Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Ευάγγελο Γιαμαρέλλο-Μπουρμπούλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Η ευκαιρία που μας έδωσε κατά τη διάρκεια της πανδημίας να συνεισφέρουμε ενεργά και η δυνατότητα να συμμετάσχουμε σε κλινικές μελέτες, είναι δώρα που θα μας συντροφεύουν στην υπόλοιπη καριέρα μας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της κλινικής μελέτης "ACHIEVE".

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ευάγγελος Ι. Γιαμαρέλλος-Μπουρμπούλης
Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
2. Εριφύλη Χατζιαγγελάκη
Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.
3. Σταυρούλα Παπαδόδημα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Γενικό μέρος	1
Η επίδραση των συννοσηροτήτων στην έκβαση	2
Μεταβολή ηκού φορτίου και ανταπόκριση στη θεραπεία	3
Η ιαιμία ως δείκτης βαρύτητας	7
Συσχέτιση ηκού φορτίου και μεταδοτικότητας	9
Ηικό φορτίο και κάθετη μετάδοση	11
Ειδικό μέρος	13
Μέθοδοι	13
Αποτελέσματα	17
Συζήτηση	23
Βιβλιογραφία	23

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η εξέλιξη της πνευμονίας από τον νέο κορονοϊό SARS-CoV-2 (επίσης γνωστό ως COVID-19) είναι απρόβλεπτη. Γι αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητος ένας δείκτης που θα μπορούσε να βοηθήσει αποτελεσματικά στην πρόβλεψη της κλινικής πορείας των ασθενών, καθώς και του κινδύνου μετάδοσης και διασποράς των μεταλλάξεων του ιού. Σε πολλές μελέτες έχει μελετηθεί η δυνατότητα του ιικού φορτίου του SARS-CoV-2 τόσο στις αναπνευστικές εκκρίσεις όσο και στο αίμα να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης βαρύτητας των ασθενών. Έχει φανεί πως η μέτρηση του ιικού φορτίου θα μπορούσε να εκτιμήσει την εξέλιξη της πορείας των ασθενών, καθώς υπάρχει συσχέτιση με τις συννοσηρότητες των ασθενών και με τη φλεγμονώδη απόκριση. Πέραν αυτού, έχει φανεί ότι υψηλότερο ιικό φορτίο συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο μετάδοσης και δύναται να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η πιθανότητα οριζόντιας και κάθετης μετάδοσης δεδομένης και της γρήγορης διασποράς των μεταδόσεων των μεταλλάξεων του ιού.

Τα παραπάνω καθιστούν αναγκαία την εύρεση ενός φαρμάκου που θα ελαττώνει το ιικό φορτίο και κατ' επέκταση θα οδηγεί σε αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της λοίμωξης COVID-19. Η κλαριθρομυκίνη, που έχει αποτελέσει και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος και έρευνας, είναι γνωστό ότι πέραν των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων της, διαθέτει ανοσοτροποποιητική και αντιφλεγμονώδη δράση¹ Γι αυτόν το λόγο έχει προταθεί στο παρελθόν ως μία θεραπευτική επιλογή για ιογενείς αναπνευστικές λοιμώξεις, οι οποίες έχουν φλεγμονώδες υπόβαθρο. Σε προηγούμενες μελέτες έχει φανεί ότι η κλαριθρομυκίνη μειώνει αποτελεσματικά το ιικό φορτίο των ιών H5N1 και H7N9 της γρίπης των πτηνών σε μοντέλο ζώων². Επιπρόσθετα, σε ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό Β-λακτάμης και κλαριθρομυκίνης για σοβαρή πνευμονία κοινότητας, το ποσοστό θνητότητας μετά από 28 ημέρες ήταν 20,8%, ενώ σε ασθενείς που έλαβαν συνδυασμό Β-λακτάμης και αζιθρομυκίνης το ποσοστό θνητότητας ήταν 33,8 %³.

Η παρουσία συννοσηροτήτων σε ασθενείς με COVID-19 επηρεάζει καθοριστικά την κλινική τους πορεία, καθώς φαίνεται πως ορισμένα υποκείμενα νοσήματα συνδέονται με δυσμενή έκβαση. Σε τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, 577 ασθενείς με ήπια έως μέτρια λοίμωξη covid-19 έλαβαν μονοθεραπεία με μονοκλωνικό αντίσωμα bamlanivimab σε διαφορετικά δασολογικά σχήματα, τον συνδυασμό των μονοκλωνικών αντισωμάτων bamlanivimab με etesivimab ή εικονικό φάρμακο. Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν η μεταβολή του ιικού φορτίου στις 11 ± 4 ημέρες συγκριτικά με το ιικό φορτίο των ασθενών κατά την έναρξη της θεραπείας. Η κλινική δοκιμή έδειξε ότι το ιικό φορτίο μειώθηκε στις ομάδες των ασθενών που έλαβαν μονοθεραπεία με bamlanivimab και στους ασθενείς που έλαβαν τον συνδυασμό bamlanivimab με etesivimab, αλλά μόνο στην ομάδα που έλαβε τον συνδυασμό η μεταβολή του ιικού φορτίου ήταν στατιστικά σημαντική. Η αναλογία των ασθενών με νοσηλεία σχετιζόμενη με covid-19 ή με επίσκεψη σε τμήμα επειγόντων, που αποτελούσε δευτερογενές καταληκτικό σημείο, ήταν μικρότερη μεταξύ των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα. Ωστόσο, μόνο στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν τον συνδυασμό η αναλογία ήταν μικρότερη στατιστικά σημαντικά (0,9% των ασθενών, $P=0.049$) συγκριτικά με την ομάδα που έλαβε εικονικό φάρμακο (5,8% των ασθενών). Η κλινική δοκιμή έδειξε μία συσχέτιση της μείωσης του ιικού φορτίου με μείωση των νοσηλειών και των επισκέψεων στο τμήμα επειγόντων περιστατικών εξαιτίας της λοίμωξης COVID-19 σε ασθενείς με ήπια έως μέτρια νόσο. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι ασθενείς με συννοσηρότητες, όπως προχωρημένη ηλικία ή νοσογόνο παχυσαρκία, που έλαβαν εικονικό φάρμακο είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσηλευτούν, ενώ αντίθετα η δημογραφικά αντίστοιχη ομάδα ασθενών που έλαβε τον συνδυασμό δεν παρουσίασε τον ίδιο κίνδυνο. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι θεραπεία που μειώνει το ιικό φορτίο των ασθενών μπορεί να είναι ιδιαίτερα προστατευτική για ασθενείς με συννοσηρότητες. Οι ερευνητές σημειώνουν ότι όλοι οι ασθενείς, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που έλαβαν εικονικό φάρμακο παρουσίασαν μείωση του ιικού φορτίου στις 11 ± 4 ημέρες συγκριτικά με εκείνο που είχε ανιχνευθεί κατά την έναρξη της θεραπείας. Γι' αυτό θεωρούν ότι η μεταβολή του ιικού φορτίου την 3^η ή την 7^η ημέρα από την έναρξη της θεραπείας ίσως είναι πιο αντιπροσωπευτική της αποτελεσματικότητας της θεραπείας⁴. Σε μελέτη που περιελάμβανε φορείς HIV

με συλλοίμωξη από SARS-CoV-2 φάνηκε ότι οι ασθενείς αυτοί έχουν υψηλότερο κίνδυνο για να εκδηλώσουν σοβαρή COVID-19, αν και ο κίνδυνος είναι συγκρίσιμος με εκείνον του γενικού πληθυσμού. Η θνητότητα δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των φορέων HIV και του γενικού πληθυσμού. Μία πιθανή εξήγηση γι' αυτό είναι ότι οι φορείς HIV παρουσιάζουν μία μόνιμη ανοσιακή δραστηριότητα εξαιτίας της ανεπάρκειας του ανοσιακού συστήματος, που εμποδίζει την εξέλιξη της νόσου. Παρά το γεγονός ότι οι ασθενείς ελάμβαναν αντιρετροϊκή αγωγή ήταν πιθανότερο να έχουν υψηλότερο ιικό φορτίο του HIV, ειδικά οι ασθενείς με σοβαρή/κρίσιμη νόσο. Αυτό πιθανά οφείλεται στην εξάντληση των CD8⁺ κυττάρων, ως επακόλουθο της λοίμωξης από SARS-CoV-2 και η οποία είναι ανάλογη της βαρύτητας της νόσου. Αν και οι δύο λοιμώξεις οδηγούν σε μείωση του αριθμού των CD4⁺ κυττάρων, δε φάνηκε να υπάρχει μία αθροιστική επίπτωση στους ασθενείς που μελετήθηκαν⁵.

Η μεταβολή του ιικού φορτίου συνδέεται με την έκβαση των ασθενών και θα μπορούσε να αποτελέσει ένα δείκτη αποτελεσματικότητας και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Σε μια πιλοτική, διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη 24 ασθενείς έλαβαν ιβερμεκτίνη ή εικονικό φάρμακο. Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης ήταν η ανίχνευση Sars-CoV-2 RNA με PCR για τα γονίδια E και N του ιού σε ρινοφαρυγγικό επίχρισμα την 7^η ημέρα από την έναρξη της θεραπείας. Επίσης το πρωτογενές καταληκτικό σημείο ενισχύθηκε από τον ποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου και της μολυσματικότητας κάθε δείγματος. Το ιικό φορτίο που ανιχνεύθηκε στους ασθενείς που έλαβαν ιβερμεκτίνη την 4^η και την 7^η ημέρα θεραπείας ήταν 3 και 18 φορές μικρότερο συγκριτικά με το ιικό φορτίο αναφοράς. Αν και υπήρχε μία τάση για χαμηλότερες τιμές ιικού φορτίου μεταξύ των ασθενών που έλαβαν ιβερμεκτίνη, η μεταβολή του ιικού φορτίου των ασθενών που έλαβαν θεραπεία σε σύγκριση με εκείνη των ασθενών που έλαβαν εικονικό φάρμακο δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Οι ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο ανέφεραν 50% (76 vs 158) και 30% (68 vs 97) περισσότερες ημέρες που παρουσίασαν ανοσμία/ αγευσία και βήχα αντίστοιχα συγκριτικά με τους ασθενείς που έλαβαν ιβερμεκτίνη, ενώ δεν υπήρχε όφελος ως προς τον πυρετό και την κακουχία. Αυτό υποδεικνύει ότι ακόμα και αυτή η στατιστικά μικρή τάση για χαμηλότερα ιικά φορτία στην ομάδα ασθενών που έλαβε ιβερμεκτίνη είχε ως αποτέλεσμα ηπιότερη πορεία νόσου και κλινικό όφελος ως προς τα συμπτώματα του covid-19 που σχετίζονται με

