



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

*“Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική:
Κλινική Πράξη και Έρευνα”*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Έλεγχος της Τ-Κυτταρικής Ανοσίας με τη δοκιμασία
QuantIFERON SARS-CoV-2 σε άτομα που
εμβολιάστηκαν με 3 δόσεις του BNT162b2 εμβολίου ή/και
νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2”**

Μαρία-Μυρτώ Δουρδουνά

A.M.: 7450162100004

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Μίχος (Επιβλέπων)

*Καθηγητής Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική
Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Νοσοκομείο
Παίδων «Η Αγία Σοφία», Αθήνα*

Βασιλική Συριοπούλου

*Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και
Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Μαρία Γ. Κανάριου

*Παιδιάτρος, Παιδιατρική Ανοσολογία, Διευθύντρια Τμήματος Παιδιατρικής
Ανοσολογίας ΙΑΣΩ ΠΑΙΔΩΝ*

*1996-2019: Συντονίστρια Διευθύντρια ΕΣΥ, Τμήμα Ανοσολογίας-
Ιστοσυμβατότητας, Ειδικό Κέντρο & Κέντρο Αναφοράς για Πρωτοπαθείς
Ανοσοανεπάρκειες-Παιδιατρική Ανοσολογία, Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία
Σοφία», Αθήνα*

**ΑΘΗΝΑ,
Μάιος 2023**



HELLENIC REPUBLIC

**National and Kapodistrian
University of Athens**

— EST. 1837 —

**School of Health Sciences
Department of Medicine**

MASTER PROGRAM IN

**“General Pediatrics and Pediatric Subspecialties:
Clinical Practice and Research”**

MASTER THESIS

**«Evaluation of T-cell responses with the QuantiFERON
SARS-CoV-2 assay in individuals with 3 doses of
BNT162b2 vaccine, SARS-CoV-2 infection, or hybrid
immunity»**

Maria-Myrto Dourdouna

Register Number: 7450162100004

Examining Board Members

Athanasios Michos, MD, PhD (Supervisor)

Professor of Pediatrics-Infectious Diseases, First Department of Pediatrics, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, "Agia Sophia" Children's Hospita, Athens, Greece

Vasiliki Syriopoulou, MD, PhD

Emeritus Professor of Pediatrics-Infectious Diseases, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens

Maria G Kanariou MD, PhD

Pediatrician, Pediatric Immunologist, Director, Department of Pediatric Immunology, IASO Children's Hospital

Formerly (1996-2019): Director of the Department of Immunology-Histocompatibility, Specialized Center & Referral Center for Primary Immunodeficiencies-Paediatric Immunology, "Aghia Sophia" Children's Hospital, Athens, Greece

**ATHENS,
May 2023**

© [2023]

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

[Μαρία-Μυρτώ Δουρδουνά, Ιατρός]

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. “ΓΕΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ” αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και του/της φοιτητή/τριας, ο/η καθένας/μία από τους/τις οποίους/ες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

Έλεγχος της T-Κυτταρικής Ανοσίας με τη δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 σε άτομα που εμβολιάστηκαν με 3 δόσεις του BNT162b2 εμβολίου ή/και νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του **Π.Μ.Σ. “ΓΕΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ”**, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρόπαιδα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής. Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στην Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική: Κλινική Πράξη και Έρευνα, και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: **Μαρία-Μυρτώ Δουρδουνά**

Αριθμός Μητρώου: **7450162100004**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή πραγματοποιήθηκε από τον Μάιο του 2022 έως και τον Ιούνιο του 2023 στο Τμήμα Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας, στο Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο, Α' Παιδιατρική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία», στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος “Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική: Κλινική Πράξη και Έρευνα” της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μελέτη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας, κ. Αθανάσιο Μίχο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας και για την ουσιαστική καθοδήγηση και υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Ομότιμη Καθηγήτρια Παιδιατρικής-Λοιμωξιολογίας, κ. Βασιλική Συριοπούλου, για τις πολύτιμες συμβουλές της, και την Παιδιάτρο, κ. Μαρία Κανάριου, για τα εύστοχα σχόλια της.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Βιολόγο κ. Ελισάβετ Βαρβάρα Τάτση, για την στήριξη της καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης και την συμβολή της στην πειραματική διαδικασία. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Στατιστικολόγο κ. Βασιλική Ευθυμίου για την συμβολή της στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΤΙΤΛΟΣ

Έλεγχος της Τ-Κυτταρικής Ανοσίας με τη δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 σε άτομα που εμβολιάστηκαν με 3 δόσεις του BNT162b2 εμβολίου ή/και νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η κυτταρική ανοσία έναντι του SARS-CoV-2 μετά από νόσο COVID-19 ή SARS-CoV-2 εμβολιασμό ενδέχεται να είναι σημαντική για την μακροπρόθεσμη προστασία έναντι της σοβαρής νόσου COVID-19. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης μετά από λοίμωξη ή/και εμβολιασμό για τη νόσο COVID-19 με μια δοκιμασία απελευθέρωσης Ιντερφερόνης- γ και η συσχέτιση της με την χυμική ανοσιακή απάντηση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Συμπεριλήφθηκαν παιδιά και ενήλικες, που ανάρρωσαν ή/και εμβολιάστηκαν για τη νόσο COVID-19. Ελήφθησαν δείγματα ολικού αίματος σε ηπαρίνη για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανοσιακής απάντησης με την δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN), μέσω ανίχνευσης της Ιντερφερόνης- γ που παράγεται από τα $CD4^+$ και τα $CD8^+$ Τ-λεμφοκύτταρα ως απάντηση σε αντιγόνα (Ag) του ιού. Το Ag1 διεγείρει την παραγωγή Ιντερφερόνης- γ από τα $CD4^+$ Τ-λεμφοκύτταρα και το Ag2 από τα $CD4^+$ και $CD8^+$ Τ-λεμφοκύτταρα. Παράλληλα, ελήφθησαν δείγματα ορού για την μέτρηση των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας και της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης του SARS-CoV-2 καθώς και για τον προσδιορισμό της εξουδετερωτική ικανότητας των αντισωμάτων έναντι του wild type και της παραλλαγής B.1.1.529.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Συμπεριλήφθηκαν 41 συμμετέχοντες: ανεμβολίαστα παιδιά (6/41) και ενήλικες (5/41) με ιστορικό νόσου COVID-19, εμβολιασμένοι ενήλικες (16/41) και εμβολιασμένοι ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 (14/41). Όλοι οι ενήλικες έλαβαν τρεις δόσεις του εμβολίου BNT162b2 6,2-10,9 μήνες πριν από την ένταξη τους στην μελέτη. Όλοι οι ανεμβολίαστοι συμμετέχοντες βρέθηκαν αρνητικοί με τη δοκιμασία QFN. Αντίθετα, το 50% (8/16) των εμβολιασμένων ενήλικων και το 57,1% (8/14) των ενήλικων με υβριδική ανοσία ήταν θετικοί στη δοκιμασία QFN. Από τους συμμετέχοντες που βρέθηκαν θετικοί, θετική απάντηση στο Ag1 και στο Ag2 ανιχνεύθηκε στο 68,8% και 87,5% των ασθενών αντίστοιχα, ενώ το 56,3% (9/16) ήταν θετικοί και στα δύο αντιγόνα. Οι τιμές της Ιντερφερόνης- γ στο Ag1 είχαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας ($P < 0,001$) και των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του wild type ($P = 0,039$), ενώ δεν βρέθηκε συσχέτιση με τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της παραλλαγής B.1.1.529 ($P = 0,09$). Οι τιμές της Ιντερφερόνης- γ στο Ag2 είχαν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας ($P = 0,009$).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 δεν εντόπισε ειδική Τ-κυτταρική ανοσολογική απάντηση σε άτομα με ιστορικό νόσου COVID-19 που δεν έλαβαν το εμβόλιο BNT162b2 και σε ένα σημαντικό ποσοστό των εμβολιασμένων. Περαιτέρω συγκριτικές μελέτες με διαφορετικές ανοσολογικές δοκιμασίες είναι απαραίτητες για να αποσαφηνιστεί εάν η χαμηλή θετικότητα της δοκιμασίας οφείλεται στην μείωση της ανοσίας έναντι του ιού με την πάροδο του χρόνου ή στην χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανοσολογία, Λοιμωξιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: SARS-CoV-2, κυτταρική ανοσία, QuantiFERON, BNT162b2 εμβόλιο

ABSTRACT

TITLE

Evaluation of T-cell responses with the QuantiFERON SARS-CoV-2 assay in individuals with 3 doses of BNT162b2 vaccine, SARS-CoV-2 infection, or hybrid immunity

BACKGROUND: Cellular immunity after SARS-CoV-2 infection or immunization may be important for long-lasting protection against severe COVID-19 disease.

AIM: The aim of this study was the evaluation of cellular immune response after SARS-CoV-2 infection and/or vaccination with the use of an interferon (IFN)- γ release assay and its correlation with humoral immunity.

METHODOLOGY: Children and adults with a history of SARS-CoV-2 infection and/or vaccination were recruited in the study. Heparinized blood samples were obtained for the assessment of cellular immunity with QuantiFERON SARS-CoV-2. The assay detects the release of IFN- γ from CD4⁺ και CD8⁺ T-cells, after stimulation with SARS-CoV-2 antigens (Ag). Ag1 stimulates IFN- γ production from CD4⁺ T-cells and Ag2 from CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. In parallel, serum samples were obtained for the measurement of SARS-CoV-2 antibodies against Nucleocapsid, antibodies against Spike and Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 wild type and B.1.1.529 variant.

RESULTS: In the study, 41 participants were enrolled: unvaccinated convalescent children (6/41) και adults (5/41), vaccinated adults (16/41) and vaccinated convalescent adults (14/41). All vaccinated adults had received three doses of the BNT162b2 COVID-19 vaccine at 6.2-10.9 months prior to their inclusion to the study. All the unvaccinated participants were tested negative with QFN. Regarding the vaccinated population, 50% (8/16) of the vaccinated uninfected adults and 57.1% (8/14) of the vaccinated convalescent adults were tested positive. Among the QFN positive individuals, a reactive response to antigen (Ag) 1 and to Ag2), was detected in 68.8% (11/16) and 87.5% (14/16) respectively, while 56.3% (9/16) had a reactive response to both antigens. Additionally, Ag1 IFN- γ values correlated positively with antibodies against Spike ($P<0.001$) and neutralizing antibodies against wild type ($P=0.039$) levels, but not with neutralizing antibodies against B.1.1.529 variant ($P=0.09$). Ag2 IFN- γ values correlated positively with antibodies against Spike levels ($P=0.009$).

CONCLUSIONS: The SARS-CoV-2 QuantiFERON assay did not detect T-cell responses in unvaccinated COVID-19 convalescent individuals and in a significant number of vaccinated individuals with BNT162b2 SARS-CoV-2 mRNA vaccine. Further comparative studies with different immunology assays are required to elucidate whether this is the result of waning immunity or low sensitivity of the assay.

SUBJECT AREA: Immunology, Infectious Diseases

KEYWORDS: SARS-CoV-2, cellular immunity, QuantiFERON, BNT162b2 vaccine

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	(6)
ABSTRACT	(7)
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	(8)
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	(10)
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	(13)
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	(15)
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	(16)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	(18)
1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ SARS-CoV-2.....	(18)
1.1.1. Ταξινόμηση του SARS-CoV-2.....	(18)
1.1.2. Μορφολογία και Δομή SARS-CoV-2.....	(19)
1.1.3. Παραλλαγές του SARS-CoV-2.....	(20)
1.2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ SARS-CoV-2	(21)
1.2.1. Μετάδοση.....	(21)
1.2.3. Κλινική Εικόνα.....	(21)
1.3. ΑΝΟΣΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ SARS-CoV-2	(22)
1.3.1. Έμφυτη Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2	(23)
1.3.2. Επίκτητη Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2: Κυτταρική Ανοσία	(25)
1.3.3. Επίκτητη Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2: Χυμική Ανοσία.....	(28)
1.4. ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ SARS-CoV-2 mRNA ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ.....	(31)
1.5. ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΛΟΙΜΩΞΗ SARS-CoV-2	(32)
1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ	(34)
1.7. QuantiFERON SARS-CoV-2	(37)
1.8. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΟ	(38)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ	(41)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	(42)
3.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	(42)
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	(43)
3.2.1. Προσδιορισμός Ολικών Αντισωμάτων	(43)
3.2.2. Προσδιορισμός Εξουδετερωτικών Αντισωμάτων	(45)

3.2.3. Έλεγχος κυτταρικής ανοσίας.....	(47)
3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	(50)
3.4. ΗΘΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ.....	(50)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	(51)
4.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	(51)
4.2. SARS-CoV-2 ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ Η/ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ.....	(52)
4.3. SARS-CoV-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ Η/ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ...	(54)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	(58)
5.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	(58)
5.2. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	(63)
5.5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	(63)
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	(64)
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	(71)
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ : ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ	(72)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ελληνικός Όρος

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς
Αναπνευστικό σύνδρομο μέσης ανατολής
Ανθρώπινοι Κορωνοϊοί
Ανθρώπινος υποδοχέας του μετατρεπτικού ενζύμου της Αγγειοτενσίνης 2
Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
Ανοσοπροσοφητική συνδεδεμένη με ενζυμικό μόριο διαδικασία ενός κυττάρου
Αντιγόνα των λευκοκυττάρων του ανθρώπου
Αντιγόνο 1
Αντιγόνο 2
Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα Βαθμονομητής
Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 1
Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 17
Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 2
Γονίδιο 5 Διαφοροποίησης του Μελανώματος
Διάμεση τιμή
Δίκλωνο RNA
Εναλλαγή ισότυπου
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος
Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφητική δοκιμασία
Εξωλεμφοζιδιακό στάδιο
Επικουρικές πρωτεΐνες
Ηλεκτροχημειοφωταύγεια
Ιντερφερόνη
Ιντερφερόνη-γ

Ξενογλωσσος όρος

Next Generation Sequencing, NGS
Middle East Respiratory Syndrome, MERS
Human Coronaviruses, HCoVs
human Angiotensin Converting Enzyme 2 Receptor, hACE2
Open Reading Frame, ORF
Enzyme-Linked Immunosorbent Spot, ELISPoT
Human Leukocyte Antigens, HLA
Antigen 1
Antigen 2
Antigen Presenting Cells, APCs
Standard
T-helper-1, Th1
T-helper 17, Th17
T-helper 2, Th2
Melanoma Differentiation gene 5, MDA-5
Median, Mdn
Double-stranded, dsRNA
Isotype Switching
Interquartile range, IQR
Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA
Extrafollicular Phase
Accessory proteins
Electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA
Interferon, IFN
Interferon-γ, IFN-γ

Κορωνοϊός που προκαλεί το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο τύπου 2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2
Κυτταρομετρία ροής	Flow Cytometry, FC
Λεμφοζιδιακά Τ-λεμφοκύτταρα	Follicular helper T-cells, Tfh
Μέθοδοι ανίχνευσης της απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ	Interferon-γ Release Assays, IGRAs
Μείζον συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I,II	Major Histocompatibility Complex class I, II, MHC-I MHC-II
Μετατρεπτικό ενζύμο της αγγειοτενσίνης 2	Angiotensin converting enzyme 2, ACE2
Μη δομικές πρωτεΐνη	Nonstructural protein, nsp
Νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη	Nucleocapsid,N
Ολικά αντισώματα έναντι νουκλεοκαψιδίου	Abs-N
Ολικά αντισώματα έναντι πρωτεΐνης ακίδας	Abs-S
Οπτική πυκνότητα	Optical density, OD
Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	World Health Organization, WHO
Παράγοντας νέκρωσης των όγκων	Tumor Necrosis Factor, TNF
Περιοχή Πρόσδεσης του Υποδοχέα	Receptor Binding Domain, RBD
Περιφερικά μονοπύρρηνα κυττάρα	Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs
Πολυσυστηματικό Φλεγμονώδες Σύνδρομο στα παιδιά	Multisystem Inflammatory Syndrome in Children, MIS-C
Πράσινος Διαλύτης	Green diluent
Πρωτεΐνη ακίδα	Spike protein, S
Πρωτεΐνη της μεμβράνης	Membrane protein, M
Πρωτεΐνη του Περιβλήματος	Envelope protein,E
Πυρηνικός παράγοντας kB	Nuclear Factor, NF-kB
Ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα	Regulatory T-cells, Treg
Σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο	Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS
Στάδιο βλαστικού κέντρου	Germinal Center Phase
Σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας	Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS
Σωματικές υπερμεταλλαγές	Somatic Hypermutations
Τετραμερή Πεπτιδίου MHC	Peptide-MHC tetramers

Έλεγχος Τ-Κυτταρικής Ανοσίας για τη λοίμωξη COVID-19 σε άτομα που εμβολιάστηκαν ή και νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2

ΠΜΣ "Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική: Κλινική Πράξη και Έρευνα"

Υπεροξειδάση χρένου	Horseradish peroxidase, HRP
Υποδοχέας αναγνώρισης προτύπων	Pattern Recognition Receptor, PRR
Υποδοχέας τύπου NOD	NOD-Like Receptor, NLRs
Υποδοχέας τύπου RIG	Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor, RLR
Υποδοχέας τύπου Toll	Toll-like Receptor, TLR
Υποδοχείς των Β-λεμφοκυττάρων	B-cell Receptors, BCR
Υψηλή συγγένεια	High Affinity
Ωρίμανση συγγένειας	Affinity Maturation
CD4 ⁺ κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα	CD4 ⁺ Cytotoxic T-cells, CTLs

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ξενόγλωσσοι όροι

ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
Ag1	Antigen 1
Ag2	Antigen 2
AIM	Activated-Induced Markers
Abs	Antibodies
APCs	Antigen Presenting Cells
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CD4 ⁺ - CTL	CD4 ⁺ Cytotoxic T-cell
COI	Cut-off index
COVID-19	Coronavirus disease 2019
dsRNA	Double stranded RNA
E	Envelope
ECLIA	Electro-chemiluminescence immunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPoT	Enzyme-Linked Immunosorbent Spot
FC	Flow Cytometry
hACE2	human Angiotensin Converting Enzyme 2 Receptor
HCoV	Human Coronaviruses
HLA	Human Leukocyte Antigens
HRP	Horseradish peroxidase
ICS	Intracellular Staining
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon-γ, IFN-γ
IGRAs	Interferon-γ Release Assays
IQR	Interquartile range
M	Membrane
MDA-5	Melanoma Differentiation gene 5
Mdn	Median
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus
MHC-I	Major Histocompatibility Complex class I

MHC-II	Major Histocompatibility Complex class II
MIS-C	Multisystem Inflammatory Syndrome in Children
N	Nucleocapsid
NF-kb	Nuclear Factor kb
NGS	Next Generation Sequencing
NLR	NOD-Like Receptor
NLRP3	NOD-Like Receptor Protein 3
Nsp	Nonstructural protein
OD	Optical density
ORFs	Open Reading Frames
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
QFN	QuantiFERON SARS-CoV-2
RBD	Receptor Binding Domain
RLR	Retinoic acid-inducible gene I (<i>RIG-I</i>)-like receptor
S	Spike
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
TCR	T-cell Receptors
Tfh	Follicular helper T-cells
Th1	T-helper 1
Th17	T-helper 17
Th2	T-helper 2
TLR	Toll-like Receptor
TMB	Tetramethyl Benzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	Regulatory T-cells
WHO	World Health Organization

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ερμηνεία Αποτελεσμάτων της Δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2... (49)

Πίνακας 2: Περιγραφικά Στατιστικά Μέτρα για την ηλικία, το χρονικό διάστημα από τη λοίμωξη SARS-CoV-2 και τον εμβολιασμό έναντι της νόσου COVID-19 ανά COVID-19 ανοσολογική Κατάσταση.....(51)

Πίνακας 3: Περιγραφικά Στατιστικά Μέτρα για τα επίπεδα των ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του ιού ανά COVID-19 Ανοσολογική Κατάσταση.....(53)

Πίνακας 4: Τελικές Τιμές IFN- γ στο Ag1 και στο Ag2 ανά COVID-19 Ανοσολογική Κατάσταση.....(54)

Πίνακας 5: Ποιοτικό Αποτέλεσμα SARS-CoV-2 QuantiFERON σε ανεμβολίαστα παιδιά και ενήλικες με ιστορικό λοίμωξης SARS-CoV-2, εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό λοίμωξης και ενήλικες με υβριδική ανοσία.....(56)

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Δομή του SARS-CoV-2.....	(19)
Εικόνα 2. Σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων κατά την έμφυτη ανοσιακή απάντηση στον SARS-CoV-2.....	(24)
Εικόνα 3. Δραστικοί μηχανισμοί CD4+ T-λεμφοκύτταρων στην νόσο COVID-19	(25)
Εικόνα 4. Το Χυμικό και το Κυτταρικό σκέλος της Ανοσίας και οι μεταξύ τους Αλληλεπιδράσεις	(26)
Εικόνα 5. Χυμική Ανοσιακή Απάντηση στον ιό SARS-CoV-2.....	(28)
Εικόνα 6. Κινητική των Αντισωμάτων στην λοίμωξη SARS-CoV-2	(29)
Εικόνα 7. Ανοσιακή Απάντηση μετά την χορήγηση mRNA εμβολίου	(31)
Εικόνα 8. Μέθοδοι Προσδιορισμού της Κυτταρικής Ανοσιακής Απάντησης έναντι του SARS-CoV-2	(34)
Εικόνα 9. Αρχή της Δοκιμασίας δοκιμασία Elecsys Anti-SARS-CoV-2 για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αντισωμάτων έναντι του Νουκλεοκαψιδίου (Abs-N)	(44)
Εικόνα 10. Αρχή της Δοκιμασίας δοκιμασία Elecsys Anti-SARS-CoV-2 για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας (Asb-S)	(44)
Εικόνα 11. Αλληλεπίδραση SARS-CoV-2 και Ξενιστή Α: απουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων Β: παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων	(45)
Εικόνα 12. Αλληλεπίδραση HRP-RBD και επικαλυμμένης με ACE-2 πλάκας ELISA Α: απουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων Β: παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων	(46)
Εικόνα 13. QuantiFERON SARS-CoV-2-Συλλογή Δείγματος, Επώαση, Φυγοκέντρηση, ELISA	(47)

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τον Μάρτιο του 2020, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) κήρυξε την έναρξη της πανδημίας COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) (Silva et al., 2022). Υπεύθυνος για την πανδημία COVID-19 είναι ο κορωνοϊός που προκαλεί το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο τύπου 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2), ο οποίος αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στην πόλη Γουχάν, στην Κίνα (Silva et al., 2022). Από τα τέλη του 2019 μέχρι τις 21 Ιουνίου του 2023, έχουν καταγραφεί παγκοσμίως 768.187.096 κρούσματα και 6.945.714 θάνατοι, υποδηλώνοντας ότι η νόσος COVID-19 χαρακτηρίζεται από αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (World Health Organization (WHO), 2023b), (Silva et al., 2022). Στην Ελλάδα, την ίδια χρονική περίοδο, έχουν καταγραφεί 6.101.379 κρούσματα και 37.089 θάνατοι (World Health Organization (WHO), 2023a). Ο ιός SARS-CoV-2 εξελίσσεται διαρκώς και αναδύονται νέα στελέχη του, μεταβάλλοντας την επιδημιολογική εικόνα της λοίμωξης και το ανοσολογικό υπόστρωμα της νόσου (Niessl et al., 2021),(Bertoletti et al., 2022),(Merad et al., 2022). Κατά συνέπεια, κρίνεται απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση των προστατευτικών ανοσιακών μηχανισμών έναντι του ιού και των αναδυόμενων παραλλαγών του (Niessl et al., 2021).

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ SARS-CoV-2

1.1.1 Ταξινόμηση του SARS-CoV-2

Οι κορωνοϊοί είναι ευρεία ομάδα RNA ιών οι οποίοι ανήκουν στην τάξη *Nidovirales* και στην οικογένεια *Coronaviridae* (Greenwood, 2010),(Ortiz-Prado et al., 2020). Οι ιοί αυτοί είναι παθογόνοι σε ζώα και ανθρώπους (Ortiz-Prado et al., 2020). Υπάρχουν 7 τύποι κορωνοϊών, οι οποίοι ανήκουν στην υποοικογένεια *Orthocoronavirinae*, που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Ανθρώπινοι Κορωνοϊοί, Human Coronaviruses, HCoVs), προκαλώντας κυρίως λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος (Vougianniopoulou et al., 2021),(Ortiz-Prado et al., 2020). Από αυτούς τους ιούς, οι HCoV-229E και HCoV-NL63 ανήκουν στο γένος *Alphacoronavirus* και οι υπόλοιποι 5 ιοί, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus), SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus) και SARS-CoV-2, ανήκουν στο γένος *Betacoronavirus* (Vougianniopoulou et al., 2021).

