

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Olivera G. Lijeskić

**PRAĆENJE KINETIKE HUMORALNOG  
IMUNSKOG ODGOVORA NAKON INFEKCIJE  
SARS-CoV-2 VIRUSOM I AKTIVNE  
IMUNIZACIJE PROTIV KOVID-19 RAZLIČITIM  
VAKCINAMA DOSTUPNIM U SRBIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Olivera G. Lijeskić

**MONITORING THE KINETICS OF THE  
HUMORAL IMMUNE RESPONSE FOLLOWING  
SARS-CoV-2 INFECTION AND ACTIVE  
IMMUNIZATION AGAINST COVID-19 WITH  
DIFFERENT VACCINES AVAILABLE IN SERBIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

**Mentor 1:**

*Dr Tijana Štajner*, viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

**Mentor 2:**

*Prof. dr Miloš Marković*, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

*Prof. dr Aleksandra Knežević*, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

*Prof. dr Emina Milošević*, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

*Prof. dr Mioljub Ristić*, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**Datum odbrane doktorske disertacije:** \_\_\_\_\_

Zahvaljujem se koautorima radova koji su proistekli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije jer su učestvovali u:

1. Kreiranju koncepta: *dr Tijana Štajner, dr Olgica Đurković-Đaković*
2. Formalnoj analizi: *dr Tijana Štajner, prof. dr Miloš Marković, dr Ivana Klun*
3. Istraživanju: *dr Jelena Srbljanović, dr Neda Bauman, Đorđe Zlatković, Marija Stamenov Đaković*
4. Pripremi softvera: *dr Nenad Gligorić*
5. Metodologiji: *dr Tijana Štajner, dr Olgica Đurković-Đaković, dr Ivana Klun*
6. Superviziji: *dr Tijana Štajner, dr Olgica Đurković-Đaković*
7. Resursima: *dr Tijana Štajner, dr Branko Bobić, dr Olgica Đurković-Đaković*
8. Upravljanju projektom: *dr Olgica Đurković-Đaković*
9. Obezbeđivanju finansiranja: *dr Tijana Štajner, dr Branko Bobić, dr Olgica Đurković-Đaković*
10. Pisanju - originalni nacrt: *dr Olgica Đurković-Đaković*
11. Pisanju - recenzija i uređivanje: *dr Tijana Štajner, prof. dr Miloš Marković, dr Olgica Đurković-Đaković, dr Branko Bobić, dr Ivana Klun, dr Jelena Srbljanović, dr Neda Bauman, Đorđe Zlatković, Marija Stamenov Đaković, dr Nenad Gligorić*

Doktorska disertacija je u celosti urađena u okviru Grupe za mikrobiologiju sa parazitologijom, Centra izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima, Instituta za medicinska istraživanja (IMI), Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom sprovedeno je uz pomoć institucionalnog finansiranja naučnoistraživačkih aktivnosti IMI od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije za 2020. (br. 451-03-68/2020-14/200015), 2021. (br. 451-03-9/2021-14/200015), 2022. (br. 451-03-68/2022-14/200015), 2023. (br. 451-03-47/2023-01/200015), 2024. (br. 451-03-66/2024-03/200015) i 2025. (br. 451-03-136/2025-03/200015) godinu.

*"Virus, Virus, shining bright,  
In the phosphotungstic night,  
What immortal hand or eye,  
Dare frame thy fivefold symmetry."*

(With apologies to William Blake [1757-1827])

**June Almeida,**  
*A classification of virus particles based on morphology,*  
Can Med Assoc J. 1963; 89(16):787-98.

## *Sažetak*

### **Praćenje kinetike humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom i aktivne imunizacije protiv kovid-19 različitim vakcinama dostupnim u Srbiji**

Praćenje humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom i vakcinacije protiv kovid-19 od velike je važnosti za procenu trenutka slabljenja zaštite imunskog odgovora i potencijalnog prilagođavanja vakcinalnih strategija. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili longitudinalno praćenje nivoa antitela nakon infekcije SARS-CoV-2 i nakon vakcinacije različitim vakcinama dostupnim u Srbiji (BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, BNT162b2, mRNA-1273). Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna kohortna studija praćenja nivoa ukupnih i neutrališućih antitela u više vremenskih tačaka.