ιστική βλάβη όπως η ανοσμία/αγευσία και ο βήχας⁶. Σε μία μελέτη κοόρτης οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν βάσει της βαρύτητας των συμπτωμάτων και την ανάγκη για νοσηλεία, ενώ υπήρχε μία παράλληλη ομάδα ελέγχου που απαρτιζόταν από επαγγελματίες υγείας, οι οποίοι δεν είχαν μολυνθεί. Στους συμμετέχοντες της μελέτης έγινε προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε δείγμα σιέλου ρινοφαρυγγικού επιχρίσματος με RT-PCR, ενώ ταυτόχρονα έγινε προσδιορισμός των επιπέδων κυτοκινών, χημειοκινών και αντισωμάτων στο πλάσμα, καθώς και του πληθυσμού των λευκών κυττάρων. Διαπιστώθηκε μία συσχέτιση μεταξύ υψηλότερων ιικών φορτίων και προχωρημένης ηλικίας, καρδιακής ανεπάρκειας, κακοήθειας, ορισμένων μορφών ανοσοκαταστολής αλλά και χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας και υπέρτασης που δεν είχε φανεί σε προηγούμενες μελέτες. Επιπλέον, η μελέτη έδειξε όχι μόνο τη συσχέτιση των παραγόντων κίνδυνων με τις υψηλές τιμές ιικού φορτίου, αλλά και την επιβαρυντική επίδραση που έχουν, αποτέλεσμα που αιτιολογεί τον αυξημένο κίνδυνο για χειρότερη έκβαση σε ασθενείς με πολλαπλούς παράγοντες κινδύνου. Επίσης, τα ιικά φορτία ήταν σημαντικά υψηλότερα στους άνδρες ασθενείς συγκριτικά με τις γυναίκες, δείχνοντας πως το φύλο αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Τα υψηλότερα ιικά φορτία αποτυπώνουν την αποτυχία των μηχανισμών της φυσικής ανοσίας να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά τον ιό. Οι ασθενείς με υψηλότερα ιικά φορτία απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις αντισωμάτων και μεγαλύτερη αναλογία αντισωμάτων-ιικών φορτίων για να υπερνικήσουν τα υψηλά ιικά φορτία. Πράγματι, οι ασθενείς της μελέτης με υψηλότερα ιικά φορτία χρειάστηκαν σημαντικά περισσότερες ημέρες για να επιτύχουν χαμηλά ιικά φορτία συγκριτικά με τους ασθενείς με μέτριας βαρύτητας νόσο ή ασθενείς που δεν έχρηζαν νοσηλείας. Επιπρόσθετα, οι ασθενείς που απεβίωσαν παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο αριθμό λεμφοκυττάρων και λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών, συμπεριλαμβανομένων των CD4, με συνέπεια την καθυστερημένη παραγωγή αντισωμάτων. Οι ασθενείς που επιβίωσαν παρήγαγαν επαρκείς συγκεντρώσεις αντισωμάτων ώστε να αντισταθμίσουν τα υψηλά ιικά φορτία, σε αντίθεση με τους ασθενείς που απεβίωσαν οι οποίοι δεν μπόρεσαν να επιτύχουν ανάλογο αποτέλεσμα. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι υπάρχει ένα χρονικό παράθυρο για την εφαρμογή των παρεμβάσεων, με στόχο τη μείωση των ιικών φορτίων πριν την εξάντληση των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών τη 10^η-20^η ημέρα από την έναρξη

των συμπτωμάτων, η οποία συμβάλλει στην ήδη μειωμένη παραγωγή αντισωμάτων.

Ενώ μερικά φάρμακα ή μονοκλωνικά αντισώματα σχεδιάστηκαν για να μειώσουν το συνολικό ιικό φορτίο, δεν έχουν επιτύχει ουσιαστικά αποτελέσματα στις κλινικές δοκιμές. Αυτό εξηγεί την ανικανότητα τους να επιτύχουν μείωση του της επίβαρυνσης των ασθενών στα πρώιμα αυτά στάδια της νόσου⁷. Σύμφωνα με τη μελέτη του ιικού φορτίου εκφρασμένο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης στο ανώτερο αναπνευστικό σύστημα σε 1122 ασθενείς, οι ασθενείς με υψηλά ιικά φορτία έτειναν να είναι μεγαλύτερης ηλικίας συγκριτικά με εκείνους με μέτρια ή χαμηλά ιικά φορτία. Το 29,3% των παιδιών <18 ετών είχαν υψηλό ιικό φορτίο, εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες και υποδηλώνει ότι τα παιδιά διαδραματίζουν ρόλο στη μετάδοση εντός του οίκου τους. Γι' αυτό το ιικό φορτίο εκφρασμένο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για συνέχιση ή μη της απομόνωσης. Ταυτόχρονα, η μελέτη έδειξε μία συσχέτιση των υψηλών ιικών φορτίων με παρουσία ορισμένων συννοσηροτήτων, ενώ και σ' αυτή τη μελέτη τα υψηλά ιικά φορτία ήταν πιθανότερο να ανιχνευθούν μεταξύ των συμπτωματικών ασθενών. Επίσης, τα υψηλά ιικά φορτία συσχετίστηκαν με αυξημένο κίνδυνο για διασωλήνωση και θάνατο, καθώς και με παρατεταμένη σοβαρότητα της νόσου όπως προκύπτει από την παρατεταμένη διάρκεια διασωλήνωσης και τη μεγαλύτερης διάρκειας παραμονή στη μονάδα εντατικής θεραπείας⁸. Σε προοπτική μελέτη 52 ασθενών έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου στο αίμα των ασθενών με covid-19. Όλοι οι ασθενείς με κρίσιμη νόσο, η οποία ορίστηκε σύμφωνα με τις Κινέζικες Κατευθυντήριες Οδηγίες για τη διαχείριση της COVID-19 (έκδοση 7.0), απέτυχαν να περιορίσουν αποτελεσματικά το ιικό φορτίο στο αίμα, σε αντίθεση με τους ασθενείς με μέτρια και σοβαρή νόσο, οι οποίοι επέτυχαν πλήρη εκκαθάριση του ιικού φορτίου. Ταυτόχρονα το ιικό φορτίο των ασθενών με κρίσιμη νόσο ήταν σημαντικά υψηλότερο από εκείνο των ασθενών με μέτρια ή σοβαρή νόσο, εύρημα που εν μέρει μπορεί να αποδοθεί στην επηρεασμένη ικανότητα των ασθενών αυτών να παράξουν SARS-CoV-2 ειδικά αντισώματα. Αν και το ιικό φορτίο δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των ασθενών με μέτρια και σοβαρή νόσο, στους ασθενείς με σοβαρή νόσο σημειώθηκε μια ισχυρότερη φλεγμονώδης απόκριση που αποτυπώθηκε στα υψηλότερα επίπεδα CRP.

Αυτό υποδεικνύει ότι ανοσοτροποποιητικές θεραπείες που θα περιορίσουν την υπερφλεγμονώδη απόκριση του ξενιστή θα μπορούσε να είναι ωφέλιμη σε ασθενείς με σοβαρότερη νόσο. Επιπρόσθετα, στο 50% των ασθενών (15/30) το ιικό φορτίο στο αίμα παρέμεινε θετικό μετά την έξοδο τους, ενώ επέτυχαν πλήρη εκκαθάριση στο follow-up. Αυτό δείχνει ότι είναι πιθανό η πλήρης εκκαθάριση του ιικού φορτίου να απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα⁹. Σε μία προσπάθεια να καθοριστούν οι κλινικές παράμετροι που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ταχεία πρόβλεψη της εξέλιξης της νόσου των ασθενών, έγινε μέτρηση σε 170 ασθενείς του ιικού φορτίου και εργαστηριακών παραμέτρων που έχουν συνδεθεί με χειρότερη πρόγνωση. Υπήρχε μία σαφής σύνδεση μεταξύ των ρινοφαρυγγικών ιικών φορτίων, της φλεγμονής του πνευμονικού ιστού, η οποία αποτυπώνεται κλινικά ως υποξαιμία, και της έκβασης των ασθενών. Αν και υπάρχουν άλλοι δείκτες που θα ήταν ίσως περισσότερο αποδεκτοί για την εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου όπως η IL-6, η μέτρηση τους στην καθημερινή κλινική πράξη δεν είναι εφικτή και οι υψηλές τιμές τους μπορεί να είναι απόρροια άλλων φλεγμονωδών καταστάσεων. Παρά τις όποιες διαφορές στη διαδικασία λήψης του δείγματος ή τις τεχνικές παραλλαγές, το ρινοφαρυγγικό ιικό φορτίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα γρήγορο και εύκολα προσβάσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της βαρύτητας των ασθενών¹⁰.

Σε μία μελέτη όπου μελετήθηκε το ιικό φορτίο 678 ασθενών φάνηκε σαφής συσχέτιση μεταξύ του ιικού φορτίου και του κινδύνου διασωλήνωσης. Επιπρόσθετα η παρουσία ορισμένων συννοσηροτήτων συνδέθηκε με υψηλότερο ιικό φορτίο και χειρότερη έκβαση, ενώ οι ασθενείς αυτοί είχαν και αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσουν έμφραγμα του μυοκαρδίου, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και οξεία νεφρική βλάβη. Συνυπολογίζοντας αυτά τα κοινά χαρακτηριστικά των ασθενών θα ήταν εφικτό να καθοριστεί ποιοι ασθενείς θα μπορούσαν να ωφεληθούν περισσότερο από την αντιική ή την ανοσοτροποποιητική αγωγή¹¹. Σε μία ανάλυση περιστατικού ενός ασθενούς που παρουσίασε υπερπηκτικότητα, ενώ ελάμβανε υποστηρικτική οξυγονοθεραπεία μέσω εξωσωματικής μεμβράνης οξυγόνωσης, φάνηκε ότι η μέτρηση του ιικού φορτίου βοήθησε στο να αποφασιστεί κατά πόσο ήταν ωφέλιμο να συνεχιστεί και να γίνει αντικατάσταση του κυκλώματος, στο οποίο βρέθηκαν θρόμβοι. Η μέτρηση του ιικού φορτίου αποτέλεσε έναν αξιόπιστο

δείκτη εκτίμησης της βαρύτητας και της πρόγνωσης. Η μέτρηση του ιικού φορτίου στο αίμα θα μπορούσε να είναι καλύτερος δείκτης για να αξιολογηθεί η βαρύτητα της νόσου, καθώς, όπως φάνηκε και σε προηγούμενες μελέτες, οι ασθενείς που παρουσιάζουν RNAαίμια έχουν κρίσιμη νόσο. Ο υπολογισμός του αριθμού των RNA αντιγράφων/ μL μπορεί πιθανά να χρησιμοποιηθεί για να γίνει παρακολούθηση της μεταβολής του ιικού φορτίου¹².

