

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΙΟΛΟΓΙΑ»

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ: «ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ
ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΤΙΚΩΝ SARS-CoV-2 anti-RBD ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΕ ΙΑΤΡΟΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΟ
ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΠΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΤΗΚΕ ΜΕ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΟ BNT162b2»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ:

ΦΙΛΙΠΠΟΣ ΦΙΛΙΠΠΑΤΟΣ

Ειδικευόμενος Παιδιατρικής

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΜΙΧΟΣ

Καθηγητής Παιδιατρικής Λοιμωξιολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών «Η Αγία Σοφία»

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2023



**POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM:
«PEDIATRIC INFECTIOUS DISEASES»**

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF MEDICINE
MASTER THESIS**

**SUBJECT: «COMPARISON STUDY OF TWO DIFFERENT METHODS FOR DETECTION OF
SARS-CoV-2 NEUTRALIZING anti-RBD ANTIBODIES IN HEALTHCARE WORKERS
VACCINATED WITH BNT162b2»**

**POSTGRADUATE STUDENT:
FILIPPOS FILIPPATOS
Pediatrics Resident**

**THESIS SUPERVISOR:
ATHANASIOS MICHOS**

**Professor of Pediatrics and Infectious Diseases, First Department of Pediatrics,
National and Kapodistrian University of Athens, "Aghia Sophia" Children's Hospital**

**ATHENS
FEBRUARY 2023**

Περίληψη

Τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης ακίδας του ιού SARS-CoV-2 παρεμποδίζουν άμεσα την είσοδο του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα παρεμποδίζοντας τη σύνδεση της περιοχής RBD της πρωτεΐνης ακίδας στους υποδοχείς ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση μιας τεχνικής ELISA με μια μέθοδο ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση εξουδετερωτικών αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό για SARS-CoV-2. Από ιατρονοσηλευτικό προσωπικό που εμβολιάστηκε με το εμβόλιο BNT162b2 συλλέχθηκαν δείγματα ορού ένα και τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου και καταγράφηκαν δημογραφικά και κλινικά δεδομένα. Η ανίχνευση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των δοκιμασιών ELISA cPass™ (εγκεκριμένη από τον FDA) και ανοσοφθορισμού (n-AbCOVID-19®). Συνολικά εξετάστηκαν δείγματα από 200 άτομα [διάμεση ηλικία (IQR): 45 (35-53) έτη] και με τις δύο δοκιμασίες. Οι διάμεσες τιμές μέτρησης των εξουδετερωτικών αντισωμάτων στο συνολικό πληθυσμό ήταν σημαντικά χαμηλότερα με τον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την ELISA (74.53 και 91.62, αντίστοιχα, P -value: <0,001). Η ποσοτική σύγκριση μεταξύ ανοσοφθορισμού και ELISA έδειξε μικρή συμφωνία ένα μήνα μετά τη 2^η δόση [(Lin's Concordance Correlation Coefficient-CCC: 0,21 (95%CI: 0,15-0,27)], η οποία βελτιώθηκε τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση [Lin's CCC: 0,6 (95%CI: 0,54-0,66)]. Ανευρέθη καλή ποιοτική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων [AUC: 0,916 (95%CI.: 0,889-0,943, P -value: 0,007)]. Ο ανοσοφθορισμός είχε καλή ποιοτική συμφωνία με την ELISA στην ανίχνευση θετικών εξουδετερωτικών αντισωμάτων και θα μπορούσε να αποτελέσει εναλλακτική λύση για την ταχεία ανίχνευση τους.

Λέξεις-κλειδιά: SARS-CoV-2; COVID-19; εξουδετερωτικά αντισώματα; ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA; ανοσοφθορισμός; BNT162b2

Abstract

SARS-CoV-2 Spike protein Receptor Binding Domain neutralizing antibodies inhibit the viral binding to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors. The purpose of the study was to compare an ELISA and a fluorescence immunochromatography method in neutralizing antibody detection after COVID-19 immunization. Serum samples from healthcare workers vaccinated with BNT162b2 were collected one and four months after the second dose. Neutralizing antibodies detection was performed using ELISA cPass™ (FDA approved) and immunofluorescence n-AbCOVID-19® assays. Samples from 200 healthcare workers [median age (IQR): 45 (35-53)] were tested with both assays. Neutralizing antibodies, were significantly lower with immunofluorescence compared to ELISA for the whole study population (74.53 και 91.62, respectively, P -value<0,001). The quantitative comparison between immunofluorescence and ELISA detected slight agreement one month after the 2nd dose [(Lin's Concordance Correlation Coefficient (CCC): 0.21 (95%CI: 0.15-0.27)] which improved four months after the 2nd dose [Lin's CCC: 0.6 (95%CI: 0.54-0.66)]. There was a good qualitative agreement between the two methods [AUC: 0.916 (95%C.I.: 0.889-0.943, P -value:0.007)]. FIC had good qualitative agreement with ELISA in the detection of positive neutralizing antibodies and could be an alternative for rapid neutralizing antibodies testing.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; neutralizing antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; immunofluorescence; BNT162b2

Αφιερώσεις

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφιερώνεται στο ιατρονοσηλευτικό προσωπικό του Νοσοκομείου Παιδων «Η Αγία Σοφία». Μαζί μοιραστήκαμε τις αγωνίες και τους προβληματισμούς γύρω από την πανδημία COVID-19 από την αρχή της μέχρι σήμερα.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο Εργαστήριο Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Αθανάσιο Μίχο, Καθηγητή Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής ΕΚΠΑ, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της μελέτης. Τον ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου καθώς και για την εξαιρετική συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας ΕΚΠΑ κ. Βασιλική Συριοπούλου για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω επίσης στη βιολόγο κ. Ελισάβετ-Βαρβάρα Τάτση για τη στήριξή της στο εργαστηριακό μέρος και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας ερευνητικής μελέτης. Ευχαριστώ θερμά το χημικό κ. Χαρίλαο Δελλή για την πολύτιμη βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μαθηματικό κ. Χρήστο Παπαγιαννόπουλο, που με τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων ανέδειξε τα αποτελέσματα της εργασίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract	4
Αφιερώσεις	5
Ευχαριστίες	6
Εισαγωγή.....	8
Γενικά	8
SARS-CoV-2	9
Ταξινόμηση και προέλευση	9
Δομή SARS-CoV-2.....	10
Ανοσολογική απόκριση μετά από λοίμωξη SARS-CoV-2	12
Εμβολιασμός για SARS-CoV-2	14
Τεχνικές προσδιορισμού εξουδετερωτικών αντισωμάτων	16
Ερευνητικοί στόχοι-Σκοπός μελέτης.....	18
Μεθοδολογία.....	19
Σχεδιασμός μελέτης και πληθυσμός	19
Δοκιμασίες προσδιορισμού εξουδετερωτικής ικανότητας αντισωμάτων anti-RBD... ..	20
Στατιστική ανάλυση.....	22
Κύριο μέρος	23
Πληθυσμός μελέτης.....	23
Ποσοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων της ELISA και του ανοσοφθορισμού	25
Σύγκριση ELISA και ανοσοφθορισμού με βάση τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης.....	30
Ποιοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων των ELISA και ανοσοφθορισμού	41
ELISA και ανοσοφθορισμός για κάθε άτομο της μελέτης ξεχωριστά	43
Συζήτηση	44
Συμπεράσματα	49
Βιβλιογραφία.....	50

Εισαγωγή

Γενικά

Οι κορονοϊοί είναι μια ομάδα ιών που αποτελούν σημαντικά παθογόνα για πολλά ζώα στους και για τον άνθρωπο. Το γεγονός ότι κανένας από τους κορονοϊούς που προκαλούν κοινό κρυολόγημα στον άνθρωπο (HCoV-OC43, HCoV-NE63, HCoV-HKU1 και HCoV-229E) δεν αναπαράγεται εύκολα σε καλλιέργεια ιστών αποτελούσε, μέχρι πρόσφατα, εμπόδιο στην πρόοδο στους μελέτες στους. Τόσο ο HCoV-229E όσο και ο HCoV-OC43 ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1960 και αποδείχθηκε σε πειράματα με εθελοντές ότι προκαλούν κοινό κρυολόγημα σε ενήλικες (1)(2). Ωστόσο, μελέτες στους δεκαετίες του 1970 και 1980 συνέδεσαν τους κορονοϊούς ως ένα από τα πιο συχνά αίτια λοιμώξεων ανώτερου αναπνευστικού συστήματος κατά τη διάρκεια χειμερινών επιδημιών σε ενήλικες, καθώς και με σημαντικό ποσοστό των λοιμώξεων κατώτερου αναπνευστικού στα παιδιά (3)(4).

Μετά το 2002 και με τη βελτιστοποίηση μοριακών διαγνωστικών τεχνικών φάνηκε η παγκόσμια γεωγραφική κατανομή των HCoV-NL63 and HCoV-HKU1 (5)(6). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση καθενός από τους τέσσερις ανθρώπινους κορονοϊούς, και η ευρεία χρήση στους έχει επιτρέψει την ουσιαστική διερεύνηση στους επιδημιολογίας και στους παθογένειάς στους σε σημαντικό βαθμό.

Οι κορονοϊοί έλαβαν το όνομά τους από τη χαρακτηριστική εικόνα «κορώνας» που διαμόρφωνε η δομή στους όταν παρατηρήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (7). Οι κορονοϊοί αποτελούν μια ευρεία ομάδα ιών με μονόκλωνο RNA γενετικό υλικό που περιλαμβάνει ένα 5' μεθυλιωμένο και 3' πολυαδενυλιωμένο άκρο, αντίστοιχα. Το γονιδιόμα τους είναι μεσαίου μεγέθους (27-32 kb) και αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα μεταξύ των RNA ιών (8).

Η οικογένειά τους ταξινομείται σε τέσσερα γένη: alpha, beta, gamma και delta κορονοϊούς. Οι κοινοί κορονοϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Human Coronaviruses, HCoVs) περιλαμβάνονται σε δύο από αυτά τα γένη: alpha (HCoV-229E and HCoV-NL63) και beta (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, Middle East respiratory syndrome coronavirus [MERS-CoV], the severe acute respiratory syndrome coronavirus [SARS-CoV]), and SARS-CoV-2 κορονοϊούς(9). Επιδημικά στελέχη κορονοϊών που έχουν εμφανιστεί παλιότερα είναι οι ιοί SARS-CoV και MERS-CoV, οι οποίοι

χαρακτηρίζονταν από χαμηλή μεταδοτικότητα, αλλά υψηλή θνητότητα (10)(11). Το στέλεχος SARS-CoV εμφανίστηκε το 2003 στην περιοχή στους Κίνας, του Βιετνάμ και του Καναδά προκαλώντας το «σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο», ενώ ο ιός MERS-CoV που προκαλεί το «αναπνευστικό σύνδρομο στους Μέσης Ανατολής» εμφανίστηκε το 2012 (12).

SARS-CoV-2

Στα τέλη του 2019, ένα νέο στέλεχος κορονοϊού, που εμφάνιζε παρόμοια γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά με τον ιό SARS-CoV και για το λόγο αυτό ονομάστηκε SARS-CoV-2, εντοπίστηκε ως η αιτία στους συνόλου περιπτώσεων πνευμονίας στην πόλη Wuhan, στην επαρχία Hubei στους Κίνας (13). Η ομάδα μελέτης των κοροναϊών στους Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών πρότεινε να χαρακτηριστεί ο ιός στους ως κορονοϊός 2 του σοβαρού οξέος αναπνευστικού συνδρόμου (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2- SARS-CoV-2)(14). Η εξάπλωση του ιού ήταν τόσο εντυπωσιακή, ώστε σε μικρό χρονικό διάστημα να ξεπεράσει τα σύνορα στους Κίνας και των γειτονικών χωρών και να αναγκάσει τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) να χαρακτηρίσει επισήμως τη νόσο COVID-19 (coronavirus disease 2019) ως πανδημία στους 11 Μαρτίου 2020 (15). Μέχρι και τον Ιανουάριο του 2023 έχουν καταγραφεί επισήμως περισσότερα από 660 εκατομμύρια κρούσματα και περισσότεροι από 6,5 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως (16).

Ταξινόμηση και προέλευση

Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 είναι γραμμικό μονόκλωνο RNA μήκους περίπου 30 kb (17)(18). Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος και η φυλογενετική ανάλυση έδειξαν ότι ο SARS-CoV-2 ανήκει στην ομάδα των beta κορονοϊών και συγκεκριμένα στην υποομάδα των *Sarbecovirus* (17) (18). Σε αντίθεση με τον ιό SARS, ο SARS-CoV-2 παρουσιάζει πιο μακρινή συγγένεια με τον ιό (MERS), ο οποίος ανήκει στους στην ομάδα των beta κορονοϊών (19). Η πλησιέστερη ομοιότητα στους αλληλουχίας RNA του SARS-CoV-2 είναι ορισμένα στελέχη κορονοϊών νυχτερίδων (BANAL-52, BANAL-103, BANAL-236 και BatCoV RaTG13), συνεπώς είναι πιθανό ότι οι νυχτερίδες αποτελούν την κύρια πρωτοπαθή πηγή προέλευσης του SARS-CoV-2 (20)(21)(22). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν ο SARS-CoV-2 μεταδίδεται απευθείας

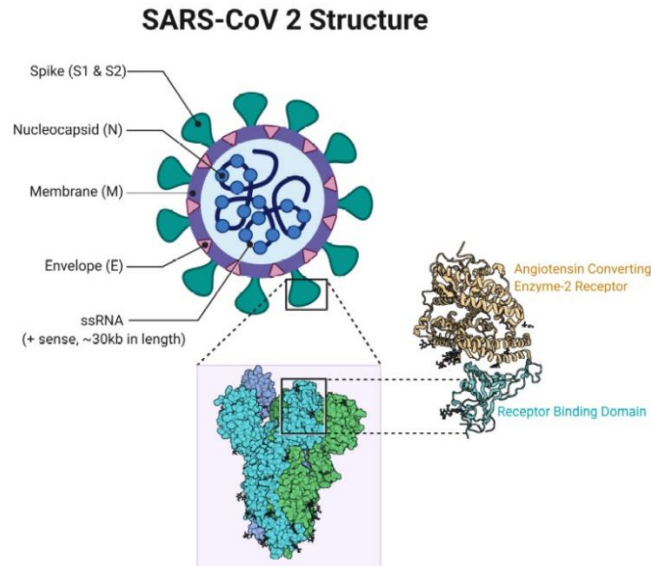
από στους νυχτερίδες στους ανθρώπους ή μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού (π.χ. μέσω ενδιάμεσου ξενιστή) (22).

Δομή SARS-CoV-2

Το RNA γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2 κωδικοποιεί 29 δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες, οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι οι δομικές ακίδα (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapsid (N) και η μη δομική πολυπρωτεΐνη ORF1a/b (25),(23). Η πρωτεΐνη ακίδα είναι έντονα γλυκοζυλιωμένη και περιέχουν μία μόνο διαμεμβρανική περιοχή προσανατολισμένη στον εξωκυττάριο χώρο (24). Η πρωτεΐνη ακίδα χωρίζεται σε δύο λειτουργικά μέρη S1 και S2, όπου η υπομονάδα S1 καταλύει την προσκόλληση του ιού στην κυτταρική μεμβράνη και η υπομονάδα S2 τη σύντηξη (fusion) (25). Από το αμινο-τελικό προς το καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης ακίδας υπάρχουν πολλές διαφορετικές λειτουργικές περιοχές, οι οποίες είναι με την ακόλουθη σειρά: η αμινο-τελική περιοχή (N-terminal domain - NTD), το μοτίβο πρόσδεσης υποδοχέα (receptor binding motif - RBM) που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης υποδοχέα (receptor binding domain - RBD), η περιοχή διάσπασης φουρίνης (furin cleavage site), το πεπτίδιο σύντηξης (fusion peptide - FP), η κεντρική έλικα (central helix - CH), η συνδετική περιοχή (connecting domain - CD), η περιοχή επανάληψης επτάδων (heptad repeat HR1/2 domain), η διαμεμβρανική περιοχή (transmembrane domain - TM) και η κυτταροπλασματική ουρά (cytoplasmic tail - CT)(26). Τα κύρια αντιγόνα που διεγείρουν τα εξουδετερωτικά αντισώματα, καθώς και σημαντικοί στόχοι των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, βρίσκονται στην πρωτεΐνη ακίδα και συγκεκριμένα στην περιοχή RBD (23).

Η λοίμωξη από τον SARS-CoV-2 ξεκινά όταν τα ιικά σωματίδια προσδένονται σε κυτταρικούς υποδοχείς της επιφάνειας του ξενιστή. Ο υποδοχέας των κυττάρων του ξενιστή για την είσοδο του SARS-CoV-2 είναι ο ίδιος με αυτόν του SARS-CoV, ο υποδοχέας του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) (23). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο ιός SARS-CoV-2 παρουσιάζει υψηλότερη συγγένεια με τον ανθρώπινο ACE2 σε σχέση με τον SARS-CoV (27)(28). Εκτός από την πρωτεΐνη ακίδα, σημαντικό ρόλο για την είσοδο του SARS-CoV-2 στο ανθρώπινο κύτταρο διαδραματίζει η διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2 (transmembrane protease, serine 2- TMPRSS2)(29).