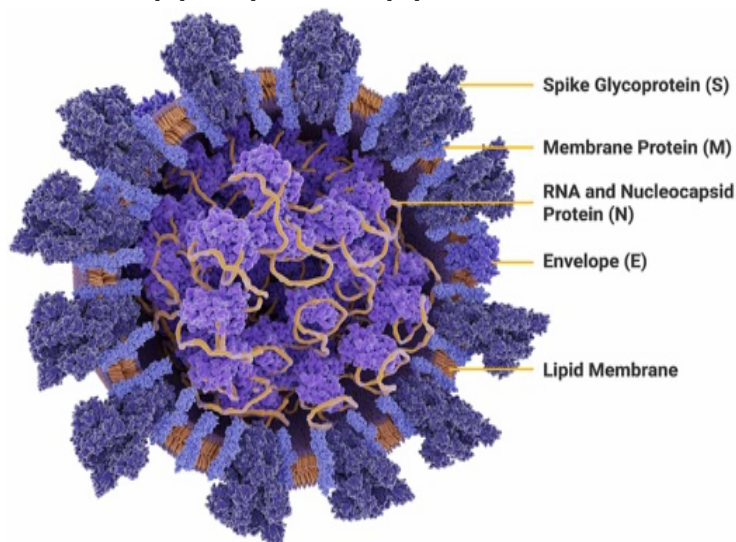
Οι περισσότεροι κυκλοφορούντες HCoVs προκαλούν κλινικές εκδηλώσεις κοινού κρυολογήματος, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν και σοβαρή

νόσηση με υψηλή θνησιμότητα (Vougianni et al., 2021). Τα τελευταία 20 χρόνια, έχουν προκληθεί επιδημίες από τους κορωνοϊούς SARS-CoV το 2003 και MERS-CoV το 2012, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) και το αναπνευστικό σύνδρομο μέσης ανατολής (Middle East Respiratory Syndrome, MERS) αντίστοιχα, καθώς και η πανδημία COVID-19, που οφείλεται στον SARS-CoV-2 (Ortiz-Prado et al., 2020),(Vougianni et al., 2021).

1.1.2 Μορφολογία και Δομή του SARS-CoV-2

Το ιικό σωματίδιο έχει μέγεθος 100 nm και είναι πλειομορφικό με φάκελο (Εικόνα 1), (Greenwood, 2010), (Cocherie et al., 2022), (Ortiz-Prado et al., 2020). Το γενετικό υλικό του SARS-CoV-2 αποτελείται από ένα μονόκλωνο θετικά φορτισμένο μόριο RNA (Cocherie et al., 2022). Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 έχει μήκος περίπου 30000 ζευγιά βάσεων (Cocherie et al., 2022). Το ιικό γενετικό υλικό αποτελείται από 10 περιοχές ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) και κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες, μη δομικές πρωτεΐνες (nonstructural protein, nsp) και άλλες επικουρικές πρωτεΐνες (accessory proteins) (Cocherie et al., 2022).

Εικόνα 1: Μορφολογία και Δομή του SARS-CoV-2



Πηγή: SARS-CoV-2 Serology Tests | COVID Testing | COVID Serology | COVID-19 Molecular Tests. Promega Corporation

Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη της μεμβράνης (Membrane protein, M), την πρωτεΐνη του περιβλήματος (Envelope protein, E), την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη (Nucleocapsid protein, N) και την πρωτεΐνη ακίδα (Spike protein, S). Το γενετικό υλικό του ιού δημιουργεί σύμπλεγμα με την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη, σχηματίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο ένα ελικοειδές καψίδιο (Diamond and Kanneganti, 2022), (Greenwood, 2010). Το καψίδιο του ιού περικλείεται από φάκελο που περιέχει τις πρωτεΐνες της

μεμβράνης, του περιβλήματος και την πρωτεΐνη ακίδα (Altawalah, 2021). Η πρωτεΐνη του περιβλήματος είναι σημαντική στην συναρμολόγηση του ιού και η πρωτεΐνη της μεμβράνης προσδένεται σε άλλες δομικές πρωτεΐνες συμβάλλοντας επίσης στην συναρμολόγηση του ιού αλλά και στην λοιμογονικότητα του (Cocherie et al., 2022). Από τις δομικές πρωτεΐνες του ιού, οι πιο ανοσογόνες είναι οι πρωτεΐνη ακίδα και η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη (Εικόνα 1) (Altawalah, 2021).

Η επιφανειακή πρωτεΐνη ακίδα είναι μια τύπου 1 γλυκοπρωτεΐνη που σχηματίζει πεπτομερή (επιφανειακές προσεκβολές) στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου, προσδίδοντας την χαρακτηριστική εμφάνιση κορώνας στον ιό από όπου πήρε και το όνομα του (Diamond and Kanneganti, 2022), (Greenwood, 2010), (Ortiz-Prado et al., 2020). Η πρωτεΐνη ακίδα αποτελείται από δυο υπομονάδες, S1 και S2, και είναι υπεύθυνη για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (Huang et al., 2020). Στην υπομονάδα S1 περιλαμβάνεται η περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor Binding Domain, RBD), η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει τον υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγιοτενσίνης 2 (Angiotensin converting enzyme 2, ACE2) των κυττάρων του ξενιστή (Huang et al., 2020). Παράλληλα, η υπομονάδα S2 διευκολύνει την σύντηξη των μεμβρανών και την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (Huang et al., 2020). Η περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα είναι ιδιαιτέρως ανοσογόνος και διεγείρει την παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του ιού (Altawalah, 2021). Τα αντισώματα αυτά συμβάλλουν στην αναχαίτηση της λοίμωξης SARS-CoV-2 (Altawalah, 2021).

1.1.3 Παραλλαγές του SARS-CoV-2

Με την πάροδο του χρόνου, ο ιός SARS-CoV-2 απέκτησε πολλές γενετικές μεταλλάξεις που αφορούν κυρίως το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδα (Cocherie et al., 2022),(Chenchula et al., 2023). Κάθε μετάλλαξη στην πρωτεΐνη ακίδα τροποποιεί μοναδικά το προφίλ της κάθε παραλλαγής ως προς την μεταδοτικότητα, τη λοιμογονικότητα και την ικανότητα ανοσιακής διαφυγής (Cocherie et al., 2022).

Οι πρώτες τρεις παραλλαγές του ιού Άλφα (B.1.1.7), Βήτα (B.1.351) και Γάμμα (P.1) εμφανίστηκαν το τέλος του 2020, στην Αγγλία, στην Νότιο Αφρική και στη Βραζιλία, αντίστοιχα (Barouch, 2022). Η παραλλαγή Άλφα είναι πιο μολυσματική και σχετίζεται με αυξημένα πιθανότητα νοσηλείας και θνησιμότητα σε σχέση με το αρχικό στέλεχος του ιού (Wild type), (Cen et al., 2023). Στα μέσα του 2021, πρωτοεμφανίστηκε στην Ινδία και εξαπλώθηκε παγκόσμια, η παραλλαγή Δέλτα (B.1.617.2) (Cocherie et al., 2022),(Barouch, 2022). Η παραλλαγή Δέλτα είναι μεταδοτικότερη κατά 60% σε σχέση με την παραλλαγή Άλφα και έχει αυξημένη θνησιμότητα (Cen et al., 2023).

Από τα τέλη του 2021 μέχρι σήμερα, ως κυρίαρχη παραλλαγή έχει αναδειχθεί η Όμικρον, η οποία φέρει στο γονιδίωμα της αξιοσημείωτο αριθμό μεταλλάξεων (συνολικά 50 μεταλλάξεις) που αφορούν κυρίως την πρωτεΐνη ακίδα (30 μεταλλάξεις) (Cocherie et al., 2022),(Barouch, 2022). Το στέλεχος Όμικρον, εμφανίζει αυξημένη μεταδοτικότητα αλλά και μεγάλη ικανότητα ανοσιακής διαφυγής σε σχέση με τα προηγούμενα στελέχη (Cocherie et al., 2022). Ωστόσο, συγκριτικά με τις προηγούμενες παραλλαγές εμφάνισε μικρότερο ποσοστό νοσηλείας, σοβαρής νόσου και θνησιμότητας (Cen et al., 2023). Η παραλλαγή Όμικρον έχει μεγαλύτερο εξελικτικό ρυθμό και για το λόγο αυτό έχουν εμφανιστεί πολλές υποπαραλλαγές της (Cen et al., 2023). Η υποπαραλλαγή της Όμικρον BA.1 ήταν υπεύθυνη για το πέμπτο επιδημικό κύμα της νόσου COVID-19, παγκοσμίως (Cocherie et al., 2022). Η BA.1 βαθμιαία αντικαταστάθηκε από την υποπαραλλαγή BA.2, η οποία έγινε κυρίαρχη τον Απρίλιο του 2022 (Cocherie et al., 2022). Στη συνέχεια όμως, τον Μάιο του 2022 παρεκτοπίστηκε από τις υποπαραλλαγές BA.4 και BA.5 (Cocherie et al., 2022). Από τον Ιούλιο του 2022, η υποπαραλλαγή BA.5 είναι η επικρατούσα μετάλλαξη του SARS-CoV-2 (Cocherie et al., 2022). Η συγκεκριμένη υποπαραλλαγή εξακολουθεί να εξελίσσεται και πλέον έχει διαχωριστεί σε νέες υπομεταλλάξεις όπως η BF.7 και η BQ.1(Cocherie et al., 2022).

1.2. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΟΥ SARS-CoV-2

1.2.1. Μετάδοση

Ο ιός SARS-CoV-2 είναι πολύ μολυσματικός (Ezzikouri et al., 2020). Η μετάδοση της λοίμωξης SARS-CoV-2 από άνθρωπο σε άνθρωπο γίνεται με εισπνοή σταγονιδίων ή αερολυμάτων που εκπέμπουν άτομα που έχουν προσβληθεί από τον ιό, κυρίως μέσω βήχα ή πταρμού (Ezzikouri et al., 2020),(Cocherie et al., 2022). Η μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει και από ασυμπτωματικούς ή προσυμπτωματικούς φορείς (Ezzikouri et al., 2020). Ο ιός εμφανίζει τροπισμό κυρίως για το αναπνευστικό σύστημα (Cocherie et al., 2022),(Ballesteros-Sanabria et al., 2022). Αν και οι προηγούμενες παραλλαγές του ιού, προσβάλλουν κυρίως το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, η παραλλαγή Όμικρον εμφανίζει τροπισμό για τα κύτταρα του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (Dighe et al., 2022).

1.2.3. Κλινική Εικόνα

Το φάσμα της νόσου COVID-19 στους ενήλικες ποικίλει από ασυμπτωματική και ήπια νόσηση έως σοβαρή νόσο (Rahman et al., 2021). Οι ασθενείς που νοσούν ήπια, εμφανίζουν συμπτώματα όπως πυρετό, κόπωση, βήχα, ρινική συμφόρηση, μυαλγίες, αρθραλγίες και κεφαλαλγίες (Rahman et al., 2021),(Peña Rodríguez et al., 2023). Όμως, ένα σημαντικό

ποσοστό ασθενών αναπτύσσει σοβαρή νόσο που εκδηλώνεται με δύσπνοια, υποξία και απεικονιστικές αλλοιώσεις στους πνεύμονες (Rahman et al., 2021). Από αυτούς τους ασθενείς κάποιοι θα αναπτύξουν αναπνευστική ανεπάρκεια λόγω του συνδρόμου οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS), καταπληξία και πολυοργανική ανεπάρκεια. Ασθενείς με σοβαρή νόσο COVID-19 μπορεί ακόμη να αναπτύξουν οξεία νεφρική βλάβη, διαταραχή της ηπατικής τους λειτουργίας και καρδιακή βλάβη (Rahman et al., 2021). Ωστόσο, με την ανάδυση και επικράτηση του στελέχους Όμικρον, η πλειοψηφία των ασθενών που είναι συμπτωματικοί νοσούν ήπια και η νοσηρότητα και η θνησιμότητα της νόσου COVID-19 έχουν μειωθεί (Cocherie et al., 2022).

Σε αντίθεση με την μεγάλη θνησιμότητα και νοσηρότητα που έχει παρατηρηθεί σε άλλες ηλικιακές ομάδες, στα παιδιά η νόσος COVID-19 συνήθως είναι ήπια ή ασυμπτωματική (Dowell et al., 2022). Τα συμπτώματα της ήπιας λοίμωξης SARS-CoV-2 στα παιδιά αφορούν κυρίως το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα (Chou et al., 2022). Ωστόσο, και τα παιδιά διατρέχουν τον κίνδυνο να νοσήσουν σοβαρά ειδικά εάν έχουν υποκείμενα νοσήματα όπως χρόνια αναπνευστικά νοσήματα, παχυσαρκία και σακχαρώδη διαβήτη (Nikolopoulou and Maltezos, 2022),

Ακόμη, τον Απρίλιο του 2020, πρωτοεμφανίστηκε μια σοβαρή μεταλοιμώδης επιπλοκή της νόσου COVID-19, το Πολυσυστηματικό Φλεγμονώδες Σύνδρομο στα παιδιά (Multisystem Inflammatory Syndrome in Children, MIS-C) το οποίο για να αντιμετωπιστεί συχνά χρειάζεται εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας (Chou et al., 2022). Η επιπλοκή αυτή απαντάται συνήθως σε παιδιά σχολικής ηλικίας, 2-4 εβδομάδες μετά την οξεία λοίμωξη SARS-CoV-2 (Dowell et al., 2022). Η επίπτωση του συνδρόμου στα παιδιά που νοσούν από COVID-19 εκτιμάται ότι είναι κάτω από 1% (Waseem et al., 2022). Αυτή η κλινική οντότητα χαρακτηρίζεται από πυρετό, συμμετοχή πολλών συστημάτων (≥ 2) και μπορεί να οδηγήσει σε καταπληξία και πολυοργανική ανεπάρκεια (Waseem et al., 2022).

1.3 ΑΝΟΣΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ SARS-CoV-2

1.3.1. Έμφυτη Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2

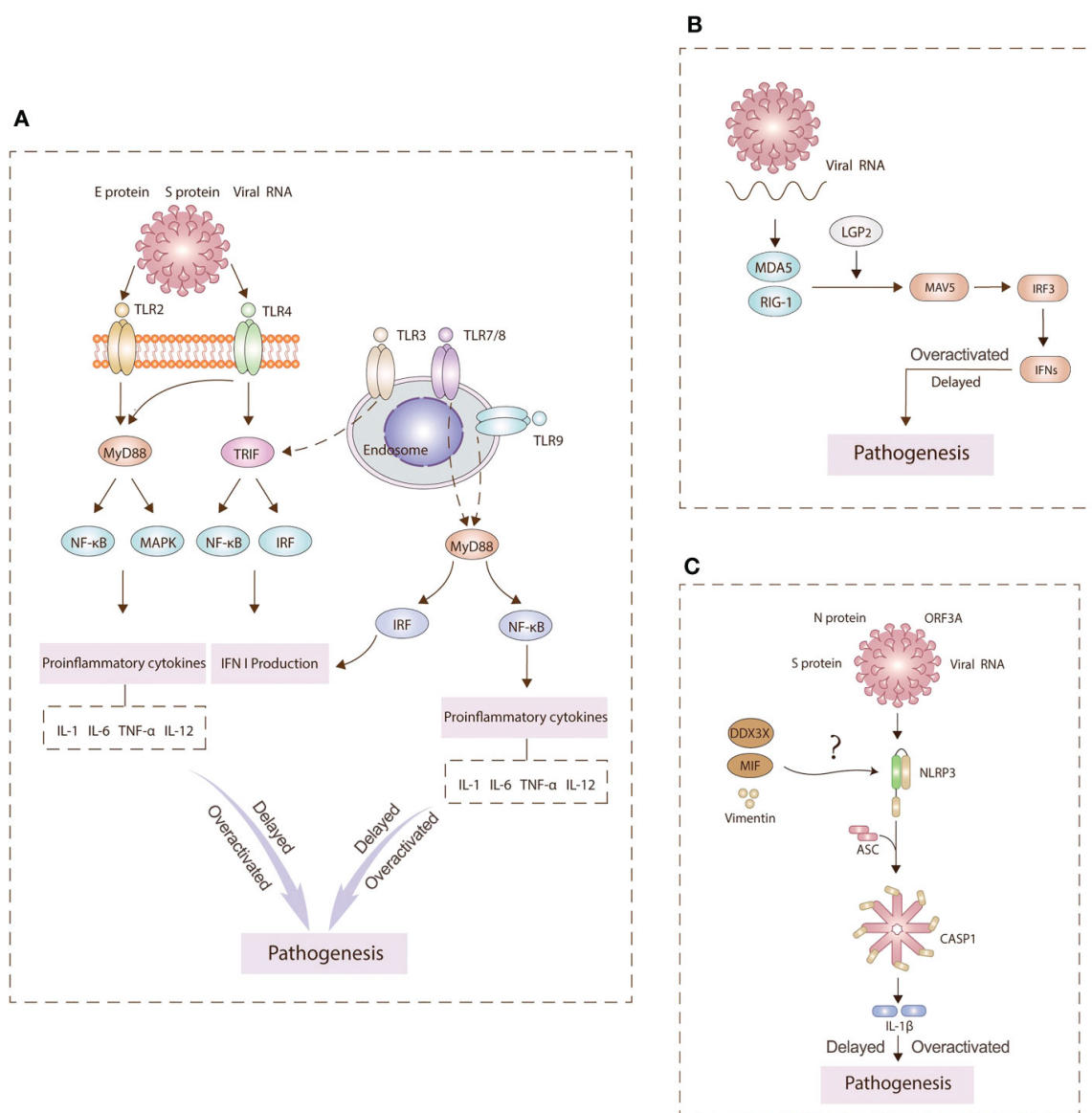
Η είσοδος του SARS-CoV-2 στα κύτταρα του ξενιστή, συμβαίνει με την πρόσδεση της πρωτεΐνης ακίδας του ιού και συγκεκριμένα της περιοχής RBD στον υποδοχέα ACE2 των κυττάρων (Silva et al., 2022),(Shen et al., 2023). Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι του SARS-CoV-2 (Diamond and Kanneganti, 2022). Η διαδικασία της εισόδου του ιού στον οργανισμό και ο πολλαπλασιασμός του ιού επιτρέπουν στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, να αναγνωρίσουν τον ιό, μέσω των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors, PRRs) που διαθέτουν (Merad et al., 2022), (Diamond and Kanneganti, 2022). Με αυτό τον τρόπο, ενεργοποιούνται φλεγμονώδη μονοπάτια που προάγουν την κάθαρση του ιού από τον οργανισμό (Diamond and Kanneganti, 2022).

Η αναγνώριση του SARS-CoV-2 από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας πραγματοποιείται με τους παρακάτω μηχανισμούς (Merad et al., 2022). Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την αναγνώριση του ιικού RNA από κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, όπως τα πλασμακυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα, μέσω του ενδοσωμικού υποδοχέα τύπου Toll (Toll-like Receptor, TLR) 7 (TLR7) (Merad et al., 2022). Οι TLRs είναι μια οικογένεια PRRs οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνεια και το ενδόσωμα των κυττάρων αυτών (Abbas, 2019). Άλλοι TLRs που εμπλέκονται στην αναγνώριση του SARS-CoV-2 είναι οι TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 και TLR9 (Shen et al., 2023). Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στην αναγνώριση του ιού μέσα στα προσβεβλημένα κύτταρα. Κατά τον πολλαπλασιασμό του ιού, οι κυτταροπλασματικοί υποδοχείς τύπου RIG (Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors, RLRs), RIG-1 και MDA-5 (Melanoma Differentiation gene 5), αναγνωρίζουν ιικό δίκλωνο RNA (dsRNA) κατά την αντιγραφή του (Merad et al., 2022). Η αναγνώριση του SARS-CoV-2 από τους παραπάνω υποδοχείς εκκινεί σηματοδοτικά μονοπάτια που καταλήγουν στην εξαρτώμενη από τους μεταγραφικούς παράγοντες IRF3/IRF7 παραγωγή Ιντερφερόνης (Interferon, IFN) τύπου I και III καθώς και στην εξαρτώμενη από τον πυρηνικό παράγοντα κB (Nuclear Factor, NF-κB) παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών (Εικόνα 2α και 2b), (Merad et al., 2022).

Επίσης, άλλοι PRRs που εμπλέκονται στην λοίμωξη SARS-CoV-2 είναι οι υποδοχείς τύπου NOD (NOD-Like Receptors, NLRs) (Shen et al., 2023). Συγκεκριμένα με την ανίχνευση της πρωτεΐνης ακίδας, της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης, του ORF3A και του ιικού RNA, ο NLRP3 (NOD-Like Receptor Protein 3) σχηματίζει ένα σηματοδοτικό

σύμπλοκο, γνωστό ως φλεγμονόσωμα, που οδηγεί στην παραγωγή Ιντερλευκίνης 1β (Interleukin-1β, IL-1β) (Εικόνα 2c), (Shen et al., 2023), (Abbas, 2019).

Εικόνα 2: Σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων κατά την έμφυτη ανοσιακή απάντηση στον SARS-CoV-2



Πηγή: Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors. (2023). SHEN, J., FAN, J., ZHAO, Y., JIANG, D., NIU, Z., ZHANG, Z. & CAO, G *Front Immunol*, 14, 1159326.

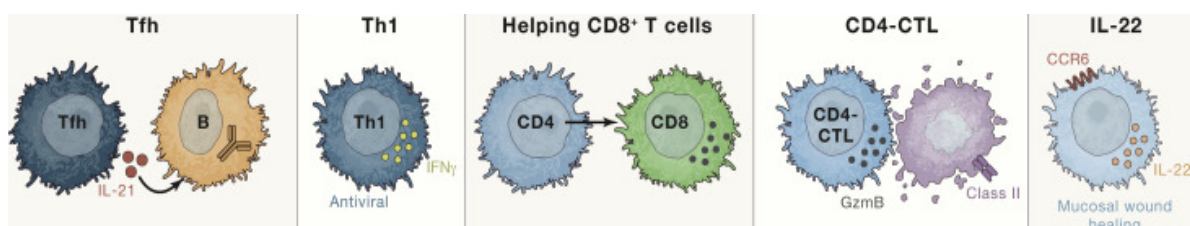
Τέλος, με τους ανοσιακούς μηχανισμούς που επάγονται από τους PRRs, κινητοποιούνται και τα δραστικά κύτταρα της φυσικής ανοσίας, όπως τα κύτταρα φυσικοί φονείς (Natural Killer cells, NK), τα οποία εντοπίζουν και εξαλείφουν τα κύτταρα που είναι μολυσμένα από τον ιό (Merad et al., 2022).

1.3.2. Επίκτητη Ανοσία: Κυτταρική Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2

Διαμεσολαβητές της κυτταρικής ανοσίας έναντι του SARS-CoV-2 είναι τα βοηθητικά $CD4^+$ και τα κυτταροτοξικά $CD8^+$ Τ-λεμφοκύτταρα (Bertoletti et al., 2022). Τα Τ-λεμφοκύτταρα δρουν συμπληρωματικά τόσο με την εγγενή ανοσία, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό του ιού όσο και με τη χυμική ανοσία, μέσω της διέγερσης των αποκρίσεων των Β-λεμφοκυττάρων (Bertoletti et al., 2022). Μετά την είσοδο του SARS-CoV-2 στον οργανισμό και την κινητοποίηση των μηχανισμών της έμφυτης ανοσολογική απάντησης, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen Presenting Cells, APCs), κυρίως τα δενδριτικά κύτταρα και άλλα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, επεξεργάζονται τις ιικές πρωτεΐνες και στη συνέχεια τις παρουσιάζουν μέσω των μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II (Major Histocompatibility Complex class II, MHC-II) στα $CD4^+$ Τ-λεμφοκύτταρα (Bertoletti et al., 2022).