Η παρουσία Sars-CoV-2 RNA στο αίμα των ασθενών έχει συνδεθεί με χειρότερη έκβαση και πιθανά αποτελεί δείκτη βαρύτητας της νόσου. Σε ανάλυση 11 περιπτώσεων ασθενών με covid-19, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε μεταθανάτια ιατροδικαστική εξέταση, έγινε ανίχνευση του Sars-CoV-2 RNA στον κερατοειδή. Συνολικά σε 170 ασθενείς έγινε μέτρηση ιικού φορτίου σε φαρυγγικό δείγμα για επιλεξιμότητα και επιλέχθηκαν ασθενείς με υψηλό ιικό φορτίο, χωρίς να υπάρχει μια καθορισμένη τιμή εισόδου στη μελέτη, ενώ από τους ασθενείς έγινε ανίχνευση ιικού φορτίου και σε άλλα κλινικά δείγματα που ελήφθησαν όπως φλεβικό αίμα ή επίχρισμα επιπεφυκότα. Στο 55%(6/11) και 46%(5/11) των ασθενών ανιχνεύθηκε Sars-CoV-2 RNA στον κερατοειδή και στον επιπεφυκότα αντίστοιχα. Το ποσοστό ανίχνευσης του ιού στον επιπεφυκότα ήταν πολύ μεγαλύτερο συγκριτικά με αυτό που είχε αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες (1,4-4,5%). Επίσης, το 67%(4/6) και το 80 % (4/5) των ασθενών με θετική PCR στο επίχρισμα του κερατοειδούς και του επιπεφυκότα αντίστοιχα είχαν Sars-CoV-2 ιαίμια. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η ιαίμια είναι μία σπάνια κατάσταση μεταξύ των ασθενών με covid-19 (1% ή 8% των ασθενών). Η μεγάλη διαφορά ως προς το ποσοστό των ασθενών που είχαν Sars-CoV-2 ιαίμια (56%) είναι πιθανό να εξηγείται από τα υψηλά ιικά φορτία βάσει των οποίων επιλέχθηκαν οι ασθενείς της μελέτης. Επιπρόσθετα οι ασθενείς στους οποίους ανιχνεύθηκαν υψηλά ιικά φορτία και είχαν ιαίμια, ήταν πιθανότερο να παρουσιάσουν οφθαλμική συμμετοχή που αποτυπώνεται στο θετικό αποτέλεσμα της PCR για Sars-CoV-2 από επιχρίσματα κερατοειδούς, επιπεφυκότα και υδατοειδούς υγρού. Η ανίχνευση ιικού φορτίου στον κερατοειδή πιθανώς οφείλεται σε επιμόλυνση του μέσω του αίματος ή του υδατοειδούς υγρού¹³. Σε 191 ασθενείς έγινε ανίχνευση Sars-CoV-2 RNA σε πλάσμα και ρινοφάρυγγα και διερευνήθηκε η συσχέτιση της ιαίμιας με τη σοβαρότητα της νόσου, την κλινική πορεία και τις εξωπνευμονικές εκδηλώσεις.

Η ιαιμία εκδηλώνεται πρώιμα σε σχέση με τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου που κορυφώνονται αργότερα και έχουν παρατεταμένη διάρκεια. Οι ασθενείς με ιαιμία είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να επιδεινωθούν μετά τη διάγνωση και σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τους ασθενείς χωρίς ιαιμία. Παράλληλα διαπιστώθηκε μία σύνδεση της ιαιμίας με εξωπνευμονικές εκδηλώσεις που δεν είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Η κινητική της ιαιμίας ακολουθεί ένα τυπικό μοτίβο σύμφωνα με το οποίο το ιικό φορτίο στο πλάσμα κορυφώνεται πρώιμα κατά την έναρξη της νόσου, ακολουθείται από μία γρήγορη πτώση που αποτυπώνει την απάντηση της φυσικής ανοσίας, φτάνοντας στην αρνητικοποίηση ως αποτέλεσμα της απάντησης της επίκτητης ανοσίας. Η πρώιμη εμφάνιση της ιαιμίας και η προγνωστική της αξία ως προς τη σοβαρότητα και την έκβαση της νόσου, την καθιστούν ένα επιπρόσθετο εργαλείο που μπορεί να κατευθύνει την έγκαιρη έναρξη θεραπειών με στόχο τη βελτίωση της κλινικής πορείας των ασθενών¹⁴. Σε μελέτη που περιελάμβανε 32 ασθενείς διερευνήθηκε η συσχέτιση του ιικού φορτίου στο αίμα και στις αναπνευστικές εκκρίσεις με την παραγωγή των αντισωμάτων και τη σοβαρότητα της νόσου. Συνολικά στο 44% των ασθενών ανιχνεύθηκε ιικό φορτίο στο αίμα, ενώ 83% των ασθενών που απεβίωσαν (5/6) είχαν ιαιμία. Οι τίτλοι των SARS-CoV-2 IgG ήταν σημαντικά χαμηλότεροι στους ασθενείς με ήπια/μέτρια νόσο συγκριτικά με τους ασθενείς με σοβαρή και κρίσιμη νόσο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης (CT) ήταν αντιστρόφως ανάλογος των τίτλων των SARS-CoV-2 IgG και της σοβαρότητας της νόσου. Οι ασθενείς, στους οποίους ανιχνεύθηκε ιικό φορτίο στο αίμα είχαν χειρότερη πρόγνωση¹⁵.

Σε μία αναδρομική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 167 ασθενείς διερευνήθηκε η πιθανή ύπαρξη SARS-CoV-2 RNA στον ορό και η συσχέτιση με την έκβαση των ασθενών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία SARS-CoV-2 RNA στον ορό συνδέεται με επταπλάσιο κίνδυνο ο ασθενής να παρουσιάσει κρίσιμη νόσο και οκταπλάσιο κίνδυνο θανάτου, ενώ η απουσία με υψηλότερη πιθανότητα για ανεπιπλεκτή ανάρρωση. Η ηλικία αποτέλεσε ανεξάρτητο παράγοντα κρίσιμης νόσου και θανάτου και οι ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας παρουσίασαν αυξημένο ιικό φορτίο. Τα αποτελέσματα οφείλονται στη μειωμένη ικανότητα των ηλικιωμένων ασθενών να περιορίσουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η ανίχνευση SARS-CoV-2 RNA στον ορό θα

μπορούσε να είναι συνέπεια διαφυγής από ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη λόγω φλεγμονώδους απάντησης. Ωστόσο η παρουσία SARS-CoV-2 RNA πριν την επιδείνωση της νόσου δείχνει πως ο ιός προκαλεί τη φλεγμονώδη απάντηση. Οι τιμές των ιικών φορτίων στο πλάσμα μεταξύ των ασθενών που εκδήλωσαν σοβαρή νόσο ήταν υψηλές παρουσιάζοντας μία ομοιογένεια που δεν είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες¹⁶. Σε μία μελέτη 85 ατόμων ελέγχθηκε η ύπαρξης RNAιμίας στους ασθενείς και κατόπιν αναλύθηκε η σύνδεση με τα δημογραφικά δεδομένα, τα εργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα, τις συννοσηρότητες και την έκβαση των ασθενών. Το ιικό φορτίο από φαρυγγικό επίχρισμα ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με το ιικό φορτίο του πλάσματος. Το γεγονός ότι το ποσοστό των θετικών δειγμάτων πλάσματος το πρώτο δεκαπενθήμερο από την έναρξη των συμπτωμάτων ήταν μεγαλύτερο από εκείνο των θετικών φαρυγγικών δειγμάτων που υποδηλώνει ότι η PCR που πραγματοποιείται στον ορό είναι πιο ευαίσθητη από αυτή των αναπνευστικών δειγμάτων. Ενώ το ιικό φορτίο του SARS-CoV μεγιστοποιείται την 3η ημέρα από την έναρξη των συμπτωμάτων, το φορτίο του SARS-CoV-2 είναι μέγιστο την 11η μέρα. Αυτό πιθανά εξηγεί τη γρηγορότερη χρονικά επιδείνωση των SARS-ασθενών. Ο κίνδυνος RNAιμίας σε ασθενείς με θερμοκρασία εισαγωγής $>39^{\circ}\text{C}$ ήταν 11,63 φορές υψηλότερος σε σχέση με τους ασθενείς με $<37,5^{\circ}\text{C}$ και 3,03 φορές υψηλότερος σε ασθενείς που παρουσίασαν βήχα. Με βάση τα εργαστηριακά ευρήματα τα όργανα που βλάπτονται περισσότερο εξαιτίας της φλεγμονώδους απάντησης ήταν κατά σειρά οι πνεύμονες, η καρδιά και οι νεφροί, ενώ παράλληλα υπήρχε διαταραχή του συστήματος πήξης. Τα ευρήματα αυτά οφείλονται πιθανά στην υψηλότερη συγκέντρωση υποδοχέων μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης II στα όργανα αυτά, κάτι που εξηγεί και τη μικρότητα συχνότητα κλινικών εκδηλώσεων από το ΚΝΣ παρά την RNAιμία. Η RNAιμία συνδέθηκε στη μελέτη με χειρότερη έκβαση των ασθενών, ενώ από τα εργαστηριακά ευρήματα στους ασθενείς αυτούς αξιοσημείωτα ήταν η αυξημένη τιμή CRP, ο αυξημένος αριθμός ουδετερόφιλων και ο μειωμένος αριθμός λεμφοκυττάρων¹⁷.