Εικόνα 1: Δομή του SARS-CoV-2, υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) και περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor Binding Domain- RBD).



Μετά την προσκόλληση του SARS-CoV-2 σε ένα κύτταρο-στόχο, η TMPRSS2 του κυττάρου διαχωρίζει την πρωτεΐνη ακίδα του ιού, εκθέτοντας ένα πεπτίδιο σύντηξης στην υπομονάδα S2. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η σύντηξη του ιού με τον υποδοχέα ACE2(30). Μετά τη σύντηξη, ένα ενδοσωμάτιο σχηματίζεται γύρω από το ιό, διαχωρίζοντάς τον από το υπόλοιπο κύτταρο-ξενιστή(30). Ο ιός απελευθερώνει στη συνέχεια RNA στο κύτταρο-ξενιστή και αναγκάζει το κύτταρο να παράγει πολλαπλά αντίγραφα του ιού, τα οποία στη συνέχεια μολύνουν περισσότερα κύτταρα(30).

Η πρωτεΐνη E είναι ένα μικρό πολυπεπίδιο, που κυμαίνεται από 8,4 έως 12 kDa. Περιλαμβάνει δύο διακριτές περιοχές: την υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και τη φορτισμένη κυτταροπλασματική ουρά(31). Το N-τελικό άκρο της μετατοπίζεται κατά μήκος της μεμβράνης και το C-τελικό άκρο είναι εκτεθειμένο στην κυτταροπλασματική πλευρά(31). Η πρωτεΐνη E είναι η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη σε όλους τους κορονοϊούς που μελετήθηκαν και, ως εκ τούτου, εμφανίζει κοινά χαρακτηριστικά και λειτουργίες(32). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη E του SARS-CoV είναι πανομοιότυπη με τον SARS-CoV-2 εκτός από τέσσερις παραλλαγές οι οποίες δεν επηρεάζουν κτη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης E(32).

Η πρωτεΐνη M είναι το πιο άφθονο συστατικό των CoVs. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης M με την S και την E διαμορφώνει το χαρακτηριστικό σχήμα του φακέλου

του ιού. Η πρωτεΐνη M είναι μια πολυδιάστατη μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία χαρακτηρίζεται από τρεις διαμεμβρανικές περιοχές που έχουν C-τελικό εσωτερικό και N-τελικό εξωτερικό άκρο(33). Η περιοχή αυτή έχει βρεθεί ότι είναι ιδιαίτερα συντηρημένη σε όλα τα μέλη των Coronaviridae (33). Μέσω διαφόρων αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες, η πρωτεΐνη M διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση του ιού και στην εσωτερική ομοιόστασή του(33). Η πρωτεΐνη M από τον SARS-CoV, η οποία έχει παρόμοια δομή με την αντίστοιχη του SARS-CoV-2 αλληλεπιδρά με τον NF-κΒ του κυττάρου ξενιστή, μειώνοντας τη γονιδιακή έκφραση της κυκλοοξυγενάσης 2 (Cox 2)(34). Επιπλέον, η πρωτεΐνη M μπορεί να συμβάλει στην παθογένεια με την πειρατεία της φλεγμονώδους απόκρισης του ξενιστή που μεσολαβείται από τον NF-κΒ και την Cox-2(34).

Η πρωτεΐνη N SARS-CoV εμπλέκεται στη ρύθμιση της σύνθεσης του ιικού RNA και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη M κατά τη σύνθεση του ιού (23). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη N δρα ως ικός καταστολέας της παρεμπόδισης της εισόδου RNA στα κύτταρα του ξενιστή (35). Η πρωτεΐνη N καταστέλλει την παραγωγή IFN-β και αναστέλλουν την έκφραση των γονιδίων που διεγείρονται από την IFN (35). Επιπλέον, η πρωτεΐνη N ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση της IFN τύπου I καταστέλλοντας τη φωσφορυλίωση του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 1 και 2 (STAT1 και STAT2)(35).

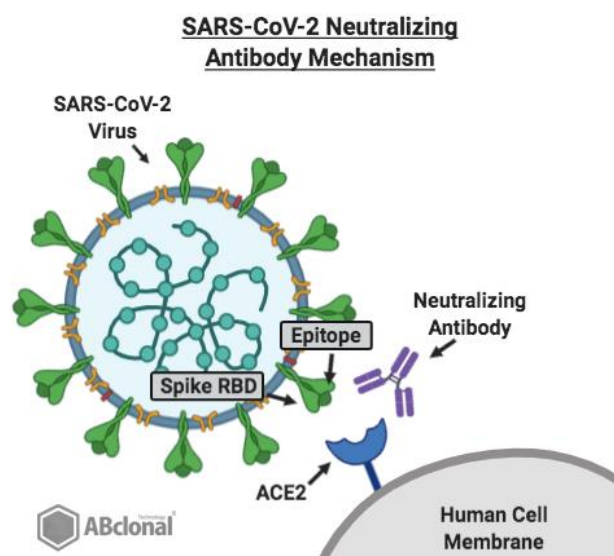
Ανοσολογική απόκριση μετά από λοίμωξη SARS-CoV-2

Μετά τη λοίμωξη από SARS-CoV-2, η πλειονότητα των ασθενών αναπτύσσει ανιχνεύσιμα αντισώματα έναντι της περιοχής (RBD) της ιικής πρωτεΐνης ακίδας (36)(37). Τα αντισώματα που παράγονται από τα B- λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγονικούς επιτόπους του ιού SARS-CoV-2, για παράδειγμα έναντι των πρωτεϊνών S και N, ξεκινώντας 4-8 ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (38). Αυτές οι αποκρίσεις αποτελούνται από μια αρχική παραγωγή αντισωμάτων IgM, ακολουθούμενη από αύξηση των IgA και IgG (38). Τα αντισώματα IgG είναι συνήθως ανιχνεύσιμα 16-20 ημέρες μετά τη λοίμωξη στην πλειονότητα των ασθενών και παραμένουν ανιχνεύσιμα για αρκετούς μήνες (39).

Τα ολικά (Total antibodies against the Receptor Binding Domain- TAbs-RBD) και τα εξουδετερωτικά (Neutralizing antibodies against the Receptor Binding Domain- NAbs-RBD) αντισώματα έναντι της περιοχής RBD χρησιμοποιούνται συνήθως για την

αξιολόγηση της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης μετά τον εμβολιασμό για το COVID-19 (23). Τα NAbs-RBD θεωρούνται μείζονος σημασίας για την προστασία από τη λοίμωξη SARS-CoV-2, δεδομένου ότι αναχαιτίζουν άμεσα την είσοδο του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα του ξενιστή μέσω τη παρεμπόδισης της σύνδεσης της περιοχής RBD της πρωτεΐνης ακίδας στους υποδοχείς ACE2 (23).

Εικόνα 2: Τα εξουδετερωτικά (Neutralizing antibodies against the Receptor Binding Domain- NAbs-RBD) αντισώματα έναντι της περιοχής RBD παρεμποδίζουν τη σύνδεση της περιοχής RBD της πρωτεΐνης ακίδας στους υποδοχείς ACE2.



Στα πλαίσια της ανοσολογικής απόκρισης μετά από λοίμωξη SARS-CoV-2, το ύψος της αντισωματικής απάντησης είναι πιθανό να σχετίζεται με τη σοβαρότητα της νόσου, ενώ ασθενείς με ήπια νόσο είναι πιθανό να μην έχουν ανιχνεύσιμα εξουδετερωτικά αντισώματα (40). Η εξουδετερωτική ικανότητα των αντισωμάτων συσχετίζεται θετικά με μειωμένο κίνδυνο για επαναλοίμωξη SARS-CoV-2 στο μέλλον (41). Παρά την αύξηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων λίγες εβδομάδες μετά τη νόσο, στη συνέχεια παρατηρείται μια επακόλουθη μείωσή τους διατηρώντας ανιχνεύσιμη εξουδετερωτική δραστηριότητα για τουλάχιστον 12 μήνες μετά την έναρξη της νόσου(42)(43). Στη μελέτη του Wajnbreg και των συνεργατών του αναδεικνύεται η μείωση του τίτλου των εξουδετερωτικών αντισωμάτων 5 μήνες μετά την έναρξη της νόσου, η μείωση αυτή συσχετίζεται θετικά με την αντίστοιχη μείωση των ολικών αντισωμάτων IgG έναντι της πρωτεΐνης ακίδας (41).

Ήδη από την αρχή της πανδημίας, η επιστημονική κοινότητα έθεσε το ερώτημα εάν η προηγούμενη έκθεση σε άλλα στελέχη κορονοϊών του κοινού κρουολογήματος ασκεί κάποια προστατευτική επίδραση στη λοίμωξη από τον SARS-CoV-2. Έχει αποδειχθεί ότι η ανοσολογική μνήμη έναντι άλλων κορονοϊών, όπως ο SARS, είναι τόσο ισχυρή που μπορεί να διαρκέσει ακόμη και για αρκετά χρόνια (44). Παρά τα μειωμένα επίπεδα αντισωμάτων στον ορό ασθενών που ανάρρωσαν από SARS ή MERS, η κυτταρική ανοσία εξακολουθούσε να υπάρχει τουλάχιστον 10 χρόνια μετά τη μόλυνση (45).

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τις διασταυρούμενες κυτταρικές ή/και χυμικές ανοσολογικές αποκρίσεις μεταξύ κορονοϊών του κοινού κρουολογήματος και SARS-CoV-2. Ωστόσο, λόγω της μεγάλης ετερογένειας είναι δύσκολο να προσδιοριστεί με σαφήνεια κατά πόσο οι αποκρίσεις από προηγούμενους κορονοϊούς ασκούν προστατευτικό όφελος στη νόσο COVID-19. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ευεργετική επίδραση της ανοσίας από προηγούμενες λοιμώξεις με κορονοϊούς του κοινού κρουολογήματος στην πορεία της νόσου COVID-19(46)(47), ενώ άλλες δεν έχουν δείξει καμία επίδραση (48) ή καταδεικνύουν ακόμη και δυσμενή επίδραση (49). Συνεπώς, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο κατά πόσο η έκθεση σε προηγούμενα στελέχη κορονοϊών επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την κλινική έκβαση της νόσου COVID-19.

Εμβολιασμός για SARS-CoV-2

Ο εμβολιασμός του πληθυσμού αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης της πανδημίας. Μέχρι σήμερα έχουν χορηγηθεί περισσότερες από 10 δισεκατομμύρια δόσεις παγκοσμίως ως αποτέλεσμα της πρωτοφανούς επαναστατικής επιτάχυνσης στη δημιουργία εμβολίων (16). Ο κύριος αντιγονικός στόχος για τα εμβόλια COVID-19 είναι η επιφανειακή πρωτεΐνη ακίδα του ιού SARS-CoV-2 (50).

Για την ανάπτυξη των εμβολίων για τον ιό SARS-CoV-2 χρησιμοποιήθηκαν παραδοσιακές τεχνικές, όπως η χρήση αδρανοποιημένων ή ζωντανών εξασθενημένων ιών, είτε νέες τεχνικές, όπως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες-φορείς και mRNA (50). Από την έναρξη της πανδημίας, έχουν υπάρξει περισσότερα από 200 υποψήφια εμβόλια παγκοσμίως, 38 από τα οποία έχουν εγκριθεί για χρήση σε τουλάχιστον μία χώρα (51). Τα εμβόλια είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά, μειώνουν

σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης σοβαρής και κρίσιμης νόσου COVID-19 καθώς έχουν συσχετιστεί με σημαντική μείωση των νοσηλειών και των θανάτων που σχετίζονται με COVID-19 (52),(53).

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα εμβόλια παγκοσμίως είναι το BNT162b2 (Pfizer-BioNTech). Το εμβόλιο έχει λάβει έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για άτομα ηλικίας 12 ετών και άνω και διατίθεται με άδεια επείγουσας χρήσης (EUA) για παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 11 ετών (54). Το τροποποιημένο αγγελιοφόρο RNA (mRNA) στο εμβόλιο είναι διαμορφωμένο σε λιπιδικά νανοσωματίδια που επιτρέπουν την μεταφορά του RNA στα κύτταρα του ξενιστή για να επιτραπεί η έκφραση του αντιγόνου, δηλαδή ολόκληρης της πρωτεΐνης ακίδας του ιού SARS-CoV-2.

Μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες σε παιδιά και ενήλικες καταδεικνύουν σημαντικά μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης συμπτωματικού και σοβαρού COVID-19 κατά τους πρώτους μήνες μετά τον εμβολιασμό με BNT162b2. Σε μεγάλες, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο (placebo) μελέτες, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου της πρωτογενούς σειράς δύο δόσεων στην πρόληψη του συμπτωματικού COVID-19 σε διάμεση παρακολούθηση δύο μηνών ήταν 95 % (95 % CI 90,3-97,6) για άτομα ηλικίας 16 ετών και άνω (55) 100 % (95 % CI 75,3-100) για άτομα ηλικίας 12 έως 15 ετών (56) και 91 % για άτομα ηλικίας 5 έως 11 ετών(57). Μεταξύ ενηλίκων ≥ 65 ετών που είχαν άλλες ιατρικές συννοσηρότητες ή παχυσαρκία, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου ήταν 91,7% (95% CI 44,2-99,8). Σε μεγαλύτερη διάρκεια παρακολούθησης, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου παρέμεινε υψηλή, αλλά μειώθηκε ελαφρώς στο 90% τοις εκατό στους δύο έως τέσσερις μήνες μετά τον εμβολιασμό και σε 84% στους τέσσερις έως έξι μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου(58).

Ως τώρα, τα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα του BNT162b2 καταδεικνύουν ισχυρές αποκρίσεις ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων με σημαντική κάποια διακύμανση ανάλογα με την ηλικία (56,59). Οι ανοσολογικές αποκρίσεις σε συμμετέχοντες ≥ 65 ετών ήταν γενικά χαμηλότερες από ό,τι σε νεότερα άτομα, αλλά εξακολουθούσαν να είναι συγκρίσιμες ή υψηλότερες από τους τίτλους σε σχέση με τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε άτομα που νόσησαν από COVID-19. Οι τίτλοι εξουδετερωτικών αντισωμάτων μειώνονται με την πάροδο του χρόνου μετά τον εμβολιασμό με BNT162b2 σε ενήλικες- σε μία μελέτη, παρατηρήθηκε απότομη μείωση των τίτλων εξουδετέρωσης σε διάστημα έξι μηνών μεταξύ ανδρών, ατόμων

ηλικίας ≥ 65 ετών και ανοσοκατασταλμένων ατόμων (60). Για παιδιά ηλικίας κάτω των πέντε ετών, τρεις δόσεις (μιας χαμηλότερης δόσης εμβολίου) ήταν απαραίτητες για να προκληθούν επίπεδα εξουδετερωτικών αντισωμάτων συγκρίσιμα με εκείνα των ηλικιωμένων ατόμων μετά από δύο δόσεις (61).

Αν και οι αρχικές κλινικές δοκιμές ανέφεραν εξαιρετικά υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας των εμβολίων COVID-19 (ιδίως με εμβόλια mRNA) στην πρόληψη της εργαστηριακά επιβεβαιωμένης συμπτωματικής λοίμωξης, η παρατηρούμενη αποτελεσματικότητά τους κατά της λοίμωξης μειώθηκε με την πάροδο του χρόνου λόγω της εξασθένησης της ανοσίας και της ανοσολογικής διαφυγής από ορισμένες παραλλαγές του SARS-CoV-2.

Παρόλο που η αποτελεσματικότητα των εμβολίων κατά της σοβαρής νόσου έχει επίσης μειωθεί με την πάροδο του χρόνου και στο πλαίσιο των υποπαραλλαγών Omicron, τα εμβόλια COVID-19 εξακολουθούν να παρέχουν καλά επίπεδα προστασίας κατά της σοβαρής νόσου.

Τεχνικές προσδιορισμού εξουδετερωτικών αντισωμάτων

Οι ορολογικές εξετάσεις ανιχνεύουν την παρουσία αντισωμάτων στο αίμα ως αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού έπειτα από την έκθεση σε κάποιο αντιγόνο. Κατά τις πρώτες ημέρες μετά την έκθεση στο αντιγόνο, τα αντισώματα ενδέχεται να μην ανιχνεύονται. Οι ορολογικές εξετάσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της πανδημίας COVID-19 βοηθώντας τους επαγγελματίες υγείας να εντοπίσουν άτομα που ενδέχεται να έχουν αναπτύξει ανοσολογική απόκριση έναντι του SARS-CoV-2. Ωστόσο, για τη σωστή χρήση των ορολογικών δοκιμασιών, είναι σημαντικό να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά απόδοσης και οι περιορισμοί τους. Επιπλέον, βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες για την αντιμετώπιση ερωτημάτων που θα ενημερώσουν καλύτερα για την κατάλληλη χρήση αυτών των δοκιμασιών, όπως ποια αντισώματα μπορούν να υποδηλώνουν ένα επίπεδο προστασίας που θα αποτρέψει ή θα μειώσει τη σοβαρότητα της λοίμωξης ή της επαναμόλυνσης, καθώς και τη διάρκεια για την οποία μπορεί να διαρκέσει αυτή η προστασία.