Με την αναγνώριση των αντιγόνων, μέσω των υποδοχέων των Τ λεμφοκυττάρων (T-cell Receptors, TCR) τα $CD4^+$ Τ-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένα δραστικά Τ-λεμφοκύτταρα: Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 1 (T-helper-1, Th1), Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 2 (T-helper 2, Th2), Βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα Τύπου 17 (T-helper 17, Th17) , ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα (regulatory T-cells, Treg), και τα λεμφοζυδιακά Τ-λεμφοκύτταρα (follicular helper T-cells, Tfh), (Εικόνα 3) (Silva et al., 2022),(Bertoletti et al., 2022).

Εικόνα 3: Δραστικοί μηχανισμοί των $CD4^+$ Τ-λεμφοκυττάρων στην νόσο COVID-19



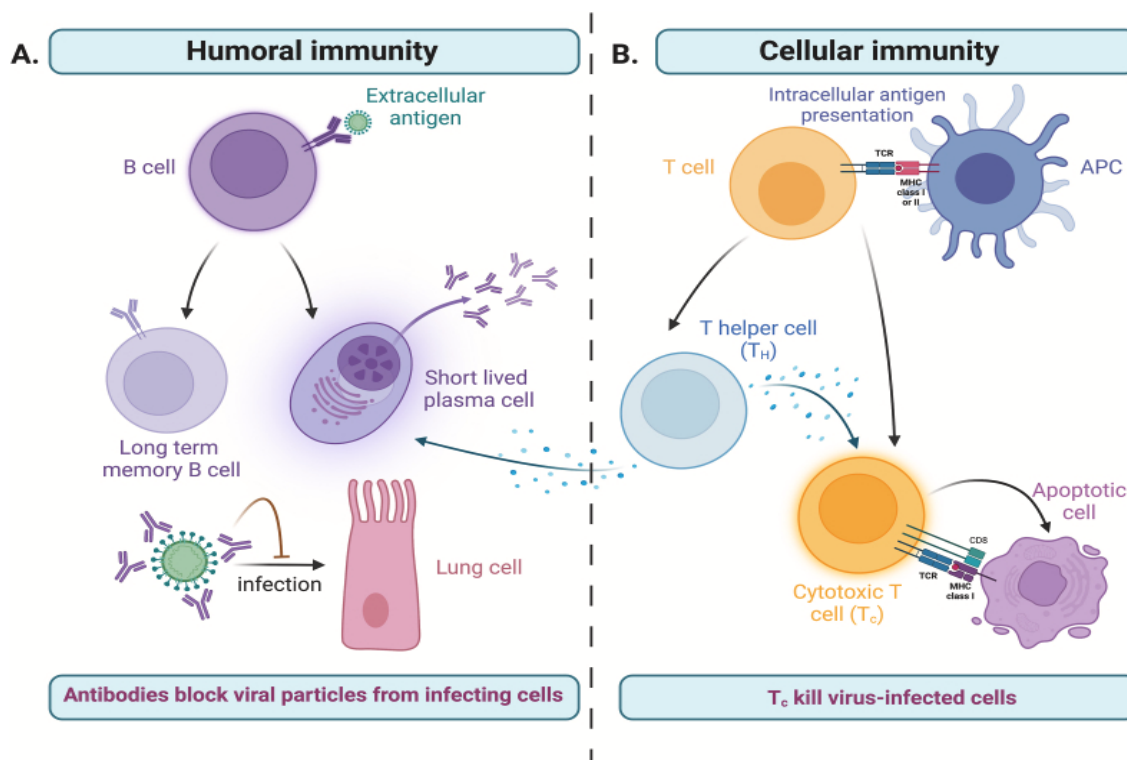
Πηγή: Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. (2021). SETTE, A. & CROTTY, S. Cell, 184, 861-880.

Στην λοίμωξη SARS-CoV-2, καθοριστικό ρόλο έχουν κυρίως τα Th1 και τα Tfh (Εικόνα 3) (Bertoletti et al., 2022), (Sette and Crotty, 2021). Η αντιική δράση των Th1 στηρίζεται κυρίως στην παραγωγή Ιντερφερόνης- γ (Interferon- γ , IFN- γ) και άλλων συναφών κυτταροκινών (Sette and Crotty, 2021). Τα Th1 κύτταρα υποστηρίζουν την έμφυτη και την κυτταρική ανοσιακή απόκριση (Bertoletti et al., 2022). Αντίθετα, με τα Th1 που δεν εμπλέκονται στην ωρίμανση των Β-λεμφοκυττάρων, τα Tfh συνδράμουν στον πολλαπλασιασμό των Β-λεμφοκυττάρων και στην παραγωγή αντισωμάτων υψηλής συγγένειας (high affinity) από τα Β-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο βλαστικό κέντρο των

δευτερογενών λεμφικών οργάνων (Εικόνα 4), (Bertoletti et al., 2022). Τα Tfh είναι επίσης σημαντικά για την διατήρηση της δράσης των CD8⁺ T-λεμφοκύτταρων (Bertoletti et al., 2022). Ακόμη, στην λοίμωξη SARS-CoV-2 παράγονται και CD4⁺ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα (CD4⁺-Cytotoxic T-cells, CD4⁺-CTLs), (Εικόνα 3) (Shen et al., 2023).

Τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν τους ειδικούς TCR υποδοχείς που διαθέτουν και αναγνωρίζουν επίτοπους του ιού (Bertoletti et al., 2022). Οι επίτοποι αυτοί προέρχονται από την επεξεργασία των ιικών πρωτεϊνών στα μολυσμένα κύτταρα οι οποίες παρουσιάζονται στην επιφάνεια του μολυσμένου κυττάρου από μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (Major Histocompatibility Complex class I, MHC-I) (Εικόνα 4). Με αυτόν τον τρόπο τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα εντοπίζουν τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό (Bertoletti et al., 2022). Κατόπιν, ακολουθεί απευθείας λύση των μολυσμένων κυττάρων καθώς και η απελευθέρωση κυτταροκινών (Ιντερφερόνη-γ, IFN-γ και παράγοντας νέκρωσης των όγκων, Tumor Necrosis Factor, TNF) με αντιική δράση (Bertoletti et al., 2022).

Εικόνα 4: Το Χυμικό και το Κυτταρικό σκέλος της Ανοσίας και οι μεταξύ τους Αλληλεπιδράσεις



Πηγή: T cell immunity is key to the pandemic endgame: How to measure and monitor it. SCHWARZ, M., MZOUGH, S., LOZANO-OJALVO, D., TAN, A. T., BERTOLETTI, A. & GUCCIONE, E. 2022 *Curr Res Immunol*, 3, 215-221.

Ο κύριος αντιγονικός επίτοπος του ιού που αναγνωρίζεται από τα T-λεμφοκύτταρα είναι η δομική πρωτεΐνη ακίδα (Sette et al., 2023). Αυτό έρχεται σε αντίθεση, με την υπάρχουσα γνώση που έχουμε για άλλες ιογενείς λοιμώξεις, όπου οι επίτοποι των T-λεμφοκυττάρων είναι κυρίως μη δομικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εσωτερικό του ιικού σωματιδίου (Sette et al., 2023). Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την διαφορά, είναι το μεγάλο μέγεθος και η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης ακίδας στο σωματίδιο του SARS-CoV-2 (Sette et al., 2023). Ωστόσο, οι αντιγονικοί επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα μπορεί να είναι και άλλα μέρη του πρωτεόματος του ιού όπως η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη, η πρωτεΐνη της μεμβράνης και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες (Sette et al., 2023).

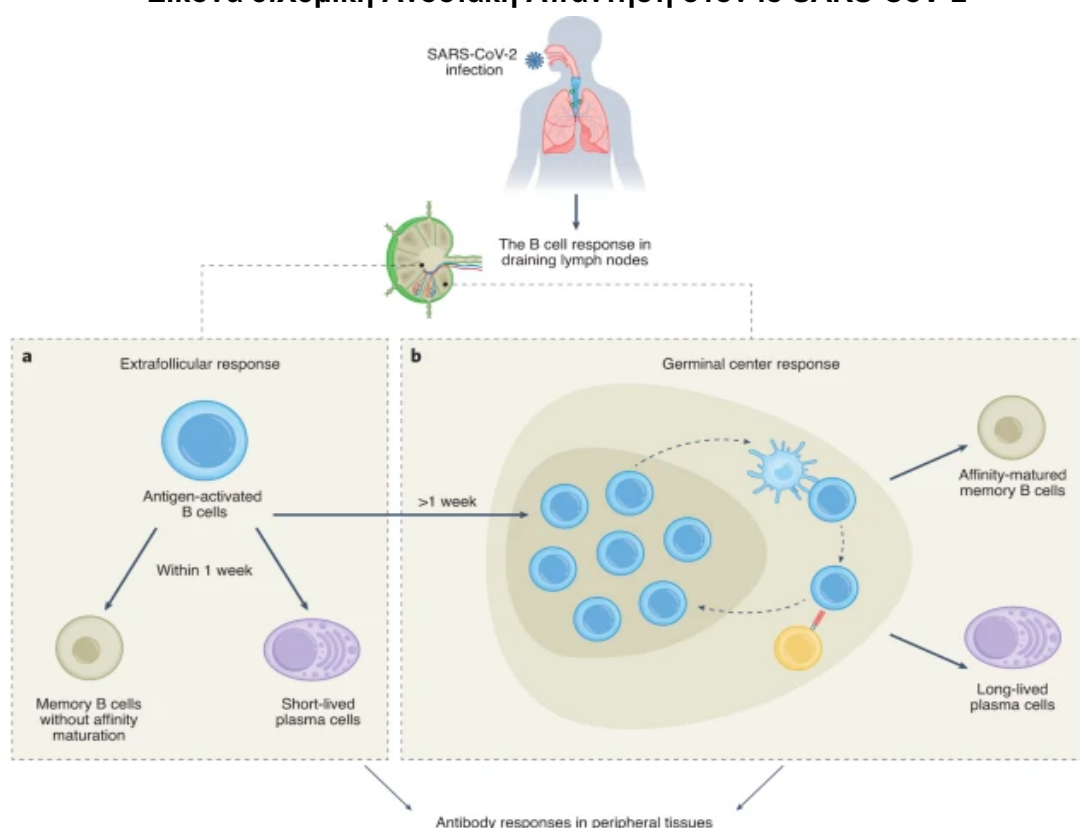
Αναφορικά με την κινητική της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης έναντι του ιού, ειδικά SARS-CoV-2 CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα μπορεί να εντοπιστούν από τις πρώτες 2 έως 4 ημέρες από την έναρξη της λοίμωξης (Shen et al., 2023). Ειδικά για τον ιό CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα εμφανίζονται τις πρώτες 7 ημέρες της οξείας φάσης της νόσου (Shen et al., 2023). Παράλληλα, CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα μνήμης ειδικά για τον ιό ανιχνεύονται στην πλειονότητα των ασθενών για πάνω από 8 μήνες από την λοίμωξη SARS-CoV-2 (Sette et al., 2023).

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλές μελέτες έχει ανευρεθεί διασταυρούμενη απάντηση των T-λεμφοκυττάρων σε άτομα που δεν έχουν εκτεθεί στον ιό, η οποία οφείλεται σε προηγούμενη έκθεση στους υπόλοιπους hCoVs (Shen et al., 2023). Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους γίνεται αυτή η διασταυρούμενη αντίδραση παραμένουν ασαφείς (Shen et al., 2023). Παρ'όλα αυτά, μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με T-λεμφοκύτταρα μνήμης μετά από διασταυρούμενη αντίδραση, αναπτύσσουν ταχύτερη και μεγαλύτερη κυτταρική ανοσιακή απάντηση μετά από εμβολιασμό (Sette et al., 2023).

1.3.3. Επίκτητη Ανοσία έναντι του SARS-CoV-2: Χυμική Ανοσία

Η χυμική ανοσολογική απάντηση έναντι του SARS-CoV-2 διαμεσολαβείται από τα εκκρινόμενα από τα Β λεμφοκύτταρα αντισώματα (Vardhana et al., 2022). Η χυμική ανοσοαπόκριση ξεκινάει με την αναγνώριση των ιικών αντιγόνων από τους ειδικούς υποδοχείς των Β-λεμφοκυττάρων (B-cell Receptors, BCR) στα περιφερειακά λεμφικά όργανα (Silva et al., 2022). Μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια: το εξωλεμφοζιδιακό στάδιο (Extrafollicular Phase) και το στάδιο του βλαστικού κέντρου (Germinal Center Phase) (Εικόνα 5) (Qi et al., 2022).

Εικόνα 5: Χυμική Ανοσιακή Απάντηση στον ιό SARS-CoV-2



Πηγή: *The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. Nat Immunol. 2022;23(7):1008-20.*

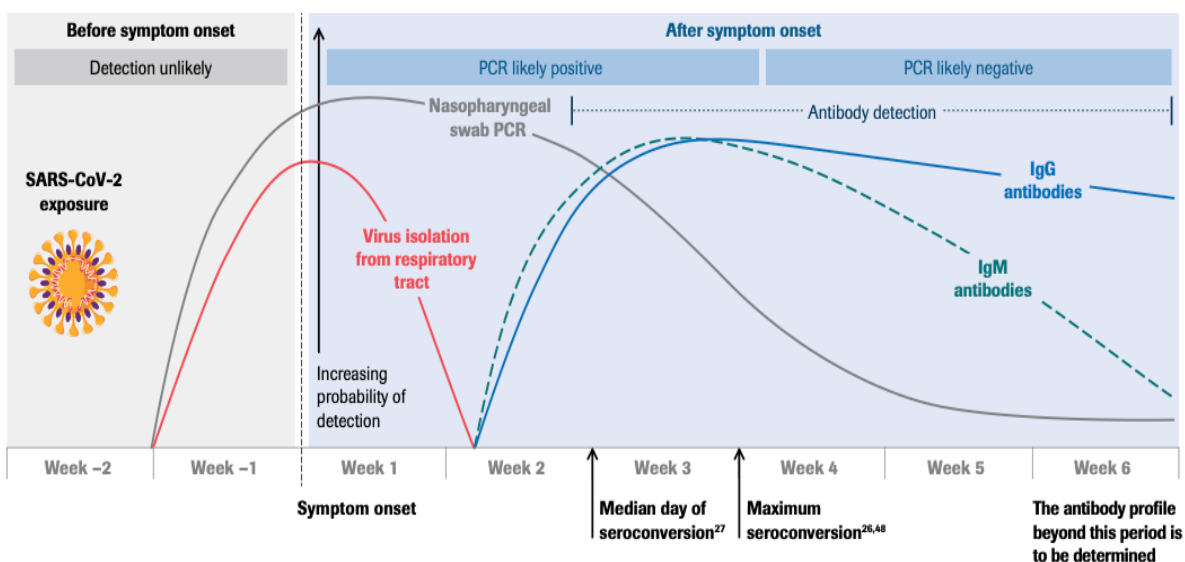
Κατά το εξωλεμφοζιδιακό στάδιο, λίγες ημέρες μετά την πρωτογενή λοίμωξη, τα Β-λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται άμεσα σε πλασματοκύτταρα (Qi et al., 2022). Τα εκκρινόμενα από τα πλασματοκύτταρα αντισώματα αν και περιέχουν λίγες σωματικές υπερμεταλλαγές (Somatic Hypermutations), έχουν υψηλή συγγένεια με τον ιό και μπορούν να τον εξουδετερώσουν (Qi et al., 2022). Τα πλασματοκύτταρα μετά από εμβολιασμό παράγουν κυρίως IgM ανοσοσφαιρίνες (Qi et al., 2022). Ωστόσο, μετά από φυσική λοίμωξη, μπορεί να γίνει εναλλαγή του ισότυπου της βαριάς αλυσίδας και τελικά να παραχθούν IgG

ή IgA ανοσοσφαιρίνες (Qi et al., 2022). Τα πλασματοκύτταρα που παράγονται στις εξωλεμφοζιδιακές εστίες, είναι κατά κανόνα βραχύβια (Qi et al., 2022).

Στο στάδιο του βλαστικού κέντρου, λίγες μέρες έως και μια εβδομάδα μετά την μόλυνση, το βλαστικό κέντρο αναπτύσσεται στα λεμφοζίδια (Qi et al., 2022), (Abbas, 2019). Το στάδιο αυτό μπορεί να διαρκέσει έως και μήνες (Qi et al., 2022). Κατά την αντίδραση του βλαστικού κέντρου, με την βοήθεια των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων (Tfh), λαμβάνουν χώρα η ωρίμανση συγγένειας (Affinity Maturation) και η εναλλαγή ισότυπου (Isotype Switching), με επακόλουθο την παραγωγή υψηλής συγγένειας ισσοτυπικά εναλλαγμένων πλασματοκυττάρων τα οποία εντοπίζονται στον μυελό των οστών για μεγάλο χρονικό διάστημα (Shen et al., 2023),(Qi et al., 2022).

Στο εξωλεμφοζιδιακό στάδιο και στο στάδιο του βλαστικού κέντρου (μετά από ωρίμανση συγγένειας), παράγονται Β-λεμφοκύτταρα μνήμης (Εικόνα 5) (Qi et al., 2022),(Palm and Henry, 2019) Τα Β-λεμφοκύτταρα μνήμης, αν και δημιουργούνται κατά την διάρκεια μιας λοίμωξης είναι λειτουργικά αδράνη ή βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλού κύκλου ζωής για μεγάλο διάστημα μετά την εξάλειψη της (Abbas, 2019). Σε αντίθεση με τα πλασματοκύτταρα που συμβάλλουν στην άμεση και αποτελεσματική προστασία έναντι της πρωτολοίμωξης, τα Β-λεμφοκύτταρα μνήμης αποτελούν μια δεξαμενή αντισωμάτων έναντι του ιού, σε περίπτωση επαναλοίμωξης (Kotaki et al., 2023).

Εικόνα 6: Κινητική των Αντισωμάτων στην λοίμωξη SARS-CoV-2



Πηγή: Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS-CoV-2 Roche Diagnostics International Ltd (2020)

Η λοίμωξη SARS-CoV-2 διεγείρει την σύνθεση και έκκριση IgM, IgG και IgA αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα (Altawalrah, 2021). Σε αντίθεση με άλλες ιογενείς λοιμώξεις, στην λοίμωξη SARS-CoV-2 τα αντισώματα IgG παράγονται σχεδόν ταυτόχρονα με τα IgA και τα

IgM (Shen et al., 2023). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι τις πρώτες 7 ημέρες από την εμφάνιση συμπτωμάτων σπανίως ανιχνεύονται αντισώματα (Altawalah, 2021). Την 10^η-11^η ημέρα, στην πλειοψηφία των ασθενών παράγονται IgM και IgG αντισώματα (Altawalah, 2021). Τα επίπεδα των IgM κορυφώνονται 20-22 ημέρες από την εμφάνιση συμπτωμάτων και στη συνέχεια μειώνονται σταδιακά (Altawalah, 2021). Τέλος, ανιχνεύονται και IgA αντισώματα μετά τη φυσική λοίμωξη τα οποία μειώνονται έναν μήνα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων (Εικόνα 6) (Altawalah, 2021).

Στην περίπτωση της οξείας λοίμωξης, τα κυκλοφορούντα αντισώματα εξασθενούν με διφασικό τρόπο: μειώνονται άμεσα σε διάστημα μικρότερο των 3 μηνών και στη συνέχεια μειώνονται ξανά σταδιακά σε διάστημα ενός χρόνου (Kotaki et al., 2023). Η κινητική των αντισωμάτων είναι συμβατή με την κινητική των πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών (Kotaki et al., 2023). Σε αντίθεση όμως με τα πλασματοκύτταρα, έχει παρατηρηθεί ότι τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης, αυξάνονται 2-3 εβδομάδες μετά την λοίμωξη και διατηρούνται σταθερά για τουλάχιστον έναν χρόνο (Kotaki et al., 2023).

Από τα ιικά αντιγόνα, η πρωτεΐνη ακίδα και η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου είναι οι πιο ανοσογόνες (Choteau et al., 2022). Η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου περικλείει το ιικό RNA (Choteau et al., 2022). Η πρωτεΐνη ακίδα είναι επιφανειακή πρωτεΐνη του ιού, η οποία εμπλέκεται στην είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή μέσω της περιοχής RBD, η οποία προσδέεται με τον υποδοχέα ACE2 των κυττάρων του ξενιστή (Choteau et al., 2022).

Τα αντισώματα είναι δραστικά έναντι των ιών κατά το εξωκυτταρίο στάδιο ζωής τους, προτού προσκολληθούν στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή (Abbas, 2019). Σε απάντηση στον SARS-CoV-2, παράγονται κυρίως δυο είδη αντισωμάτων τα μη εξουδετερωτικά αντισώματα και τα εξουδετερωτικά αντισώματα (Altawalah, 2021). Τα εξουδετερωτικά αντισώματα αποτρέπουν την προσκόλληση της πρωτεΐνης ακίδας του ιού στον υποδοχέα ACE2 (Merad et al., 2022). Αναχαιτίζουν, λοιπόν, την εξάπλωση του SARS-CoV-2 από κύτταρο σε κύτταρο και για το λόγο αυτό, θεωρούνται σημαντικά για την προστασία από την συμπτωματική νόσο COVID-19 (Abbas, 2019), (Kotaki et al., 2023). Τα επίπεδα των IgG-RBD αντισωμάτων συσχετίζονται θετικά με τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης ακίδας (Shen et al., 2023).

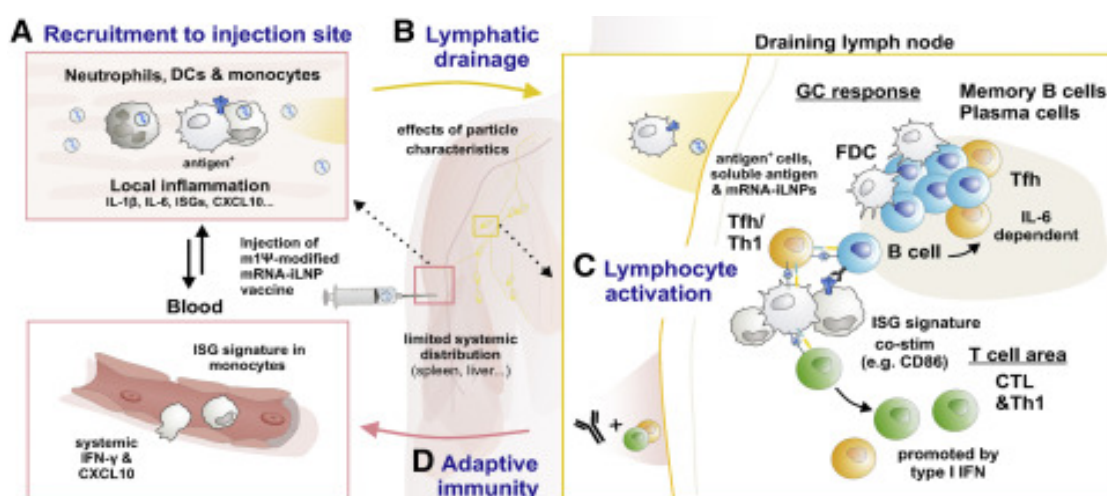
Τέλος, πέραν των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έχει προταθεί και άλλος δραστικός μηχανισμός της χυμικής ανοσίας έναντι του SARS-CoV-2 (Barouch, 2022),(Bartsch et al., 2022). Ειδικότερα, παρότι η παραλλαγή Όμικρον διαφεύγει των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, τα αντισώματα έναντι του ιού, που παράγονται μετά από εμβολιασμό, έχουν την ικανότητα να διεγείρουν δραστικούς μηχανισμούς, που μεσολαβούνται από την Fc

περιοχή των ανοσοσφαιρινών (καρβοξυτελικό άκρο της σταθερής περιοχής του αντισώματος), σε απάντηση στην παραλλαγή αυτή (Abbas, 2019),(Bartsch et al., 2022). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε διατήρηση των αντισωμάτων που προσδένονται στους υποδοχείς FcγR2a και FcγR3a καθώς και της ενεργοποίησης των NK κυττάρων από ειδικά για την πρωτεΐνη ακίδα αντισώματα (Bartsch et al., 2022). Ο υποδοχέας FcγR2a είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση φαγοκυττάρων και ο υποδοχέας FcγR3a είναι σημαντικός για την εξαρτώμενη από τα αντισώματα Τ- λεμφοκυτταρική κυτταροτοξικότητα (Abbas, 2019).