Σε μελέτες έχει φανεί ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ ιικού φορτίου και της μετάδοσης της λοίμωξης. Συνεπώς, η αξιολόγηση του ιικού φορτίου και της μεταβολής του είναι ουσιώδους σημασίας για την πορεία και την απομόνωση των ασθενών. Σε διαφορετικά κλινικά δείγματα 145 ασθενών

μελετήθηκε τα χαρακτηριστικά του ιικού φορτίου, η διάρκεια αποβολής ιικών σωματιδίων (shedding), καθώς και η επίδραση τους στην έκβαση των ασθενών. Αν και ο ιός εντοπίζεται κυρίως στο αναπνευστικό σύστημα, ιικό φορτίο ανιχνεύθηκε επίσης σε αίμα, σε οφθαλμικό έκκριμα και στον γαστρεντερικό σωλήνα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν υψηλότερο κατά την εισαγωγή των ασθενών, άρχισε να μειώνεται μετά την έναρξη της θεραπείας, μειώθηκε ραγδαία εντός των 10 ημερών από την έναρξη της θεραπείας και συνέχισε να ελαττώνεται σταδιακά έως πολύ χαμηλά επίπεδα ή αρνητικοποίηση. Στη συγκεκριμένη μελέτη μόνο η θεραπεία με χλωροκίνη φάνηκε να έχει προστατευτική δράση ως προς τη μείωση αποβολής ιικών σωματιδίων. Η αποβολή των ιικών σωματιδίων επηρεάστηκε από το διάστημα μεταξύ της έναρξης της νόσου και της εισαγωγής, με την καθυστερημένη εισαγωγή να συνδέεται με παρατεταμένη αποβολή ιικών σωματιδίων, μεγαλύτερη πιθανότητα για εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας και μικρότερη πιθανότητα επιβίωσης. Το εύρημα αυτό δείχνει ότι η πρόωγη ανίχνευση και η έγκαιρη παρέμβαση αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την έκβαση των ασθενών. Ακόμη, φάνηκε ότι οι ηλικιωμένοι ασθενείς παρουσίαζαν υψηλότερα ιικά φορτία, εύρημα που αντανάκλα την ανικανότητα του ανοσιακού συστήματος των ασθενών αυτών να περιορίσουν αποτελεσματικά τον ιικό πολλαπλασιασμό, με αποτέλεσμα παρατεταμένη αποβολή ιικών σωματιδίων¹⁸.

Σε μελέτη συγκρίθηκε το ιικό φορτίο του SARS-CoV-2 με το ιικό φορτίο άλλων αναπνευστικών ιών, με σκοπό να προσδιοριστεί το κατά πόσο επηρεάζει τη μεταδοτικότητα. Το ιικό φορτίο του SARS-CoV-2 ήταν συγκρίσιμο με εκείνο του RSV και του ιού της γρίπης τύπου Β. Όσο μικρότερο ποσοτικά ήταν το ιικό φορτίο τόσο μικρότερος ήταν ο κίνδυνος μετάδοσης του SARS-CoV-2. Ωστόσο όπως τόνισαν και οι συγγραφείς της μελέτης, η προσέγγιση θα πρέπει να είναι προσεκτική σε περίπτωση που έχουμε μόνο μία τιμή ιικού φορτίου, καθώς σημειώνεται μία φυσική σταδιακή μείωση του ιικού φορτίου από ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα κατά τη διάρκεια του κύκλου της νόσου¹⁹. Σε μία αναδρομική μελέτη 303 ατόμων συγκρίθηκε το ιικό φορτίο μεταξύ συμπτωματικών και ασυμπτωματικών ασθενών, με σκοπό να καθοριστεί ο ρόλος των ασυμπτωματικών ασθενών στη διασπορά του ιού. Σε ό,τι αφορά τους ασυμπτωματικούς ασθενείς φάνηκε ότι το ιικό φορτίο τους ήταν παρόμοιο με

εκείνο των συμπτωματικών ασθενών, ενώ παράλληλα το 80,9% των ασθενών παρέμειναν ασυμπτωματικοί για αρκετές ημέρες μετά τη θετική PCR. Το ποσοστό αυτό ήταν σαφώς υψηλότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο προηγούμενων μελετών. Παρά το γεγονός ότι δεν μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανότητα μετάδοσης του ιού από τους ασυμπτωματικούς ασθενείς, είναι πιθανό ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη διασπορά του ιού. Γι'αυτό είναι λογικό να γίνεται εκτετάμενο screening, ώστε να είναι εφικτή η έγκαιρη απομόνωση των ασθενών με θετική PCR²⁰.

Η μέτρηση του ιικού φορτίου θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η πιθανότητας οριζόντιας και κάθετης μετάδοσης του ιού. Σε μία προοπτική μελέτη όπου μελετήθηκαν 127 εγκυμοσύνες, ανιχνεύθηκε το ιικό φορτίο στο πλάσμα και στις αναπνευστικές εκκρίσεις της μητέρας και στο ομφάλιο αίμα, η ποσοτικοποίηση των anti-SARS-CoV-2 αντισωμάτων στο μητρικό και στο ομφάλιο αίμα, καθώς και η παρουσία Sars-CoV-2 RNA στον πλακούντα. Μεταξύ των μητέρων δε σημειώθηκε κάποια περίπτωση ιαιμίας, εύρημα που δείχνει την πιθανότητα ενισχυμένου ιικού ελέγχου. Η απουσία ιαιμίας μεταξύ των μητέρων είναι λογική δεδομένου της χαμηλής επίπτωσης διαπλακουντιακής λοίμωξης και της χαμηλής πιθανότητας διαπλακουντιακής μετάδοσης. Το ιικό φορτίο στις αναπνευστικές εκκρίσεις ήταν σημαντικά πιθανότερο να ανιχνευθεί στα κλινικά δείγματα που πάρθηκαν πλησιέστερα του ρινοφάρυγγα και, όπως και σε προηγούμενες μελέτες, η νόσος ήταν σοβαρότερη μεταξύ των ασθενών με αυξημένο ιικό φορτίο. Στη μελέτη αυτή σημειώθηκε μειωμένη διαπλακουντιακή μεταφορά αντισωμάτων συγκριτικά με άλλα νοσήματα, πιθανά λόγω τροποποίησης των SARS-CoV-2 ειδικών αντισωμάτων χωρίς να αποσαφηνίζεται ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός. Καμία περίπτωση ύποπτης κάθετης μετάδοσης δεν παρατηρήθηκε και καμία περίπτωση διαπλακουντιακής λοίμωξης δε σημειώθηκε υποδηλώνοντας την πιθανή παρουσία ενδογενών αμυντικών μηχανισμών έναντι της κάθετης μετάδοσης²¹. Σε μία άλλη αναδρομική μελέτη διάρκειας 4 εβδομάδων όπου μελετήθηκαν 57 εγκυμοσύνες, μελετήθηκε η σοβαρότητα της λοίμωξης κατά την εγκυμοσύνη, η πορεία νόσου των ασθενών και ο κίνδυνος κάθετης μετάδοσης της νόσου. Στη μελέτη αυτή η πλειοψηφία των καισαρικών τομών διενεργήθηκε εξαιτίας δυσχέρειας του νεογνού, που είναι πιθανό να οφείλεται σε υποκείμενη παθολογία πλακουντιακής

ανεπάρκειας ή υποξίας στη λοίμωξη COVID-19. Δεν ανευρέθηκε συσχέτιση μεταξύ των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης και των κλινικών συμπτωμάτων, αλλά αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός οι περισσότεροι ασθενείς παρουσίασαν ήπια συμπτωματολογία. Στη συγκεκριμένη κανένα από τα SARS-CoV-2 θετικά νεογνά δεν παρουσίασε σοβαρές εκδηλώσεις της νόσου. Αυτό δείχνει καλή έκβαση του νεογνού σε εγκύους με SARS-CoV-2 λοίμωξη. Δύο νεογνά που παρουσίασαν ήπια λεμφοπενία και απεικονιστική εικόνα συμβατή με πνευμονία, είχαν καλή κλινική και ανέρρωσαν πλήρως. Αυτό οφείλεται στο ότι τα έμβρυα και τα νεογνά πιθανόν παρουσιάζουν ανοσιακή απάντηση, συχνά υποκλινική, στη λοίμωξη της μητέρας και γι αυτό η κάθετη μετάδοση δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι το ιικό φορτίο τριών νεογνών που μολύνθηκαν μετά τον τοκετό (οριζόντια μετάδοση) ήταν συγκρίσιμο με εκείνο των ενήλικων, οι εκδηλώσεις της νόσου ήταν ηπιότερες μεταξύ των νεογνών²². Σύμφωνα με μελέτη που περιελάμβανε 65 νεογνά των οποίων οι μητέρες είχαν θετική PCR για SARS-CoV-2 συνολικά 7 εξ αυτών ήταν θετικά (ποσοστό θετικότητας 10,7%). Όπως είχε φανεί και σε προηγούμενες μελέτες, τα νεογνά παρουσιάζουν ηπιότερα συμπτώματα συγκριτικά με τους ενήλικες παρά τα συγκρίσιμα ιικά φορτία μεταξύ νεογνών και ενηλίκων. Στη συγκεκριμένη μελέτη δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του ιικού φορτίου των μητέρων (εκφρασμένο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης) και της θετικότητας ή της βαρύτητας της νόσου στα νεογνά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός πως το ιικό φορτίο ήταν υψηλότερο τις πρώτες 72 ώρες της ζωής του νεογνών, ενώ ήταν οριακά ανιχνεύσιμο τη 2η εβδομάδα της ζωής τους. Παρά το γεγονός ότι ο αριθμός των COVID-θετικών νεογνών της μελέτης ήταν μικρός, φάνηκε ότι ο κίνδυνος μετάδοσης μέσω του θηλασμού ή της παραμονής του νεογνού στο ίδιο δωμάτιο με τη μητέρα είναι χαμηλός²³.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ACHIEVE