Ορισμένες ορολογικές δοκιμασίες ανιχνεύουν αντισώματα κατά της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2. Ωστόσο, οι δοκιμασίες αυτές δεν μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ προηγούμενης λοίμωξης και προηγούμενου εμβολιασμού,

καθώς ένα θετικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να υποδηλώνει προηγούμενη λοίμωξη, προηγούμενο εμβολιασμό ή και τα δύο. Ορισμένες ορολογικές δοκιμασίες ανιχνεύουν μόνο αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης N η οποία εντοπίζεται στον ιό SARS-CoV-2 αλλά όχι στα ευρέως χρησιμοποιούμενα εμβόλια που έχουν εγκριθεί για χρήση παγκοσμίως, συνεπώς ένα θετικό αποτέλεσμα σε μια ορολογική δοκιμασία με βάση την πρωτεΐνη N σε ένα άτομο που έχει λάβει ένα από αυτά τα εμβόλια θα υποδείκνυε ιστορικό μόλυνσης. Ωστόσο, ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι τα εμβολιασμένα άτομα είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης N μετά τη μόλυνση από ό,τι τα ανεμβολίαστα άτομα (62).

Η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι χαρακτηριστικά της διαγνωστικής δοκιμασίας και δεν εξαρτώνται από τον επιπολασμό της υπό εξέταση διάγνωσης (63)(64). Οι ορολογικές δοκιμασίες περιγράφονται επίσης από τη θετική και την αρνητική προγνωστική τους αξία(64). Η θετική και αρνητική προγνωστική αξία, σε αντίθεση με την ευαισθησία και την ειδικότητα, επηρεάζονται από την εκ των προτέρων πιθανότητα ενός ατόμου να έχει τη διάγνωση, δηλαδή από τον επιπολασμό της διάγνωσης στον πληθυσμό με τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά (63). Αυτά τα μέτρα υπολογίζονται χρησιμοποιώντας την ευαισθησία μιας εξέτασης, την ειδικότητά της και χρησιμοποιώντας μια υπόθεση σχετικά με το ποσοστό των ατόμων στον πληθυσμό που έχουν αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2. Κάθε εξέταση ενδέχεται να παρουσιάζει κάποια ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία υπολογίζουν την πιθανότητα ένα άτομο που λαμβάνει θετικό αποτέλεσμα από μια εξέταση να έχει πραγματικά αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2 (θετική προγνωστική αξία) και πόσο πιθανό είναι ένα άτομο που λαμβάνει αρνητικό αποτέλεσμα από μια εξέταση να μην έχει πραγματικά αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2 (αρνητική προγνωστική αξία)(63).

Στις μέρες μας έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της εξουδερωτικής ικανότητας των αντισωμάτων μετά από εμβολιασμό για τον ιό SARS-CoV-2 που στηρίζονται σε διαφορετικές μεθοδολογικές αρχές. Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) θεωρείται η μέθοδος αναφοράς για την αξιολόγηση της εξουδερωτικής ικανότητας των αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό COVID-19 και έχει εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA) μαζί με άλλες ανοσολογικές δοκιμασίες (65). Ωστόσο, υπάρχουν κι άλλες μέθοδοι που

χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση εξουδετερωτικών αντισωμάτων για SARS-CoV-2, οι οποίες, αν και δεν έχουν εγκριθεί επισήμως από τον FDA, παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την ELISA.

Η ELISA χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας αλλά υψηλό κόστος και αυξημένο κίνδυνο τυχαίων σφαλμάτων. Η ανεύρεση νέων, ταχύτερων, αυτοματοποιημένων και οικονομικότερων μεθόδων ανίχνευσης αντισωμάτων με υψηλή αξιοπιστία κρίνεται αναγκαία προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο βελτιστοποίησης ή αντικατάστασης των ήδη υπάρχουσων παραδοσιακών τεχνικών.

Ερευνητικοί στόχοι-Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός της εξουδετερωτικής ικανότητας των anti-RBD αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 σε ιατρονοσηλευτικό προσωπικό του τεταρτοβάθμιου Παιδιατρικού Νοσοκομείου «Η Αγία Σοφία» που έχει εμβολιαστεί πλήρως για τη COVID-19 με το εμβόλιο BNT162b2 καθώς και η σύγκριση δύο διαφορετικών μεθόδων ανίχνευσής τους, της ELISA και του ανοσοφθορισμού. Η πρώτη είναι επισήμως αναγνωρισμένη από τον FDA για τον προσδιορισμό της εξουδετερωτικής ικανότητας αντισωμάτων, ενώ η δεύτερη είναι ταχύτερη και έχει χαμηλότερο κόστος συγκριτικά με την πρώτη. Πιο συγκεκριμένα, ερευνητικοί στόχοι της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι:

1. Η σύγκριση δύο μεθόδων προσδιορισμού της εξουδετερωτικής ικανότητας των anti-RBD αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από τον εμβολιασμό για COVID-19 με το εμβόλιο BNT162b2 με τη χρήση δύο διαφορετικών μεθόδων.

2. Η καταγραφή της μεταβολής της εξουδετερωτικής ικανότητας των αντισωμάτων στο ίδιο χρονικό διάστημα με τη χρήση ELISA και ανοσοφθορισμού.

3. Ο υπολογισμός της αξιοπιστίας της μεθόδου του ανοσοφθορισμού σε σχέση με την ELISA.

Μεθοδολογία

Σχεδιασμός μελέτης και πληθυσμός

Η παρούσα μελέτη κοόρτης περιλαμβάνει τη συμμετοχή 200 ατόμων που ανήκουν στο ιατρονοσηλευτικό προσωπικό του Νοσοκομείου Παίδων "Αγία Σοφία" στην Αθήνα, το οποίο είναι το μεγαλύτερο τεταρτοβάθμιο παιδιατρικό νοσοκομείο στην Ελλάδα. Η μελέτη περιλαμβάνει επαγγελματίες υγείας (ιατρούς, νοσηλεύτες, τραυματιοφορείς), εργαστηριακό προσωπικό, προσωπικό καθαριότητας καθώς και διοικητικό προσωπικό που έλαβαν τις δύο πρώτες δόσεις του εμβολίου Pfizer/BioNTech BNT162b2 mRNA COVID-19 τον Ιανουάριο του 2021.

Για κάθε άτομο που συμμετείχε στη μελέτη πραγματοποιήθηκε συμπλήρωση ενός εντύπου συλλογής δημογραφικών και κλινικών δεδομένων. Τα δεδομένα περιλάμβαναν το φύλο, την ηλικία, τον Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ- φυσιολογικό βάρος = $18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$, υπέρβαρο = $25-29,9 \text{ kg/m}^2$ και παχυσαρκία $\geq 30 \text{ kg/m}^2$), ιστορικό καπνίσματος, ιστορικό αυτοάνοσων παθήσεων (Θυρεοειδίτιδα Hashimoto, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, αυτοάνοση ηπατίτιδα, ψωρίαση κ.λπ.) ιστορικό υπερλιπιδαιμίας καθώς και αλλεργίες (σε φάρμακα, τρόφιμα κ.λπ.).

Από τη μελέτη αποκλείστηκαν άτομα που ανήκουν στο ιατρονοσηλευτικό προσωπικό με ιστορικό εργαστηριακά επιβεβαιωμένης φυσικής λοίμωξης SARS-CoV-2 κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης.

Δείγματα ορού συλλέχθηκαν σε δύο χρονικές στιγμές για όλους τους συμμετέχοντες: 1 μήνα (n=200 οροί) και 4 μήνες (n=200 οροί) μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2 mRNA COVID-19.

Τα δείγματα, αφού κωδικοποιήθηκαν με μοναδικό κωδικό, φυγοκεντρήθηκαν στα $2000 \times g$ για 10 λεπτά και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι την ανάλυση. Ο προσδιορισμός της εξουδετερωτικής ικανότητας των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας, στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Νοσοκομείο Παίδων "Αγία Σοφία". Σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών και στις δύο μεθόδους, όλες οι πειραματικές διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και

αποκλείστηκαν δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση ή που περιέχουν αυξημένες συγκεντρώσεις χολερυθρίνης.

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παιδών "Αγία Σοφία" (Αριθμός Πρωτοκόλλου: 2794). Από όλους τους συμμετέχοντες ελήφθη γραπτή συγκατάθεση.

Δοκιμασίες προσδιορισμού εξουδετερωτικής ικανότητας αντισωμάτων anti-RBD

Η εξουδετερωτική ικανότητα των αντισωμάτων έναντι της περιοχής πρόσδεσης υποδοχέα (NAbs-RBD; %) μετρήθηκε με τη χρήση δύο διαφορετικών δοκιμασιών. Η δοκιμασία προσδιορισμού εξουδετερωτικής ικανότητας αντισωμάτων με τη χρήση ELISA διενεργήθηκε προοπτικά, ενώ με τον ανοσοφθορισμό αναδρομικά. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο δοκιμασίες είχαν τον ίδιο αριθμό παρτίδας (LOT Number:29210306).

Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Η πρώτη δοκιμασία πραγματοποιήθηκε προοπτικά με τη χρήση του κιτ ανίχνευσης αντισωμάτων εξουδετέρωσης SARS-CoV-2 cPass™ (GenScript Biotech Corporation, Piscataway, New Jersey, ΗΠΑ). Αυτή η μέθοδος είναι μια ELISA αποκλεισμού που χρησιμοποιεί συζευγμένο με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase - HRP) ανασυνδυασμένο θραύσμα RBD του SARS-CoV-2 και την ανθρώπινη πρωτεΐνη υποδοχέα ACE2. Η οπτική πυκνότητα (Optical Density - OD) μετρήθηκε στα 450 nm στον αναγνώστη πλακών μικροτίτλων Labtech LT-4500. Τα ποσοστά εξουδετερωτικής ικανότητας αντισωμάτων υπολογίζονται με τον ακόλουθο τύπο: Ποσοστό αναστολής σήματος (%) = $(1 - \text{τιμή OD του δείγματος} / \text{τιμή OD του αρνητικού ελέγχου}) * 100$. Ποσοστά $\geq 30\%$ θεωρούνται θετικά. Η μέθοδος αυτή έχει εγκριθεί από τον FDA λόγω των υψηλών ποσοστών ευαισθησίας και ειδικότητας (100%)(66) και χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος εκλογής (gold standard method) για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

Εικόνα 3: Η μέθοδος ELISA SARS-CoV-2 cPass™ (GenScript Biotech Corporation, Piscataway, New Jersey, ΗΠΑ).



Ανοσοφθορισμός

Η δεύτερη δοκιμασία ήταν η ταχεία μέθοδος ανοσοχρωματογραφίας φθορισμού, η οποία πραγματοποιήθηκε αναδρομικά στον χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο n-AbCOVID-19 (DyonMed S.A., Γλυκά Νερά, Ελλάδα). Όταν στο ορό υπάρχουν εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού SARS-CoV-2, τότε αυτά θα προσκολληθούν στην φθοριοσημασμένη πρωτεΐνη RBD της μεμβράνης (ζώνη δοκιμής) κατά τη διάρκεια επώασης 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, όταν αυτά χαρτογραφηθούν προς την περιοχή ανίχνευσης (Ζώνη T), θα εμφανιστεί μια ασθενής ζώνη σήματος φθορισμού. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων βασίζεται στον υπολογισμό του βαθμού αναστολής [(αρνητικός έλεγχος-δείγμα προς εξέταση) / αρνητικός έλεγχος * 100%]. Τα ποσοστά $\geq 20\%$ θεωρούνται θετικά. Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η ευαισθησία και η ειδικότητα του ανοσοφθορισμού είναι 95% και 99%, αντίστοιχα.

Εικόνα 4: Ο αναλυτή Axceed-P200 (Bioscience Diagnostic Technology Co., Ltd., Tianjin, Κίνα).



Στατιστική ανάλυση

Η καταγραφή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο λογιστικό πρόγραμμα Excel. Η επαλήθευση, η επεξεργασία και η τροποποίηση των δεδομένων έγινε με την γλώσσα υπολογιστών SQL σύμφωνα με προγραμματισμό κατάλληλων σχεσιακών πινάκων για την αποφυγή επαναληψιμότητας και πιθανών διπλοεγγραφών χρησιμοποιώντας ως μοναδικό κριτήριο τον κωδικό που έλαβαν τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη. Η ανάλυση των δεδομένων υλοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου R (v.4-01).

Οι αριθμητικές τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (SD), ως διάμεση τιμή (25ο – 75ο) για τα παραμετρικά και τα μη παραμετρικά μεγέθη αντίστοιχα και ως μέγεθος (ποσοστό %). Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $\alpha=5\%$.

Η ανάλυση των δεδομένων για τα εξαρτημένα μεγέθη πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο των μέσων τιμών *paired sample test* και τον έλεγχο των διαμέσων τιμών με την στατιστική δοκιμασία του προσημικού *test* κατά ζεύγη του Wilcoxon για παραμετρικά και μη παραμετρικά μεγέθη αντίστοιχα. Η ανάλυση των δεδομένων για την σύγκριση 2 ανεξάρτητων μεγεθών έγινε σύμφωνα με τον ανεξάρτητο παραμετρικό έλεγχο *t-test* για την σύγκριση των μέσων τιμών και τον μη παραμετρικό έλεγχο του προσημικού *test* του Wilcoxon για την σύγκριση διαμέσων τιμών, για τα παραμετρικά και μη παραμετρικά μεγέθη αντίστοιχα. Η ανάλυση των δεδομένων για την σύγκριση περισσότερων από 2 μεγεθών έγινε σύμφωνα με τον ανεξάρτητο παραμετρικό έλεγχο *One Way Anova* και ανεξάρτητο μη παραμετρικό *Kruskall-Wallis*. Η ισότητα των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με την στατιστική δοκιμασία *Bartlett test*. Οι πολλαπλές συγκρίσεις των παραμετρικών δεδομένων ελέγχθηκαν με αναλύσεις *Post-Hoc*, συγκεκριμένα με δοκιμές εύρους του *Tukey* (ίσες διακυμάνσεις) και *Tamhane's T2* (άνισες διακυμάνσεις) ανάλογα με τα αποτελέσματα ισότητας των διακυμάνσεων. Οι πολλαπλές συγκρίσεις των μη παραμετρικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με την στατιστική δοκιμασία του *Wilcoxon rank sum test* με διόρθωση *Bonferroni*. Οι δοκιμές χ^2 και *Fisher's exact test* πραγματοποιήθηκαν για την ανίχνευση των συσχετίσεων μεταξύ ποιοτικών δεδομένων.

Για την ανίχνευση της ποιοτικής συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη ROC (*Receiver operating characteristic*). Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) προσδιορίζει την ορθότητα της δοκιμής. Οι τιμές $AUC < 0,5$ υποδηλώνουν ότι η δοκιμασία δεν είναι χρήσιμη, $0,5-0,6$ κακή, $0,6-0,7$ επαρκής, $0,7-$

0,8 καλή,, 0,8-0,9 πολύ καλή και 0,9-1,0 εξαιρετική διαγνωστική ακρίβεια, αντίστοιχα(67). Οι τιμές *P-values* των AUCs (Mann-Whitney) και των συγκρίσεων (Venkatraman test) υπολογίστηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα pROC.

Υπολογίστηκαν το θετικό ποσοστό συμφωνίας (Positive percentage agreement-PPA), το αρνητικό ποσοστό συμφωνίας (negative percent agreement-NPA), το συνολικό ποσοστό συμφωνίας (overall percent agreement-OPA) και ο συντελεστής Cohen's Kappa για την ανίχνευση της συμφωνίας μεταξύ των αποτελεσμάτων της ELISA και του ανοσοφθορισμού. Οι τιμές Kappa $\leq 0,2$ υποδηλώνουν ασθενή συμφωνία, 0,2-0,4 ικανοποιητική συμφωνία, 0,4-0,6 μέτρια συμφωνία, 0,6-0,8 καλή συμφωνία και $\geq 0,8$ σχεδόν τέλεια συμφωνία(68).

Ο συντελεστής συσχέτισης συμφωνίας του Lin (Lin's concordance correlation coefficient-CCC) και τα διαγράμματα Bland-Altman αντικατοπτρίζουν την ποσοτική συμφωνία μεταξύ ELISA (μεθόδου αναφοράς) και ανοσοφθορισμού όσον αφορά την (69)Οι τιμές του Lin's CCC $\leq 0,9$ υποδηλώνουν ασθενή συμφωνία, 0,9-0,95 μέτρια συμφωνία, 0,95-0,99 σημαντική συμφωνία και $\geq 0,99$ σχεδόν τέλεια συμφωνία(70).