1.4. ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΟΝ SARS-CoV-2 mRNA ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ

Δυο mRNA εμβόλια έναντι του SARS-CoV-2, το BNT162b2 (BioNTech/Pfizer) και το mRNA-1273 (Moderna) έλαβαν έγκριση από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Barouch, 2022). Τα mRNA εμβόλια αποτελούνται από ένα συνθετικό μόριο mRNA το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακίδα του SARS-CoV-2 και νανοσωματίδια λιπιδίων τα οποία βοηθούν στην ακέραιη μεταφορά του mRNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων για να γίνει η μετάφραση (Verbeke et al., 2022). Τα εμβόλια αυτά θεωρήθηκαν ασφαλή και αποτελεσματικά και η τεχνολογία mRNA στην οποία βασίζονται παρέχει το πλεονέκτημα ταχείας παραγωγής τους (Jin et al., 2021). Η αποτελεσματικότητα της τρίτης δόσης του BNT162b2 εμβολίου ανέρχεται στο 95,3% (Shen et al., 2023). Τα mRNA εμβόλια κινητοποιούν τους μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας και της επίκτητης ανοσίας (Εικόνα 7), (Verbeke et al., 2022).

Εικόνα 7: Ανοσιακή Απάντηση στην χορήγηση mRNA εμβολίου



Πηγή: Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. Verbeke R, Hogan MJ, Loré K, Pardi N. *Immunity*. 2022;55(11):1993-2005

Αναλυτικότερα, μετά την ενδομυϊκή χορήγηση των εμβολίων, προκαλείται τοπική φλεγμονή κατά την οποία επιστρατεύονται μέσω της παραγωγής χημειοκινών και άλλων διαμεσολαβητών της φλεγμονής ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και διάφορα δενδριτικά κύτταρα (Verbeke et al., 2022). Στη συνέχεια, το αντιγόνο και τα αντιγονοσυναρπαστικά κύτταρα μεταφέρονται στους λεμφαδένες όπου ξεκινά η επίκτητη ανοσοαπόκριση (Εικόνα 7) (Verbeke et al., 2022).

Η ανοσοποίηση με τη χορήγηση mRNA εμβολίων συμβάλλει στην άμεση παραγωγή υψηλών τίτλων εξουδετερωτικών αντισωμάτων τα οποία συσχετίζονται με την προστασία (Εικόνα 7), (Barouch, 2022). Έχει ωστόσο παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα των αντισωμάτων αυτών εξασθενούν 3-6 μήνες μετά τον εμβολιασμό (Barouch, 2022). Ταυτόχρονα, τα mRNA εμβόλια επάγουν και την κυτταρική ανοσολογική απόκριση (Moss, 2022). Συγκεκριμένα, ενεργοποιούν άμεσα τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (Moss, 2022). Επίσης, επάγουν και CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα, τα οποία είναι απαραίτητα και για την παραγωγή και διατήρηση αντισωμάτων υψηλής συγγένειας με τον ιό (Moss, 2022). Τα ειδικά T_{fh} για την πρωτεΐνη ακίδα, φθάνουν στα υψηλότερα επίπεδα μετά την δεύτερη δόση και διατηρούνται για τουλάχιστον 6 μήνες (Shen et al., 2023).

1.5. ΣΗΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΤΗΝ ΛΟΙΜΩΞΗ SARS-CoV-2

Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί μέχρι στιγμής στις οροεπιδημιολογικές μελέτες και στις μελέτες της κινητικής των εξουδετερωτικών αντισωμάτων, καθώς αποτελούν πρακτικό εργαλείο για την αξιολόγηση της χυμικής ανοσιακής απάντησης στη νόσο και στον εμβολιασμό μέσω της μέτρησης των αντισωμάτων σε μεγάλους πληθυσμούς (Vardhana et al., 2022). Αν και ο εμβολιασμός οδήγησε σε σημαντική μείωση της νοσηρότητας και της θνητότητας από τη νόσο COVID-19, η ανάδειξη νέων μεταλλάξεων, οι οποίες διαφεύγουν από την εξουδετερωτική ικανότητα των αντισωμάτων και άρα δεν καλύπτονται πλήρως από τα διαθέσιμα εμβόλια, οδήγησε σε επαναλοιμώξεις, παρά τη μεγάλη εμβολιαστική κάλυψη του πληθυσμού (Vardhana et al., 2022). Σημαντικό ρόλο στην προστασία από βαριά νόσηση και επαναλοίμωξη, εκτός από τη χυμική απάντηση, διαδραματίζει και η κυτταρική ανοσία (Vardhana et al., 2022).

Τα T-λεμφοκύτταρα είναι ιδιαίτερος σημαντικά για τον έλεγχο της οξείας λοίμωξης SARS-CoV-2 (Vardhana et al., 2022). Η άμεση παραγωγή T-λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν IFN- γ έχει συσχετιστεί με αυξημένη ιική κάθαρση και ηπιότερη πορεία της νόσου (Vardhana et al., 2022). Ο αριθμός και ο φαινότυπος των T-λεμφοκυττάρων έχουν συσχετιστεί με τη βαρύτητα της νόσου COVID-19 (Vardhana et al., 2022). Για παράδειγμα, χαμηλά επίπεδα CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων έχουν συσχετιστεί με κακή έκβαση (Sette et al., 2023).

Καθυστερημένη ή πολύ μεγάλη κινητοποίηση των T-λεμφοκυττάρων μπορεί να οδηγήσει επίσης σε βαρύτερη νόσηση (Shen et al., 2023). Ακόμη, η λειτουργική ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων είναι επίσης σημαντική για την τελική έκβαση της νόσου (Moss, 2022). Συγκεκριμένα, τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα τύπου 1 σχετίζονται με καλύτερη έκβαση ενώ τα CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα τύπου 2 σχετίζονται με σοβαρή νόσο (Moss, 2022). Τέλος, η βαριά λεμφοπενία έχει επίσης συσχετιστεί με σοβαρή νόσο (Moss, 2022).

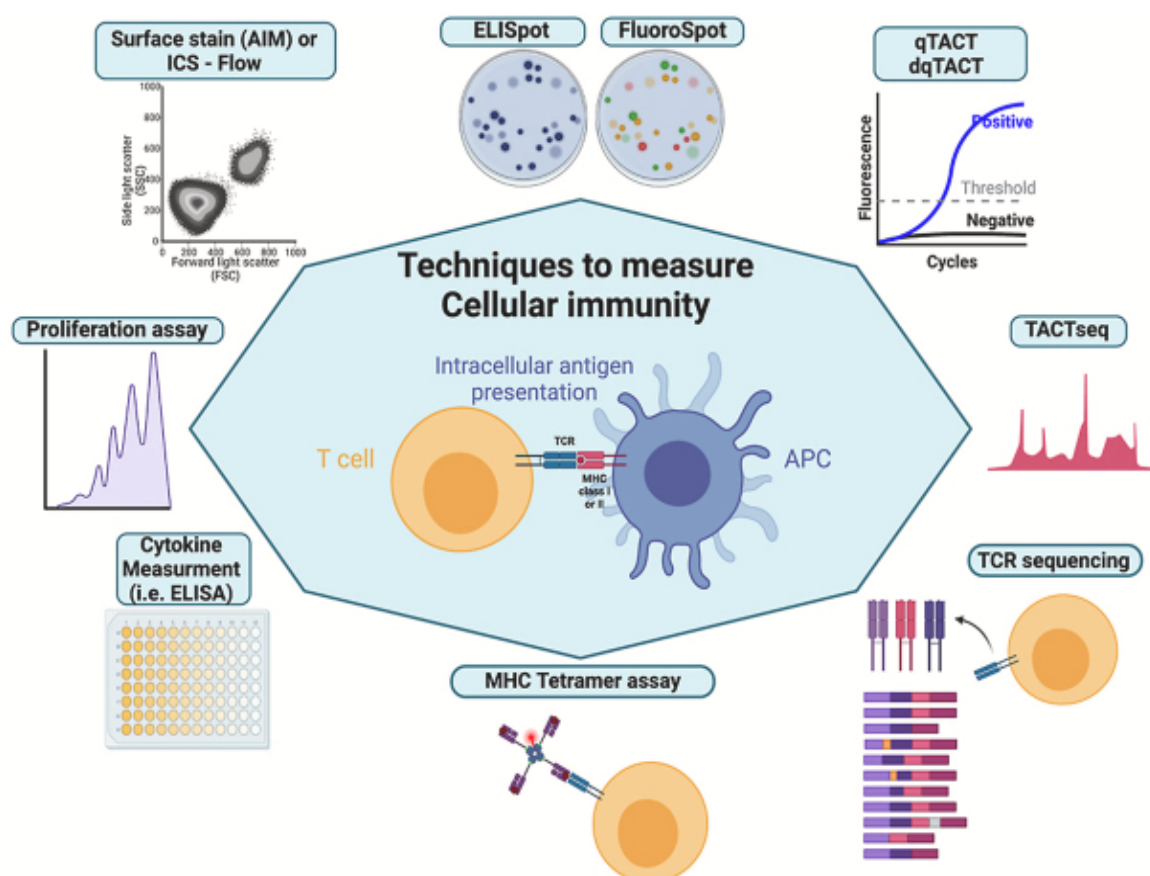
Ταυτοχρόνως, τα T-λεμφοκύτταρα μετά την λοίμωξη αναγνωρίζουν πολλούς αντιγονικούς επίτοπους του SARS-CoV-2, πιθανόν και περιοχές της πρωτεΐνης ακίδας που δεν έχουν μεταλλαχθεί (Vardhana et al., 2022). Επίσης, σε αντίθεση με τα εξουδετερωτικά αντισώματα, οι επίτοποι του ιού που αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα δεν είναι μόνο οι επιφανειακές πρωτεΐνες αλλά και οι υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2, οι οποίες προέρχονται και από συντηρημένα τμήματα της ιικής αλληλουχίας, κοινά για τις περισσότερες παραλλαγές του SARS-CoV-2 (Vardhana et al., 2022). Ενδέχεται, λοιπόν, σε περίπτωση επαναλοίμωξης, τα T-λεμφοκύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν και τις παραλλαγές του SARS-CoV-2 οι οποίες διαφεύγουν της εξουδετερωτικής ικανότητας των αντισωμάτων (Vardhana et al., 2022). Η ποικιλία των επιτόπων αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα, μπορεί να χρησιμεύσει και στον σχεδιασμό νέων αποτελεσματικότερων εμβολίων τα οποία θα στοχεύουν σε ευρύτερο φάσμα αντιγόνων του ιού (Vardhana et al., 2022).

Επιπρόσθετα, η κυτταρομεσολαβητική απάντηση ενδέχεται να έχει μεγαλύτερη διάρκεια από την αντισωματική απάντηση. Μετά από τον mRNA εμβολιασμό, έχει παρατηρηθεί ότι οι υψηλοί τίτλοι των εξουδετερωτικών αντισωμάτων που παράγονται αρχικά, ξεκινούν να εξασθενούν μέσα σε 4 έως 6 μήνες (Wherry and Barouch, 2022). Αντίθετα, παρατηρήθηκε με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής ότι η CD4⁺ και CD8⁺ T-κυτταρική απάντηση παραμένει σταθερή μετά από τον αρχικό εμβολιασμό έως και 7 μήνες (Sette et al., 2023). Είναι αξιοσημείωτο, ακόμη, ότι έχουν ανιχνευτεί T-λεμφοκύτταρα μνήμης μετά από 17 χρόνια σε άτομα που είχαν εκτεθεί στον SARS-CoV (Vardhana et al., 2022).

1.6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της επίκτητης κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης έναντι του SARS-CoV-2, οι οποίες αναλύονται παρακάτω (Εικόνα 8).

Εικόνα 8: Μέθοδοι Προσδιορισμού της Κυτταρικής Ανοσιακής Απάντησης έναντι του SARS-CoV-2



Πηγή: *T cell immunity is key to the pandemic endgame: How to measure and monitor it.* SCHWARZ, M., MZOUGH, S., LOZANO-OJALVO, D., TAN, A. T., BERTOLETTI, A. & GUCCIONE, E. 2022 *Curr Res Immunol*, 3, 215-221.

(1) Κυτταρομετρία Ροής

Αρχικά, ο προσδιορισμός των Τ-λεμφοκυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC). Η κυτταρομετρία ροής είναι μια ανοσολογική μέθοδος ανάλυσης του φαινότυπου των κυττάρων, ανιχνεύοντας ειδικά μόρια (ενδοκυττάρια ή και επιφανειακά) σε μεμονωμένα κύτταρα μέσω σεσημασμένων με φθορίζουσα χρωστική ανιχνευτών (Abbas, 2019). Με την παραπάνω διαδικασία μπορεί να

προσδιοριστούν το στάδιο ωρίμανσης, η ιστική προέλευση, και η κατάσταση ενεργοποίησης ενός κυττάρου (Abbas, 2019).

Κατά την δοκιμασία αυτή, τα T-λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται με βάση τον φαινότυπό τους, την αύξηση τους και επιφανειακούς ή και ενδοκυττάριους δείκτες (Intracellular Staining, ICS) (Schwarz et al., 2022). Ακόμη, με την τεχνική AIM (Activated-Induced Markers) μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση των αντιγονο-ειδικών κυττάρων χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη γνώση του επίτοπου, του τύπου των αντιγόνων των λευκοκυττάρων του ανθρώπου (Human Leukocyte Antigens, HLA) και των κυτταροκινών (Schwarz et al., 2022).

Η κυτταρομετρία ροής έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη των κυτταρομεσολαβούμενων αποκρίσεων έναντι του ιού SARS-CoV-2 (Schwarz et al., 2022). Γίνεται αντιληπτό, ότι η παραπάνω μέθοδος συμβάλλει στην απόκτηση εκτενών γνώσεων για τα T-λεμφοκύτταρα (Schwarz et al., 2022). Ωστόσο, η κυτταρομετρία ροής είναι χρονοβόρος και περίπλοκη διαδικασία η οποία έχει μεγάλο κόστος και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό για να εφαρμοστεί (Schwarz et al., 2022).

(2) Τετραμερή Πεπτιδίου MHC (peptide-MHC tetramers)

Τα τετραμερή Πεπτιδίου Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (peptide MHC tetramers) είναι αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την απαρίθμηση των T-λεμφοκυττάρων ειδικών για ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου (Abbas, 2019). Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα τετραμερών σεσημασμένων με φθορίζουσα χρωστική που έχουν τέσσερα σύμπλοκα πεπτιδίου-MHC και δεσμεύονται στους TCR των αντιγονοεδικών T-λεμφοκυττάρων (Abbas, 2019),(Schwarz et al., 2022). Φυσιολογικά, στον οργανισμό, αυτά τα σύμπλοκα θα αναγνωρίζονταν από τα T-λεμφοκύτταρα συστηνόμενα σε αυτά από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Abbas, 2019). Η παραπάνω δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό επιτόπων του ιού που αναγνωρίζονται από τα CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα και για την ex vivo μελέτη της ποικιλίας των TCR μετά από φυσική λοίμωξη SARS-CoV-2 και εμβολιασμό (Schwarz et al., 2022). Το βασικό μειονέκτημα της παραπάνω μεθόδου είναι ότι τα αποτελέσματα εξαρτώνται από τον HLA γονότυπο κάθε ανθρώπου και ότι έχουν σχεδιαστεί για συγκεκριμένους επίτοπους (Schwarz et al., 2022).

(3) Μοριακές μέθοδοι

Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των TCRs , χωρίς ωστόσο να παρέχει πληροφορίες

για την λειτουργικότητα των T-λεμφοκυττάρων (Schwarz et al., 2022). Η μέθοδος αν και μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα σε πολλά δείγματα, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και έχει υψηλό κόστος (Schwarz et al., 2022). Επίσης, μελέτη της κυτταρικής ανοσιακής απόκρισης έναντι του ιού μπορεί να γίνει και με την χρήση της PCR (Schwarz et al., 2022).

(4) Μέθοδοι ανίχνευσης της απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ (Interferon-γ Release Assays, IGRAs)

Οι μέθοδοι ανίχνευσης της απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ (Interferon-γ Release Assays, IGRAs) στηρίζονται στην ανίχνευση της κυτταροκίνης IFN-γ από ειδικά T-λεμφοκύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνα του ιού *ex vivo* (Schwarz et al., 2022). Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν η ανοσοπροσοφητική συνδεδεμένη με ενζυμικό μόριο διαδικασία ενός κυττάρου (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot, ELISPoT) και η ανίχνευση IFN-γ με την χρήση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσοφητικής δοκιμασίας (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA), (Schwarz et al., 2022).

A. IGRA: Ανοσοπροσοφητική συνδεδεμένη με ενζυμικό μόριο διαδικασία ενός κυττάρου (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot, ELISPoT)

Η δοκιμασία ELISPoT χρησιμοποιείται για τον καθορισμό λειτουργικών αντιγόνο-ειδικών T-λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν κυτταροκίνες (IFN-γ) (Abbas, 2019),(Schwarz et al., 2022), Συγκεκριμένα κατά την δοκιμασία, T-λεμφοκύτταρα διεγείρονται με αντιγόνα του SARS-CoV-2 και καλλιεργούνται σε πλάκες επικαλυμμένες με αντισώματα ειδικά για μια συγκεκριμένη κυτταροκίνη (στην περίπτωση αυτή IFN-γ) (Abbas, 2019),(Schwarz et al., 2022), (Ameratunga et al., 2021) . Τα T-λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα του ιού θα παράγουν την κυτταροκίνη (Abbas, 2019). Κατά συνέπεια, τα αντισώματα θα δεσμεύσουν την κυτταροκίνη που εκκρίνεται από τα T-λεμφοκύτταρα, σχηματίζοντας διακριτές κηλίδες σε αντιστοιχία με την θέση των επιμέρους T-λεμφοκυττάρων (Abbas, 2019). Με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος, οι κηλίδες οπτικοποιούνται, με αποτέλεσμα, τον καθορισμό του αριθμού των T-λεμφοκυττάρων που εκκρίνουν κυτταροκίνες (Abbas, 2019).

Η δοκιμασία έχει μεγάλη ευαισθησία, είναι σχετικά γρήγορη και έχει μικρότερο κόστος από τις παραπάνω μεθόδους (Schwarz et al., 2022). Ωστόσο, είναι περίπλοκη και απαιτείται απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή σε περίπτωση κρυοσυντήρησης των PBMCs (Schwarz et al., 2022).

B. IGRA: Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)

Κατά τη δοκιμασία αυτή, τα Τ-λεμφοκύτταρα επωάζονται με αντιγόνα ειδικά για τον SARS-CoV-2 (Schwarz et al., 2022). Στη συνέχεια, επικαλυμμένες με ειδικά αντισώματα πλάκες δεσμεύουν την παραγόμενη από τα Τ-λεμφοκύτταρα IFN-γ και ακολουθεί μέτρηση της IFN-γ με τη χρήση φωτόμετρου (Schwarz et al., 2022). Στην κατηγορία αυτή ανήκει η δοκιμασία QuantiFERON® SARS-CoV-2 (Qiagen, Hilden, Germany), η οποία αναλύεται παρακάτω.

1.7. QuantiFERON SARS-CoV-2

Η *in vitro* δοκιμασία QuantiFERON® SARS-CoV-2 (Qiagen, Hilden, Germany) βασίζεται στην μέθοδο ELISA με την οποία επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της παραγόμενης IFN-γ μετά από διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων με αντιγόνα ειδικά για τον ιό SARS-CoV-2 (Schwarz et al., 2022). Χρησιμοποιεί αντιγόνα που προέρχονται από την πρωτεΐνη ακίδα και διεγείρουν την παραγωγή IFN-γ από τα CD4⁺ και CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα (Jaganathan et al., 2021).

Η παραπάνω δοκιμασία είναι απλή στην εφαρμογή της, δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτοχρόνως σε πολλά δείγματα, απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό και είναι λιγότερο ακριβή από τις υπόλοιπες μεθόδους (Schwarz et al., 2022). Ακόμη, σε σχέση με την δοκιμασία ELISpot, έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα που έχουν προηγουμένως φυλαχθεί στην κατάψυξη (Schwarz et al., 2022).

Η μεθοδολογία στην οποία βασίζεται η δοκιμασία QuantiFERON, χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη για την διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης (QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay, Qiagen, Germany) (Wen et al., 2022), (Jaganathan et al., 2021), (Wikell et al., 2021). Τα ειδικά αντιγόνα του *M. Tuberculosis* (Early Secretory Antigenic Target 6, ESAT6 και Culture Filtrate Protein 10, CFP10) που χρησιμοποιούνται στην δοκιμασία δεν υπάρχουν στο στέλεχος *M. bovis*, το οποίο περιέχεται στο εμβόλιο BCG, και στα άτυπα μυκοβακτηρίδια (εκτός των *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. Szulgai*) (Wen et al., 2022), (Hermansen et al., 2014). Επομένως, η ανοσοδοκιμασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης και στα άτομα που έχουν εμβολιαστεί με BCG.

Μια παρόμοια δοκιμασία (QuantiFERON CMV) για τον ιό CMV (Cytomegavirus) έχει χρησιμοποιηθεί σε μεταμοσχευμένους ασθενείς (Ameratunga et al., 2021). Ο Ερπητοϊός

CMV, έχει την ικανότητα να διαβεί σε λανθάνουσα κατάσταση στον ξενιστή και να επανενεργοποιείται όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση στρες ή ανοσοκαταστολή (Hiskey et al., 2022). Η λοίμωξη αν και ελέγχεται από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα, δεν μπορεί να εξαλειφθεί από τα κύτταρα αυτά (Abbas, 2019). Θετικό αποτέλεσμα της δοκιμασίας σχετίζεται με καλύτερη προστασία έναντι του ιού, ενώ αντίθετα το αρνητικό αποτέλεσμα υποδηλώνει έλλειψη στην ανοασοαπόκριση του ξενιστή και άρα αδυναμία ελέγχου πιθανής αναζωπύρωσης της λοίμωξης (Abbas, 2019),(Kim, 2020),(Valle-Arroyo et al., 2020). Στην περίπτωση που η δοκιμασία αποβεί θετική, μπορεί να διακοπεί με ασφάλεια η προφυλακτική χορήγηση Γανκυκλοβίρης στην συγκεκριμένη ομάδα ασθενών (Ameratunga et al., 2021).

Η ανοσοδιαγνωστική δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης στον εμβολιασμό με δυο δόσεις του εμβολίου BNT162b2 έναντι του SARS-CoV-2 σε υγειονομικούς (Martínez-Gallo et al., 2022). Ειδικότερα, σε πιλοτική μελέτη 20 υγειονομικών, μελετήθηκαν παράλληλα η αντισωματική απάντηση στον εμβολιασμό με μέτρηση IgG αντισωμάτων έναντι της ακίδας και της νουκλεοκαψιδικής πρωτεΐνης και η κυτταρική απάντηση με τη μέθοδο QuantiFERON, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν σε συμφωνία (Martínez-Gallo et al., 2022). Αξίζει να αναφερθεί, ότι σε εμβολιασμένο ανοσοκατεσταλμένο συμμετέχοντα στη μελέτη που βρέθηκε οροαρνητικός, η δοκιμασία QuantiFERON απέβει θετική (Martínez-Gallo et al., 2022).

Επίσης, το συγκεκριμένο διαγνωστικό εργαλείο έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανοσίας, μαζί με την μέτρηση αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδας σε μελέτη που μετείχαν 505 ενήλικες με πρωτοπαθείς ανοσοανεπάρκειες για την αξιολόγηση της ανοσιακής απόκρισης τους στον εμβολιασμό με δύο δόσεις του εμβολίου BNT162b2 (Van Leeuwen et al., 2022). Στη μελέτη αυτή, βρέθηκε ότι στους εμβολιασμένους ασθενείς με φυλοσύνδετη αγαμμασφαιρηναιμία, στην οποία σχεδόν απουσιάζουν τα CD19⁺ Β-λεμφοκύτταρα και οι ανοσοσφαιρίνες, μετά τον εμβολιασμό δεν ανιχνεύτηκαν αντισώματα στους περισσότερους ασθενείς. Ωστόσο, το κυτταρικό σκέλος της άμυνας στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών είχε ενεργοποιηθεί μετά τον εμβολιασμό για την νόσο COVID-19 (Van Leeuwen et al., 2022).