Διενεργήσαμε την κλινική δοκιμή ACHIEVE (Anti-inflammatory Clarithromycin to Improve SARS-CoV 2 Infection Early) για να εξετάσουμε, εάν η έγκαιρη χορήγηση από του στόματος κλαριθρομυκίνης σε ασθενείς με λοίμωξη του ανώτερου ή κατώτερου αναπνευστικού συστήματος λόγω SARS-CoV-2, μπορεί να εξασθενήσει το φλεγμονώδες φορτίο, να τροποποιήσει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και να οδηγήσει σε πρώιμη κλινική βελτίωση. Συγκρίναμε την αποτελεσματικότητα της κλαριθρομυκίνης με μια ομάδα σύγκρισης στατιστικά τακτοποιημένων ασθενών που έλαβαν τη συνήθη θεραπεία (Standard Of Care, SOC) με αζιθρομυκίνη και υδροξυχλωροκίνη. Η αποτελεσματικότητα της κλαριθρομυκίνης μελετήθηκε επίσης σε σχέση με την καθυστερημένη έναρξη από την εμφάνιση των συμπτωμάτων και με τη φυλογενετική ανάλυση του μολυσματικού στελέχους του SARS-CoV-2.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Οι εγγεγραμμένοι ασθενείς ήταν ενήλικες (ηλικίας ≥ 18 ετών) με επιβεβαιωμένη λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2 με Real Time RT-PCR ρινοφαρυγγικών εκκρίσεων, καθώς και λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (Upper Respiratory Tract Infection, URTI) ή του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (Lower Respiratory Tract Infection, LRTI) . Η λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος ορίστηκε ως η οξεία εμφάνιση τουλάχιστον δύο από τα ακόλουθα σημεία: α) θερμοκρασία πυρήνα ≥ 37.5 °C, β) νεοεμφανιζόμενος βήχας, γ) φρίκια ή ρίγος και δ) ο συνολικός απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων μικρότερος από $1.500 / \text{mm}^3$. Η λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος ορίστηκε ως η παρουσία διηθημάτων συμβατών με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος σε ακτινογραφία θώρακος ή σε αξονική τομογραφία θώρακος συνοδευόμενη

από τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα: α) νεοεμφανιζόμενος βήχας ή επιδείνωση προ υπάρχοντος βήχα, β) δύσπνοια γ) επιπρόσθετοι μη μουσικοί (τρίζοντες) ήχοι συμβατοί με πνευμονική λοίμωξη και δ) ο συνολικός απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων μικρότερος από $1.500/\text{mm}^3$. Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν: ηλικία κάτω των 18 ετών, προηγούμενη λήψη οποιασδήποτε άλλης μακρολίδης και υδροξυχλωροκίνης για το τρέχον επεισόδιο της λοίμωξης που μελετάται, αναλογία μερικής πίεσης οξυγόνου προς το κλάσμα του εισπνεόμενου οξυγόνου (pO_2 / FiO_2) μικρότερο από 150, ανάγκη για μηχανικό αερισμό (MV) ή μη επεμβατικό αερισμό υπό θετική πίεση (NIV), ουδετεροπενία ($<1.000 / \text{mm}^3$), οποιαδήποτε προηγούμενη λήψη κορτικοστεροειδών σε ημερήσια δόση $\geq 0,4 \text{ mg / kg}$ πρεδνιζόνης ή ισοδύναμο τις τελευταίες 15 ημέρες, παρουσία οποιασδήποτε αντενδείξεως για μία μακρολίδη, διάστημα QTc σε ηλεκτροκαρδιογράφημα ηρεμίας $\geq 500 \text{ msec}$, ιστορικό γνωστού συγγενούς συνδρόμου μακρού QTc και εγκυμοσύνη ή γαλουχία.

Παρεμβάσεις κατά την κλινική δοκιμή

Οι εγγεγραμμένοι ασθενείς έλαβαν ένα δισκίο 500 mg κλαριθρομυκίνης κάθε 12 ώρες για 7 ημέρες. Όλα τα άλλα φάρμακα, εκτός από τις μακρολίδες και την υδροξυχλωροκίνη / φωσφορική χλωροκίνη, επιτρέπονταν. Οι επισκέψεις των συμμετεχόντων έγιναν καθημερινά ξεκινώντας από την 1^η ημέρα πριν από την έναρξη της θεραπείας έως την 8^η ημέρα μετά το τέλος της θεραπείας (end-of treatment visit, EOT). Η τελική επίσκεψη (test-of-cure, TOC) των συμμετεχόντων πραγματοποιήθηκε τη 14^η ημέρα. Για ασθενείς που είχαν εξέλθει νωρίτερα από το νοσοκομείο, η επίσκεψη μετά το τέλος της θεραπείας, όπως και η τελική επίσκεψη πραγματοποιήθηκαν μέσω τηλεφωνικών κλήσεων. Οι καταγεγραμμένες αρχικές πληροφορίες των ασθενών εκτιμήθηκαν ως προς τη σοβαρότητα με τη βαθμολογία APACHE II, τη βαθμολογία SOFA και τον δείκτη σοβαρότητας πνευμονίας (PSI), τις συν νοσηρότητες και τις εργαστηριακές πληροφορίες. Σε κάθε επίσκεψη παρακολούθησης, αξιολογήθηκε η κατάσταση του ασθενούς και υπολογίστηκε η βαθμολογία των αναπνευστικών συμπτωμάτων (Respiratory Symptoms Score, RSS).

Τα ρινοφαρυγγικά επιχρίσματα συλλέχθηκαν από ασθενείς θετικούς για SARS-CoV-2 χρησιμοποιώντας το σύστημα συλλογής και μεταφοράς 350C UTM © mini 1ml (COPAN, Italia, S.p.A.) την 1^η ημέρα πριν από την έναρξη της θεραπείας, την 4^η ημέρα και μετά το τέλος της θεραπείας (EOT). Τα συλλεχθέντα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80° C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία. Το ιικό φορτίο εκφράστηκε ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης (Ct) και ως μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E και του γονιδίου RdRp εκφρασμένη σε λογάριθμο του 2 ($\log_2$). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς εφαρμόστηκε για ιικά στελέχη. Οι αλληλουχίες γονιδιώματος του SARS-CoV-2 κατανεμήθηκαν σε ιικές γενεολογικές σειρές σύμφωνα με το δυναμικό σύστημα ονοματολογίας που προτάθηκε από τους Rambaut et al. Για το σκοπό αυτό, τα αρχεία FASTA που δημιουργήθηκαν από το εργαλείο SOPHiA DDM μεταφορτώθηκαν στην εφαρμογή ιστού pangolin 2.0 (<https://pangolin.cog-uk.io/>).

Δείγματα αίματος λήφθηκαν ταυτόχρονα από τους ασθενείς της παράλληλης ομάδας σύγκρισης που έλαβε τον συνδυασμό αζιθρομυκίνης και

υδροχλωροκίνης/χλωροκίνης την 1^η ημέρα πριν από την έναρξη της θεραπείας και την 8^η ημέρα για τη μέτρηση των βιοδεικτών.

Αποτελέσματα

Το πρωτογενές καταληκτικό σημείο της μελέτης περιγράφηκε την 8η ημέρα μετά το τέλος της θεραπείας. Αυτό ήταν ένα σύνθετο καταληκτικό σημείο που ορίστηκε διαφορετικά για ασθενείς με URTI και για ασθενείς με LRTI. Για ασθενείς με URTI το πρωτογενές καταληκτικό σημείο ορίστηκε είτε ως μη ανάγκη επανεισαγωγής στο νοσοκομείο σε περίπτωση πρόωρου εξιτηρίου είτε ως απουσία εξέλιξης σε LRTI. Για ασθενείς με LRTI, το πρωτογενές καταληκτικό σημείο ορίστηκε ως μείωση κατά τουλάχιστον 50% του RSS από την αρχική βαθμολογία της 1^{ης} ημέρας, υπό την προϋπόθεση ότι ο ασθενής δεν παρουσίασε σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια ή είχε πεθάνει κατά το τέλος της θεραπείας (EOT). Ως σοβαρή αναπνευστική ανεπάρκεια (SRF) ορίστηκε οποιαδήποτε μείωση του pO_2 / FiO_2 κάτω από 150 που απαιτούσε MV ή NIV. Τα ίδια καταληκτικά σημεία καταγράφηκαν για τους ασθενείς της παράλληλης ομάδας σύγκρισης που έλαβαν τη συνήθη θεραπεία. Τα δευτερογενή καταληκτικά σημεία ήταν η ανάπτυξη SRF στην τελική επίσκεψη TOC, επανεισαγωγή στο νοσοκομείο έως την τελική επίσκεψη TOC, μεταβολή του ιικού φορτίου συγκριτικά με την αρχική τιμή στις αναπνευστικές εκκρίσεις την 4^η ημέρα και στο τέλος της θεραπείας (EOT), μεταβολή των κυκλοφορούντων βιοδεικτών και τις μεταβολές στην παραγωγή κυτοκινών από μονοκύτταρα και από Th1 και Th2 λεμφοκύτταρα. Η ανάλυση που παρουσιάζεται επικέντρωθηκε στις μεταβολές των συγκεντρώσεων του ιικού φορτίου των ασθενών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εκτέλεση της κλινικής δοκιμής

Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην ανοικτή δοκιμή ACHIEVE εγγράφηκαν μεταξύ 17 Μαΐου 2020 και 8 Οκτωβρίου 2020. Οι ασθενείς που συμμετείχαν στην παράλληλη ομάδα σύγκρισης που έλαβε συνήθη θεραπεία εγγράφηκαν εντός του ίδιου χρονικού πλαισίου. Η χορηγούμενη δόση αζιθρομυκίνης ήταν 500 mg ημερησίως και υδροξυχλωροκίνης 500 mg κάθε 12 ώρες. Τα βασικά

δημογραφικά στοιχεία των ασθενών που έλαβαν κλαριθρομυκίνη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