Κύριο μέρος

Πληθυσμός μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 200 άτομα από το ιατρονοσηλευτικό προσωπικό του Νοσοκομείου «Η Αγία Σοφία» οι οποίοι έλαβαν τις 2 πρώτες δόσεις του εμβολίου BNT162b2 με διαφορά 21 ημερών. Η διάμεση ηλικία (IQR) των συμμετεχόντων ήταν 45 (35-53) έτη. Κατά την ταξινόμηση το πληθυσμού σε 3 ηλικιακές ομάδες, 53 (26,5%) συμμετέχοντες ανήκαν στην ηλικία 20-35 ετών, 80 (40%) στην ηλικία 35-50 ετών και 67 (33,5%) στην ηλικία 50-65 ετών. Η διάμεση τιμή του ΔΜΣ (IQR) ήταν 24,15 kg/m² (21,60-27,13 kg/m²). Μεταξύ των 200 συμμετεχόντων, 147 (73,5%) ήταν γυναίκες, 52 (26%) είχαν αλλεργίες, 44 (22%) είχαν ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος, 42 (21%) ήταν καπνιστές και 16 (8%) είχαν υπερλιπιδαιμία. Τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης ανά ηλικιακή ομάδα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Κατανομή των δημογραφικών χαρακτηριστικών των 200 ατόμων που ανήκουν στο ιατρονοσηλευτικό προσωπικό του Νοσοκομείου Παίδων "Η Αγία Σοφία" και συμμετείχαν στη μελέτη.

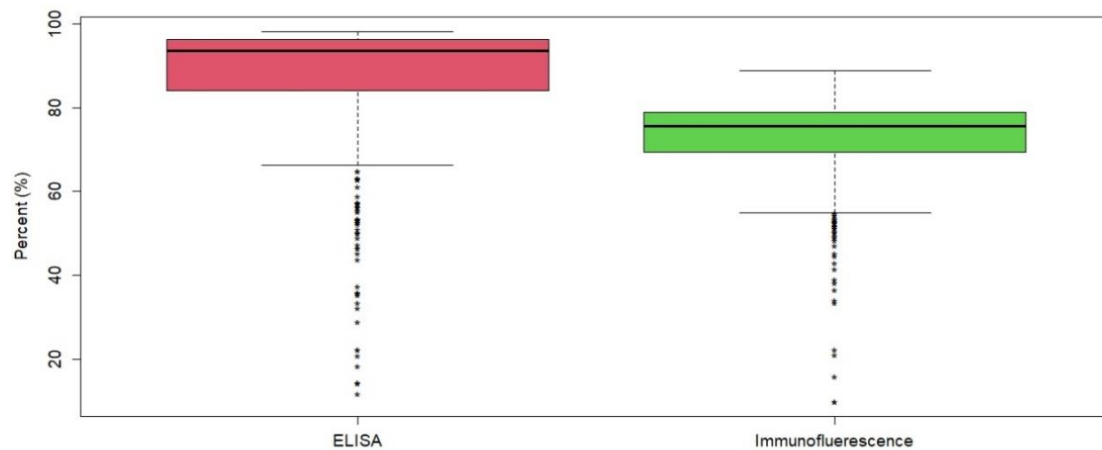
Χαρακτηριστικά	Ηλικιακές ομάδες (Ετη)				P-Value
	All	20-35	35-50	50-65	
	N = 200 (100%)	N = 53 (26.5%)	N = 80 (40%)	N = 67 (33.5%)	
Φύλο n (%)					0.374
Θήλυ	147 (73.5)	36 (67.92)	58 (72.5)	53 (79.1)	
Άρρεν	53 (26.5)	17 (32.08)	22 (27.5)	14 (17.5)	
Αυτοάνοσα νοσήματα n (%)					0.679
Όχι	156 (78)	43 (81.13)	63 (78.75)	50 (74.63)	
Ναι	44 (22)	10 (18.87)	17 (21.25)	17 (21.25)	
Υπερλιπιδαιμία n (%)					0.035
Όχι	184 (92)	50 (94.34)	77 (96.25)	57 (85.07)	
Ναι	16 (8)	3 (5.66)	3 (3.75)	10 (12.5)	
Αλλεργίες n (%)					0.859
Όχι	148 (74)	38 (71.7)	59 (73.75)	51 (76.12)	
Ναι	52 (26)	15 (28.3)	21 (26.25)	16 (20)	
Κάπνισμα n (%)					0.049
Όχι	158 (79)	48 (90.57)	61 (76.25)	49 (73.13)	
Ναι	42 (21)	5 (9.43)	19 (23.75)	18 (22.5)	
Διάμεση ηλικία (IQR) (Years)	45 [35-53]	31 [29-33]	44 [40-47]	55 [53-60.5]	0.372
Διάμεση τιμή BMI (IQR) (Kg/m²)	24.15 [21.6-27.13]	22.3 [20.3-25.8]	23.95 [21.75-26]	25.8 [23.5-29.35]	<0.001

Ποσοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων της ELISA και του ανοσοφθορισμού

Σύγκριση αποτελεσμάτων στο σύνολο των μετρήσεων

Στο συνολικό πληθυσμό της μελέτης, οι διάμεσες τιμές (IQR) των NAbs-RBD (%) που ανιχνεύθηκαν με ELISA και ανοσοφθορισμό ήταν 91,62% (82.17-95.75) και 74.53 (77.21-86.54) (P -value<0,0001) **(Εικόνα 5)**.

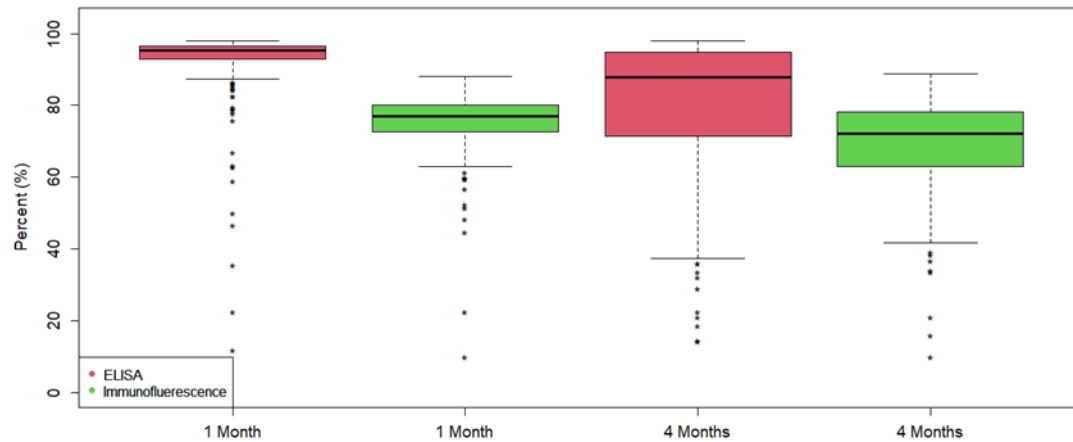
Εικόνα 5: Σύγκριση διάμεσων τιμών (IQR) των NAbs-RBD με ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (πράσινο χρώμα) στο συνολικό πληθυσμό της μελέτης.



Σύγκριση αποτελεσμάτων σε 1 και 4 μήνες μετά τον εμβολιασμό

Ένα μήνα μετά τη 2^η δόση, οι διάμεσες τιμές (IQR) των NAbs-RBD (%) που ανιχνεύθηκαν με ELISA και ανοσοφθορισμό σε 200 συμμετέχοντες ήταν 95,31% (92,84-96,61%) (εύρος: 11,76-98%) και 76,94% (72,71-80%) (εύρος: 10-88,1%), αντίστοιχα (P -value<0,0001) **(Εικόνα 6)**. Τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση, οι διάμεσες τιμές (IQR) των NAbs-RBD (%) που ανιχνεύθηκαν με ELISA και ανοσοφθορισμό ήταν 87,91% (71,5-94,89) (εύρος: 14,25-98%) και 72,22% (62,99-78,15%) (εύρος: 10-88,81%), αντίστοιχα (P -value<0,0001) **(Εικόνα 6)**.

Εικόνα 6: Σύγκριση διάμεσων τιμών (IQR) των NAbs-RBD με ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (πράσινο χρώμα) ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2.



Ένα μήνα μετά τη 2^η δόση, οι τιμές NAbs-RBD (%) ήταν σημαντικά χαμηλότερες με τον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την ELISA, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία, τον ΔΜΣ, την ομάδα αίματος, το κάπνισμα, το ιστορικό αλλεργιών, αυτοάνοσων νοσημάτων ή υπερλιπιδαιμίας (P -value<0,004). Τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση, οι τιμές NAbs-RBD (%) ήταν επίσης σημαντικά χαμηλότερες με τον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την ELISA, ανεξάρτητα από όλες τις δημογραφικές και κλινικές παραμέτρους (P -value< 0,042).

Στις δύο χρονικές στιγμές της μελέτης, οι διάμεσες τιμές των NAbs-RBD (%) ήταν σημαντικά χαμηλότερες με τον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την ELISA (P -value<0,0001) για όλες τις ηλικιακές ομάδες (**Πίνακας 2**). Η υψηλότερη διάμεση διαφορά εντοπίστηκε στην ηλικιακή ομάδα 50-65 ετών έναν μήνα μετά τη 2^η δόση (ELISA: 94,49 % έναντι ανοσοφθορισμού: 75,44 %, P -value<0,0001), ενώ η χαμηλότερη διάμεση διαφορά παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 50-65 ετών τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση (78,11 % έναντι 67,3 %, P -value<0,0001) (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2: Ποσοτική σύγκριση των διάμεσων τιμών NAbs-RBD (%) μεταξύ ELISA και ανοσοφθορισμού ανά ηλικιακή ομάδα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Wilcoxon signed rank test (a) ή του Kruskal-Wallis test (b). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (P -value<0,05) σημειώνονται με πλάγια γράμματα. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη διάμεση τιμή [IQR] (%).

Χρονική στιγμή μετά τον εμβολιασμό	1 Μήνας			4 Μήνες			
	Ηλικία (έτη)	ELISA (%)	Ανοσοφθορισμός (%)	P -value	ELISA (%)	Ανοσοφθορισμός (%)	P -value
Συνολικός Πληθυσμός		95.31 [92.84-96.61]	76.94 [72.71-80]	<0.001 ^a	87.91 [71.5-94.89]	72.22 [62.99-78.15]	<0.001 ^a
20-35 n=53 (26.5%)		96.06 [94.5-96.75]	78.33 [76.11-80.28]	<0.001 ^a	94.31 [87.71-96.45]	77.56 [72.22-80]	<0.001 ^a
35-50 n=80 (40%)		95.14 [92.98-96.5]	76.53 [72.43-79.17]	<0.001 ^a	86.87 [70.93-94.17]	71.34 [64.86-77.14]	<0.001 ^a
50-65 n=67 (33.5%)		94.49 [89.63-96.37]	75.44 [71.39-79.93]	<0.001 ^a	78.52 [55.91-91.38]	67.22 [54.44-76.39]	<0.001 ^a
P-Value		0.0189 ^b	0.008 ^b		<0.001 ^b	<0.001 ^b	

Προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν αποκλίσεις μεταξύ των δύο μεθόδων, οι τιμές NAbs-RBD (%) που μετρήθηκαν με ELISA και ανοσοφθορισμό κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 διαφορετικές ομάδες με βάση τα διαφορετικά cut-offs για κάθε μέθοδο. Ο δείκτης ακρίβειας μεταξύ ELISA και ανοσοφθορισμού εκτιμήθηκε σε 36,8%, που δείχνει μέτρια συμφωνία. Ένα μήνα μετά τη 2^η δόση, δεν υπήρχαν συμμετέχοντες που να είναι αρνητικοί και με τις δύο μεθόδους, ενώ 2/200 (1%) συμμετέχοντες ήταν αρνητικοί στην ELISA και θετικοί στον ανοσοφθορισμό και 1/200 (0,5%) ήταν αρνητικοί στον ανοσοφθορισμό και θετικοί στην ELISA. Τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση, 5/200 (2,5%) συμμετέχοντες ήταν αρνητικοί στην ELISA και θετικοί

στον ανοσοφθορισμό, 2/200 (1%) ήταν αρνητικοί στον ανοσοφθορισμό αλλά θετικοί στην ELISA και 1/200 (0,5%) ήταν αρνητικοί και στις δύο μεθόδους (**Πίνακας 3**).

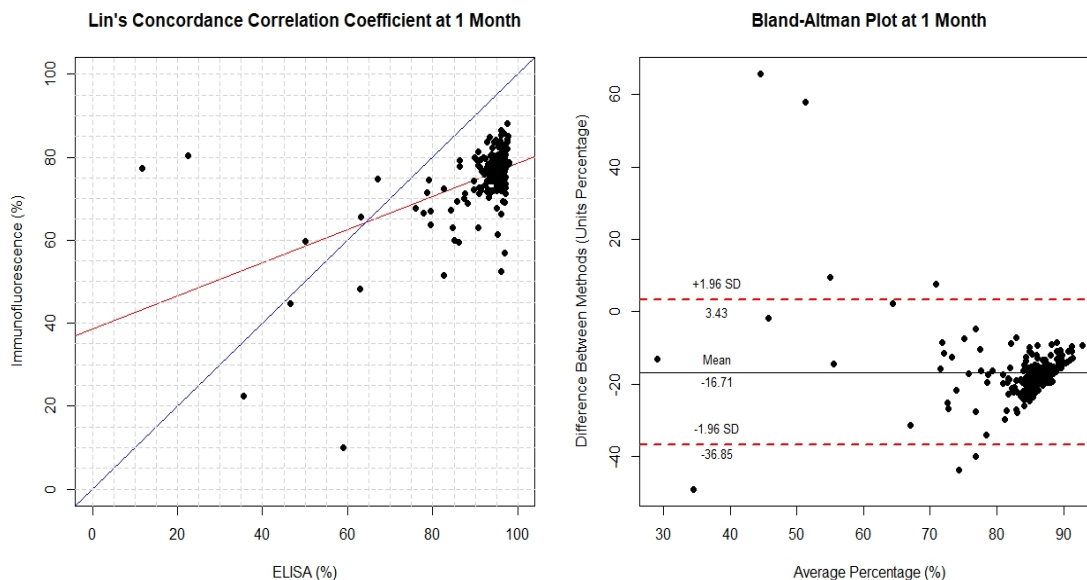
Πίνακας 3: Πίνακας συνάφειας μεταξύ των κατηγοριοποιημένων ποσοστών των μεθόδων ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με ELISA και ανοσοφθορισμό. Τα όρια των θετικών τιμών για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού είναι 30% και 20%. Ο δείκτης ακρίβειας είναι 36,8 % που υποδηλώνει μέτρια συμφωνία.

	Ανοσοφθορισμός (%)			
ELISA (%)	[0-20)	[20,50)	[50,80)	[80,100]
[0-30)	1	4	2	1
[30,50)	0	4	8	0
[50,80)	2	6	59	0
[80,100]	0	1	229	83

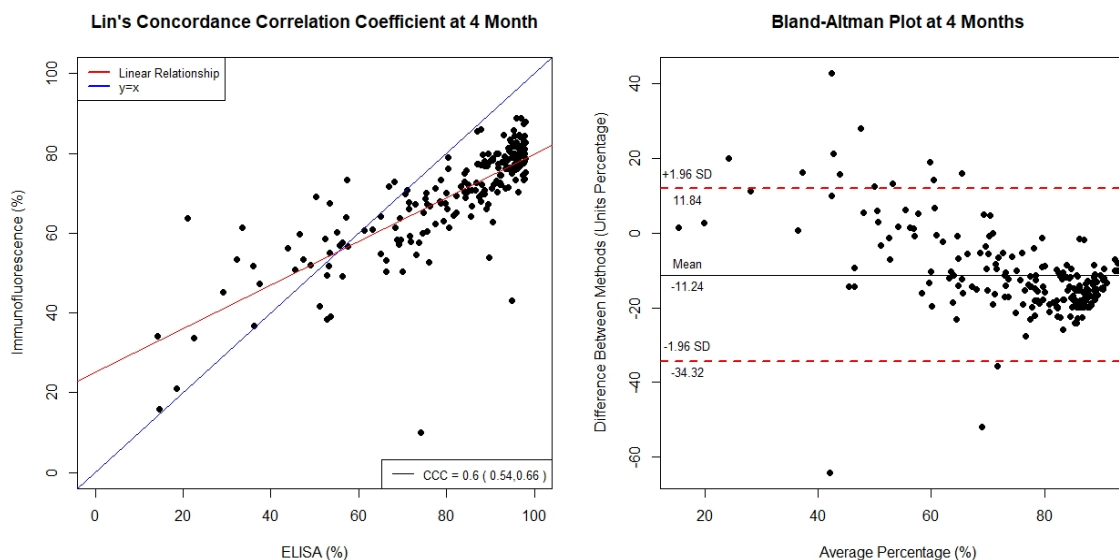
Στις δύο χρονικές στιγμές της μελέτης, ο δείκτης Lin's CCC υπολογίστηκε σε 0,37 (95% CI: 0.31-0.42). Ο δείκτης Lin's CCC αυξήθηκε σημαντικά από 0,21 (95% CI: 0,15-0,27) στον 1^ο μήνα σε 0,6 (95% CI: 0,53-0,66) στους 4 μήνες μετά τη 2^η δόση, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Ένα μήνα μετά τη 2^η δόση, το μέσο αρνητικό σφάλμα (%) του ανοσοφθορισμού από την ELISA ήταν 16,71% και το εύρος της μέσης διαφοράς μεταξύ των δύο μεθόδων (± 2 τυπικές αποκλίσεις- Standard Deviation-SD) ήταν -16,71% έως -36,85% (**Εικόνα 7**) (**Blant-Altman analysis**). Τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση, το μέσο αρνητικό σφάλμα (%) του ανοσοφθορισμού σε σύγκριση με την ELISA ήταν 11,24% και το εύρος για τη μέση διαφορά (± 2 SD) ήταν μεταξύ 11,84% και -34,32% (**Εικόνα 8**) (**Blant-Altman analysis**). Τα όρια συμφωνίας 95% ήταν ευρεία και οι τιμές κατανέμονται τυχαία κοντά στη γραμμή, με τις διαφορές των δύο μεθόδων να εκτιμώνται περίπου 19% και 14% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση, αντίστοιχα.