1.8. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΟ

Για την δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2, υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για τους εμβολιασμένους ενήλικες στους οποίους έχει παρέλθει μεγάλο χρονικό διάστημα (πάνω από 6 μήνες) από την ολοκλήρωση του εμβολιασμού με 3 δόσεις καθώς και για

ανεμβολίαστα παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19. Ως εκ τούτου, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί περαιτέρω η κυτταρική απάντηση έναντι του SARS-CoV-2 με τη χρήση της δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2 στους παραπάνω πληθυσμούς.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Σκοπός και Ερευνητική Υπόθεση

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού SARS-CoV-2 μέσω μέτρησης της παραγόμενης από τα Τ-λεμφοκύτταρα IFN- γ , με τη δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2, σε παιδιά και ενήλικες. Η ερευνητική υπόθεση είναι ότι στα άτομα με υβριδική ανοσία επάγεται ισχυρότερη κυτταρική ανοσολογική απάντηση σε σχέση με τα άτομα που έχουν μόνο εμβολιαστεί ή νοσήσει από τον ιό.

Συγκεκριμένα, οι στόχοι της εργασίας είναι:

(1).Ο έλεγχος της κυτταρικής ανοσίας μέσω μέτρησης IFN- γ μετά από:

A. Εμβολιασμό για τη νόσο COVID-19 με το mRNA εμβόλιο BNT162b2

B. Εμβολιασμό με mRNA SARS-CoV-2 BNT162b2 εμβόλιο και επακόλουθη COVID-19 νόσηση

Γ. Νόσηση με SARS-CoV-2 σε μη εμβολιασμένα άτομα

(2).Η σύγκριση της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης μεταξύ των τριών προαναφερθέντων ομάδων

(3).Η συσχέτιση της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης στις παραπάνω ομάδες με την τιμή των ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε προοπτικά στο Νοσοκομείο Παίδων «Η Αγία Σοφία» από τον Ιούλιο έως τον Σεπτέμβριο του 2022. Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από παιδιά σχολικής ηλικίας (άνω των 5 ετών) και ενήλικες. Στη μελέτη, συμπεριελήφθησαν παιδιά άνω των 5 ετών που νοσηλεύτηκαν στο Νοσοκομείο Παίδων “Η Αγία Σοφία” και υγειονομικοί, προσωπικό του συγκεκριμένου νοσοκομείου.

Κριτήρια εισόδου στην μελέτη ήταν το ιστορικό εμβολιασμού με 3 δόσεις του εμβολίου BNT162b2 έναντι του SARS-CoV-2 ή/και το ιστορικό νόσησης με COVID-19 τον τελευταίο χρόνο. Κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη αποτελούν οι συγγενείς ή οι επίκτητες ανοσοανεπάρκειες και η μετάγγιση.

Οι συμμετέχοντες διαχωρίστηκαν στις ακόλουθες κατηγορίες με βάση το είδος ανοσοποίησης τους έναντι του ιού SARS-CoV-2 και την ηλικιακή τους ομάδα: ανεμβολίαστα παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19, ανεμβολίαστοι ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19, εμβολιασμένοι ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 και εμβολιασμένοι ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 (ενήλικες με υβριδική ανοσία).

Από κάθε συμμετέχοντα ελήφθησαν ταυτόχρονα δυο δείγματα αίματος, για την μελέτη χυμικής και κυτταρικής ανοσίας, αντίστοιχα. Δημογραφικά δεδομένα και στοιχεία από το ιστορικό που αφορούσαν τη νόσο COVID-19 και τον εμβολιασμό συλλέχθηκαν με τη χρήση ερωτηματολογίου.

Όλες οι εργαστηριακές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Λοιμώξεων και Χημειοθεραπείας στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο της Α’ Παιδιατρικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Για τον προσδιορισμό της χυμικής ανοσολογικής απάντησης έναντι του ιού SARS-CoV-2, έγινε λήψη 2-5 mL αίματος από τους συμμετέχοντες. Από τον ορό προσδιορίστηκαν τα ολικά αντισώματα (IgM, IgA και IgG) έναντι των ιικών πρωτεϊνών ακίδας (Abs-S) και νουκλεοκαψιδίου (Abs-N) με τη χρήση των αντιδραστηρίων Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S και Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics, Switzerland), αντίστοιχα. Οι δοκιμασίες βασίζονται στην ενζυμική ανοσοδοκιμασία διπλού-αντιγόνου Sandwich ELISA και η ανίχνευση γίνεται με ηλεκτροχημειοφωταύγεια (Electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA).

Τα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης ακίδας είναι θετικά όταν η τιμή είναι $\geq 0,8$ IU/mL και έναντι του νουκλεοκαψιδίου όταν είναι ≥ 1 COI (cut-off index). Οι δοκιμασίες έγιναν στον αυτοματοποιημένο αναλυτή cobas e 411. Η αρχή των συγκεκριμένων δοκιμασιών (ECLIA) παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 9,10):

Βήμα 1^ο

Δείγμα ορού του ασθενούς (20μL) επωάζεται για 9 λεπτά με μείγμα βιτυνιλιωμένου SARS-CoV-2 ειδικού ανασυνδυασμένου αντιγόνου (πρωτεΐνη ακίδα ή νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη) και SARS-CoV-2 ειδικού ανασυνδυασμένου αντιγόνου (πρωτεΐνη ακίδα ή νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη) συζευγμένου με ρουθίνιο (Ru). Εάν υπάρχουν αντισώματα έναντι του αντιγόνου στον ορό σχηματίζονται ανοσολογικά συμπλέγματα διπλού αντιγόνου τύπου Sandwich.

Βήμα 2^ο

Μετά από προσθήκη καλυμμένων με στρεπταβιδίνη μικροσωματιδίων, τα υπάρχοντα ανοσολογικά συμπλέγματα διπλού αντιγόνου Sandwich δεσμεύονται στη στερεή φάση μέσω της ισχυρής σύνδεσης της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη. Η διαδικασία διαρκεί 9 λεπτά.

Βήμα 3^ο

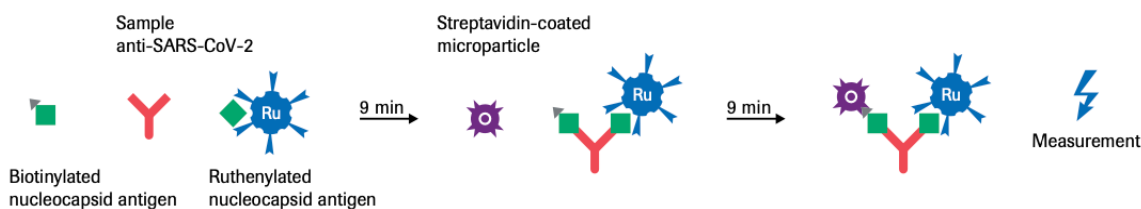
Το μείγμα μεταφέρεται μέσα σε ένα ηλεκτρόδιο όπου τα μικροσωματίδια δεσμεύονται μαγνητικά. Οποιαδήποτε αδέσμευτη ουσία απομακρύνεται με το διάλυμα ProCell. Η εφαρμογή ρεύματος στο ηλεκτρόδιο επάγει την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετρείται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Το προσλαμβανόμενο σήμα αυξάνει όσο αυξάνει και ο τίτλος των αντισωμάτων.

Η χρήση και των δύο αντιδραστηρίων είναι απαραίτητη για να διαχωριστούν οι νοσούντες (θετικοί και στις 2 δοκιμασίες) από τους εμβολιασμένους (θετικοί μόνο στην δοκιμασία για το αντιγόνο ακίδα).

Εικόνα 9. Αρχή της Δοκιμασίας δοκιμασία Elecsys Anti-SARS-CoV-2 για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αντισωμάτων έναντι του Νουκλεοκαψιδίου (Ab-N)

Electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA)

Test principle: double-antigen sandwich assay (testing time: 18 minutes)⁴⁵

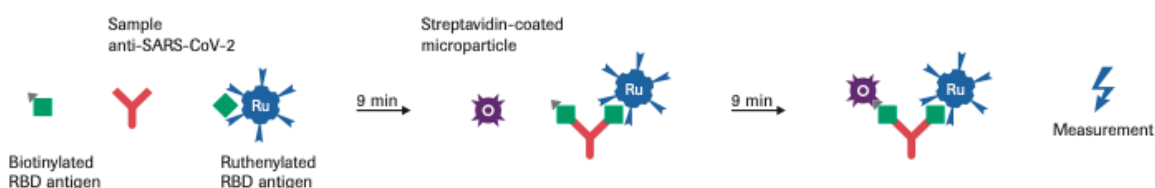


Πηγή: *Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS-CoV-2 Roche Diagnostics International Ltd (2020)*

Εικόνα 10. Αρχή της Δοκιμασίας δοκιμασία Elecsys Anti-SARS-CoV-2 για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης ακίδα (Ab-S)

Electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA)

Test principle: double-antigen sandwich assay (testing time: 18 minutes)³¹



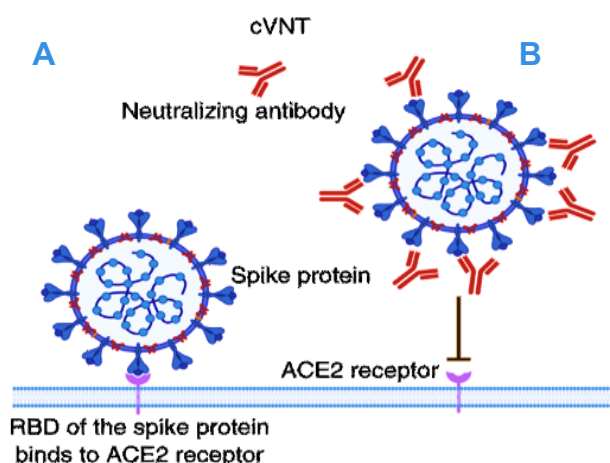
Πηγή: *Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS-CoV-2 Roche Diagnostics International Ltd (2020)*

3.2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Η εξουδετερωτική ικανότητα των αντισωμάτων (neutralizing antibodies, NAbs) έναντι της περιοχής πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor binding domain, RBD) της πρωτεΐνης ακίδας του ιού SARS-CoV-2 επίσης προσδιορίστηκε. Η μέτρηση της εξουδετερωτικής ικανότητας έγινε με τη μέθοδο blocking ELISA, cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (GenScrip Biotech Corporation, Piscataway, New Jersey, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2, μιμούμενη την αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή και του ιού (Εικόνα 1). Στη μέθοδο αυτή, οι 96 θέσεις της πλάκας της ELISA είναι επικαλυμμένες με τον ανθρώπινο υποδοχέα του μετατρεπτικού ενζύμου της Αγγειοτενσίνης 2 (human Angiotensin Converting Enzyme Receptor, hACE2). Στις πλάκες προστίθεται μείγμα από τον ορό του εξεταζόμενου και την αντιγονική περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα (Receptor binding domain, RBD) συζευγμένη με υπεροξειδάση χρένου (Horseradish peroxidase, HRP) (HRP-RBD). Εάν ο ορός δεν περιέχει εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του ιού, θα γίνει η σύνδεση μεταξύ HRP-RBD και ACE2 και το διάλυμα θα αποκτήσει κίτρινο χρώμα. Αντίθετα, εάν ο ορός περιέχει εξουδετερωτικά αντισώματα, η σύνδεση HRP-RBD και ACE2 θα παρεμποδιστεί από τα εξουδετερωτικά αντισώματα τα οποία θα προσδεθούν με το HRP-RBD και το διάλυμα θα παραμείνει άχρωμο (Εικόνα 9).

Εικόνα 11. Αλληλεπίδραση SARS-CoV-2 και Ξενιστή
A: απουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων
B: παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων

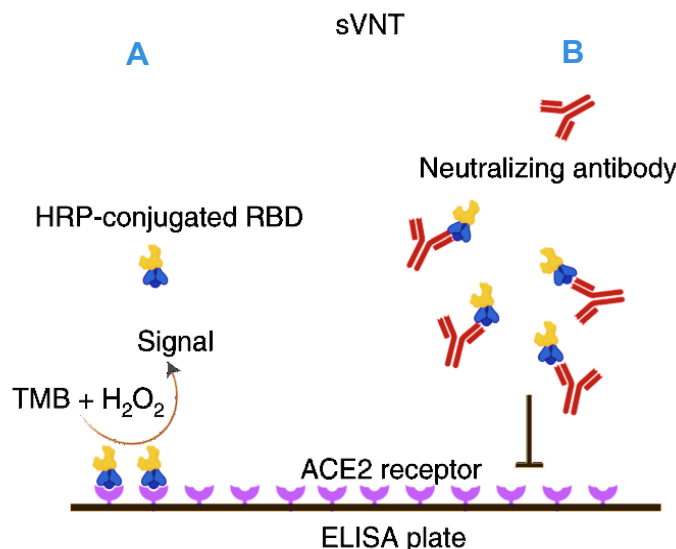


Πηγή: A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. Tan, C.W., et al., Nat Biotechnol 38, 1073–1078.

Εικόνα 12. Αλληλεπίδραση HRP-RBD και επικαλυμμένης με ACE-2 πλάκας ELISA

A: απουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων

B: παρουσία εξουδετερωτικών αντισωμάτων



Πηγή: A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. Tan, C.W., et al., Nat Biotechnol 38, 1073–1078.

Αναλυτικά, η πειραματική διαδικασία ήταν η εξής:

1. Σε διαφορετικά σωληνάρια, έγινε ανάμειξη των δειγμάτων θετικού μάρτυρα, αρνητικού μάρτυρα και ορού των συμμετεχόντων με το αραιωμένο διάλυμα HRP-RBD σε αναλογία όγκου 1:1 και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

2. Στη συνέχεια 100μL από το παραπάνω μείγμα προστέθηκαν στην πλάκα ELISA και επωάστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά

3. Ακολούθησε τέσσερις φορές έκπλυση της πλάκας ELISA με 260 μL από το 1× διάλυμα πλύσης (wash solution) και απομάκρυνση του διαλύματος με έντονο τίναγμα και στέγνωμα.

4. Προστέθηκαν 100 μL του χρωμογόνου διαλύματος TMB (Tetramethyl Benzidine) σε κάθε αντίδραση και έγινε επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.

5. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 50 μL του διαλύματος Stop σε κάθε αντίδραση.

6. Η οπτική πυκνότητα της πλάκας (optical density, OD) μετρείται αμέσως σε μήκος κύματος 450 nm στο φωτόμετρο Labtech LT 4500

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έγινε εφαρμογή του τύπου: Ποσοστό Αναστολής (%) = $(1 - \text{OD δείγματος} / \text{OD αρνητικού μάρτυρα}) * 100$. Ποσοστό $\geq 30\%$ θεωρείται θετικό για την ύπαρξη εξουδετερωτικών αντισωμάτων.

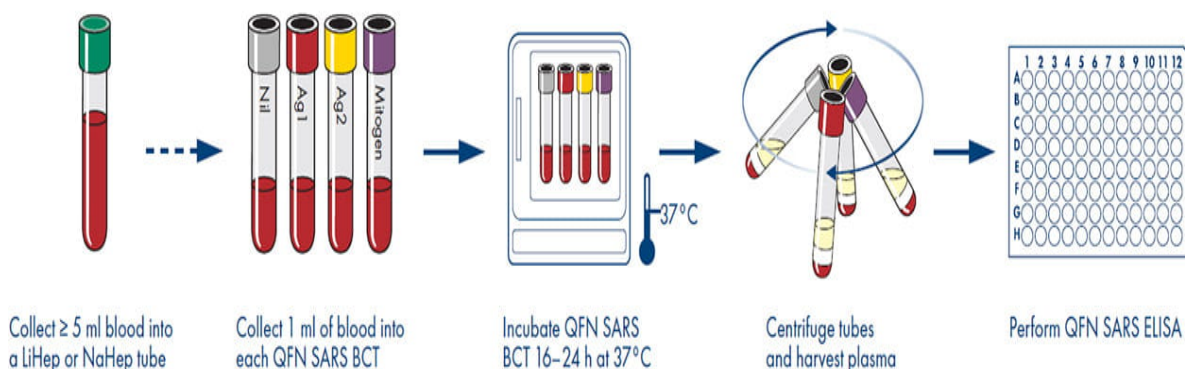
3.2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ

Η αξιολόγηση της κυτταρικής ανοσίας βασίστηκε στην μέτρηση της IFN- γ ειδικής για τον SARS-CoV-2. Η μέτρηση της IFN- γ από το ηπαρινισμένο ολικό αίμα των συμμετεχόντων, έγινε *in vitro* με τη χρήση της ανοσοδοκιμασίας QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 (Qiagen, Hilden, Germany) (QFN SARS-CoV-2).

Αρχικά, από κάθε ένα συμμετέχοντα συλλέχθηκαν 5 mL ολικού αίματος με ηπαρινισμένη σύριγγα. Ακολούθως, μεταφέρθηκε από 1 ml ολικού αίματος σε κάθε ένα από τα 4 ειδικά σωληνάρια QFN. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα παρακάτω σωληνάρια: (1) ένα σωληνάριο με αντιγόνα που προέρχονται από επίτοπους της υπομονάδας S1 (στην οποία συμπεριλαμβάνεται η περιοχή RBD) της πρωτεΐνης ακίδας και διεγείρουν την παραγωγή IFN- γ από τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα (Antigen1, Ag1), (2) ένα σωληνάριο με αντιγόνα που προέρχονται από επίτοπους της υπομονάδας S1 και S2 της πρωτεΐνης ακίδας και διεγείρουν την παραγωγή IFN- γ από τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα (Antigen 2, Ag2), (3) ένα σωληνάριο χωρίς την παρουσία αντιγόνου (αρνητικός μάρτυρας, Nil), (4) ένα σωληνάριο με μιτογόνο ουσία (θετικός μάρτυρας, Mitogen), η οποία διεγείρει την μη ειδική παραγωγή IFN- γ (Jaganathan et al., 2021) .

Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν για περίπου 18 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά σε 2500 g και κατόπιν, έγινε η συλλογή του πλάσματος από κάθε δείγμα. Εάν τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα είναι ευαισθητοποιημένα στα συγκεκριμένα αντιγόνα του ιού, παράγουν IFN- γ με την επανέκθεσή τους στα αντιγόνα αυτά.

Εικόνα 13. QuantiFERON SARS-CoV-2: Συλλογή Δείγματος, Επώαση, Φυγοκέντρηση, ELISA



Πηγή : QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit Instructions for Use, QIAGEN, (2021)

Για τη μέτρηση της IFN- γ , πραγματοποιήθηκε η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA, όπως περιγράφεται παρακάτω:

Προετοιμασία αντιδραστηρίων για την ELISA

1. Όλα τα δείγματα και τα αντιδραστήρια (εκτός του 100 x διαλύματος σύζευξης) ήταν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την χρήση για τουλάχιστον 60 λεπτά.

2. Έγινε ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου βαθμονομητή (standard) της IFN- γ με 1,61 mL απιονισμένου ύδατος προκειμένου να έχει συγκέντρωση 8 IU/mL.

3. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις του standard με τον πράσινο διαλύτη (100 x Green diluent) για την δημιουργία της καμπύλης με 4 σημεία ως εξής:

-S1 (Standard 1) περιλαμβάνει 150 μ L standard και 150 μ L 100 x Green diluent για τελική συγκέντρωση 4 IU/mL IFN- γ

-S2 (Standard 2) περιλαμβάνει 50 μ L από το S1 και 150 μ L 100 x Green diluent για τελική συγκέντρωση 1 IU/mL IFN- γ

-S3(Standard 3) περιλαμβάνει 0,25 IU/mL IFN- γ

-S4(Standard 4) περιλαμβάνει 0 IU/mL IFN- γ

4. Ανασύσταση πραγματοποιήθηκε και στο λυοφιλοποιημένο Conjugate με την προσθήκη 0,3 mL απιονισμένου ύδατος

Πειραματική διαδικασία

1. Πραγματοποιήθηκε αραιώση του διαλύματος Conjugate και προσθήκη 50 μ L σε κάθε θέση της πλάκας ELISA.

2. Προστέθηκαν επίσης 50 μ L των δειγμάτων πλάσματος και των αραιωμένων βαθμονομητών (S1-4) εις διπλούν στην πλάκα ELISA.

3. Η πλάκα της ELISA καλύφθηκε και έγινε μίξη του διαλύματος σύζευξης και των δειγμάτων/βαθμονομητών σε αναδευτή μικροπλακών για 1 λεπτό.

4. Η πλάκα ELISA έπειτα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 120 λεπτά στο σκοτάδι.

5. Κατά τη διάρκεια της επώασης της πλάκας, παρασκευάστηκε το 1 x διάλυμα πλύσης (working strength wash buffer), με αραιώση του αρχικού 20x διαλύματος πλύσης με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:20.

6. Μετά την επώαση της πλάκας ELISA, έγινε έκπλυση με 400 μ L του 1 x Wash buffer 6 φορές και απομάκρυνση του διαλύματος με έντονο τίναγμα και στέγνωμα κάθε φορά.

7. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μ L του υποστρώματος Enzyme Substrate Solution ανά αντίδραση και ανάδευση για 1 λεπτό σε αναδευτή μικροπλακών.

8. Η πλάκα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά στο σκοτάδι.

9. Μετά την επώαση, προστέθηκαν 50 μ L του διαλύματος διακοπής της αντίδρασης Enzyme Stopping Solution ανά αντίδραση και ανάδευση για 1 λεπτό.

10. Η τιμή της IFN- γ σε κάθε σωληνάριο προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση στα 450nm. Κατόπιν, αφαιρέθηκε από την τιμή απορρόφησης της IFN- γ στα σωληνάρια με τα Ag₁ και Ag₂, η τιμή απορρόφησης της IFN- γ στο σωληνάριο Nil (**Τελική Τιμή IFN- γ στο Ag₁ και Τελική Τιμή IFN- γ στο Ag₂**, αντίστοιχα).

Τιμές της δοκιμασίας πάνω από 0,15 IU/mL θεωρούνται θετικές σε εμβολιασμένους ενήλικες σύμφωνα με τον κατασκευαστή. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2 χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα της εταιρείας Qiagen, QFN SARS-CoV-2 Analysis Software v.1.1.0.0.

Πίνακας 1: Ερμηνεία Αποτελεσμάτων της Δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2

IFN- γ Nil (IU/mL)	IFN- γ Ag1-Nil (IU/mL)	IFN- γ Ag2-Nil (IU/mL)	IFN- γ Μιτογόνο-Nil (IU/mL)	Αποτέλεσμα QuantiFERON	Ερμηνεία
$\leq 8,0$	$\geq 0,15$ και $\geq 25\%$ του Nil	Οποιαδήποτε Τιμή	Οποιαδήποτε Τιμή	ΘΕΤΙΚΟ	Εντοπίστηκε απάντηση στον SARS-CoV-2
	Οποιαδήποτε Τιμή	$\geq 0,15$ και $\geq 25\%$ του Nil			
	$< 0,15$ ή $\geq 0,15$ και $< 25\%$ του Nil	$< 0,15$ ή $\geq 0,15$ και $< 25\%$ του Nil	$\geq 0,50$	ΑΡΝΗΤΙΚΟ	Δεν εντοπίστηκε απάντηση στον SARS-CoV-2
$\geq 8,0$	$< 0,15$ ή $\geq 0,15$ και $< 25\%$ του Nil	$< 0,15$ ή $\geq 0,15$ και $< 25\%$ του Nil	$< 0,50$	ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ	Δεν μπορεί να εντοπιστεί απάντηση στον SARS-CoV-2 και στο Μιτογόνο
	Οποιαδήποτε Τιμή				

Πηγή: QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit Instructions for Use, QIAGEN, (2021)

3.3.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μετά τη συλλογή των δεδομένων, έγινε επεξεργασία τους με τη χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης SPSS 28 (IBM SPSS Statistics, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05 (P -value $<0,05$). Οι

κατηγορικές μεταβλητές περιεγράφηκαν με τις σχετικές συχνότητες και τα σχετικά ποσοστά. Η ανάλυση των κατηγορικών μεταβλητών έγινε με τις δοκιμασίες Fisher’s exact test και Fisher-Freeman-Halton Exact Test. Η κανονικότητα της κατανομής των ποσοτικών συνεχών μεταβλητών έγινε με τους ελέγχους Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk καθώς και με κύρτωση και ασυμμετρία. Για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η διάμεση τιμή (Median, Mdn) και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range, IQR: 75th, 25th τεταρτημόριο). Οι συνεχείς μεταβλητές αναλύθηκαν με τον έλεγχο *t*-test ή την Ανάλυση της Διακύμανσης (ANOVA) και τη δοκιμασία Bonferroni post hoc test εάν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή και τους ελέγχους Mann-Whitney ή Kruskal-Wallis εάν δεν την ακολουθούσαν. Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman (Spearman correlation coefficient, r_s).