Nakon infekcije detektovan je značajan pad nivoa antitela tokom 12 meseci praćenja. Iako inicijalno viši, nivoi antitela opadali su brže kod ispitanika sa težom kliničkom slikom. Na nivoe antitela nakon dve doze vakcine, značajno su uticali postojanje prethodne infekcije i tip vakcinalne platforme. BNT162b2 vakcina indukovala je najviši humoralni imunski odgovor, dok je BBIBP-CorV pokazala slabiju imunogenost, čak i kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. Takođe, jedino je BBIBP-CorV vakcina indukovala niže nivoe antitela u odnosu na rekonvalescente. U okviru istraživanja predstavljeno je 11 različitih kombinacija primarne serije i treće doze vakcine. Tako je uočeno da je heterologna BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacija indukovala više nivoe antitela u odnosu na homologne pristupe i kod starije populacije, omogućivši prevazilaženje slabije imunogenosti BBIBP-CorV primarne serije. Uprkos inicijalnom dobrom odgovoru na treću dozu, kod svih kombinacija uočen je pad nivoa antitela tokom šestomesečnog praćenja.

Imajući u vidu rezultate, značaj ovakvog istraživanja ogleda se u doprinosu razumevanja humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije, vakcinacije i hibridnog imuniteta, tokom različitih faza najznačajnije pandemije savremenog doba.

**Ključne reči:** SARS-CoV-2, kovid-19, BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, BNT162b2, vakcinacija, humoralni imunski odgovor

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Mikrobi i infekcija

**UDK broj:**

## *Abstract*

### **Monitoring the kinetics of the humoral immune response following SARS-CoV-2 infection and active immunization against covid-19 with different vaccines available in Serbia**

Monitoring the humoral immune response after SARS-CoV-2 infection and vaccination against covid-19 is of great importance in assessing the timing of waning immune protection and potential adaptation of vaccination strategies. Therefore, the aims of this research were longitudinal monitoring of antibody levels after SARS-CoV-2 infection and after vaccination with different vaccines available in Serbia (BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, BNT162b2, mRNA-1273). The research was conducted as a prospective cohort study monitoring the levels of total and neutralizing antibodies at multiple time points.

After infection, significant waning of antibody levels was detected during the 12-month follow-up. Although initially higher, antibody levels declined faster in subjects with a more severe clinical presentation. The existence of a previous infection and the type of vaccine significantly affected the antibody levels after two doses of vaccine. BNT162b2 induced the highest humoral immune response, while BBIBP-CorV showed lower immunogenicity, even in subjects with previous infection. Furthermore, only BBIBP-CorV vaccine induced lower antibody levels compared to convalescents. Within the scope of this study, 11 different combinations of the primary series and the third dose of the vaccine were presented. Thus, it was observed that the heterologous BBIBP-CorV/BNT162b2 combination induced higher levels of antibodies compared to homologous approaches and showed an advantage even in the elderly population, indicating the ability to overcome the weaker immunogenicity of the BBIBP-CorV primary series. Despite an initial good response to the third dose, a decline in antibody levels was observed after all booster combinations by six months of follow-up.

Results obtained during this research contribute to the understanding of the humoral immune response following infection, vaccination, and hybrid immunity across different phases of the pandemic.

**Key words:** SARS-CoV-2, covid-19, BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, BNT162b2, vaccination, humoral immune response

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfields:** Microbes and infection