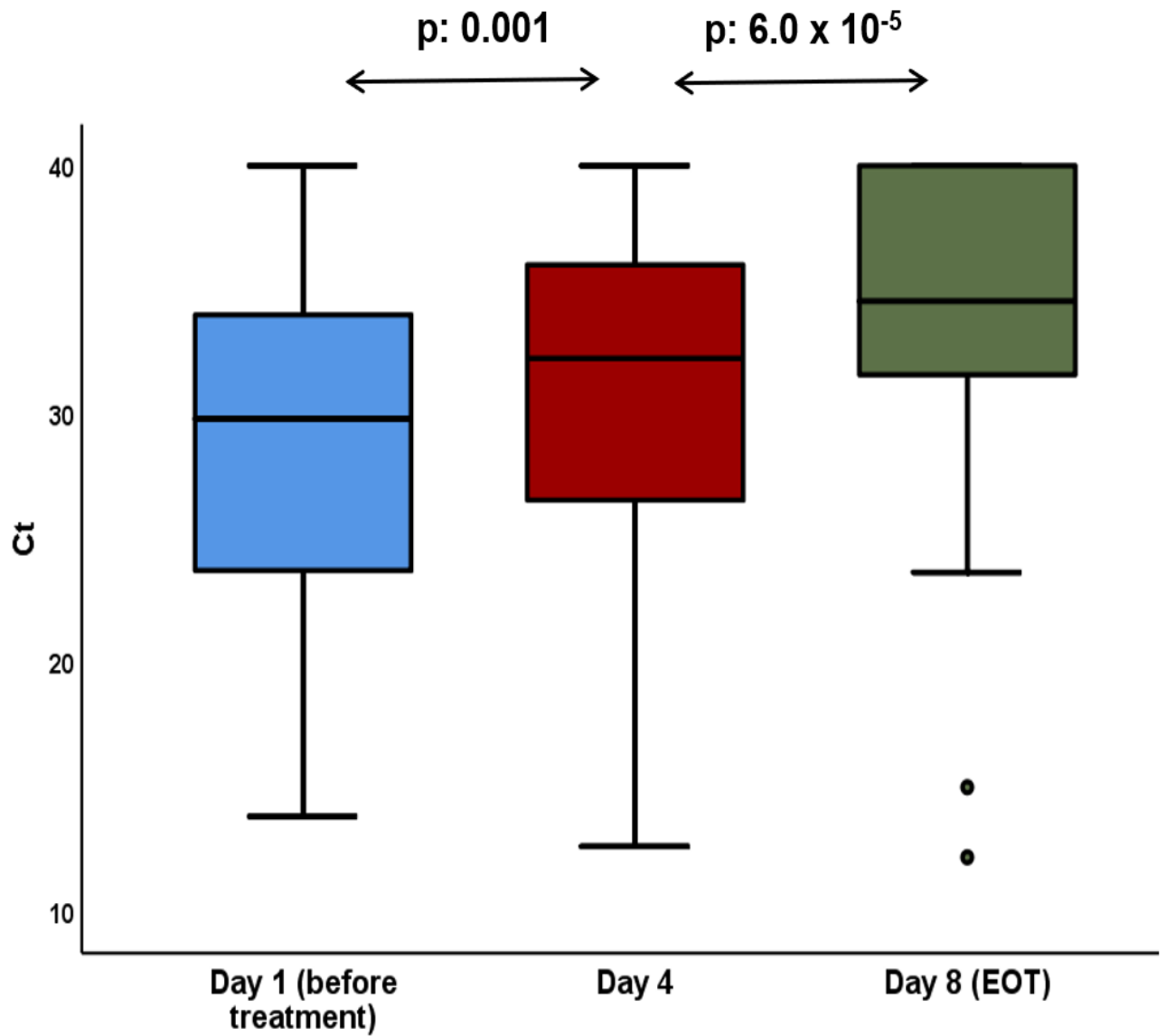
Πίνακας 1. Εργαστηριακές τιμές αναφοράς, δημογραφικά στοιχεία και συγχωρηγούμενες θεραπείες στους ασθενείς της κλινικής δοκιμής ACHIEVE

Μεταβλητή	ACHIEVE δοκιμή (N=90)
Ηλικία, έτη, μέση τιμή (SD)	56.9 (16.9)
Ανδρικό φύλο, no. (%)	53 (58.9)
Λοίμωξη ανώτερου/κατώτερου αναπνευστικού, no(%)	12 (13.3) / 78 (86.7)
Δείκτες Βαρύτητας, μέση τιμή (SD)	
Δείκτης Συννοσηρότητας Charlson	2.39 (2.42)
Βαθμολογία Κλίμακας APACHE II εισαγωγής	5.51 (3.82)
Δείκτης Βαρύτητας Πνευμονάς εισαγωγή	62.3 (27.6)
Βαθμολογία Κλίμακας SOFA εισαγωγή	1.24 (1.18)
Συννοσηρότητες, no (%)	17 (18.9)
Διαβήτης τύπου 2	4 (4.4)
Χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια	8 (8.9)
Χρόνια νεφρική ανεπάρκεια	6 (6.7)
Κολπική μαρμαρυγή	3 (3.3)
Υπέρταση	36 (40.0)
Χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσος	4 (4.4)
Υποθυρεοειδισμός	12 (13.3)
Κακοήθεια συμπαγούς οργάνου	7 (7.8)
Δυσλιπιδαιμία	22 (24.4)
Εργαστηριακές τιμές, μέση τιμή (SD)	
Συνολικός αριθμός λευκών κυττάρων	6053.9 (2295.2)
Ουδετερόφιλα	4124.2 (2181.9)
Λεμφοκύτταρα	1334.1 (528.4)
Αιμοπετάλια	214.7 (72.3)
Διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο	1.10 (0.22)
APTT	34.29 (8.62)
AST	34.0 (21.1)
ALT	40.1 (36.5)
pO ₂ /FiO ₂	372.0 (87.3)
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη	69.6 (85.7)

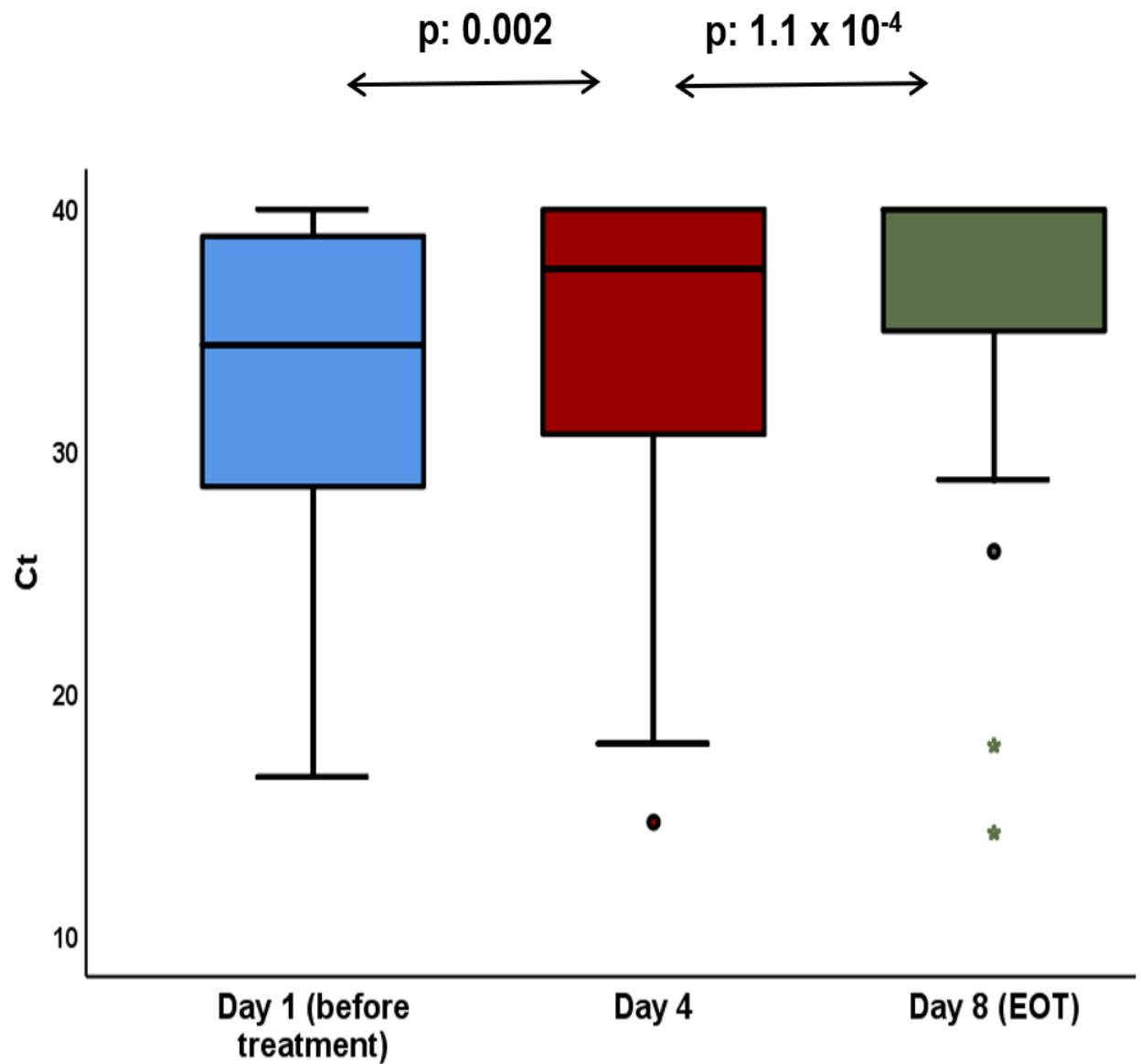
Συγχρηγούμενη θεραπεία, no (%)	
3 ^{ης} -γενιάς κεφαλοσπορίνη	63 (70.8)
Πιπερακιλλίνη/ταζομπακτάμη	11 (12.4)
Μοξιφλοξασίνη/Λεβοφλοξασίνη	2 (2.2)