3.4. ΗΘΙΚΑ ΖΗΤΗΜΑΤΑ

Το ερευνητικό πρωτόκολλο υποβλήθηκε για έγκριση στην επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Παίδων «Η Αγία Σοφία» (Αριθμός πρωτοκόλλου:19546). Το βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε μόνο μετά από πληροφορημένη γραπτή συγκατάθεση των συμμετεχόντων ή στην περίπτωση των παιδιών, των κηδεμόνων τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα μελέτη, συμπεριλήφθηκαν συνολικά 41 άτομα. Οι συμμετέχοντες διαχωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με την ανοσολογική τους κατάσταση (χορήγηση εμβολίου BNT162b2 ή νόσος COVID-19) σε σχέση την λοίμωξη SARS-CoV-2:

(1)6/41 (14,63%) ανεμβολίαστα παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19

(2)5/41 (12,20%) ανεμβολίαστοι ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19

(3)16/41 (39,02%) εμβολιασμένοι ενήλικες με το εμβόλιο BNT162b2

(4)14/41 (34,14%) εμβολιασμένοι ενήλικες με το εμβόλιο BNT162b2 με ιστορικό νόσου COVID-19 μετά τον εμβολιασμό (Υβριδική Ανοσία)

Η διάμεση τιμή της ηλικίας των συμμετεχόντων ήταν 41 (IQR=28,00 – 53,00) έτη και η πλειοψηφία των συμμετεχόντων ήταν γυναίκες (70,7%, 29/41). Η μέση ηλικία των ανεμβολίαστων παιδιών ήταν 8 έτη (IQR= 6,50–13,50), των ανεμβολίαστων ενηλίκων ήταν 41 έτη (IQR=31,00–51,50), των εμβολιασμένων ενηλίκων ήταν 42 έτη (IQR=31,50-51,75) και των ενηλίκων με υβριδική ανοσία ήταν 52,50 έτη (IQR=40,25–56,00).

Όλοι οι ενήλικες είχαν εμβολιαστεί με τρεις δόσεις του εμβολίου BNT162b2 για τη νόσο COVID-19 πριν από 6,2-10,9 μήνες από την έναρξη τους στην μελέτη. Συγκεκριμένα, η διάμεσος χρόνος μεταξύ εμβολιασμού και μέτρησης ήταν 8,08 μήνες (IQR=6,97–8,97) για τους εμβολιασμένους ενήλικες, ενώ στους ενήλικες με υβριδική ανοσία ήταν 9,55 μήνες (IQR=7,93–10,14) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Περιγραφικά στατιστικά μέτρα για την ηλικία, το χρονικό διάστημα από τη λοίμωξη SARS-CoV-2 και τον εμβολιασμό έναντι της νόσου COVID-19 ανά COVID-19 ανοσολογική Κατάσταση

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		Μήνες από τη Λοίμωξη Mdn (IQR)	Μήνες από τον Εμβολιασμό Mdn (IQR)
Νόσος COVID-19	Παιδιά (n=6)	ME	-
	Ενήλικες (n=5)	7,27 (1,43–7,88)	-
Εμβολιασμός Ενήλικες (n=16)		-	8,08 (6,97–8,97)
Υβριδική Ανοσία Ενήλικες (n=14)		3,75 (1,41–6,86)	9,55 (7,93–10,14)
P-value		0,548 [§]	0,047 [§]

Συνοτομογραφίες: Mdn: Διάμεσος Median, IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος, Interquartile range, ME=Μη εφαρμοσίμο

Σημειώσεις: Οι ποσοτικές μεταβλητές εκφράζονται ως Διάμεσος και Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος P-value μετά από: [§]t-test.

4.2. SARS-CoV-2 ΧΥΜΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ Η/ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ

Όλοι οι εμβολιασμένοι ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 ήταν αρνητικοί για τα Abs-N (εύρος τιμών: 0,04-0,09 IU/mL). Τα επίπεδα των Abs-N είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών ανοσολογικής κατάστασης (Kruskal-Wallis, P -value<0,001), (Πίνακας 3). Συγκεκριμένα, οι εμβολιασμένοι ενήλικες είχαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα Abs-N (Mdn=0,07 IU/mL, IQR=(0,06-0,08) IU/mL) σε σχέση με τα ανεμβολίαστα παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19 (Mdn=43,26IU/mL, IQR=4,24-140,83 IU/mL) και με τους ανεμβολίαστους ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 (Mdn=33,20, IQR=14,41-98,17 IU/mL). Τα επίπεδα των Abs-N στους εμβολιασμένους ενήλικες ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερα από τα επίπεδα των Abs-N που ανιχνεύθηκαν στους ενήλικες με υβριδική ανοσία (Mdn=8,28 IU/mL, IQR=4,86-31,40 IU/mL) (Πίνακας 3).

Όλοι οι εμβολιασμένοι ενήλικες (με ή χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19) είχαν ανιχνεύσιμα Abs-S. Τα επίπεδα των Abs-S είχαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων κατηγοριών ανοσοποίησης (Kruskal-Wallis, P -value<0,001) (Πίνακας 3). Οι ενήλικες με υβριδική ανοσία είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Abs-S (Mdn=17336,50 IU/mL, IQR=13042,25- 25000 IU/mL) σε σχέση με τα ανεμβολίαστους συμμετέχοντες με ιστορικό νόσου COVID-19 (παιδιά και ενήλικες) (Mdn=39,93 IU/mL, IQR=5,15-7689 IU/mL και MDN=483,90 IU/mL, IQR=2,64-3103 IU/mL, αντίστοιχα). Στους ενήλικες με υβριδική ανοσία παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα Abs-S σε σχέση με τους εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 (Mdn=3.185 IU/mL, IQR=1521,75-12991,5 IU/mL), αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3).

Ακόμη, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και στα ποσοστά των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του Wild type (Kruskal-Wallis, P -value =0.031). Ειδικότερα, τα ποσοστά των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του wild type ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στους εμβολιασμένους ενήλικες (Mdn=97,06%, IQR=96,24- 98,03 %) χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους ανεμβολίαστους συμμετέχοντες με ιστορικό νόσου COVID-19 (παιδιά και ενήλικες), (Mdn=19,37%, IQR=11,50-97,28% και Mdn=58,44%, IQR=7,13-96,75%, αντίστοιχα). Επίσης, στους ενήλικες με υβριδική ανοσία ανιχνεύθηκαν υψηλότερα επίπεδα εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του Wild type (Mdn = 97,16%, IQR = 96,13-97,47%) σε σχέση με τους ανεμβολίαστους ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 (Πίνακας 3).

Τέλος, στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα ποσοστά εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι της παραλλαγής Όμικρον ανιχνεύθηκαν στους ενήλικες με υβριδική ανοσία σε σχέση με

τους εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 (Kruskal-Wallis, P -value =0.008) (Πίνακας 3).

Στο σύνολο του δείγματος, τα επίπεδα Abs-S levels συσχετίστηκαν θετικά με τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του wild type και της παραλλαγής Όμικρον ($r_s = 0,579$, P -value<0.001 και $r_s = ,517$, P -value<0.001, αντίστοιχα). Παρομοίως, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των Abs-N και των εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι της παραλλαγής Όμικρον ($r_s = 0,456$, P -value=0.003). Αντίθετα, Abs-N δεν είχαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του wild type ($r_s = -0.224$, P -value=0.160).

Πίνακας 3: Περιγραφικά στατιστικά μέτρα για τα επίπεδα των ολικών και εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του SARS-CoV-2 ανά COVID-19 Ανοσολογική Κατάσταση

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		Abs-N (COI) Mdn(IQR)	Abs-S (IU/mL) Mdn((IQR)	NAbs έναντι Wild type (%) Mdn((IQR)	NAbs έναντι Omicron (%) Mdn((IQR)
Νόσος COVID-19	Παιδιά (n=6)	43,26 (4,24-140,83)	39,93 (5,15-7689)	19,37 (11,50-97,28)	52,73 (14,47-69,77)
	Ενήλικες (n=5)	33,20 (14,41-98,17)	483,90 (2,64-3103)	58,44 (7,13-96,75)	47,07 (25,47-90,76)
Εμβολιασμένοι Ενήλικες (n=16)		0,07 (0,06-0,08)	3185 (1521,75-12991,50)	97,06 (96,24- 98,03)	25,60 (0,00-67,08)
Υβριδική Ανοσία Ενήλικες (n=14)		8,28 (4,86-31,40)	17336,50 (13042,25-25000)	97,16 (96,13-97,47)	92,11 (67,32-94,75)
P-value		<0,001^{α,γ,στ}	<0,001^{β,δ}	0,031^{α,γ,δ}	0,008^{στ}

Συντομογραφίες: Abs-N: Αντισώματα έναντι του νουκλεοκαψιδίου Abs-S: Αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης ακίδας; COI: Cutoff index; NAbs: Εξουδετερωτικά αντισώματα; Mdn: Διάμεσος Median; IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος, Interquartile range

Σημειώσεις: Οι μεταβλητές εκφράζονται ως Διάμεσος και Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος P-value μετά από: Kruskal-Wallis H test

Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε

^αΑνεμβολίαστα Παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Εμβολιασμένους Ενήλικες

^βΑνεμβολίαστα Παιδιά με ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Ενήλικες με υβριδική ανοσία

^γΑνεμβολίαστοι Ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Εμβολιασμένους Ενήλικες

^δΑνεμβολίαστοι Ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Ενήλικες με υβριδική ανοσία

^{στ}Εμβολιασμένοι ενήλικες σε σχέση με τους Ενήλικες με υβριδική ανοσία

4.3. SARS-CoV-2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΕ ΛΟΙΜΩΞΗ Η/ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ

Η κυτταρική ανοσία έναντι του SARS-CoV-2 προσδιορίστηκε με χρήση της ανοσοδοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2. Κατά την δοκιμασία, ανιχνεύεται η παραγόμενη από τα Τ-λεμφοκύτταρα IFN-γ μετά από διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων με αντιγόνα που προέρχονται από την πρωτεΐνη ακίδα του ιού (Ag1 και Ag2).

Μετά από διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων με το Ag1, διαπιστώθηκε ότι οι ενήλικες με υβριδική ανοσία είχαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες τελικές τιμές IFN-γ (Mdn=0,14 IU/mL, IQR=0,04-0,56 IU/mL) σε σχέση με τα ανεμβολίαστους (παιδιά και ενήλικες) συμμετέχοντες με ιστορικό νόσου COVID-19 (MDN=0,00 IU/mL, IQR=0,00-0,02 IU/mL και Mdn=0,00 IU/mL, IQR=0,00-0,05 IU/mL, αντίστοιχα) (Kruskal-Wallis, *P*-value=0,001). Οι ενήλικες με υβριδική ανοσία είχαν μεγαλύτερες τελικές τιμές IFN-γ από ότι οι εμβολιασμένοι ενήλικες (Mdn=0,06 IU/mL, IQR=0,02-0,17 IU/mL) αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Τελικές Τιμές IFN-γ στο Ag1 και στο Ag2 ανά COVID-19 Ανοσολογική Κατάσταση

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		IFN-γ Ag1 (IU / ml) Mdn((IQR)	IFN-γ Ag2 (IU/mL) Mdn((IQR)
Νόσος COVID-19	Παιδιά (n=6)	0,00 (0,00-0,02)	0,02 (0,00-0,04)
	Ενήλικες (n=5)	0,00 (0,00-0,05)	0,01 (0,00-0,02)
Εμβολιασμένοι Ενήλικες (n=16)		0,06 (0,02-0,17)	0,11 (0,00-0,28)
Υβριδική Ανοσία Ενήλικες (n=14)		0,14 (0,04-0,56)	0,18 (0,09-0,67)
<i>P</i>-value		0,001^{α,β}	0,011^β

Συντομογραφίες: IFN-γ: Ιντερφερόνη-γ, Mdn: Διάμεσος Median, IQR: Ενδοτεταρτημοριακό Εύρος, Interquartile range

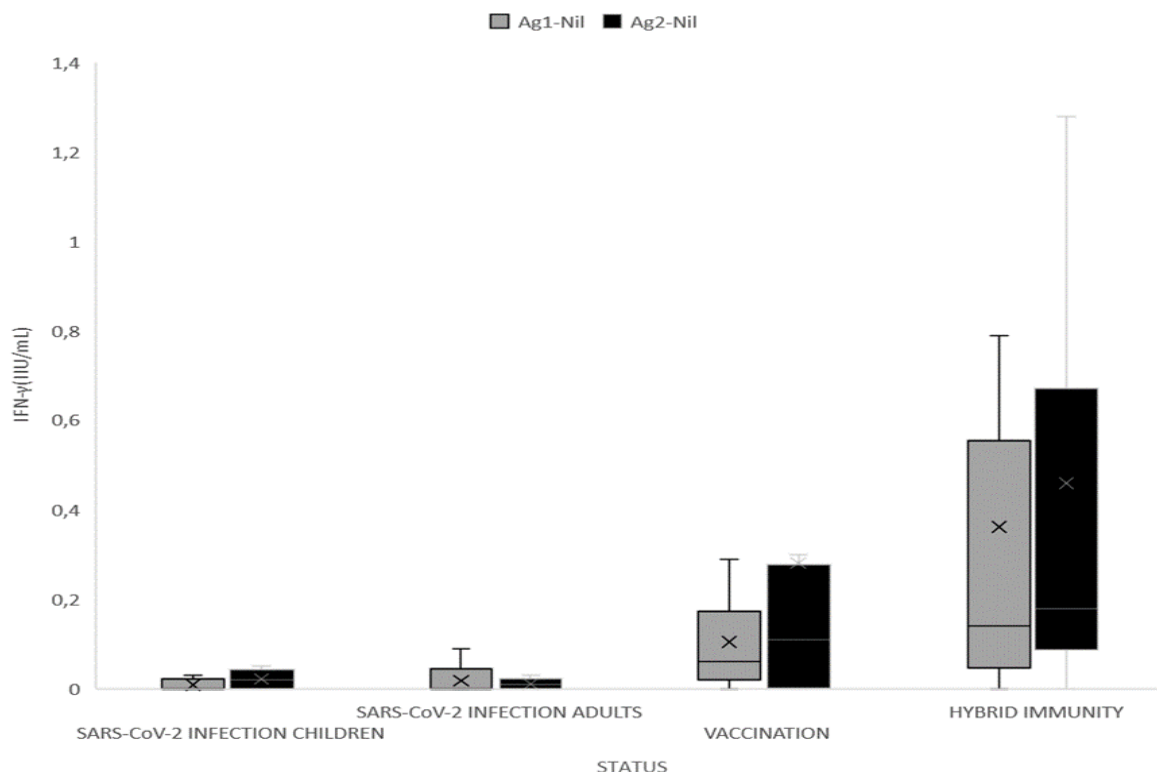
Σημειώσεις: *P*-value μετά από: Kruskal-Wallis *H* test

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ: ^αΑνεμβολίαστα Παιδιά ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Ενήλικες με υβριδική ανοσία, ^βΑνεμβολίαστοι Ενήλικες ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με τους Ενήλικες με υβριδική ανοσία

Μετά από διέγερση των Τ-λεμφοκυττάρων με το Ag2, οι τελικές τιμές της IFN-γ διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ενηλίκων με υβριδική ανοσία (Mdn=0,18 IU/mL, IQR =0,09-0,67 IU/mL) σε σχέση με τους ανεμβολίαστους ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-

19 (Mdn=0,01 IU/mL και IQR =0,00-0,02 IU/mL), (Kruskal-Wallis, P -value=0,011) (Πίνακας 4).

Γραφική Παράσταση 1: Επίπεδα τελικών τιμών IFN- γ σε ανεμβολίαστα παιδιά και ενήλικες με ιστορικό νόσου COVID-19 εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 και ενήλικες με υβριδική ανοσία



Στο σύνολο του δείγματος, η τιμή της IFN- γ στο σωληνάριο με το Ag1 μειωμένη κατά την τιμή IFN- γ στο σωληνάριο του Αρνητικού μάρτυρα (Ag1) (Τελική Τιμή IFN- γ στο Ag1) και η τιμή της IFN- γ στο Ag1 μειωμένη κατά την τιμή IFN- γ στο σωληνάριο του Αρνητικού μάρτυρα (Ag2) (Τελική Τιμή IFN- γ στο Ag2) είχαν θετική συσχέτιση ($r_s = 0,84$, P -value <0,001).

Στο σύνολο του δείγματος, τα επίπεδα των Ab-S συσχετίστηκαν θετικά με τις τελικές τιμές της IFN- γ στο Ag1 ($r_s=0,52$, P -value<0.001) και στο Ag2 ($r_s=0,40$, P -value=0.009). Επιπρόσθετα, υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις τιμές της IFN- γ στο Ag1 και τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι του wild type ($r_s = 0,324$, P -value=0,039), αλλά όχι με τα εξουδετερωτικά αντισώματα έναντι της παραλλαγής Omicron ($r_s = 0,269$, P -value=0,09). Αυτές οι συσχετίσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντικές για τις τιμές IFN- γ (Ag2) και στην ανάλυση κάθε ομάδας ανοσολογικής κατάστασης COVID-19 ξεχωριστά.

Όλοι οι ανεμβολίαστοι ενήλικες ήταν αρνητικοί με την δοκιμασία QFN (Πίνακας 5). Σχετικά με τους εμβολιασμένους ενήλικες, το 50% (8/16) των εμβολιασμένων ενηλίκων με

ιστορικό νόσου COVID-19 και το 57,1% (8/14) των ενηλίκων με υβριδική ανοσία ήταν θετικοί με τη δοκιμασία (QFN (+)) (P -value=0,018). Η θετικότητα της δοκιμασίας συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τον εμβολιασμό για τη νόσο COVID-19 (P -value =0,003), ενώ το ιστορικό νόσου COVID-19 (είτε στους ανεμβολίαστους συμμετέχοντες είτε στους ενήλικες με υβριδική ανοσία) δεν ήταν στατιστικά σημαντικό για το αποτέλεσμα της δοκιμασίας (P -value =0,33).

Πίνακας 5. Ποιοτικό Αποτέλεσμα SARS-CoV-2 QuantiFERON σε ανεμβολίαστα παιδιά και ενήλικες με ιστορικό λοίμωξης SARS-CoV-2, εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό λοίμωξης και ενήλικες με υβριδική ανοσία

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ		QFN SARS-CoV-2	Σχετική Συχνότητα n (%)
Νόσος COVID-19	Παιδιά(n=6)	ΘΕΤΙΚΟ	0 (0)
	Ενήλικες(n=5)	ΘΕΤΙΚΟ	0 (0)
Εμβολιασμένοι Ενήλικες (n=16)		ΘΕΤΙΚΟ	8 (50)
Ενήλικες με Υβριδική ανοσία(n=14)		ΘΕΤΙΚΟ	8 (57,1)

Συνοτομογραφίες: QFN:QuantiFERON

Τόσο στο σύνολο του δείγματος (n=41) όσο και σε όλους τους εμβολιασμένους συμμετέχοντες (με ή χωρίς ιστορικό λοίμωξης) η ηλικία, το χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό, τα Abs-N, τα Abs-S, η εξουδετερωτική ικανότητα των αντισωμάτων έναντι του wild-type και της παραλλαγής Όμικρον δεν είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το αποτέλεσμα του QFN. Στους συμμετέχοντες με ιστορικό νόσου COVID-19 (με ή χωρίς εμβόλιο) το χρονικό διάστημα από τη λοίμωξη δεν συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας.

Στα άτομα που η δοκιμασία ήταν θετική, η διάμεσος τιμή της IFN- γ στο Ag1 ήταν 0,25 IU/ml (IQR = 0,11-0,54) και η διάμεση τιμή της IFN- γ για το Ag2 ήταν 0.36 IU/mL (IQR=0,20-0,91), ενώ στα άτομα που η δοκιμασία ήταν αρνητική η διάμεση τιμή της IFN- γ στο Ag1 ήταν 0.02 (IQR=0,00-0,04) και στο Ag2 ήταν 0,01 (IQR=0,00-0,07).

Ακόμη, μεταξύ των ατόμων που η δοκιμασία ήταν θετική, θετική απάντηση στο Ag1 (επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα CD4⁺ Τ-λεμφοκύτταρα) και στο Ag2 (επίτοποι που αναγνωρίζονται από τα CD4⁺ και CD8⁺ Τ-λεμφοκύτταρα), ανιχνεύτηκε στο 68,8% (11/16) και στο 87,5% (14/16) αντίστοιχα, ενώ το 56,3% (9/16) είχαν θετική απάντηση και στα δυο αντιγόνα (Ag1 και Ag2).

Μεταξύ όλων των εμβολιασμένων (με ή χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19), το ιστορικό νόσου COVID-19 δεν ήταν στατιστικά σημαντικό για το αποτέλεσμα του QFN (P -value=0,730).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κυτταρική ανοσολογική απάντηση μετά από την νόσο COVID-19 ή τον εμβολιασμό έναντι του SARS-CoV-2 ενδέχεται να είναι σημαντική για την μακροπρόθεσμη προστασία έναντι της σοβαρής νόσου COVID-19 (Schwarz et al., 2022). Επομένως, είναι σημαντική η μέτρηση της με αξιόπιστες μεθόδους, έτσι ώστε να παρακολουθήσουμε πιο σωστά τη διάρκεια της προστασίας που παρέχουν τα εμβόλια ή/και η νόσος (Schwarz et al., 2022). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε αξιολόγηση της επίκτητης κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης στον SARS-CoV-2 σε ενήλικες (με ή χωρίς ιστορικό λοίμωξης SARS-CoV-2) περίπου 6-11 μήνες μετά τον εμβολιασμό με τρεις δόσεις του BNT162b2 mRNA SARS-CoV-2 εμβολίου και σε ανεμβολίαστα παιδιά και ενήλικες με προηγούμενη λοίμωξη SARS-CoV-2, με τη χρήση της δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2.

Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές μέτρησης κυτταρικής ανοσίας, όπως η κυτταρομετρία ροής και η NGS, η δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 είναι πιο οικονομική, λιγότερο περίπλοκη και απαιτεί ελάχιστο εξοπλισμό (Schwarz et al., 2022). Η δοκιμασία χρησιμοποιεί δύο αντιγόνα (Ag1 και Ag2) τα οποία προέρχονται από την πρωτεΐνη ακίδα του ιού SARS-CoV-2 (Jaganathan et al., 2021). Στην μελέτη αυτή, οι τελικές τιμές τις IFN- γ μετά από διέγερση με το Ag2 κυμαίνονταν σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις τελικές τιμές για το Ag1. Στην πλειοψηφία των θετικών στην δοκιμασία ατόμων, η θετική απάντηση ανιχνεύτηκε στο Ag2. Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με ευρήματα από άλλες μελέτες και συνηγορεί στο ότι τα CD4⁺ και τα CD8⁺ T-Λεμφοκύτταρα συμβάλλουν στην παραγόμενη IFN- γ , μετά από την διέγερση τους με αντιγόνα του ιού (Jaganathan et al., 2021), (Krüttgen et al., 2021), (Costa et al., 2022).

Αναφορικά με την χυμική ανοσία, στο σύνολο των συμμετεχόντων (εμβόλιο ή/και νόσος COVID-19) τα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνη ακίδας συσχετίστηκαν θετικά με την κυτταρική ανοσολογική απάντηση. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που χρησιμοποίησαν την συγκεκριμένη δοκιμασία σε εμβολιασμένους ασθενείς (Bonnet et al., 2022), (Barreiro et al., 2022).