**UDC number:**

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Klasifikacija koronavirusa.....	3
1.2. Istorijat humanih koronavirusa.....	3
1.3. Struktura viriona i genom SARS-CoV-2.....	5
1.4. Ulazak SARS-CoV-2 u ćelije domaćina.....	6
1.5. Kliničke manifestacije kovid-19.....	7
1.6. Imunski odgovor domaćina na SARS-CoV-2 infekciju.....	7
1.7. Vakcine protiv kovid-19.....	10
1.7.1. BBIBP-CorV vakcina.....	11
1.7.2. Gam-COVID-Vac vakcina.....	12
1.7.3. ChAdOx1 vakcina.....	13
1.7.4. BNT162b2 vakcina.....	14
1.8. Evolucija SARS-CoV-2.....	14
1.9. Imunski odgovor na različite varijante SARS-CoV-2 nakon vakcinacije.....	16
1.10. Treća doza vakcine i novi pristupi prevenciji.....	17
1.11. Testovi za detekciju i praćenje humoralnog imunskog odgovora.....	18
2. CILJEVI RADA.....	20
3. MATERIJAL I METODE.....	22
3.1. Tip studije.....	23
3.2. Mesto i period praćenja ispitanika.....	23
3.3. Selekcija ispitanika i osnovne grupe.....	23
3.4. Uzorkovanje materijala.....	24
3.5. Određivanje ukupnih IgG antitela specifičnih za RBD domen.....	25
3.6. Određivanje ukupnih IgM antitela specifičnih za RBD domen.....	27
3.7. Određivanje ukupnih IgG antitela specifičnih za N protein.....	27
3.8. Određivanje neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen.....	29
3.9. Statistička analiza.....	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Grupa nevakcinisanih ispitanika nakon SARS-CoV-2 infekcije.....	34
4.1.1. Demografski podaci kovid-19 grupe.....	34
4.1.2. Učestalost infekcije SARS-CoV-2 tokom perioda praćenja.....	34
4.1.2.1. Zastupljenost simptoma kovid-19.....	35
4.1.3. Kinetika RBD-specifičnih IgG antitela.....	36
4.1.3.1. Nalaz N-specifičnih IgG i neutrališućih antitela kod ispitanika kojima je nivo RBD-IgG antitela pao ispod praga detekcije tokom perioda praćenja.....	38
4.1.3.2. Tipovi evolucije RBD-specifičnih IgG antitela u kovid-19 grupi.....	39
4.1.4. Kinetika RBD-specifičnih IgM antitela.....	41

4.1.4.1. Ispitanici sa pozitivnim RBD-IgM antitelima u odsustvu RBD-IgG antitela.....	43
4.1.5. Podgrupa 3 kovid-19 grupe .....	44
4.1.6. Prikaz kinetike RBD-specifičnih antitela u odnosu na težinu kliničke slike, pol i godine starosti .....	45
4.1.6.1. Uticaj težine kliničke slike, pola i uzrasta na nivoe RBD-specifičnih antitela .....	47
4.1.7. Reinfekcije u kovid-19 grupi.....	49
4.2. Grupa vakcinisanih ispitanika nakon primarne serije vakcinacije.....	50
4.2.1. Demografski podaci grupe vakcinisanih ispitanika nakon primarne serije.....	50
4.2.2. Neželjene reakcije nakon prve i druge doze vakcine .....	51
4.2.3. RBD-specifična antitela nakon prve doze vakcine, pre kompletirane primarne serije .....	53
4.2.4. RBD-specifična IgG antitela nakon dve doze vakcine.....	54
4.2.4.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BBIBP-CorV vakcine kod prethodno naivnih ispitanika .....	54
4.2.4.1.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BBIBP-CorV vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom.....	55
4.2.4.2. RBD-specifična IgG antitela nakon Gam-COVID-Vac vakcine kod prethodno naivnih ispitanika .....	56
4.2.4.2.1. RBD-specifična IgG antitela nakon Gam-COVID-Vac vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom.....	57
4.2.4.3.1. RBD-specifična IgG antitela nakon ChAdOx1 vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom.....	58
4.2.4.4. RBD-specifična IgG antitela nakon BNT162b2 vakcine kod prethodno naivnih ispitanika .....	59
4.2.4.4.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BNT162b2 vakcine kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom .....	60
4.2.5. Uticaj pola, starosti, tipa vakcine i prethodnog kovid-19 na nivoe RBD-specifičnih IgG antitela nakon primarne serije .....	61
4.2.6. Poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela između vakcina nakon primarne serije i kovid-19 grupe ispitanika .....	64
4.2.7. RBD-specifična IgM antitela nakon vakcinacije.....	66
4.2.7.1. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine.....	67
4.2.7.2. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze Gam-COVID-Vac vakcine .....	67
4.2.7.3. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze ChAdOx1 vakcine .....	67
4.2.7.4. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze BNT162b2 vakcine .....	67
4.2.7.5. Poređenje učestalosti RBD-specifičnih IgM antitela između vakcina nakon primarne serije i kovid-19 grupe ispitanika .....	68
4.2.8. Prisustvo N-specifičnih IgG i RBD-specifičnih antitela u vezanim uzorcima ispitanika koji su pre primanja BBIBP-CorV vakcine imali kovid-19.....	68
4.2.9.1. N-specifična IgG antitela i neutrališuća antitela kod ispitanika BBIBP-CorV podgrupe čiji su nalazi RBD-IgG antitela pali ispod praga detekcije tokom perioda praćenja.....	70
4.2.10. Neutrališuća antitela kod ispitanika Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 podgrupe čiji su nalazi RBD-IgG antitela pali ispod praga detekcije tokom perioda praćenja.....	72
4.2.11. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon prve doze vakcine .....	72
4.2.12. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon druge doze vakcine .....	73
4.2.12.1. Infekcije nakon vakcinacije: poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela posle simptomatske infekcije nakon vakcinacije sa nivoima RBD-specifičnih IgG antitela ispitanika iz kovid-19 grupe .....	75
4.2.13. Asimptomatske infekcije nakon druge doze vakcine.....	75
4.3. Grupa vakcinisanih ispitanika nakon treće doze vakcine .....	76
4.3.1. Neželjene reakcije nakon treće doze vakcine.....	77