Εικόνα 7: Συντελεστής συσχέτισης συμφωνίας του Lin's και διαγράμματα Bland-Altman για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA. Στα διαγράμματα του συντελεστή συσχέτισης Lin's, η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει την πραγματική συμφωνία και η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την ιδανική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο δείκτης εκτιμήθηκε σε 0,21 (95% CI: 0,15-0,27) ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση υποδηλώνοντας ασθενή ποσοτική συμφωνία των δύο μεθόδων. Στα διαγράμματα Blant-Altman, το μέσο αναλογικό σφάλμα και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης απεικονίζονται με μαύρες και κόκκινες γραμμές, αντίστοιχα και υπολογίστηκε σε 16,71%.



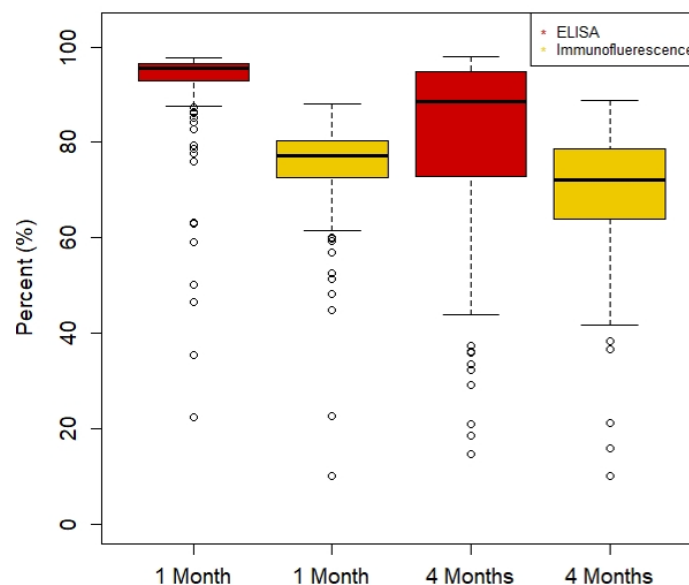
Εικόνα 8: Συντελεστής συσχέτισης συμφωνίας του Lin's και διαγράμματα Bland-Altman για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA. Στα διαγράμματα του συντελεστή συσχέτισης Lin's, η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει την πραγματική συμφωνία και η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την ιδανική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Ο δείκτης εκτιμήθηκε σε 0.6 (95% CI: 0.54-0.66) τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση, υποδηλώνοντας ασθενή ποσοτική συμφωνία των δύο μεθόδων. Στα διαγράμματα Blant-Altman, το μέσο αναλογικό σφάλμα και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης απεικονίζονται με μαύρες και κόκκινες γραμμές, αντίστοιχα υπολογίστηκε σε 11,24%.



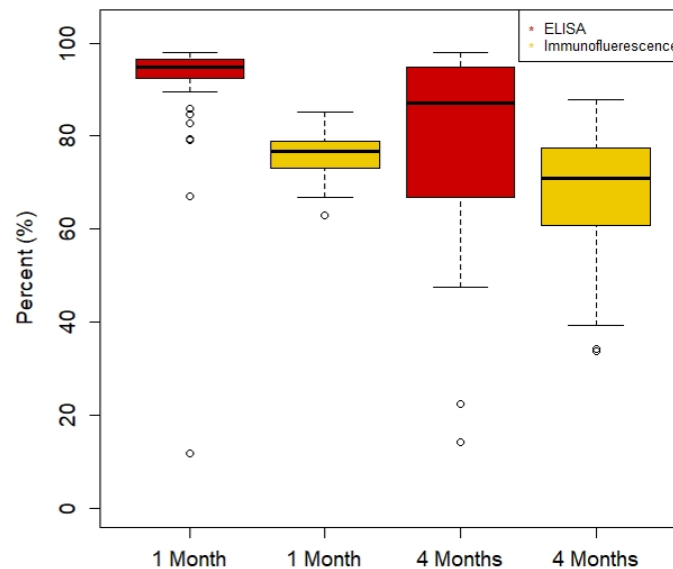
Σύγκριση ELISA και ανοσοφθορισμού με βάση τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού μελέτης

Στις **Εικόνες 9 και 10** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό ανά φύλο ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το φύλο. Στις 147 γυναίκες, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.27% και 16.31% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στους 53 άνδρες, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.8% και 16.35% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 9: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στις 147 γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.27% και 16.31% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).



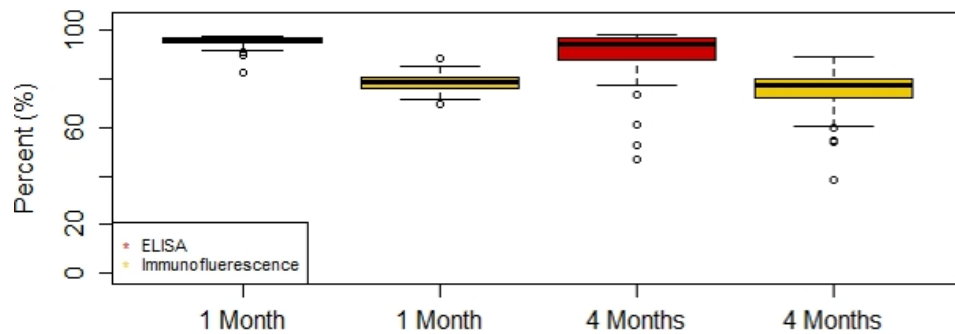
Εικόνα 10: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στους 53 άνδρες που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.8% και 16.35% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).



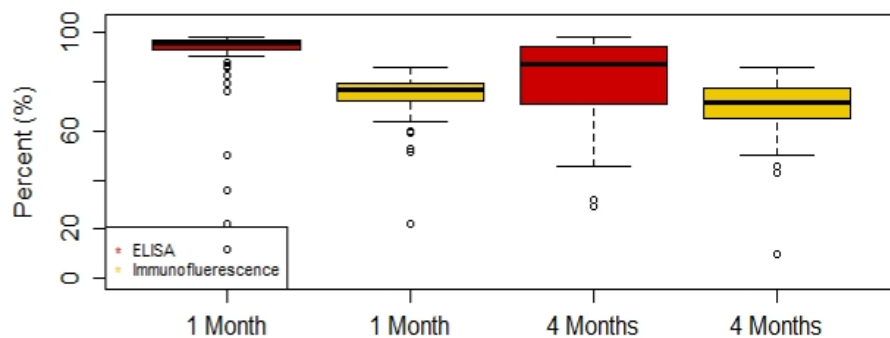
Στις **Εικόνες 11, 12 και 13** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό ανά ηλικιακή ομάδα (0-35, 35-50, 50-65 ετών, αντίστοιχα) των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) για όλες τις ηλικιακές ομάδες. Στα 53 άτομα ηλικίας 0-35 ετών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.82% και 16.75% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα 80 άτομα ηλικίας 35-50 ετών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.61% και 15.53% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα 67 άτομα ηλικίας 50-65 ετών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο

αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 19.05% και 11.3% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

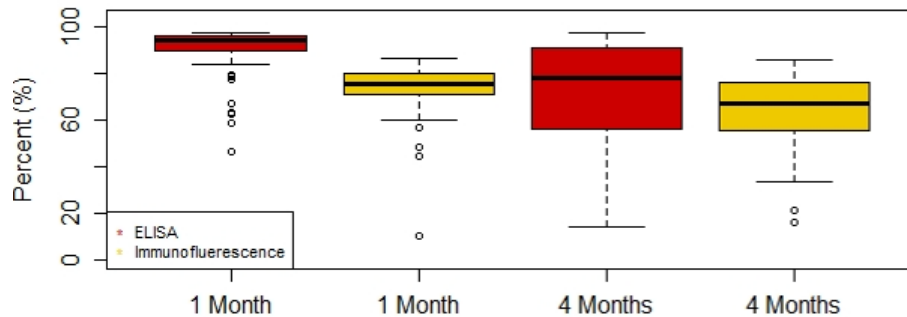
Εικόνα 11: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 53 άτομα ηλικίας 0-35 ετών ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2 που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.82% και 16.75% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).



Εικόνα 12: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 80 άτομα ηλικίας 35-50 ετών ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2 που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.61% και 15.53% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

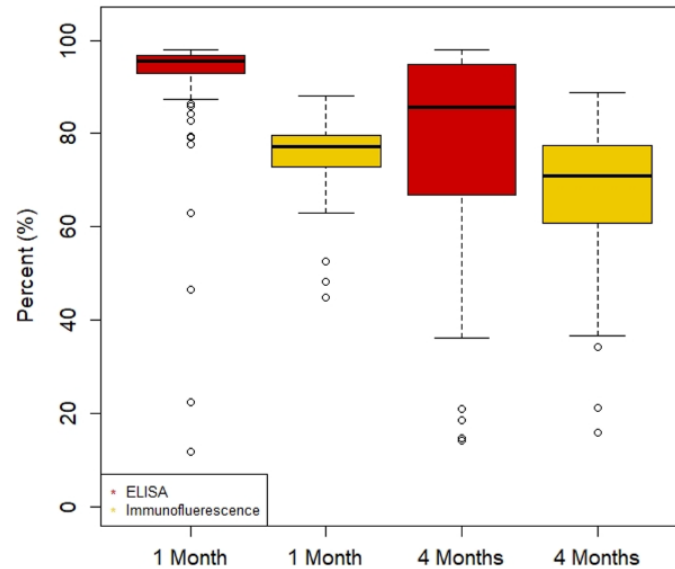


Εικόνα 13: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 67 άτομα ηλικίας 50-65 ετών ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2 που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 19.05% και 11.3% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

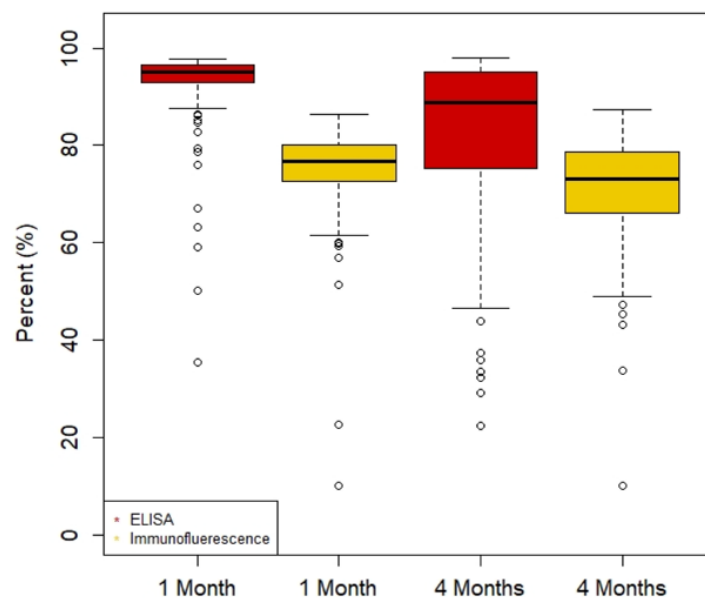


Στις **Εικόνες 14 και 15** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό ανά κατηγορία ΔΜΣ (≤ 25 Kg/m² και > 25 Kg/m², αντίστοιχα) των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το ΔΜΣ. Στα 115 άτομα με ΔΜΣ ≤ 25 Kg/m², το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.27% και 14.79% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα 85 άτομα με ΔΜΣ > 25 Kg/m², το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.41% και 15.83% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 14: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 115 άτομα με ΔΜΣ ≤ 25 Kg/m² που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.27% και 14.79% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value <0.001).

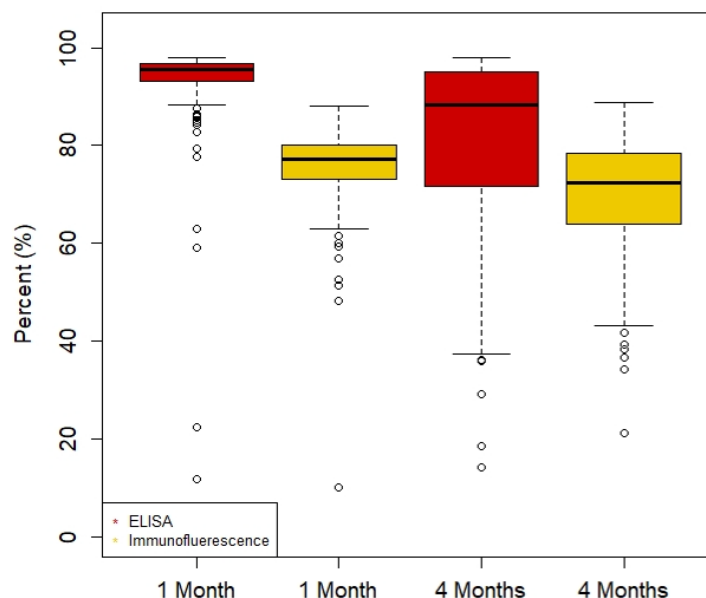


Εικόνα 15: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 85 άτομα με ΔΜΣ > 25 Kg/m² που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.41% και 15.83% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value <0.001).

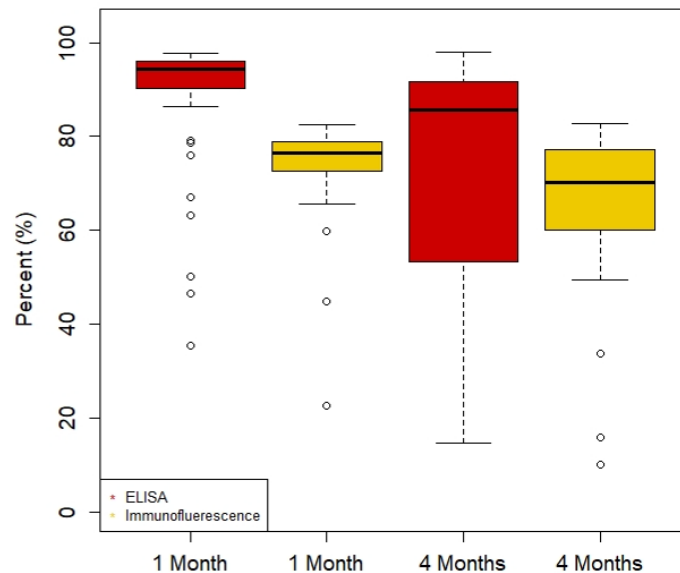


Στις **Εικόνες 16 και 17** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό στους καπνίζοντες και μη καπνίζοντες που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το κάπνισμα. Στους 158 μη καπνίζοντες, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.37% και 15.9% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στους 42 καπνίζοντες, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.87% και 15.65% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 16: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στους 158 μη καπνίζοντες που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.37% και 15.9% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

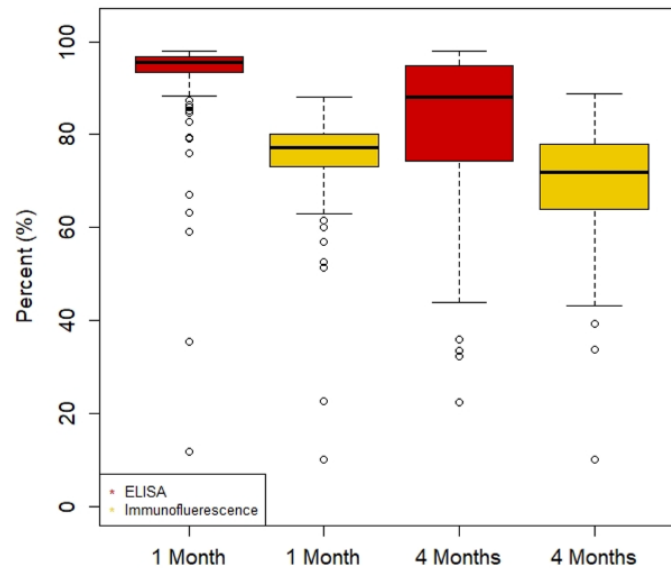


Εικόνα 17: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στους 42 καπνίζοντες που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.87% και 15.65% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