Καταληκτικά σημεία της μελέτης

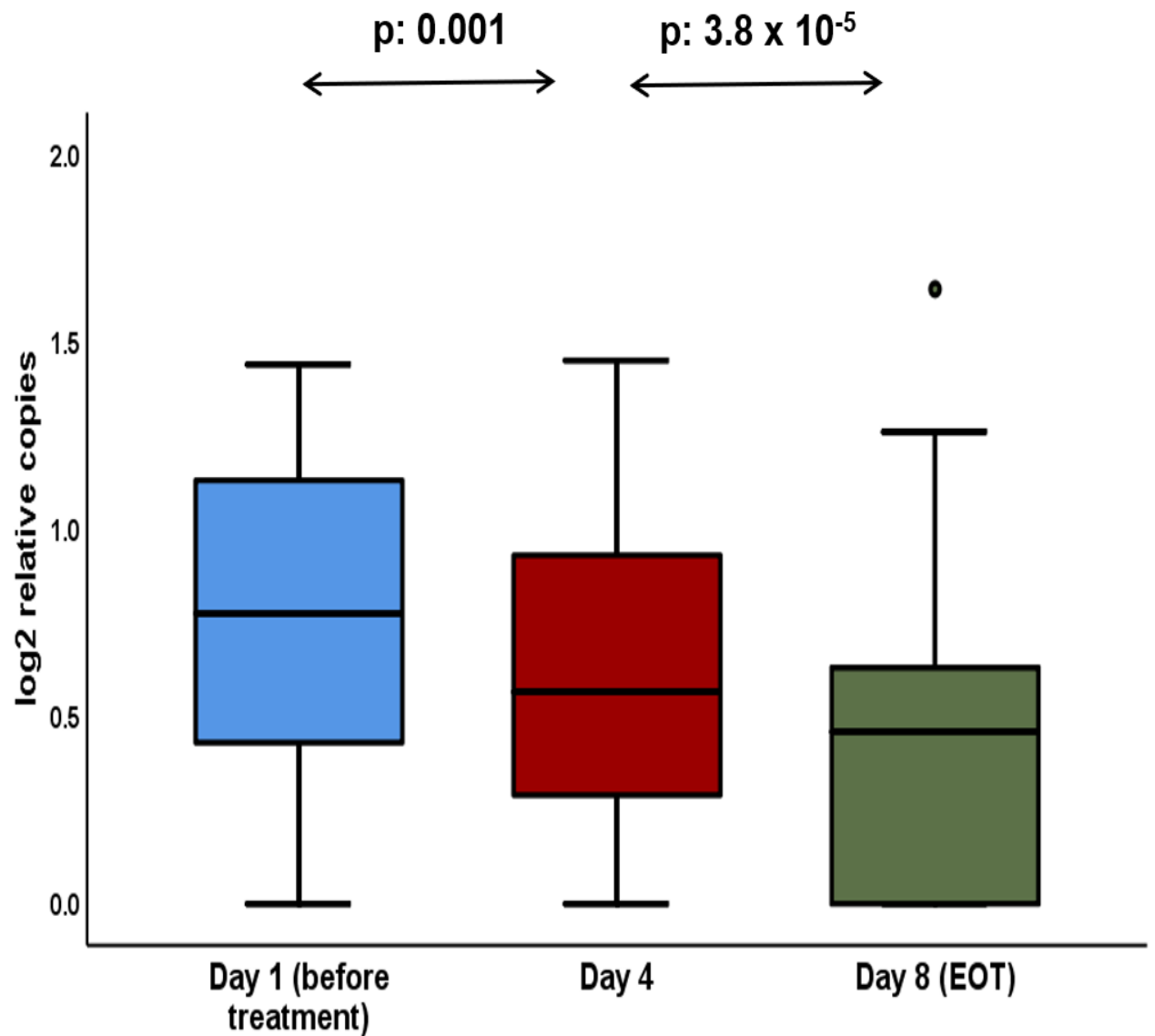
Το ιικό φορτίο εκφράστηκε τόσο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης (Ct) και ως μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς εκφρασμένων σε λογάριθμο του 2 ($\log_2$). Το ιικό φορτίο εκφράστηκε τόσο για το συστατικό (constitutive) γονίδιο E όσο και για το ειδικό γονίδιο RdRp. Ο αριθμός των κύκλων (Ct) έως τη θετικοποίηση αυξήθηκε κατά τις επισκέψεις μελέτης έτσι ώστε να θεωρηθεί έμμεσος δείκτης μείωσης των αντιγράφων του γονιδίου E και του γονιδίου RdRp (Σχήμα 1 και 2). Ο αριθμός των αντιγράφων εκφρασμένων σε λογάριθμο του 2 ($\log_2$) και των δύο γονιδίων μειώθηκε προοδευτικά (Σχήμα 3 και 4). Η ανάλυση αλληλούχισης επομένης γενιάς (NGS) των απομονωμένων ιών δεν έδειξε καμία μονονουκλεοτιδική παραλλαγή (SNV) είτε στο γονίδιο E είτε στο γονίδιο RdRp.



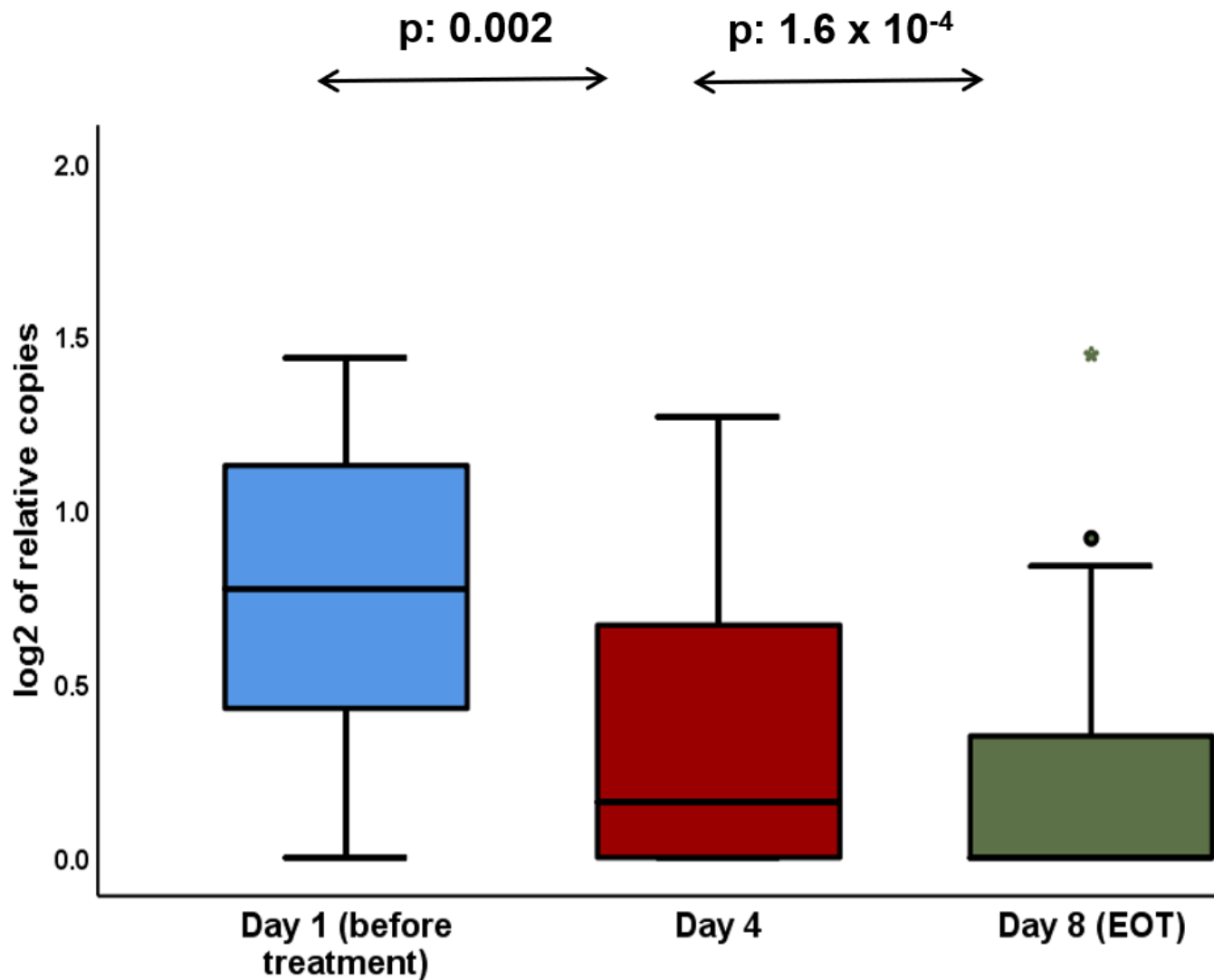
Σχήμα 1. Το ιικό φορτίο ως αριθμος των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης για το γονίδιο *E* στους ασθενείς που έλαβαν κλαριθρομυκίνη. Απεικονίζονται οι συγκρίσεις και δίνονται οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου *p*.



Σχήμα 2. Το ιικό φορτίο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης για το γονίδιο *RdRp* στους ασθενείς που έλαβαν κλαριθρομυκίνη. Απεικονίζονται οι συγκρίσεις και δίνονται οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p



Σχήμα 3. Το ιικό φορτίο ως μεταβολή του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου E σε λογάριθμο του 2 ($\log_2$) στους ασθενείς που έλαβαν κλαριθρομυκίνη. Απεικονίζονται οι συγκρίσεις και δίνονται οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου p.



Σχήμα 4. Το ιικό φορτίο ως αριθμός των κύκλων θετικοποίησης της αντίδρασης για το γονίδιο *RdRp* στους ασθενείς που έλαβαν κλαριθρομυκίνη. Απεικονίζονται οι συγκρίσεις και δίνονται οι τιμές του στατιστικού κριτηρίου *p*.

Διερευνητικά καταληκτικά σημεία της μελέτης

Η γενεολογική σειρά του απομονωθέντος ιού SARS-CoV-2 θα μπορούσε να προσδιοριστεί μετά τον ταξινομικό ποιοτικό έλεγχο σε απομονωθέντα στελέχη που προέρχονταν από 49 ασθενείς. Αυτά ταυτοποιήθηκαν ως B1.1 (*n* = 30, 61.2%); B1.1. με 75% ταύτιση με το γονικό B1.1 (*n* = 2, 4.1%). B1.1. με 50% ταύτιση με το γονικό B1.1 (*n* = 8, 16.3%). B1.1.2 (*n* = 3, 6.1%); B1 (*n* = *n*; 4.1%), B1.1.25 (*n* = 2; 4.1%), B1.1.10 (*n* = 1, 2.1%); και B1.1.70 (*n* = 1, 2.1%).