Στην παρούσα μελέτη, όλοι οι ανεμβολίαστοι ασθενείς με λοίμωξη SARS-CoV-2 (παιδιά και ενήλικες) βρέθηκαν αρνητικοί στην δοκιμασία. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, σε μια μικρή πιλοτική μελέτη, τέσσερεις από τους πέντε ανεμβολίαστους συμμετέχοντες με ιστορικό νόσου COVID-19 ήταν αρνητικοί στην δοκιμασία πριν τον εμβολιασμό τους και θετικοποιήθηκαν μετά το εμβόλιο (Martínez-Gallo et al., 2022).

Αντίθετα, σε μια δημοσίευση των Jaganathan και συνεργατών, βρέθηκε ότι τρεις από τους τέσσερεις συμμετέχοντες που ανέρρωσαν από την νόσο COVID-19 ήταν θετικοί με τη δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 (Jaganathan et al., 2021). Επίσης, τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης εργασίας υποστηρίζουν ότι το 69,2% ατόμων με ιστορικό λοίμωξης SARS-CoV-2 (17-59 ημέρες μετά από την θετική PCR) (N=30) ήταν θετικά στην δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 (Lamara Mahammed et al., 2023). Σύμφωνα, όμως με τα ευρήματα μιας άλλης μελέτης, αν και στην οξεία φάση της λοίμωξης η ευαισθησία και η θετικότητα της μεθόδου για την διάγνωση της λοίμωξης SARS-CoV-2 σε ανεμβολίαστους ασθενείς ανήλθε στο 100% (12-21 μέρες), 172-444 ημέρες μετά την νόσο η ευαισθησία μειώθηκε στο 12,5% (Johnson et al., 2023). Επομένως, το χρονικό διάστημα της μέτρησης της κυτταρικής ανοσίας από την λοίμωξη πιθανώς να ερμηνεύει την διαφορά στα ευρήματα των μελετών.

Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι στις τρεις αυτές μελέτες, εκτός από τα Ag1 και Ag2, χρησιμοποιήθηκε ένα επιπλέον αντιγόνο (Ag3) το οποίο περιέχει επίτοπους από την πρωτεΐνη ακίδα και διεγείρει την παραγωγή IFN- γ από τα CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα και από ανοσοκυρίαρχους επίτοπους που κωδικοποιούνται από το υπόλοιπο γονιδίωμα του ιού και διεγείρουν την παραγωγή IFN- γ από τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα (Jaganathan et al., 2021),(Lamara Mahammed et al., 2023),(Johnson et al., 2023). Στις παραπάνω δημοσιεύσεις παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό θετικότητας ήταν μεγαλύτερα στο Ag3 (Jaganathan et al., 2021),(Lamara Mahammed et al., 2023).

Συνεπώς, αν και, λόγω του σχετικά μικρού αριθμού ανεμβολίαστων συμμετεχόντων στις μελέτες, δύσκολα μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την θετικότητα της μεθόδου στους ανεμβολίαστους, μια πιθανή εξήγηση για την διαφορά των αποτελεσμάτων είναι η προσθήκη του Ag3 για την ανίχνευση κυτταρικής ανοσοαπόκρισης στον ιό. Άλλωστε, έχει παρατηρηθεί ότι στους ασθενείς με ήπια νόσο COVID-19 επάγονται CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα ειδικά για δομικές και μη δομικές ιικές πρωτεΐνες (Bertoletti et al., 2022). Αν και περίπου το 25% της κυτταρικής απόκρισης κατά την οξεία φάση της λοίμωξης επάγεται από την πρωτεΐνη ακίδα, η κυτταρική ανοσοαπόκριση επάγεται και από άλλες δομικές (όπως η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη και πρωτεΐνη της μεμβράνης) και μη δομικές πρωτεΐνες (όπως ns3,ns4, ns12, ns13) (Grifoni and Sette, 2022). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί σε ανεμβολίαστα άτομα με νόσο COVID-19, ότι CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα ειδικά για την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη της μεμβράνης είχαν ευρύτερη λειτουργικότητα και παράγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες κυτταροκινών σε σχέση με τα CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα ειδικά για την πρωτεΐνη ακίδα (Lamara Mahammed et al., 2023).

Επιπλέον, οι περισσότερες από τις παραπάνω μελέτες διεξήχθησαν πριν την ανάδυση της παραλλαγής Όμικρον. Κατά τη διενέργεια της παρούσας μελέτης επικρατούσα παραλλαγή ήταν η Όμικρον και οι περισσότεροι ανεμβολίαστοι ασθενείς με ιστορικό νόσου πιθανότατά νόσησαν από την παραλλαγή Όμικρον ή την παραλλαγή Δέλτα.

Η παραλλαγή Όμικρον φέρει στο γονιδίωμα της έναν μεγάλο αριθμό από μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης ακίδας (GeurtsvanKessel et al., 2021). Ωστόσο, οι επίτοποι του ιού που αναγνωρίζονται από τα Τ-λεμφοκυττάρων επηρεάζονται λιγότερο από τις μεταλλάξεις αυτές σε σχέση με τα εξουδετερωτικά αντισώματα (GeurtsvanKessel et al., 2021),(Geers et al., 2022),(Barreiro et al., 2022). Ακόμη και σε αυτήν την περίπτωση, η συγκεκριμένη δοκιμασία χρειάζεται επικύρωση έναντι της παραλλαγής Όμικρον και των υποπαραλλαγών της, καθώς έχει επικυρωθεί μόνο έναντι της παραλλαγής Άλφα (B.1.1.7) (Barreiro et al., 2022).

Τέλος, τα επίπεδα IFN-γ των ανεμβολίαστων ήταν χαμηλότερα από τους εμβολιασμένους, υποδηλώνοντας ότι η παρεχόμενη από το εμβόλιο ανοσία σχετίζεται με μεγαλύτερη κινητοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Ενδεχομένως, να πρέπει να επαναπροσδιοριστεί το όριο θετικότητας για την διάγνωση προηγηθείσας λοίμωξης SARS-CoV-2 χωρίς εμβολιασμό, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς παρήγαγαν έστω και μικρές ποσότητες IFN-γ από τα Τ-λεμφοκύτταρα και όχι μηδενικές, σε απάντηση σε τουλάχιστον ένα από τα δύο αντιγόνα (Ag1 ή Ag2).

Με τη χρήση του QuantiFERON SARS-CoV-2, μόνο το 50% των εμβολιασμένων συμμετεχόντων χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 βρέθηκε θετικό 6-10,5 μήνες μετά τον εμβολιασμό με τρεις δόσεις του mRNA εμβολίου BNT162b2 εμβολίου. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μας, σε πρόσφατη προοπτική μελέτη βρέθηκε ότι ένα σημαντικό ποσοστό των εμβολιασμένων δεν είχε αναπτύξει επαρκή ανοσολογική απάντηση πάνω από το όριο θετικότητας της συγκεκριμένης δοκιμασίας 3 εβδομάδες μετά την τρίτη δόση mRNA εμβολίου BNT162b2 (Busà et al., 2022). Στην συγκεκριμένη μελέτη, η κυτταρική ανοσία μετρήθηκε με το QuantiFERON SARS-CoV-2 και την δοκιμασία ELISpot (Busà et al., 2022).

Σε αντίθεση με τα ευρήματά μας, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μεγαλύτερη θετικότητα της μεθόδου (με δυο δόσεις mRNA εμβολίων) σε εμβολιασμένους ενήλικες χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 σε σχέση με την παρούσα μελέτη (Martínez-Gallo et al., 2022),(Jaganathan et al., 2021),(Kurteva et al., 2022). Η μελέτη των Martínez-Gallo και συνεργατών βρήκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ 86-100%, 13 μέρες μετά την δεύτερη δόση του BNT162b2 mRNA εμβολίου (Martínez-Gallo et al., 2022). Οι μελέτες αυτές διενεργήθηκαν σε μικρότερο χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό (ένα με

δυο μήνες) με δυο δόσεις mRNA εμβολίων. Σε μια πιο πρόσφατη δημοσίευση, το 72.7% (8/11) των εμβολιασμένων συμμετεχόντων ήταν θετικό 6.6-9.4 μήνες μετά τον εμβολιασμό με δυο δόσεις του εμβολίου BNT162b2. Ωστόσο, και σε αυτή την δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε και το Ag3 (Stieber et al., 2023).

Τα αποτελέσματα του QuantiFERON SARS-CoV-2 ήταν θετικά στο 57,1% των ατόμων με υβριδική ανοσία. Στη μελέτη μας, το ποσοστό θετικότητας στα άτομα με υβριδική ανοσία δεν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο συγκριτικά με τους εμβολιασμένους χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19 και δεν υπήρχε χρονική συσχέτιση με τον χρόνο του εμβολιασμού ή τον χρόνο λοίμωξης. Αντίθετα, υψηλότερα επίπεδα IFN- γ σε άτομα με υβριδική ανοσία σε σχέση με εμβολιασμένα άτομα με BNT162b2 mRNA εμβόλιο και με ιστορικό νόσου έχουν παρατηρηθεί σε άλλες μελέτες (Tormo et al., 2022b),(Desmecht et al., 2022). Η διαφορά στο αποτέλεσμα ενδεχομένως να σχετίζεται με τον μικρό αριθμό εμβολιασμένων ατόμων στις δύο ομάδες που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη αλλά και με το ότι είχε παρέλθει μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό στην μελέτη μας,

Εξακολουθεί, να μην είναι σαφές πως η νόσηση με την παραλλαγή Ομικρον εμβολιασμένων επηρεάζει το αποτέλεσμα της δοκιμασίας. Σε πρόσφατη μελέτη των Sørhaas και συνεργατών, η λοίμωξη από τις παραλλαγές Ομικρον και Δέλτα είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη παραπλήσιων επιπέδων IFN- γ υποδηλώνοντας διατήρηση της κυτταρικής ανοσίας μεταξύ των δυο μεταλλάξεων (Sørhaas et al., 2022).

Στην παρούσα μελέτη, σχεδόν στους μισούς εμβολιασμένους ενήλικες (με ή χωρίς ιστορικό νόσου COVID-19) τα επίπεδα της IFN- γ δεν ήταν παραπάνω από το όριο θετικότητας της δοκιμασίας QuantiFERON SARS-CoV-2, περίπου 6-11 μήνες μετά την τρίτη δόση. Όλοι οι εμβολιασμένοι ενήλικες είχαν αναπτύξει επαρκή χυμική ανοσολογική απάντηση στον εμβολιασμό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην εξασθένηση της ανοσιακής απάντησης έναντι του SARS-CoV-2 με την πάροδο του χρόνου από τον εμβολιασμό και να υπογραμμίζει τη σημασία μιας ενισχυτικής δόσης του εμβολίου.

Ένας άλλος πιθανός παθοφυσιολογικός μηχανισμός που μπορεί να επεξηγεί τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι η μετανάστευση των T-λεμφοκυττάρων μνήμης στους ιστούς (Kurteva et al., 2022). Συγκεκριμένα, τα T-λεμφοκύτταρα μετά την συνάντηση τους με τα αντιγόνα του SARS-CoV-2, κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα εκκρίνοντας IFN- γ (Kurteva et al., 2022). Με την πάροδο του χρόνου, τα ειδικά T-λεμφοκύτταρα εδράζονται στους λεμφαδένες και περιοδικά κυκλοφορούν στην περιφέρεια (Kurteva et al., 2022). Υπάρχει, λοιπόν, η πιθανότητα σε απουσία αντιγονικού διεγέρτη, η δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 να μην μπορεί να εντοπίσει αυτά τα T-λεμφοκύτταρα (Kurteva

et al., 2022). Συνεπώς, χρειάζεται επαναξιολόγηση της δοκιμασίας μετά από κάποιο χρονικό διάστημα.

Πράγματι, η συγκεκριμένη δοκιμασία ελέγχει την κυτταρική ανοσία από δείγματα που λαμβάνονται από το περιφερικό αίμα (Poon et al., 2021), (Xu et al., 2023). Η ανοσολογική απάντηση όμως δεν περιορίζεται στο περιφερικό αίμα, αλλά εντοπίζεται και στους ιστούς (Poon et al., 2021). Τα κύτταρα μνήμης διατηρούνται στους προσβεβλημένους ιστούς και στους λεμφαδένες και η ανίχνευση τους είναι αρκετά πιο περίπλοκη (Poon et al., 2021). Ωστόσο, CD4⁺, CD8⁺ T-λεμφοκύτταρα μνήμης και B-λεμφοκύτταρα μνήμης έχουν ανιχνευτεί στον μυελό των οστών, στον σπλήνα, στους πνεύμονες και σε λεμφαδένες σε ανεμβολίαστα άτομα 6 μήνες μετά την λοίμωξη SARS-CoV-2 (Poon et al., 2021). Επιπρόσθετα, στον λεμφικό ιστο του φάρυγγα, σε παιδιά με ιστορικό λοίμωξης SARS-CoV-2, ανιχνεύτηκε ειδική για τους ιστούς επίκτητη ανοσία ή οποία παραμένει μετά την λοίμωξη (Xu et al., 2023).

Μείωση της κυτταρικής ανοσολογικής απάντησης, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2, έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες 6 έως 7 μήνες από τον εμβολιασμό με δυο δόσεις του εμβολίου BN162b2 mRNA (Takeuchi et al., 2022), (Costa et al., 2022), (Uwamino et al., 2022). Σύμφωνα με μια τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης δημοσίευσης, 6 μήνες μετά τον εμβολιασμό, οι κυτταρικές απαντήσεις με την χρήση του QuantiFERON SARS-CoV-2 μειώθηκαν κατά 42% σε 91 συμμετέχοντες και αυξήθηκαν κατά 33% σε 17 άλλους (Bonnet et al., 2022). Σε μια προοπτική μελέτη 419 υγειονομικών, μετά από διάμεσο χρονικό διάστημα 7 μηνών μετά την δεύτερη δόση, το 72,3% των συμμετεχόντων είχαν θετική απάντηση σε τουλάχιστον ένα αντιγόνο (Costa et al., 2022). Στην ίδια μελέτη, αυξημένο χρονικό διάστημα μεταξύ του εμβολίου και του χρόνου μέτρησης συσχετίστηκε με μειωμένη κυτταρική απόκριση όπως αυτή μετρήθηκε με το QuantiFERON SARS-CoV-2 (Costa et al., 2022).

Τέλος, η δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 πιθανότατα είναι λιγότερο ευαίσθητη από άλλες εργαστηριακές μεθόδους προσδιορισμού της T-κυτταρικής ανοσίας. Οι Tormo και συνεργάτες διαπίστωσαν ότι η κυτταρομετρία ροής (FC-ICS) επέδειξε μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το QuantiFERON SARS-CoV-2 σε εμβολιασμένα άτομα με δυο δόσεις του εμβολίου BN162b2 mRNA (Tormo et al., 2022a). Αυτές οι διαφορές μπορούν να αποδοθούν πιθανώς στην διαφορετική φύση των αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν στις δυο ανοσοδιαγνωστικές δοκιμασίες. Ενδεχομένως, τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στην δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 δεν προσδένονται επαρκώς σε όλα τα HLA-I and HLA-II, σε σχέση με τα αντιγόνα που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταρομετρία ροής (Tormo et al., 2022a).

Οι Busà και συνεργάτες παρατήρησαν ότι παρόλο που οι μισοί συμμετέχοντες δεν είχαν ανιχνεύσιμη κυτταρική ανοσία με την χρήση δοκιμασιών απελευθέρωσης IFN- γ , όλοι είχαν κυτταρική ανοσία με τη χρήση της μεθόδου κυτταρομετρίας ροής (AIM), υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν Τ-λεμφοκύτταρα μνήμης (Busà et al., 2022). Για την ερμηνεία της τεχνικής AIM δεν χρειάζεται προηγούμενη γνώση του HLA τύπου, των επιτόπων και των κυτταροκινών (Schwarz et al., 2022). Επίσης, με την μέθοδο AIM καθίσταται δυνατή η ανίχνευση των Tfh (Reiss et al., 2017). Τα Tfh στα βλαστικά κέντρα, παράγουν μικρότερες ποσότητες κυτταροκινών (Dan et al., 2016). Συνεπώς, τα Tfh στα βλαστικά κέντρα είναι ένας υποπληθυσμός Τ-λεμφοκυττάρων που υποεκτιμάται από τις κλασσικές δοκιμασίες έκκρισης κυτταροκινών (π.χ. IGRAs) οι οποίες ανιχνεύουν κυρίως κυτταροκίνες πάνω από ένα ορισμένο όριο προερχόμενες κυρίως από τα Th1(IFN- γ , IL-2) (Reiss et al., 2017),(Dan et al., 2016).

5.2.ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Οι περιορισμοί της μελέτης αυτής είναι ο μικρός αριθμός συμμετεχόντων, κυρίως στους ανεμβολίαστους και η απουσία εμβολιασμένων παιδιών. Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης είναι ότι η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων δεν διαχωρίζει τα IgA, IgG και IgM αντισώματα. Ωστόσο, οι περισσότεροι συμμετέχοντες είχαν εμβολιαστεί πολλούς μήνες πριν την είσοδο τους στη μελέτη, συνεπώς οι μετρήσεις είναι ενδεικτικές για τις IgG ανοσοσφαιρίνες. Επίσης, η μελέτη αυτή δεν διερεύνησε την κινητική των Τ-λεμφοκυττάρων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και δεν έγινε σύγκριση της μεθόδου QuantiFERON SARS-CoV-2 με άλλες μεθόδους προσδιορισμού της κυτταρικής ανοσίας. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη παρέχει αποτελέσματα για την κυτταρική ανοσοαπόκριση 6-11 μήνες μετά την τρίτη δόση του BNT162b2 mRNA εμβολίου. Τα δεδομένα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία με την δοκιμασία το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μετά τον εμβολιασμό με τρεις δόσεις του BNT162b2 mRNA εμβολίου είναι εξαιρετικά περιορισμένα.

5.3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Καταλήγοντας, η δοκιμασία QuantiFERON SARS-CoV-2 δεν εντόπισε ειδική κυτταρική ανοσολογική απάντηση στα άτομα με ιστορικό νόσου COVID-19 που δεν εμβολιάστηκαν για τον ιό SARS-CoV-2 και σε ένα σημαντικό ποσοστό ατόμων που εμβολιάστηκαν με το BNT162b2 mRNA εμβόλιο. Περαιτέρω συγκριτικές μελέτες με διαφορετικές ανοσολογικές δοκιμασίες είναι απαραίτητες για να αποσαφηνιστεί εάν η χαμηλή θετικότητα της δοκιμασίας οφείλεται στην χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου ή στην μείωση της ανοσίας έναντι του ιού με την πάροδο του χρόνου

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ABBAS, K. A., LICHTMAN H. A., PILLAI S. 2019. *Κυτταρική και Μοριακή Ανοσολογία*, Αθήνα, Utopia.
2. ALTAWALAH, H. 2021. Antibody Responses to Natural SARS-CoV-2 Infection or after COVID-19 Vaccination. *Vaccines (Basel)*, 9.
3. AMERATUNGA, R., WOON, S. T., JORDAN, A., LONGHURST, H., LEUNG, E., STEELE, R., LEHNERT, K., SNELL, R. & BROOKS, A. E. S. 2021. Perspective: diagnostic laboratories should urgently develop T cell assays for SARS-CoV-2 infection. *Expert Rev Clin Immunol*, 17, 421-430.
4. BALLESTEROS-SANABRIA, L., PELAEZ-PRESTEL, H. F., RAS-CARMONA, A. & RECHE, P. A. 2022. Resilience of Spike-Specific Immunity Induced by COVID-19 Vaccines against SARS-CoV-2 Variants. *Biomedicines*, 10.
5. BAROUCH, D. H. 2022. Covid-19 Vaccines — Immunity, Variants, Boosters. *New England Journal of Medicine*, 387, 1011-1020.
6. BARREIRO, P., SANZ, J. C., SAN ROMÁN, J., PÉREZ-ABELEDÓ, M., CARRETERO, M., MEGÍAS, G., VIÑUELA-PRIETO, J. M., RAMOS, B., CANORA, J., MARTÍNEZ-PEROMINGO, F. J., BARBA, R., ZAPATERO, A. & CANDEL, F. J. 2022. A Pilot Study for the Evaluation of an Interferon Gamma Release Assay (IGRA) To Measure T-Cell Immune Responses after SARS-CoV-2 Infection or Vaccination in a Unique Cloistered Cohort. *J Clin Microbiol*, 60, e0219921.
7. BARTSCH, Y. C., TONG, X., KANG, J., AVENDAÑO, M. J., SERRANO, E. F., GARCÍA-SALUM, T., PARDO-ROA, C., RIQUELME, A., CAI, Y., RENZI, I., STEWART-JONES, G., CHEN, B., MEDINA, R. A. & ALTER, G. 2022. Omicron variant Spike-specific antibody binding and Fc activity are preserved in recipients of mRNA or inactivated COVID-19 vaccines. *Sci Transl Med*, 14, eabn9243.
8. BERTOLETTI, A., LE BERT, N. & TAN, A. T. 2022. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity*, 55, 1764-1778.
9. BONNET, B., CHABROLLES, H., ARCHIMBAUD, C., BREBION, A., COSME, J., DUTHEIL, F., LAMBERT, C., JUNDA, M., MIRAND, A., OLLIER, A., PEREIRA, B., REGAGNON, C., VIDAL, M., EVRARD, B. & HENQUELL, C. 2022. Decline of Humoral and Cellular Immune Responses Against SARS-CoV-2 6 Months After Full BNT162b2 Vaccination in Hospital Healthcare Workers. *Front Immunol*, 13, 842912.
10. BUSÀ, R., SORRENTINO, M. C., RUSSELLI, G., AMICO, G., MICELI, V., MIELE, M., DI BELLA, M., TIMONERI, F., GALLO, A., ZITO, G., DI CARLO, D., CONALDI, P. G. & BULATI, M. 2022. Specific Anti-SARS-CoV-2 Humoral and Cellular Immune Responses After Booster Dose of BNT162b2 Pfizer-BioNTech mRNA-Based Vaccine: Integrated Study of Adaptive Immune System Components. *Frontiers in Immunology*, 13.
11. CEN, X., WANG, F., HUANG, X., JOVIC, D., DUBEE, F., YANG, H. & LI, Y. 2023. Towards precision medicine: Omics approach for COVID-19. *Biosaf Health*.
12. CHENCHULA, S., AMERNENI, K. C., GHANTA, M. K., PADMAVATHI, R., CHANDRA, M. B., ADUSUMILLI, M. B., CHAVAN, M., MUDDA, S., GUPTA, R. & LAKHAWAT, B. 2023. Clinical virology and effect of Covid-19 vaccination and monoclonal antibodies against highly infectious SARS- CoV-2 omicron sub variant BF.7 (BA.5.2.1.7): A systematic review. *Virology*, 584, 38-43.