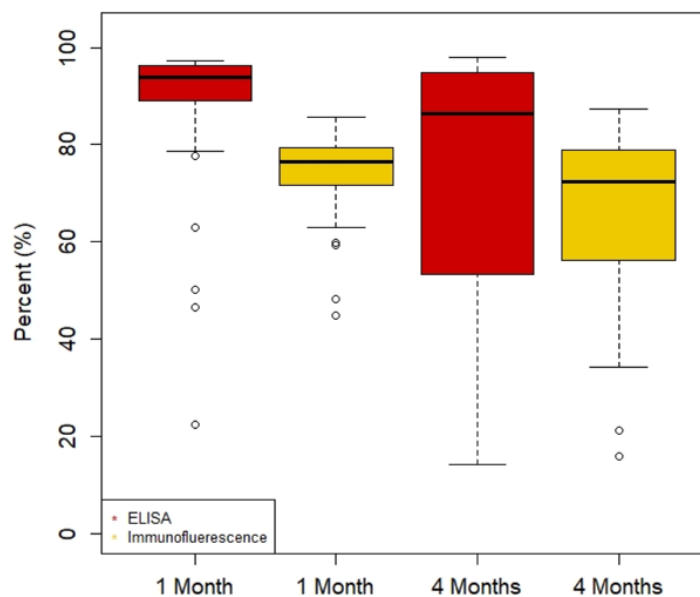


Στις **Εικόνες 18 και 19** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό στα άτομα με και χωρίς ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος. Στα 156 άτομα χωρίς ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.41% και 16.14% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα 44 άτομα με ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.43% και 13.96% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 18: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 156 άτομα χωρίς ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.41% και 16.14% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

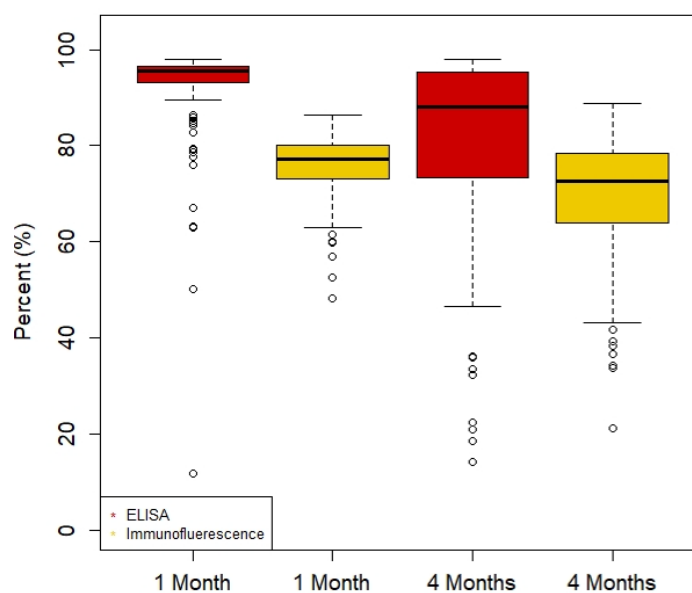


Εικόνα 19: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 44 άτομα με ιστορικό αυτοάνοσου νοσήματος που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 17.43% και 13.96% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

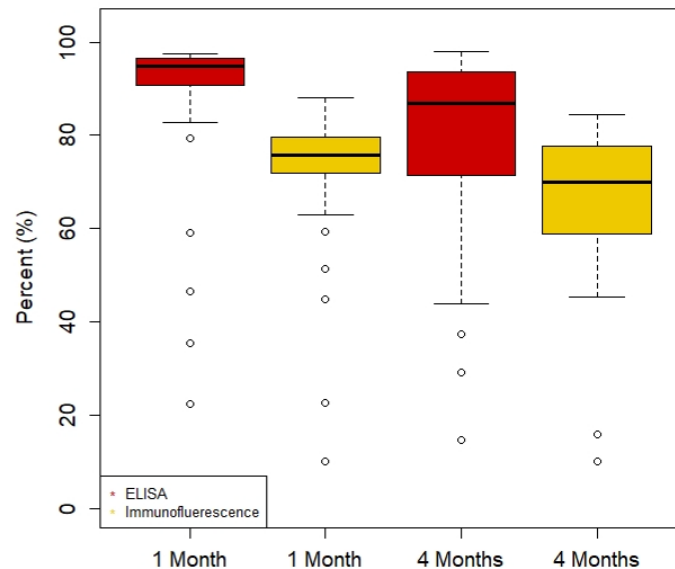


Στις **Εικόνες 20 και 21** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό στα άτομα με και χωρίς ιστορικό αλλεργιών που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το ιστορικό αλλεργιών. Στα 148 άτομα χωρίς ιστορικό αλλεργιών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.28% και 15.47% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα άτομα με ιστορικό αλλεργιών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 19.05% και 17.07% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 20: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα 148 άτομα χωρίς ιστορικό αλλεργιών που συμμετείχαν στη μελέτη. Στα άτομα χωρίς ιστορικό αλλεργιών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.28% και 15.47% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

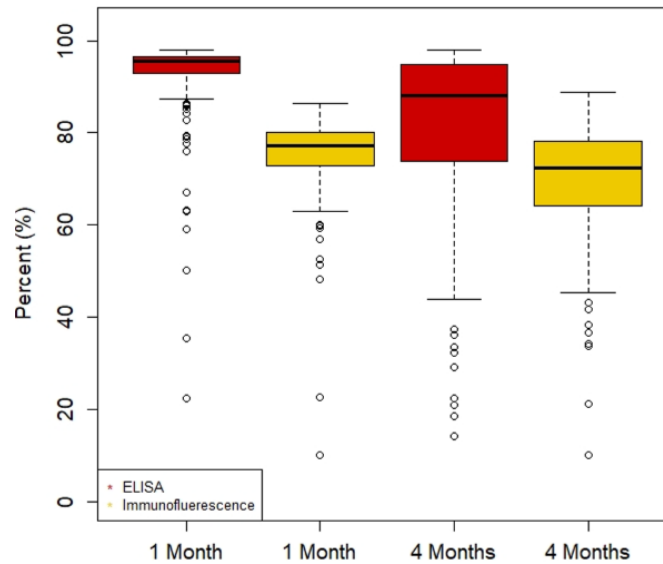


Εικόνα 21: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) στα άτομα με ιστορικό αλλεργιών που συμμετείχαν στη μελέτη. Στα άτομα με ιστορικό αλλεργιών, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 19.05% και 17.07% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

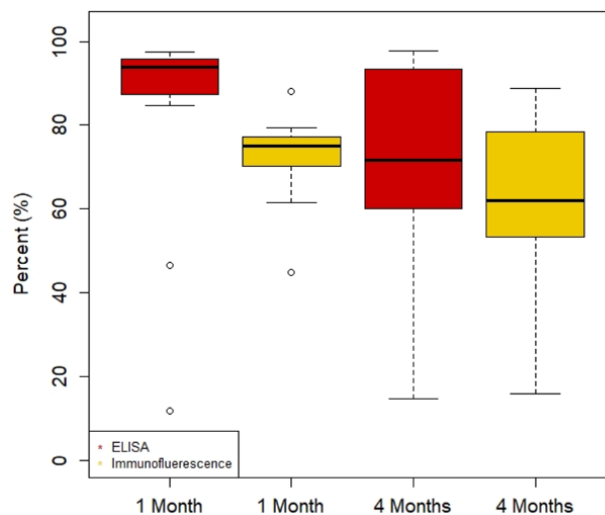


Στις **Εικόνες 22 και 23** παρουσιάζονται τα διαγράμματα σύγκρισης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμό στα άτομα με και χωρίς ιστορικό υπερλιπιδαιμίας που συμμετείχαν στη μελέτη ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001) ανεξάρτητα από το ιστορικό υπερλιπιδαιμίας. Στα 184 άτομα χωρίς ιστορικό υπερλιπιδαιμίας, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.28% και 15.75% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001). Στα 16 άτομα με ιστορικό υπερλιπιδαιμίας, το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.81% και 9.04% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

Εικόνα 22: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) σε 184 άτομα χωρίς ιστορικό υπερλιπιδαιμίας που συμμετείχαν στη μελέτη. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.28% και 15.75% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).



Εικόνα 23: Σύγκριση εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τις μεθόδους ELISA (κόκκινο χρώμα) και ανοσοφθορισμό (κίτρινο χρώμα) σε 16 άτομα με ιστορικό υπερλιπιδαιμίας. Το διάμεσο ποσοστό ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων με τη μέθοδο αναφοράς ELISA είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό κατά 18.81% και 9.04% ένα και τέσσερις μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2, αντίστοιχα (P -value<0.001).

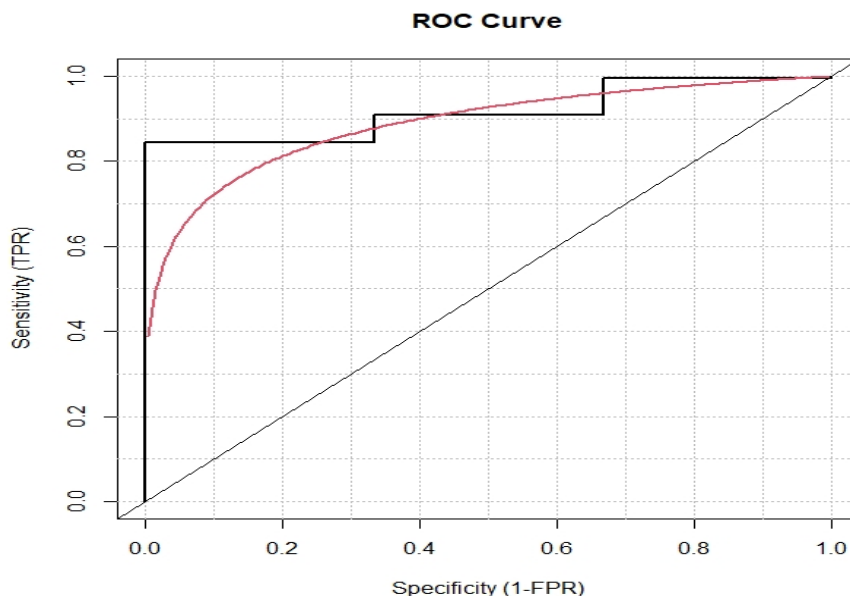


Ποιοτική σύγκριση των αποτελεσμάτων των ELISA και ανοσοφθορισμού

Στο παρακάτω γράφημα βλέπουμε την καμπύλη ROC μεταξύ των 2 μεθόδων για κάθε χρονική στιγμή ταυτόχρονα. Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού διακριτοποιήθηκε έχοντας σημείο διαχωρισμού το ποσοστό 20%. Άτομα με ποσοστά μεγαλύτερα του 20% θεωρούνται θετικά, ενώ με μικρότερα ποσοστά αρνητικά. Η μέθοδος ELISA διακριτοποιήθηκε έχοντας σημείο διαχωρισμού το ποσοστό 30%. Άτομα με ποσοστά μεγαλύτερα του 30% θεωρούνται θετικά, ενώ με μικρότερα ποσοστά αρνητικά.

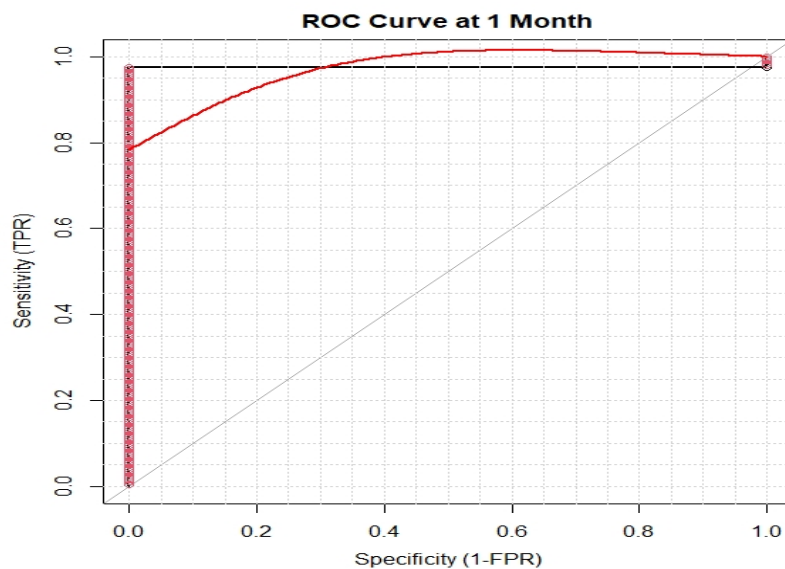
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24** η καμπύλη ROC είναι αρκετά αριστερά του τετραγώνου πλευράς 1 μονάδας, που σημαίνει πως η νέα μέθοδος σε σύγκριση με την μέθοδο αναφοράς προβλέπει σχεδόν με την ίδια ακρίβεια τον αριθμό των θετικών και αρνητικών διαγνωστικών συνολικά και για τις 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η ανάλυση ROC της ELISA και του ανοσοφθορισμού με cut-offs στο 30% και 20%, αντίστοιχα, έδειξε ότι ο ανοσοφθορισμός μπορούσε να προβλέψει με ακρίβεια τον αριθμό των συμμετεχόντων με θετική και αρνητική εξουδετερωτική ικανότητα αντισωμάτων με $AUC= 0,916$ (95% διάστημα εμπιστοσύνης-confidence interval C.I.: 0,889-0,943, P-value: 0,007) και για τις δύο χρονικές στιγμές της μελέτης.

Εικόνα 24: Ανάλυση λειτουργικών χαρακτηριστικών (καμπύλη ROC) της ELISA και του ανοσοφθορισμού για όλη την περίοδο της μελέτης μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC (Area Under the Curve-AUC) για όλη την περίοδο της μελέτης υπολογίστηκε σε $AUC= 0,916$, υποδηλώνοντας εξαιρετική ποιοτική συμφωνία των δύο μεθόδων. Τα όρια των θετικών τιμών για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού είναι 30% και 20%, αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

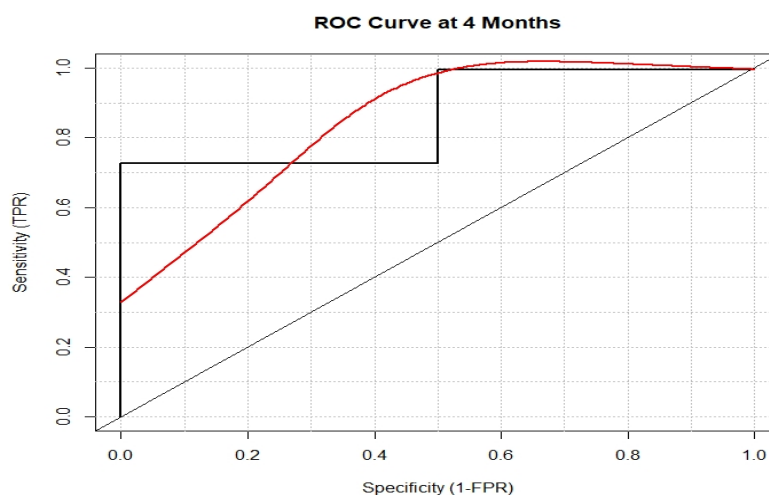


Η εκτιμώμενη AUC από την ανάλυση ROC έναν και τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση δεν διέφερε σημαντικά (τιμή P: 0,722). Ένα μήνα μετά τη 2η δόση, η AUC εκτιμήθηκε σε 0,975 (95% C.I.: 0,489-0,999, P-value: 0,051) (**Εικόνα 25**), ενώ τέσσερις μήνες μετά τη 2η δόση, η AUC εκτιμήθηκε σε 0,861 (95% C.I.: 0,597-0,999, P-value: 0,04) (**Εικόνα 26**).

Εικόνα 25: Ανάλυση λειτουργικών χαρακτηριστικών (καμπύλη ROC) της ELISA και του ανοσοφθορισμού ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC (Area Under the Curve- AUC) ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου υπολογίστηκε σε AUC=0,975, υποδηλώνοντας εξαιρετική ποιοτική συμφωνία των δύο μεθόδων. Τα όρια των θετικών τιμών για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού είναι 30% και 20%, αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Εικόνα 26: Ανάλυση λειτουργικών χαρακτηριστικών (καμπύλη ROC) της ELISA και του ανοσοφθορισμού τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη ROC (Area Under the Curve- AUC) τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου υπολογίστηκε σε AUC=0,861, υποδηλώνοντας πολύ καλή ποιοτική συμφωνία των δύο μεθόδων. Τα όρια των θετικών τιμών για τις μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού είναι 30% και 20%, αντίστοιχα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

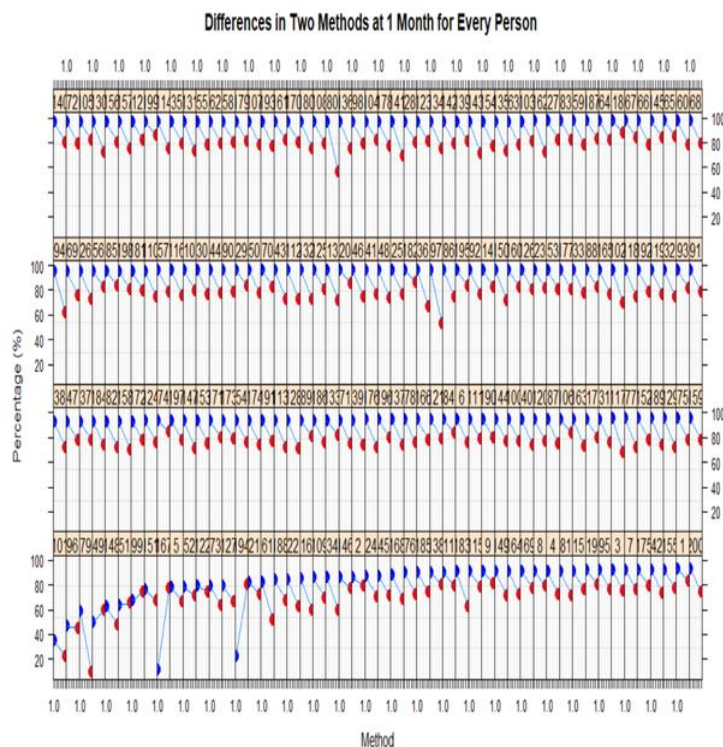


Για την ELISA και τον ανοσοφθορισμό, η θετική και η αρνητική εκτιμήθηκαν σε 98,23% (95% C.I.: 98,37-100) και 25% [20,76-29,24] αντίστοιχα. Ο συντελεστής kappa του Cohen εκτιμήθηκε σε 0,1728 (95% C.I: 0,1101-0,2355) για ολόκληρη την περίοδο μελέτης.