λικά στελέχη B1.1 και B1.1 με 75% ταύτιση με το γονικό B1.1 αναλύθηκαν μαζί ως απομονωθέντα ιικά στελέχη της γενεολογικής σειράς B1.1. Ως τέτοια, η ανάλυση περιελάβανε 32 απομονωθέντα ιικά στελέχη της γενεολογικής σειράς B1.1 και 17 απομονωθέντα στελέχη της μη-B.1.1 γενεολογικής σειράς. Οι ασθενείς που ξεκίνησαν πρώιμα την αγωγή με κλαριθρομυκίνη είχαν επίτευξη θετικού πρωτογενούς καταληκτικού σημείου ανταπόκρισης στη θεραπεία παρόμοιο και για τους δύο τύπους ιικής γενεολογικής σειράς. Ωστόσο, μεταξύ των ασθενών που ξεκίνησαν όψιμα την αγωγή με κλαριθρομυκίνη, η επίτευξη της θετικής ανταπόκρισης στη θεραπεία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη μεταξύ εκείνων που είχαν μολυνθεί από τα μη-B1.1 SAR-CoV-2 απομονωθέντα στελέχη .

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην ανοικτή δοκιμή ACHIEVE συμμετείχαν ασθενείς με μέτριας βαρύτητας λοίμωξη COVID-19, οι οποίοι συγκρίθηκαν με μία παράλληλη ομάδα ασθενών που έλαβαν τη συνήθη θεραπεία (SOC) με αζιθρομυκίνη και υδροξυχλωροκίνη και νοσηλεύτηκαν στην ίδια χρονική περίοδο. Τα δεδομένα που προέκυψαν, συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες και υποδηλώνουν ότι η ενεργός αντιγραφή του ιού και η παραμονή του στον ανώτερο πνευμονικό ιστό συνδέεται με τη σοβαρότητα της νόσου. Οι ασθενείς που έλαβαν κλαριθρομυκίνη παρουσίασαν αξιοσημείωτη μείωση του ιικού φορτίου στον ρινοφάρυγγα που συσχετίστηκε με κλινική βελτίωση των ασθενών. Η πρώιμη χορήγηση κλαριθρομυκίνης φάνηκε ότι οδηγεί σε μείωση του ιικού φορτίου και στις δύο γενεολογικές σειρές που αναλύθηκαν . Το αποτέλεσμα αυτό θεωρείται εξαιρετικά σημαντικό και ενθαρρυντικό, δεδομένης της μεγάλης διασποράς των μεταλλάξεων του ιού και ενδεχόμενης εμφάνισης νέων μεταλλάξεων. Η κλαριθρομυκίνη θα μπορούσε να αποτελέσει μία σημαντική προσθήκη στη θεραπευτική φαρέτρα των κλινικών γιατρών, καθώς μπορεί με ασφάλεια να δοθεί πρώιμα σε ασθενείς με μέτριας βαρύτητας λοίμωξη COVID-19 και να βοηθήσει καθοριστικά στην κλινική πορεία των ασθενών μειώνοντας αποτελεσματικά το ιικό φορτίο του SAR-CoV-2, ανεξαρτήτως της γενεολογικής σειράς του.²⁴

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

¹ Pani A, Lauriola M, Romandini A, Scaglione F. Macrolides and viral infections: focus on azithromycin in COVID-19 pathology. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Aug;56(2):106053. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106053.

² Arikata M, Itoh Y, Shichinohe S, Nakayama M, Ishigaki H, Kinoshita T, Le MQ, Kawaoka Y, Ogasawara K, Shimizu T. Efficacy of clarithromycin against H5N1 and H7N9 avian influenza a virus infection in cynomolgus monkeys. *Antiviral Res*. 2019 Nov;171:104591. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104591.

³ Kyriazopoulou E, Sinapidis D, Halvatzis S, Velissaris D, Alexiou N, Kosmas V, Adami ME, Kyprianou M, Kyprianou A, Stefos A, Lada M, Koutoukas P, Pavlaki M, Kyriakoudi A, Makina A, Gogos C, Niederman MS, Giamarellos-Bourboulis EJ. Survival benefit associated with clarithromycin in severe community-acquired pneumonia: A matched comparator study. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Jan;55(1):105836. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.10.017.

⁴ Gottlieb RL, Nirula A, Chen P, Boscia J, Heller B, Morris J, et al. Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination With Etesevimab on Viral Load in Patients With Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021 Feb 16;325(7):632-644. doi: 10.1001/jama.2021.0202. 0.

⁵ Hu R, Yan H, Liu M, Tang L, Kong W, Zhu Z, Liu P, et al. Brief Report: Virologic and Immunologic Outcomes for HIV Patients With Coronavirus Disease 2019. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2021 Feb 1;86(2):213-218. doi: 10.1097/QAI.0000000000002540.

⁶ Chaccour C, Casellas A, Blanco-Di Matteo A, Pineda I, Fernandez-Montero A, Ruiz-Castillo P, et al. The effect of early treatment with ivermectin on viral load, symptoms and humoral response in patients with non-severe COVID-19: A pilot, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *EClinicalMedicine*. 2021 Feb;32:100720. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100720.

⁷ Silva J, Lucas C, Sundaram M, Israelow B, Wong P, Klein J, et al. Saliva viral load is a dynamic unifying correlate of COVID-19 severity and mortality. *medRxiv [Preprint]*. 2021 Jan 10:2021.01.04.21249236. doi: 10.1101/2021.01.04.21249236.

-
- ⁸ Maltezou HC, Raftopoulos V, Vorou R, Papadima K, Mellou K, Spanakis N, et al. Association Between Upper Respiratory Tract Viral Load, Comorbidities, Disease Severity, and Outcome of Patients With SARS-CoV-2 Infection. *J Infect Dis*. 2021 Apr 8;223(7):1132-1138. doi: 10.1093/infdis/jiaa804.
- ⁹ Chen L, Wang G, Long X, Hou H, Wei J, Cao Y, et al. Dynamics of Blood Viral Load Is Strongly Associated with Clinical Outcomes in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Prospective Cohort Study. *J Mol Diagn*. 2021 Jan;23(1):10-18. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.10.007.
- ¹⁰ Shlomai A, Ben-Zvi H, Glusman Bendersky A, Shafran N, Goldberg E, Sklan EH. Nasopharyngeal viral load predicts hypoxemia and disease outcome in admitted COVID-19 patients. *Crit Care*. 2020 Sep 1;24(1):539. doi: 10.1186/s13054-020-03244-3.
- ¹¹ Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of SARS-CoV-2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Jun 30:ciaa851. doi: 10.1093/cid/ciaa851.
- ¹² Sakamaki I, Morinaga Y, Tani H, Takegoshi Y, Fukui Y, Kawasuji H, et al. Monitoring of viral load by RT-PCR caused decision making to continue ECMO therapy for a patient with COVID-19. *J Infect Chemother*. 2020 Dec;26(12):1324-1327. doi: 10.1016/j.jiac.2020.08.014.
- ¹³ Casagrande M, Fitzek A, Spitzer MS, Püschel K, Glatzel M, Krasemann S, et al. Presence of SARS-CoV-2 RNA in the Cornea of Viremic Patients With COVID-19. *JAMA Ophthalmol*. 2021 Apr 1;139(4):383-388. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2020.6339.
- ¹⁴ Ram-Mohan N, Kim D, Zudock EJ, Hashemi MM, Tjandra KC, Rogers AJ, et al. SARS-CoV-2 RNAemia predicts clinical deterioration and extrapulmonary complications from COVID-19. *medRxiv [Preprint]*. 2020 Dec 22:2020.12.19.20248561. doi: 10.1101/2020.12.19.20248561.
- ¹⁵ Eberhardt KA, Meyer-Schwickerath C, Heger E, Knops E, Lehmann C, Rybníček J, Schommers P, et al. RNAemia Corresponds to Disease Severity

and Antibody Response in Hospitalized COVID-19 Patients. *Viruses*. 2020 Sep 18;12(9):1045. doi: 10.3390/v12091045.

¹⁶ Hagman K, Hedenstierna M, Gille-Johnson P, Hammas B, Grabbe M, Dillner J, et al. SARS-CoV-2 RNA in serum as predictor of severe outcome in COVID-19: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis*. 2020 Aug 28;ciaa1285. doi: 10.1093/cid/ciaa1285.

¹⁷ Xu D, Zhou F, Sun W, Chen L, Lan L, Li H, Xiao F, et al. Relationship Between serum SARS-CoV-2 nucleic acid(RNAemia) and Organ Damage in COVID-19 Patients: A Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 2020 Jul 28;ciaa1085. doi: 10.1093/cid/ciaa1085.

¹⁸ Chen PF, Yu XX, Liu YP, Ren D, Shen M, Huang BS, et al. Virus load and virus shedding of SARS-CoV-2 and their impact on patient outcomes. *World J Clin Cases*. 2020 Dec 26;8(24):6252-6263. doi: 10.12998/wjcc.v8.i24.6252. .

¹⁹ Jacot D, Greub G, Jaton K, Opota O. Viral load of SARS-CoV-2 across patients and compared to other respiratory viruses. *Microbes Infect*. 2020 Nov-Dec;22(10):617-621. doi: 10.1016/j.micinf.2020.08.004.

²⁰ Lee S, Kim T, Lee E, Lee C, Kim H, Rhee H, et al. Clinical Course and Molecular Viral Shedding Among Asymptomatic and Symptomatic Patients With SARS-CoV-2 Infection in a Community Treatment Center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med*. 2020 Nov 1;180(11):1447-1452. doi:10.1001/jamainternmed.2020.3862.

²¹ Edlow AG, Li JZ, Collier AY, Atyeo C, James KE, Boatn AA, et al. Assessment of Maternal and Neonatal SARS-CoV-2 Viral Load, Transplacental Antibody Transfer, and Placental Pathology in Pregnancies During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Netw Open*. 2020 Dec 1;3(12):e2030455. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.30455.

²² Bachani S, Arora R, Dabral A, Marwah S, Anand P, Reddy KS, et al. Clinical Profile, Viral Load, Maternal-Fetal Outcomes of Pregnancy With COVID-19: 4-Week Retrospective, Tertiary Care Single-Centre Descriptive Study. *J Obstet Gynaecol Can*. 2021 Apr;43(4):474-482. doi: 10.1016/j.jogc.2020.09.021.

²³ Anand P, Yadav A, Debata P, Bachani S, Gupta N, Gera R. Clinical profile, viral load, management and outcome of neonates born to COVID 19 positive mothers: a tertiary care centre experience from India. *Eur J Pediatr*. 2021 Feb;180(2):547-559. doi: 10.1007/s00431-020-03800-7.