13. CHOTEAU, M., SCOHY, A., MESSE, S., LUYCKX, M., DECHAMPS, M., MONTIEL, V., YOMBI, J. C., GRUSON, D., LIMAYE, N., MICHIELS, T. & DUMOUTIER, L. 2022. Development of SARS-CoV2 humoral response including neutralizing antibodies is not sufficient to protect patients against fatal infection. *Sci Rep*, 12, 2077.
14. CHOU, J., THOMAS, P. G. & RANDOLPH, A. G. 2022. Immunology of SARS-CoV-2 infection in children. *Nature Immunology*, 23, 177-185.
15. COCHERIE, T., ZAFILAZA, K., LEDUCQ, V., MAROT, S., CALVEZ, V., MARCELIN, A. G. & TODESCO, E. 2022. Epidemiology and Characteristics of SARS-CoV-2 Variants of Concern: The Impacts of the Spike Mutations. *Microorganisms*, 11.
16. COSTA, C., SCOZZARI, G., MIGLIORE, E., GALASSI, C., CICCONE, G., RICCIARDELLI, G., SCARMOZZINO, A., ANGELONE, L., CASSONI, P. & CAVALLO, R. 2022. Cellular Immune Response to BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in a Large Cohort of Healthcare Workers in a Tertiary Care University Hospital. *Vaccines*, 10.
17. DAN, J. M., LINDESTAM ARLEHAMN, C. S., WEISKOPF, D., DA SILVA ANTUNES, R., HAVENAR-DAUGHTON, C., REISS, S. M., BRIGGER, M., BOTHWELL, M., SETTE, A. & CROTTY, S. 2016. A Cytokine-Independent Approach To Identify Antigen-Specific Human Germinal Center T Follicular Helper Cells and Rare Antigen-Specific CD4+ T Cells in Blood. *J Immunol*, 197, 983-93.
18. DESMECHT, S., TASHKEEV, A., EL MOUSSAOUI, M., MARECHAL, N., PERÉE, H., TOKUNAGA, Y., FOMBELLIDA-LOPEZ, C., POLESE, B., LEGRAND, C., WÉRY, M., MNI, M., FOUILLIEN, N., TOUSSAINT, F., GILLET, L., BUREAU, F., LUTTERI, L., HAYETTE, M. P., MOUTSCHEN, M., MEURIS, C., VERMEERSCH, P., DESMECHT, D., RAHMOUNI, S. & DARCIS, G. 2022. Kinetics and Persistence of the Cellular and Humoral Immune Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine in SARS-CoV-2-Naive and -Experienced Subjects: Impact of Booster Dose and Breakthrough Infections. *Front Immunol*, 13, 863554.
19. DIAMOND, M. S. & KANNEGANTI, T.-D. 2022. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, 23, 165-176.
20. DIGHE, H., SARKALE, P., PATIL, D. Y., MOHANDAS, S., SHETE, A. M., SAHAY, R. R., LAKRA, R., PATIL, S., MAJUMDAR, T., GAWANDE, P., YEMUL, J., VEDPATHAK, P. & YADAV, P. D. 2022. Differential Cell Line Susceptibility to the SARS-CoV-2 Omicron BA.1.1 Variant of Concern. *Vaccines (Basel)*, 10.
21. DOWELL, A. C., BUTLER, M. S., JINKS, E., TUT, G., LANCASTER, T., SYLLA, P., BEGUM, J., BRUTON, R., PEARCE, H., VERMA, K., LOGAN, N., TYSON, G., SPALKOVA, E., MARGIELEWSKA-DAVIES, S., TAYLOR, G. S., SYRIMI, E., BAAWUAH, F., BECKMANN, J., OKIKE, I. O., AHMAD, S., GARSTANG, J., BRENT, A. J., BRENT, B., IRELAND, G., AIANO, F., AMIN-CHOWDHURY, Z., JONES, S., BORROW, R., LINLEY, E., WRIGHT, J., AZAD, R., WAIBLINGER, D., DAVIS, C., THOMSON, E. C., PALMARINI, M., WILLETT, B. J., BARCLAY, W. S., POH, J., AMIRTHALINGAM, G., BROWN, K. E., RAMSAY, M. E., ZUO, J., MOSS, P. & LADHANI, S. 2022. Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology*, 23, 40-49.
22. EZZIKOURI, S., NOURLIL, J., BENJELLOUN, S., KOHARA, M. & TSUKIYAMA-KOHARA, K. 2020. Coronavirus disease 2019—Historical context, virology,

- pathogenesis, immunotherapy, and vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16, 2992-3000.
23. GEERS, D., SABLEROLLES, R. S. G., VAN BAARLE, D., KOOTSTRA, N. A., RIETDIJK, W. J. R., SCHMITZ, K. S., BOGERS, S., GOMMERS, L., NIEUWKOOP, N. J., VAN DIJK, L. L. A., VAN HAREN, E., LAFEBER, M., DALM, V. A. S. H., GOORHUIS, A., POSTMA, D. F., VISSER, L. G., HUCKRIEDE, A. L. W., SETTE, A., GRIFONI, A., DE SWART, R. L., KOOPMANS, M. P. G., VAN DER KUY, P. H. M., GEURTSVANKESSEL, C. H. & DE VRIES, R. D. 2022. Ad26.COV2.S priming provides a solid immunological base for mRNA-based COVID-19 booster vaccination. *medRxiv*, 2022.07.15.22277639.
 24. GEURTSVANKESSEL, C. H., GEERS, D., SCHMITZ, K. S., MYKYTYN, A. Z., LAMERS, M. M., BOGERS, S., GOMMERS, L., SABLEROLLES, R. S. G., NIEUWKOOP, N. N., RIJSBERGEN, L. C., VAN DIJK, L. L. A., DE WILDE, J., ALBLAS, K., BREUGEM, T. I., RIJNDERS, B. J. A., DE JAGER, H., WEISKOPF, D., VAN DER KUY, P. H. M., SETTE, A., KOOPMANS, M. P. G., GRIFONI, A., HAAGMANS, B. L. & DE VRIES, R. D. 2021. Divergent SARS CoV-2 Omicron-specific T- and B-cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *medRxiv*, 2021.12.27.21268416.
 25. GREENWOOD, D., SLACK, R., PEUTHERER, J., BARER, M. 2010. *Ιατρική Μικροβιολογία*, Αθήνα, Εκδόσεις Πασχαλίδης.
 26. GRIFONI, A. & SETTE, A. 2022. From Alpha to omicron: The response of T cells. *Curr Res Immunol*, 3, 146-150.
 27. HERMANSEN, T. S., THOMSEN, V., LILLEBAEK, T. & RAVN, P. 2014. Non-tuberculous mycobacteria and the performance of interferon gamma release assays in Denmark. *PLoS One*, 9, e93986.
 28. HISKEY, L., MADIGAN, T., RISTAGNO, E. H., RAZONABLE, R. R. & FERDJALLAH, A. 2022. Prevention and management of human cytomegalovirus in pediatric HSCT recipients: A review. *Front Pediatr*, 10, 1039938.
 29. HUANG, Y., YANG, C., XU, X.-F., XU, W. & LIU, S.-W. 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41, 1141-1149.
 30. JAGANATHAN, S., STIEBER, F., RAO, S. N., NIKOLAYEVSKYY, V., MANISSERO, D., ALLEN, N., BOYLE, J. & HOWARD, J. 2021. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIAreac Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. *Infect Dis Ther*, 10, 2765-2776.
 31. JIN, Y., HOU, C., LI, Y., ZHENG, K. & WANG, C. 2021. mRNA Vaccine: How to Meet the Challenge of SARS-CoV-2. *Front Immunol*, 12, 821538.
 32. JOHNSON, S. A., PHILLIPS, E., ADELE, S., LONGET, S., MALONE, T., MASON, C., STAFFORD, L., JAMSEN, A., GARDINER, S., DEEKS, A., NEO, J., BLURTON, E. J., WHITE, J., ALI, M., KRONSTEINER, B., WILSON, J. D., SKELLY, D. T., JEFFERY, K., CONLON, C. P., GOULDER, P., CARROLL, M., BARNES, E., KLENERMAN, P. & DUNACHIE, S. J. 2023. Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 interferon- γ release assay following SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Clin Exp Immunol*.
 33. KIM, S. H. 2020. Interferon- γ Release Assay for Cytomegalovirus (IGRA-CMV) for Risk Stratification of Posttransplant CMV Infection: Is It Time to Apply IGRA-CMV in Routine Clinical Practice? *Clin Infect Dis*, 71, 2386-2388.

34. KOTAKI, R., MORIYAMA, S. & TAKAHASHI, Y. 2023. Humoral immunity for durable control of SARS-CoV-2 and its variants. *Inflamm Regen*, 43, 4.
35. KRÜTTGEN, A., KLINGEL, H., HAASE, G., HAEFNER, H., IMÖHL, M. & KLEINES, M. 2021. Evaluation of the QuantiFERON SARS-CoV-2 interferon- γ release assay in mRNA-1273 vaccinated health care workers. *J Virol Methods*, 298, 114295.
36. KURTEVA, E., VASILEV, G., TUMANGELOVA-YUZEIR, K., IVANOVA, I., IVANOVA-TODOROVA, E., VELIKOVA, T. & KYURKCHIEV, D. 2022. Interferon-gamma release assays outcomes in healthy subjects following BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. *Rheumatol Int*, 42, 449-456.
37. LAMARA MAHAMMED, L., BENSALD, K., AIT-SEDDIK, S., LARINOUNA, A., BRAHIMI, G., BELKAID, R., HAMZAOU, O., ROUAKI, S. M., IDDER, C., ALLAM, I. & DJIDJIK, R. 2023. Improved Performance of the QuantiFERON-SARS-CoV-2 Assay with the Extended Set. *Viruses*, 15.
38. MARTÍNEZ-GALLO, M., ESPERALBA, J., PUJOL-BORRELL, R., SANDÁ, V., ARRESE-MUÑOZ, I., FERNÁNDEZ-NAVAL, C., ANTÓN, A., CARDONA, V., LABRADOR-HORRILLO, M., PUMAROLA, T. & HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. 2022. Commercialized kits to assess T-cell responses against SARS-CoV-2 S peptides. A pilot study in health care workers. *Med Clin (Engl Ed)*, 159, 116-123.
39. MERAD, M., BLISH, C. A., SALLUSTO, F. & IWASAKI, A. 2022. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, 375, 1122-1127.
40. MOSS, P. 2022. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat Immunol*, 23, 186-193.
41. NIESSL, J., SEKINE, T. & BUGGERT, M. 2021. T cell immunity to SARS-CoV-2. *Semin Immunol*, 55, 101505.
42. NIKOLOPOULOU, G. B. & MALTEZOU, H. C. 2022. COVID-19 in Children: Where do we Stand? *Arch Med Res*, 53, 1-8.
43. ORTIZ-PRADO, E., SIMBAÑA-RIVERA, K., GÓMEZ-BARRENO, L., RUBIO-NEIRA, M., GUAMAN, L. P., KYRIAKIDIS, N. C., MUSLIN, C., JARAMILLO, A. M. G., BARBA-OSTRIA, C., CEVALLOS-ROBALINO, D., SANCHEZ-SANMIGUEL, H., UNIGARRO, L., ZALAKEVICIUTE, R., GADIAN, N. & LÓPEZ-CORTÉS, A. 2020. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 98, 115094.
44. PALM, A. E. & HENRY, C. 2019. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. *Front Immunol*, 10, 1787.
45. PEÑA RODRÍGUEZ, M., HERNÁNDEZ BELLO, J., VEGA MAGAÑA, N., VIERA SEGURA, O., GARCÍA CHAGOLLÁN, M., CEJA GÁLVEZ, H. R., MORA MORA, J. C., RENTERÍA FLORES, F. I., GARCÍA GONZÁLEZ, O. P. & MUÑOZ VALLE, J. F. 2023. Prevalence of symptoms, comorbidities, and reinfections in individuals infected with Wild-Type SARS-CoV-2, Delta, or Omicron variants: a comparative study in western Mexico. *Front Public Health*, 11, 1149795.
46. POON, M. M. L., RYBKINA, K., KATO, Y., KUBOTA, M., MATSUMOTO, R., BLOOM, N. I., ZHANG, Z., HASTIE, K. M., GRIFONI, A., WEISKOPF, D., WELLS, S. B., URAL, B. B., LAM, N., SZABO, P. A., DOGRA, P., LEE, Y. S., GRAY, J. I., BRADLEY, M. C., BRUSKO, M. A., BRUSKO, T. M., SAPHIRE, E. O., CONNORS, T. J., SETTE, A., CROTTY, S. & FARBER, D. L. 2021. SARS-CoV-2 infection

- generates tissue-localized immunological memory in humans. *Science Immunology*, 6.
47. QI, H., LIU, B., WANG, X. & ZHANG, L. 2022. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol*, 23, 1008-1020.
48. RAHMAN, S., MONTERO, M. T. V., ROWE, K., KIRTON, R. & KUNIK, F., JR. 2021. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 14, 601-621.
49. REISS, S., BAXTER, A. E., CIRELLI, K. M., DAN, J. M., MOROU, A., DAIGNEAULT, A., BRASSARD, N., SILVESTRI, G., ROUTHY, J.-P., HAVENAR-DAUGHTON, C., CROTTY, S. & KAUFMANN, D. E. 2017. Comparative analysis of activation induced marker (AIM) assays for sensitive identification of antigen-specific CD4 T cells. *PLOS ONE*, 12, e0186998.
50. SCHWARZ, M., MZOUGH, S., LOZANO-OJALVO, D., TAN, A. T., BERTOLETTI, A. & GUCCIONE, E. 2022. T cell immunity is key to the pandemic endgame: How to measure and monitor it. *Curr Res Immunol*, 3, 215-221.
51. SETTE, A. & CROTTY, S. 2021. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184, 861-880.
52. SETTE, A., SIDNEY, J. & CROTTY, S. 2023. T Cell Responses to SARS-CoV-2. *Annual Review of Immunology*, 41, 343-373.
53. SHEN, J., FAN, J., ZHAO, Y., JIANG, D., NIU, Z., ZHANG, Z. & CAO, G. 2023. Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors. *Front Immunol*, 14, 1159326.
54. SILVA, M. J. A., RIBEIRO, L. R., LIMA, K. V. B. & LIMA, L. 2022. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: A systematic review. *Front Immunol*, 13, 1001198.
55. SØRAAS, A., GRØDELAND, G., GRANERUD, B. K., UELAND, T., LIND, A., FEVANG, B., MURPHY, S., HUSE, C., NYGAARD, A. B., STEFFENSEN, A. K., ALBALDAWI, H., HOLBERG-PETERSEN, M., ANDRESEN, L. L., ÅGNES, C., RANHEIM, T., SCHANKE, Y., ISTRE, M., DAHL, J. A., CHOPRA, A., DUDMAN, S., KAARBØ, M., ANDERSEN, J. T., VAAGE, E. B., TRAN, T. T., VAAGE, J. T., MICHELSEN, A. E., MÜLLER, F., AUKRUST, P., HALVORSEN, B., BØRRESDATTER DAHL, T., HOLTER, J. C. & LUND-JOHANSEN, F. 2022. Breakthrough infections with the omicron and delta variants of SARS-CoV-2 result in similar re-activation of vaccine-induced immunity. *medRxiv*, 2022.01.27.22269895.
56. STIEBER, F., ALLEN, N., CARPENTER, K., HU, P., ALAGNA, R., RAO, S., MANISSERO, D., HOWARD, J. & NIKOLAYEVSKYY, V. 2023. Durability of COVID-19 vaccine induced T-cell mediated immune responses measured using the QuantiFERON SARS-CoV-2 assay. *Pulmonology*, 29, 151-153.
57. TAKEUCHI, J. S., FUKUNAGA, A., YAMAMOTO, S., TANAKA, A., MATSUDA, K., KIMURA, M., KAMIKAWA, A., KITO, Y., MAEDA, K., UEDA, G., MIZOUE, T., UJIE, M., MITSUYA, H., OHMAGARI, N. & SUGIURA, W. 2022. SARS-CoV-2 specific T cell and humoral immune responses upon vaccination with BNT162b2: A 9 months longitudinal study. *medRxiv*, 2021.11.06.21265632.
58. TORMO, N., GIMÉNEZ, E., MARTÍNEZ-NAVARRO, M., ALBERT, E., NAVALPOTRO, D., TORRES, I., GIMENO, C. & NAVARRO, D. 2022a. Performance comparison of a flow cytometry immunoassay for intracellular cytokine staining and the QuantiFERON® SARS-CoV-2 test for detection and quantification

- of SARS-CoV-2-Spike-reactive-IFN- γ -producing T cells after COVID-19 vaccination. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 41, 657-662.
59. TORMO, N., NAVALPOTRO, D., MARTÍNEZ-SERRANO, M., MORENO, M., GROSSON, F., TUR, I., GUNA, M. R., SORIANO, P., TORNERO, A. & GIMENO, C. 2022b. Commercial Interferon-gamma release assay to assess the immune response to first and second doses of mRNA vaccine in previously COVID-19 infected versus uninfected individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 102, 115573.
60. UWAMINO, Y., KURAFUJI, T., TAKATO, K., SAKAI, A., TANABE, A., NOGUCHI, M., YATABE, Y., ARAI, T., OHNO, A., TOMITA, Y., SHIBATA, A., YOKOTA, H., YAMASAWA, W., NAMKOONG, H., SATO, Y., HASEGAWA, N., WAKUI, M. & MURATA, M. 2022. Dynamics of antibody responses, cellular immunity, and breakthrough infections among Japanese healthcare workers during the 6 months after receiving two doses of BNT162b2 mRNA vaccine. *medRxiv*, 2022.01.29.22270052.
61. VALLE-ARROYO, J., AGUADO, R., PÁEZ-VEGA, A., PÉREZ, A. B., GONZÁLEZ, R., FORNÉS, G., TORRE-CISNEROS, J. & CANTISÁN, S. 2020. Lack of cytomegalovirus (CMV)-specific cell-mediated immune response using QuantiFERON-CMV assay in CMV-seropositive healthy volunteers: fact not artifact. *Sci Rep*, 10, 7194.
62. VAN LEEUWEN, L. P. M., GEURTSVANKESSEL, C. H., ELLERBROEK, P. M., DE BREE, G. J., POTJEWIJD, J., RUTGERS, A., JOLINK, H., VAN DE VEERDONK, F., VAN GORP, E. C. M., DE WILT, F., BOGERS, S., GOMMERS, L., GEERS, D., BRUNS, A. H. W., LEAVIS, H. L., VAN HAGA, J. W., LEMKES, B. A., VAN DER VEEN, A., DE KRUIJF-BAZEN, S. F. J., VAN PAASSEN, P., DE LEEUW, K., VAN DE VEN, A. A. J. M., VERBEEK-MENKEN, P. H., VAN WENGEN, A., AREND, S. M., RUTEN-BUDDE, A. J., VAN DER ENT, M. W., VAN HAGEN, P. M., SANDERS, R. W., GROBBEN, M., VAN DER STRATEN, K., BURGER, J. A., PONIMAN, M., NIERKENS, S., VAN GILS, M. J., DE VRIES, R. D. & DALM, V. A. S. H. 2022. Immunogenicity of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine in adult patients with inborn errors of immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 149, 1949-1957.
63. VARDHANA, S., BALDO, L., MORICE, W. G., 2ND & WHERRY, E. J. 2022. Understanding T cell responses to COVID-19 is essential for informing public health strategies. *Sci Immunol*, 7, eabo1303.
64. VERBEKE, R., HOGAN, M. J., LORÉ, K. & PARDI, N. 2022. Innate immune mechanisms of mRNA vaccines. *Immunity*, 55, 1993-2005.
65. VOUGOGIANNOPOULOU, K., CORONA, A., TRAMONTANO, E., ALEXIS, M. N. & SKALTSOUNIS, A. L. 2021. Natural and Nature-Derived Products Targeting Human Coronaviruses. *Molecules*, 26.
66. WASEEM, M., SHARIFF, M. A., TAY, E. T., MORTEL, D., SAVADKAR, S., LEE, H., KONDAMUDI, N. & LIANG, T. 2022. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *J Emerg Med*, 62, 28-37.
67. WEN, A., LENG, E. L., LIU, S. M., ZHOU, Y. L., CAO, W. F., YAO, D. Y. & HU, F. 2022. Diagnostic Accuracy of Interferon-Gamma Release Assays for Tuberculous Meningitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 788692.
68. WHERRY, E. J. & BAROUCH, D. H. 2022. T cell immunity to COVID-19 vaccines. *Science*, 377, 821-822.

69. WIKELL, A., JONSSON, J., DYRDAK, R., HENNINGSSON, A. J., ERINGFÄLT, A., KJERSTADIUS, T., HÅLLDIN, E., BAQIR, H., KHOLOD, V., STUREGÅRD, E., BRUCHFELD, J. & SCHÖN, T. 2021. The Impact of Borderline Quantiferon-TB Gold Plus Results for Latent Tuberculosis Screening under Routine Conditions in a Low-Endemicity Setting. *J Clin Microbiol*, 59, e0137021.
70. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2023a. *Greece: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data* [Online]. Available: <https://covid19.who.int/region/euro/country/gr> [Accessed June 25 2023].
71. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2023b. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data* [Online]. Available: <https://covid19.who.int/> [Accessed June 25 2023].
72. XU, Q., MILANEZ-ALMEIDA, P., MARTINS, A. J., RADTKE, A. J., HOEHN, K. B., OGUZ, C., CHEN, J., LIU, C., TANG, J., GRUBBS, G., STEIN, S., RAMELLI, S., KABAT, J., BEHZADPOUR, H., KARKANITSA, M., SPATHIES, J., KALISH, H., KARDAVA, L., KIRBY, M., CHEUNG, F., PREITE, S., DUNCKER, P. C., KITAKULE, M. M., ROMERO, N., PRECIADO, D., GITMAN, L., KOROLEVA, G., SMITH, G., SHAFFER, A., MCBAIN, I. T., MCGUIRE, P. J., PITTALUGA, S., GERMAIN, R. N., APPS, R., SCHWARTZ, D. M., SADTLER, K., MOIR, S., CHERTOW, D. S., KLEINSTEIN, S. H., KHURANA, S., TSANG, J. S., MUDD, P., SCHWARTZBERG, P. L. & MANTHIRAM, K. 2023. Adaptive immune responses to SARS-CoV-2 persist in the pharyngeal lymphoid tissue of children. *Nature Immunology*, 24, 186-199.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

(Ιστορικό Σημείωμα-έντυπο Συγκατάθεσης)

Έλεγχος Τ-Κυτταρικής Ανοσίας για τη λοίμωξη COVID-19 σε άτομα που εμβολιάστηκαν ή και νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2

ΠΜΣ "Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική: Κλινική Πράξη και Έρευνα"

ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΠΑΙΔΩΝ « Η ΑΓΙΑ ΣΟΦΙΑ»
Α' ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ - ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Χ.ΚΑΝΑΚΑ-GANTENBEIN

ΧΩΡΕΜΕΙΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
ΤΗΛ: 210 7467478

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ SARS-CoV-2

Κλινική: Τηλέφωνο: Παραπέμπων Ιατρός:.....

Ατομικό Ιστορικό

Ημερομηνία Αιμοληψίας:

Στοιχεία επικοινωνίας οικογένειας (τηλέφωνο/email):.....

Όνοματεπώνυμο ασθενούς:..... Φύλο:.....

Ημερ. Γέννησης: Εθνικότητα:

Βάρος (Kg):..... Ύψος (cm):.....

Υποκείμενα νοσήματα:.....

Μετάγγιση: Ναι Όχι

Απία εισόδου:.....

.....

Αγωγή:.....

.....

Ιστορικό για COVID-19

Υπήρξε θετικός ο ασθενής για SARS-CoV-2; Ναι Όχι

(Ημερομηνία):.....

Επαφή με επιβεβαιωμένο κρούσμα: Ναι Όχι

Ημερομηνία έναρξης συμπτωμάτων:

Συμπτώματα:

Βήχας Δύσπνοια Καταρροή Θερμοκρασία°C Κόπωση Ανοσμία

Αγευσία Κεφαλαλγία Φαρυγγαλγία Διάρροια Ασυμπτωματικός

Άλλο σύμπτωμα:.....

Έλεγχος Τ-Κυτταρικής Ανοσίας για τη λοίμωξη COVID-19 σε άτομα που εμβολιάστηκαν ή και νόσησαν από τον ιό SARS-CoV-2

ΠΜΣ "Γενική και Εξειδικευμένη Παιδιατρική: Κλινική Πράξη και Έρευνα"

Κλινική Εξέταση/ Απεικονιστικός Έλεγχος:.....

Εμβολιασμός για τη νόσο COVID-19: Ναι Όχι

Ημερ/νία..... Εμβόλιο.....

Εργαστηριακός Έλεγχος

WBC: PMNs: Λεμφοκύτταρα:..... PLTs:.....

CRP: PCT: D-dimers:..... NT-proBNP:.....

Τροπονίνη:..... LDL:..... Τριγλυκερίδια: Σάκχαρο:.....

Λοιπά ευρήματα:

Απεικονιστικά ευρήματα:.....

Οικογενειακό Ιστορικό

Όνοματεπώνυμο:.....(Μητέρα)

.....(Πατέρας)

..... (Αδελφός/ή)

Μοριακός έλεγχος μελών (Αποτέλεσμα-Ημερ.):.....

Συμπτώματα μελών:

.....
.....
.....
.....

Έχω ενημερωθεί για την μελέτη και επιθυμώ να ελεγχθώ εγώ και τα παιδιά μου

.....
(Υπογραφή και ονοματεπώνυμο γονέα)

Σημείωση: Στα πλαίσια διεξαγωγής της μελέτης τηρούνται τα πρωτόκολλα προστασίας προσωπικών δεδομένων