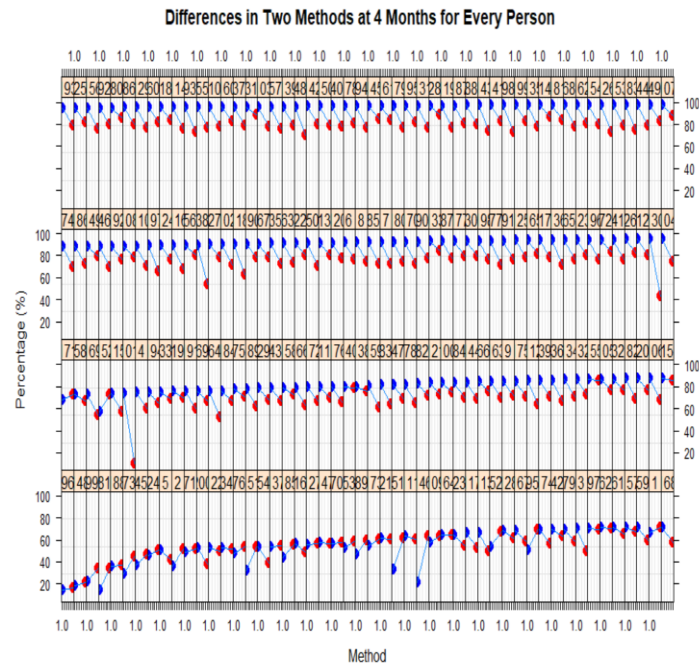
ELISA και ανοσοφθορισμός για κάθε άτομο της μελέτης ξεχωριστά

Στα παρακάτω γραφήματα βλέπουμε για τον 1^ο και 4^ο μήνα μετά τη 2^η δόση αντίστοιχα, τα ποσοστά ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων σύμφωνα με τις 2 μεθόδους για κάθε άτομο της μελέτης ξεχωριστά. Παρατηρούμε πως 1 μήνα μετά τη 2^η δόση η ELISA δίνει ποσοστά μεγαλύτερα, σχεδόν για κάθε άτομο, σε σχέση με τον ανοσοφθορισμό (**Εικόνα 27**). Ίδια συμπεράσματα ισχύουν και στους 4 μήνες μετά τη 2^η δόση με τις διαφορές να μην είναι τόσο έντονες, καθώς κάποιες (τελευταία σειρά) τείνουν να ταυτίζονται (**Εικόνα 28**).

Εικόνα 27: Ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA για κάθε άτομο της μελέτης ξεχωριστά. Η ELISA παρουσιάζεται με μπλε χρώμα (1) και ο ανοσοφθορισμός με κόκκινο χρώμα (2).



Εικόνα 28: Ποσοτικές διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων τέσσερις μήνες μετά τη δεύτερη δόση του εμβολίου COVID-19 BNT162b2 mRNA για κάθε άτομο της μελέτης ξεχωριστά. Η ELISA παρουσιάζεται με μπλε χρώμα (1) και ο ανοσοφθορισμός με κόκκινο χρώμα (2).



Συζήτηση

Η μέτρηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων SARS-CoV-2 είναι σημαντική για την εκτίμηση της προστασίας του οργανισμού μετά από φυσική μόλυνση ή ανοσοποίηση με COVID-19. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες ανοσολογικές δοκιμασίες για την ανίχνευση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, αλλά η χρησιμότητά τους για την αξιολόγηση της ανοσολογικής απόκρισης είναι ακόμη αβέβαιη και απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Τα δεδομένα σχετικά με τη σύγκριση μεταξύ ELISA και ανοσοφθορισμού για τη μέτρηση της δραστηριότητας των εξουδετερωτικών αντισωμάτων SARS-CoV-2 είναι περιορισμένα, επειδή οι περισσότερες εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ανοσοφθορισμού που είναι εγκεκριμένες από τον FDA έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση ολικών αντισωμάτων IgG έναντι SARS-CoV-2(71). Ο ανοσοφθορισμός είναι μια λιγότερο δαπανηρή, ταχύτερη και ευκολότερη στη χρήση μέθοδος σε σύγκριση με την ELISA.

Η μέθοδος ELISA που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας (cPass) χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και έχει εγκριθεί επίσημα από τον FDA για τον προσδιορισμό της εξουδετερωτικής δραστηριότητας μετά από εμβολιασμό με SARS-

CoV-2 ή φυσική μόλυνση. Η μελέτη των Nandakumar et al. έδειξε ότι η εκτιμώμενη ευαισθησία και ειδικότητα της δοκιμασίας cPass ήταν μεγαλύτερη από 96% σε άτομα με COVID-19 σε ανάρρωση με απουσία άλλων διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα παθογόνα του αναπνευστικού συστήματος (εκτός SARS-CoV-2)(72). Για την ανίχνευση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, υπάρχουν πολλές μελέτες που υποστηρίζουν την καλή συμφωνία μεταξύ της μεθόδου ELISA cPass και άλλων ανοσολογικών δοκιμασιών, όπως χημειοφωταύγειας (72)(73)(74), των δοκιμασιών εξουδετέρωτικής ικανότητας με μείωση της πλάκας(75) ή άλλων μεθόδων ELISA(76).

Υπάρχουν πολλές εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ανοσοφθορισμού, εγκεκριμένοι από τον FDA, που έχουν σχεδιαστεί για την ανίχνευση ολικών αντισωμάτων IgG για SARS-CoV-2(65). Η συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις διαφορετικές οδηγίες των κατασκευαστών. Μια παρεμφερής με την παρούσα συγκριτική μελέτη από τους Duan et al. με λιγότερα δείγματα, έδειξε καλή συμφωνία μεταξύ της μεθόδου cPass ELISA και μιας διαφορετικής μεθόδου ανοσοφθορισμού, σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη, αν και τα cut-offs των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικά σε σχέση με τα αντίστοιχα της μελέτης μας(77).

Στη μελέτη, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μιας μεθόδου ανοσοφθορισμού με μια εγκεκριμένη από τον FDA ELISA για τον έλεγχο της δραστηριότητας των εξουδετερωτικών αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό SARS-CoV-2 σε έναν μεγάλο αριθμό συμμετεχόντων, οι οποίοι έλαβαν δύο δόσεις εμβολίου BNT162b2. Επιλέχθηκαν δύο χρονικές στιγμές (έναν και τέσσερις μήνες), καθώς υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την εξασθένηση της χυμικής ανοσίας μετά τον εμβολιασμό SARS-CoV-2 τουλάχιστον ένα μήνα μετά τη χορήγηση της 2^{ης} δόσης(78).

Συγκρίνοντας τις δύο δοκιμασίες, διαπιστώθηκε υψηλή ποιοτική συμφωνία ένα και τέσσερις μήνες μετά τη χορήγηση της 2^{ης} δόσης εμβολίου mRNA. Ωστόσο, διαπιστώθηκαν διαφορές στα ποσοτικά αποτελέσματα των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, τα οποία ήταν χαμηλότερα με τον ανοσοφθορισμό σε σχέση με την ELISA και στις δύο χρονικές στιγμές της μελέτης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στα διαφορετικά όρια (cut-off) θετικότητας των δύο μεθόδων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα όρια της ELISA και της μεθόδου ανοσοφθορισμού (30% και 20% αντίστοιχα) για τα εξουδετερωτικά αντισώματα δεν είναι καλά τεκμηριωμένα όσον αφορά την κλινική τους σημασία για την προστασία από τη συμπτωματική νόσο COVID-19. Παρά τη μέτρια ποσοτική συμφωνία μεταξύ των δύο ανοσολογικών

δοκιμασιών όταν οι τιμές των εξουδετερωτικών αντισωμάτων είναι υψηλές (ένα μήνα μετά τη δεύτερη δόση), η απόκλιση των δύο μεθόδων μειώθηκε όσο αυξανόταν ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό και η ηλικία των εμβολιαζόμενων.

Ο καθορισμός συγκεκριμένων προστατευτικών ορίων εξουδετερωτικών αντισωμάτων τα οποία επιτυγχάνουν την πρόληψη της νόσου COVID-19 δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα θεωρούνται πιθανώς από τους κυριότερους ανοσολογικούς προγνωστικούς δείκτες της προστασίας έναντι της συμπτωματικής λοίμωξης SARS-CoV-2 και υπάρχει θετική συσχέτιση των επιπέδων τους με την αποτελεσματικότητα του εμβολίου(23). Μια μελέτη από το Ισραήλ σε ιατρονοσηλευτικό προσωπικό που εμβολιάστηκαν με BNT162b2 υπογράμμισε ότι οι τίτλοι εξουδετερωτικών αντισωμάτων συνδέονταν αρνητικά με τον κίνδυνο λοίμωξης από SARS-CoV-2 και τα ποσοστά μολυσματικότητας(79). Ωστόσο, συγκεκριμένες τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων που παρεμποδίζουν την εξέλιξη της λοίμωξης και δρουν προστατευτικά δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί.

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τη συμφωνία μεταξύ της μεθόδου cPass ELISA και των ανοσολογικών δοκιμασιών χημειοφωταύγειας (80),(81),(82),(83)των δοκιμασιών εξουδετέρωσης με μείωση της πλάκας (84) ή άλλων μεθόδων ELISA (85). Οι Duan και συνεργάτες συνέκριναν τη μέθοδο cPass ELISA με μια δοκιμασία ανοσοφθορισμού σε 266 δείγματα ορού και διαπίστωσαν ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των μεθόδων (Καρρα: 0,8166)(86). Μια άλλη μελέτη των Jung και συνεργατών έδειξε επίσης καλή συμφωνία (Καρρα: 0,914) μεταξύ της cPass ELISA και της BZ-nAb, μιας άλλης δοκιμασίας ανοσοφθορισμού. Ωστόσο, οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν 0-2 μήνες μετά τη φυσική μόλυνση από τον SARS-CoV-2 και όχι μετά από εμβολιασμό σε αντίστοιχες χρονικές στιγμές με την παρούσα μελέτη (1 και 4 μήνες μετά τη 2^η δόση του εμβολίου BNT162b2 (87). Αντίθετα, μια μελέτη των Saker και συνεργατών έδειξε ευαισθησία μεταξύ 49,2-66,7 % και ειδικότητα μεταξύ 68,4-77,3 % μιας μεθόδου ανοσοφθορισμού (Dynamiker Biotechnology) σε σύγκριση με την ποσοτική ELISA (TECO) (88).

Οι υψηλές τιμές θετικής προγνωστικής αξίας και AUC στην ανάλυση ROC που βρέθηκαν στην ανάλυση των δεδομένων μας, δείχνουν μια καλή συμφωνία όσον αφορά την ποιοτική ανίχνευση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, παρά την ύπαρξη περιορισμένου αριθμού συμμετεχόντων με αρνητικά αποτελέσματα εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Με το διαχωρισμό της ανάλυσης των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων σε τέσσερις ομάδες, δείξαμε ότι οι περισσότεροι

εμβολιαζόμενοι με τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων $\geq 80\%$ στην ELISA αναμένεται να έχουν τιμές $\geq 50\%$ στον ανοσοφθορισμό. Τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στην κλινική πρακτική, δεδομένου ότι ο ανοσοφθορισμός μπορεί να ανιχνεύσει γρήγορα και με επιτυχία έναν οροαρνητικό εμβολιασμένο για SARS-CoV-2 για εξουδετερωτική ικανότητα αντισωμάτων και να προσφέρει πολύτιμη καθοδήγηση για τη χορήγηση αναμνηστικής δόσης.

Στη μελέτη έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί κατά πόσο η ηλικία επηρεάζει τις διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων. Στις δύο χρονικές στιγμές της μελέτης και σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, οι διάμεσες τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων ήταν σημαντικά χαμηλότερες με τον ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την ELISA και παρουσίασαν ασθενή συμφωνία, ιδίως όταν οι τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων ήταν υψηλές (ένα μήνα μετά τη 2^η δόση). Αυτό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στις διαφορετικές τιμές cut-off της ELISA και του ανοσοφθορισμού (30% και 20%, αντίστοιχα).

Η διαφορά των διάμεσων τιμών εξουδετερωτικών αντισωμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων μειώνεται όσο αυξάνεται ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό και η ηλικία των εμβολιαζόμενων. Η τάση σύγκλισης δύο ή περισσότερων διαφορετικών ανοσολογικών δοκιμασιών όταν αυξάνεται ο χρόνος μετά την έκθεση σε αντιγόνα του SARS-CoV-2 (είτε μέσω φυσικής λοίμωξης είτε μετά από εμβολιασμό) έχει επίσης αποδειχθεί στη μελέτη των Yamamoto et al. για τα ολικά αντισώματα φυσικής νόσου μετά από COVID-19(89). Τα αποτελέσματά της παρούσας μελέτης είναι ενδεικτικά της αυξημένης αξιοπιστίας του ανοσοφθορισμού σε χαμηλότερες τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Συνεπώς, ο ανοσοφθορισμός, υπό ορισμένες συνθήκες, θα μπορούσε ενδεχομένως να αντικαταστήσει την ELISA για την ποσοτική ανίχνευση εξουδετερωτικών αντισωμάτων στην κλινική πράξη σε περιπτώσεις εμβολιασμένων μεγαλύτερης ηλικίας και τουλάχιστον τέσσερις μήνες μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σύγκρισης αρκετούς μήνες μετά τη χορήγηση της 2^{ης} δόσης μεταξύ των δύο μεθόδων προκειμένου να τεκμηριωθεί η υπόθεση αυτή.

Στην παρούσα μελέτη, υπήρξε χαμηλή αρνητική προγνωστική αξία για τον ανοσοφθορισμό. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει σχετικά χαμηλή πιθανότητα ανίχνευσης ενός ατόμου χωρίς εξουδετερωτικά αντισώματα όταν η εξέταση είναι αρνητική. Οι προγνωστικές αξίες των δοκιμασιών εξαρτώνται από την αναλογία μεταξύ των συμμετεχόντων με θετικές και αρνητικές τιμές εξουδετερωτικών

αντισωμάτων. Στην παρούσα μελέτη, ωστόσο, υπήρχε περιορισμένος αριθμός συμμετεχόντων με αρνητικές τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων καθώς το εμβόλιο BNT162b2 στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύεται από ισχυρές αποκρίσεις ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων, με βάση στοιχεία από μελέτες ανοσογονικότητας (90),(91). Περαιτέρω μελέτες σύγκρισης μεταξύ των δύο μεθόδων θα πρέπει να περιλαμβάνουν περισσότερους συμμετέχοντες με αρνητικές τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων, προκειμένου να προσεγγιστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα ποσοστά θετικής και αρνητικής προγνωστικής αξίας.

Ένας περιορισμός της μελέτης ήταν η αναδρομική αξιολόγηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων με ανοσοφθορισμό σε σύγκριση με την προοπτική μέτρηση τους με ELISA. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να έχει επηρεάσει την ποιότητα των δειγμάτων λόγω των πολλαπλών διαδικασιών απόψυξης. Ένας άλλος περιορισμός ήταν ότι η υπεροχή των γυναικών έναντι των ανδρών στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης δεν μας επέτρεψε να αξιολογήσουμε με ακρίβεια κατά πόσο το φύλο επηρεάζει τη συμφωνία των δύο μεθόδων. Επίσης, δεν υπήρξε καλή κατανομή των υψηλών και χαμηλών ποσοστών εξουδετερωτικών αντισωμάτων, καθώς ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό όλες οι τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων που μετρήθηκαν με ELISA ήταν εξαιρετικά υψηλές. Δεδομένου ότι τα αποτελέσματά μας παρουσιάζουν μια καλύτερη συμφωνία μεταξύ ELISA και ανοσοφθορισμού όσο αυξάνεται ο χρόνος μετά τον εμβολιασμό, η εφαρμογή μιας δεύτερης μελέτης αρκετούς μήνες μετά τον εμβολιασμό SARS-CoV-2 θα μπορούσε να ανιχνεύσει πιθανώς μια καλύτερη ποσοτική συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Παρά την έλλειψη αποδεικτικών στοιχείων που να υποστηρίζουν ότι ο ανοσοφθορισμός ήταν ανώτερος από τη μέθοδο εκλογής ELISA, το κύριο πλεονέκτημα της μελέτης είναι η ποιοτική συμφωνία της ELISA και του ανοσοφθορισμού στην ανίχνευση ατόμων με αρνητικές και θετικές τιμές εξουδετερωτικών αντισωμάτων σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, η οποία θα μπορούσε να υποστηρίξει τον ανοσοφθορισμό ως πολύτιμη εναλλακτική λύση της ELISA στις ποιοτικές διαδικασίες εξέτασης εξουδετερωτικών αντισωμάτων, ειδικά σε περιπτώσεις που το ιατρονοσηλευτικό δεν είναι εξοικειωμένο με την τεχνική της ELISA.

Συμπεράσματα

Τα εμβόλια για την πρόληψη της λοίμωξης SARS-CoV-2 θεωρούνται το πιο αποτελεσματικό μέτρο για την καταπολέμηση της πανδημίας COVID-19. Οι μελέτες υποδηλώνουν ότι τα επίπεδα ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας του ιού SARS-CoV-2 πιθανά σχετίζονται με προστασία για συμπτωματική λοίμωξη, ενώ η αύξηση των επιπέδων εξουδετερωτικών αντισωμάτων συνδέεται με αυξημένη αποτελεσματικότητα του εμβολίου και μειωμένο κίνδυνο νοσηλείας και θνητότητας από σοβαρή νόσο. Ενώ υπάρχουν αρκετές μέθοδοι ανίχνευσης εξουδετερωτικών αντισωμάτων, αυτές συχνά χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος και αυξημένη χρονική διάρκεια πειραματικών διαδικασιών, ενώ συχνά απαιτούνται ειδικές εργαστηριακές συνθήκες και εξειδικευμένη επιστημονική κατάρτιση για την πραγματοποίησή τους.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι ο ανοσοφθορισμός είχε καλή ποιοτική συμφωνία με την ELISA για την ανίχνευση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων SARS-CoV-2 και θα μπορούσε να αποτελέσει μια γρήγορη, απλή και εύχρηστη εναλλακτική λύση για την αποτελεσματική ανίχνευση τους. Η χαμηλή ποσοτική συμφωνία των δύο μεθόδων, πιθανώς λόγω διαφορετικών τιμών cut-off, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για τον προσδιορισμό των επιπέδων και της κινητικής των εξουδετερωτικών αντισωμάτων που θα αποτελέσουν όριο προστασίας από τη σοβαρή νόσο COVID-19, ώστε να βελτιστοποιηθούν οι κατευθυντήριες οδηγίες δημόσιας υγείας σχετικά με τον εμβολιασμό και τις αναμνηστικές δόσεις των εμβολίων για τον ιό SARS-CoV-2.

Βιβλιογραφία

1. Bradburne AF, Bynoe ML, Tyrrell DAJ. Effects of a “new” human respiratory virus in volunteers. *Br Med J*. 1967 Sep 9;3(5568):767.
2. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967 Apr 1;57(4):933–40.
3. McIntosh K, Kapikian AZ, Turner HC, Hartley JW, Parrott RH, Chanock RM. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol*. 1970;91(6):585–92.
4. McIntosh K, Kwa Chao R, Krause HE, Wasil R, Mocega HE, Mufson MA. Coronavirus infection in acute lower respiratory tract disease of infants. *J Infect Dis*. 1974;130(5):502–7.
5. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):368–73.
6. Woo PCY, Lau SKP, Chu C ming, Chan K hung, Tsoi H wah, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*. 2005 Jan 15;79(2):884–95.
7. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infezioni in Medicina*. 2020;28(2):174–84.
8. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. *Viruses*. 2010;2(8):1804.
9. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 20;382(8):727–33.
10. Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, Hedley AJ, Fraser C, Riley S, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet*. 2003 May 24;361(9371):1761–6.
11. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Outbreak in the Republic of Korea, 2015. *Osong Public Health Res Perspect*. 2015 Aug 1;6(4):269–78.
12. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):465–522.
13. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(8):727–33.
14. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020 Apr 1;5(4):536–44.
15. Director-General W. WHO Director-General’s remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. World Health Organization (WHO). 2020. p. 6–9.

16. Center for Systems Science and Engineering. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. 2021.
17. Wong ACP, Li X, Lau SKP, Woo PCY. Global epidemiology of bat coronaviruses. Vol. 11, *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2019.
18. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Vol. 5, *Nature Microbiology*. Nature Research; 2020. p. 536–44.
19. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):565–74.
20. Temmam S, Vongphayloth K, Baquero E, Munier S, Bonomi M, Regnault B, et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature* 2022 604:7905. 2022 Feb 16;604(7905):330–6.
21. Mallapaty S. Closest known relatives of virus behind COVID-19 found in Laos. *Nature*. 2021 Sep 1;597(7878):603.
22. Perlman S. Another Decade, Another Coronavirus. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 20;382(8):760–2.
23. Dogan M, Kozhaya L, Placek L, Gunter C, Yigit M, Hardy R, et al. SARS-CoV-2 specific antibody and neutralization assays reveal the wide range of the humoral immune response to virus. *Commun Biol*. 2021 Jan 29;4(1):1–13.
24. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022 Jan 1;23(1):3.
25. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Mar 1;19(3):155.
26. Xia X. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 109. 2021 Jan 14;13(1):109.
27. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*. 2020 Apr 1;5(4):562.
28. Hwang SS, Lim J, Yu Z, Kong P, Sefik E, Xu H, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 3;367(6483):1260.
29. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8.
30. Costa LB, Perez LG, Palmeira VA, Macedo e Cordeiro T, Ribeiro VT, Lanza K, et al. Insights on SARS-CoV-2 Molecular Interactions With the Renin-Angiotensin System. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 951.
31. Alam I, Kamau AA, Kulmanov M, Jaremko Ł, Arold ST, Pain A, et al. Functional Pangenome Analysis Shows Key Features of E Protein Are Preserved in SARS and SARS-CoV-2. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jul 27;10:405.

32. Wilson L, Mckinlay C, Gage P, Ewart G. SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology* [Internet]. 2004 Dec 5 [cited 2023 Jan 20];330(1):322–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15527857/>
33. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020 581:7807 [Internet]. 2020 Mar 30 [cited 2023 Jan 20];581(7807):215–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>
34. Fang X, Gao J, Zheng H, Li B, Kong L, Zhang Y, et al. The membrane protein of SARS-CoV suppresses NF-kappaB activation. *J Med Virol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2023 Jan 20];79(10):1431–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17705188/>
35. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses* 2021, Vol 13, Page 1115 [Internet]. 2021 Jun 10 [cited 2023 Jan 20];13(6):1115. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/6/1115/htm>
36. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020 May 28;581(7809):465–9.
37. To KKW, Tsang OTY, 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 May 1;20(5):565–74.
38. 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 Dec 1;11(1).
39. Wang X, Guo X, Xin Q, Pan Y, Hu Y, Li J, et al. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients.
40. Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, van Looy B, van den Berge M, Veenemans J, et al. Differences in antibody kinetics and functionality between severe and mild severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2020 Oct 15;222(8):1265–9.
41. Letizia AG, Ge Y, Vangeti S, Goforth C, Weir DL, Kuzmina NA, et al. SARS-CoV-2 seropositivity and subsequent infection risk in healthy young adults: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2021 Jul 1;9(7):712–20.
42. Crawford KHD, Dings AS, Eguia R, Wolf CR, Wilcox N, Logue JK, et al. Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *J Infect Dis*. 2021 Jan 15;223(2):197–205.
43. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. 2021 Jul 15;595(7867):426–31.
44. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584:457.

45. Rokni M, Ghasemi V, Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. Vol. 30, Reviews in Medical Virology. John Wiley and Sons Ltd; 2020.
46. Kundu R, Narean JS, Wang L, Fenn J, Pillay T, Fernandez ND, et al. Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nat Commun.* 2022 Dec 1;13(1).
47. Sagar M, Reifler K, Rossi M, Miller NS, Sinha P, White LF, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. *Journal of Clinical Investigation.* 2021 Jan 4;131(1).
48. Ringlander J, Martner A, Nilsson S, Westin J, Lindh M, Hellstrand K. Incidence and Severity of Covid-19 in Patients with and without Previously Verified Infections with Common Cold Coronaviruses. *J Infect Dis.* 2021 May 28;223(10):1831–2.
49. Wratil PR, Schmacke NA, Karakoc B, Dulovic A, Junker D, Becker M, et al. Evidence for increased SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity related to pre-existing immunity to seasonal coronaviruses. *Cell Rep.* 2021 Dec 28;37(13).
50. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. Vol. 586, *Nature.* Nature Research; 2020. p. 516–27.
51. Vaccines – {COVID19} {Vaccine} {Tracker}.
52. Haas EJ, Angulo FJ, McLaughlin JM, Anis E, Singer SR, Khan F, et al. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet.* 2021 May 15;397(10287):1819–29.
53. Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, Ball SW, Naleway AL, Ong TC, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines in Ambulatory and Inpatient Care Settings. *N Engl J Med.* 2021 Oct 7;385(15):1355–71.
54. FDA. Comirnaty and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine | FDA [Internet]. FDA. 2022 [cited 2022 Mar 22]. Available from: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/comirnaty-and-pfizer-biontech-covid-19-vaccine#additional>
55. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(27):2603–15.
56. Frenck RW, Klein NP, Kitchin N, Gurtman A, Absalon J, Lockhart S, et al. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine in Adolescents. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2021 Sep 2];385(3):239–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34043894/>
57. FACT SHEET FOR HEALTHCARE PROVIDERS ADMINISTERING VACCINE (VACCINATION PROVIDERS). [cited 2023 Jan 20]; Available from: www.cvdvaccine.com.
58. Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Nov 4 [cited 2023 Jan 20];385(19):1761–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34525277/>

59. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2020 Dec 17 [cited 2021 Oct 7];383(25):2439–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33053279/>
60. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Dec 9 [cited 2022 Jun 6];385(24):e84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34614326/>
61. Fda. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting FDA Briefing Document EUA amendment request for Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine for use in children 6 months through 4 years of age. 2022;
62. Follmann D, Janes HE, Buhule OD, Zhou H, Girard B, Marks K, et al. Antinucleocapsid Antibodies After SARS-CoV-2 Infection in the Blinded Phase of the Randomized, Placebo-Controlled mRNA-1273 COVID-19 Vaccine Efficacy Clinical Trial. *Ann Intern Med* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Jan 19];175(9):1258–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35785530/>
63. Parikh R, Mathai A, Parikh S, Sekhar GC, Thomas R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J Ophthalmol* [Internet]. 2008 [cited 2023 Jan 20];56(1):45–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18158403/>
64. Søreide K, Kørner H, Søreide JA. Diagnostic accuracy and receiver-operating characteristics curve analysis in surgical research and decision making. *Ann Surg* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 Jan 20];253(1):27–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21294285/>
65. EUA Authorized Serology Test Performance | FDA [Internet]. [cited 2022 Jun 1]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>
66. EUA Authorized Serology Test Performance | FDA [Internet]. [cited 2022 Jun 1]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>
67. Šimundić AM. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Aug 26];19(4):203. Available from: </pmc/articles/PMC4975285/>
68. Wongpakaran N, Wongpakaran T, Wedding D, Gwet KL. A comparison of Cohen’s Kappa and Gwet’s AC1 when calculating inter-rater reliability coefficients: A study conducted with personality disorder samples. *BMC Med Res Methodol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jun 6];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23627889/>
69. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)* [Internet]. 2015 [cited 2023 Feb 6];25(2):141. Available from: </pmc/articles/PMC4470095/>
70. Concordance Correlation Coefficient: Definition & Interpretations - Statistics How To [Internet]. [cited 2023 Feb 6]. Available from: <https://www.statisticshowto.com/concordance-correlation-coefficient/>

71. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>.
72. Nandakumar V, Profaizer T, Lozier BK, Elgort MG, Larragoite ET, Williams ESCP, et al. Evaluation of a surrogate enzyme-linked immunosorbent assay-based severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) cPass neutralization antibody detection assay and correlation with immunoglobulin G commercial serology assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Oct 1;145(10):1212–20.
73. Nam M, Seo J Do, Moon HW, Kim H, Hur M, Yun YM. Evaluation of Humoral Immune Response after SARS-CoV-2 Vaccination Using Two Binding Antibody Assays and a Neutralizing Antibody Assay. *Microbiol Spectr*. 2021 Dec 22;9(3).
74. Dou X, Wang E, Jiang R, Li M, Xiong D, Sun B, et al. Longitudinal profile of neutralizing and binding antibodies in vaccinated and convalescent COVID-19 cohorts by chemiluminescent immunoassays. *Immun Inflamm Dis*. 2022 Jun 1;10(6):e612.
75. Taylor SC, Hurst B, Charlton CL, Bailey A, Kanji JN, McCarthy MK, et al. A New SARS-CoV-2 Dual-Purpose Serology Test: Highly Accurate Infection Tracing and Neutralizing Antibody Response Detection. *J Clin Microbiol*. 2021 Apr 1;59(4).
76. Krüttgen A, Lauen M, Klingel H, Imöhl M, Kleines M. Two novel SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization assays are suitable for assessing successful immunization with mRNA-1273. *J Virol Methods*. 2022 Jan 1;299:114297.
77. Duan X, Shi Y, Zhang X, Ge X, Fan R, Guo J, et al. Dual-detection fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike RBD-ACE2 blocking neutralizing antibody. *Biosens Bioelectron*. 2022 Mar 3;199:113883.
78. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S, et al. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months. *New England Journal of Medicine*. 2021 Dec 9;385(24):e84.
79. Bergwerk M, Gonen T, Lustig Y, Amit S, Lipsitch M, Cohen C, et al. Covid-19 Breakthrough Infections in Vaccinated Health Care Workers. *New England Journal of Medicine*. 2021 Oct 14;385(16):1474–84.
80. Nandakumar V, Profaizer T, Lozier BK, Elgort MG, Larragoite ET, Williams ESCP, et al. Evaluation of a Surrogate Enzyme-Linked Immunosorbent Assay–Based Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) cPass Neutralization Antibody Detection Assay and Correlation With Immunoglobulin G Commercial Serology Assays. *Arch Pathol Lab Med*. 2021 Oct 1;145(10):1212–20.
81. Nam M, Seo J do, Moon HW, Kim H, Hur M, Yun YM. Evaluation of Humoral Immune Response after SARS-CoV-2 Vaccination Using Two Binding Antibody Assays and a Neutralizing Antibody Assay. *Microbiol Spectr*. 2021 Dec 22;9(3).
82. Dou X, Wang E, Jiang R, Li M, Xiong D, Sun B, et al. Longitudinal profile of neutralizing and binding antibodies in vaccinated and convalescent COVID-19 cohorts by chemiluminescent immunoassays. *Immun Inflamm Dis*. 2022 Jun 19;10(6).
83. Valdivia A, Torres I, Latorre V, Francés-Gómez C, Albert E, Gozalbo-Rovira R, et al. Inference of SARS-CoV-2 spike-binding neutralizing antibody titers in sera from hospitalized COVID-19 patients by using commercial enzyme and chemiluminescent immunoassays. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2021 Mar 6;40(3):485–94.

84. Taylor SC, Hurst B, Charlton CL, Bailey A, Kanji JN, McCarthy MK, et al. A New SARS-CoV-2 Dual-Purpose Serology Test: Highly Accurate Infection Tracing and Neutralizing Antibody Response Detection. *J Clin Microbiol*. 2021 Mar 19;59(4).
85. Krüttgen A, Lauen M, Klingel H, Imöhl M, Kleines M. Two novel SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization assays are suitable for assessing successful immunization with mRNA-1273. *J Virol Methods*. 2022 Jan;299:114297.
86. Duan X, Shi Y, Zhang X, Ge X, Fan R, Guo J, et al. Dual-detection fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike RBD-ACE2 blocking neutralizing antibody. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2022 Mar 3 [cited 2022 Jun 24];199:113883. Available from: [/pmc/articles/PMC8673933/](#)
87. Jung BK, Yoon J, Bae JY, Kim J, Park MS, Lee SY, et al. Performance Evaluation of the BZ COVID-19 Neutralizing Antibody Test for the Culture-Free and Rapid Detection of SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies. *Diagnostics*. 2021 Nov 25;11(12):2193.
88. Saker K, Pozzetto B, Escuret V, Pitiot V, Massardier-Pilonchéry A, Mokdad B, et al. Evaluation of commercial Anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody assays in seropositive subjects. *Journal of Clinical Virology*. 2022 Jul 1;152:105169.
89. Yamamoto M, Okazaki K, Kitai Y, Shinohara K, Yukawa S, Noguchi T, et al. Comparison of six antibody assays and two combination assays for COVID-19. *Virol J*. 2022 Dec 1;19(1).
90. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(27):2603–15.
91. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *New England Journal of Medicine*. 2020 Dec 17;383(25):2439–50.