4.3.2. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi prethodno naivnih ispitanika .....	78
4.3.2.1. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom.....	79
4.3.3. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi prethodno naivnih ispitanika .....	80
4.3.3.1. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom.....	81
4.3.3.2. N-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi .....	82
4.3.4. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine: ostale kombinacije.....	82
4.3.5. Međusobno poređenje različitih kombinacija treće doze i uticaj pola, starosti, tipa kombinacije i prethodnog kovid-19 na nivoe RBD-specifičnih IgG antitela.....	83
4.3.6. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine u poređenju sa drugom dozom .....	85
4.3.6.1. Poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela nakon treće doze vakcine sa kovid-19 grupom .....	86
4.3.7. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon treće doze vakcine .....	89
4.3.7.1. Simptomi kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon treće doze.....	91
4.3.7.2. Poređenje RBD-specifičnih IgG i neutrališućih antitela pre i posle infekcije nakon treće doze .....	92
4.3.8. N-specifična IgG antitela posle treće doze i nakon postvakcinalne SARS-CoV-2 infekcije ..	93
5. DISKUSIJA .....	95
6. ZAKLJUČAK.....	121
7. LITERATURA.....	124

## **1. UVOD**

Sredinom decembra 2019. godine, u kineskom gradu Vuhan, provincije Hubei, primećen je porast slučajeva atipične pneumonije, sa simptomima nalik na infekciju koronavirusom udruženim sa teškim akutnim respiratornim sindromom (eng. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*, SARS-CoV). Ustanovljena je epidemiološka veza između inicijalnih pacijenata i pijace morskih plodova Huanan, međutim, kako naredni slučajevi nisu bili u dodiru sa pomenutom pijacom, posumnjalo se i na direktan prenos sa čoveka na čoveka. Početkom januara 2020. godine iz humanih ćelija epitela respiratornog trakta, inficiranim bronhoalveolarnim lavatima pacijenata sa atipičnom pneumonijom, izolovan je novi virus, klasifikovan u porodicu *Coronaviridae* – tada nazvan 2019-nCoV (eng. *novel coronavirus*).<sup>[1,2]</sup> U februaru Međunarodni komitet za virusnu taksonomiju preimenovao je ovaj virus u koronavirus udružen sa teškim akutnim respiratornim sindromom 2 (eng. *severe acute respiratory syndrome virus 2*, SARS-CoV-2), dok bolest biva nazvana od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO) koronavirusno oboljenje 2019, odnosno kovid-19 (eng. *coronavirus disease 2019*, COVID-19).<sup>[3]</sup> Nakon hitrog širenja SARS-CoV-2 širom sveta, SZO krajem januara 2020. godine proglašava vanrednu javno zdravstvenu situaciju od međunarodnog značaja (eng. *public health emergency of international concern*, PHEIC), što predstavlja najviši nivo alarma ove organizacije.<sup>[4]</sup> U martu 2020. godine, u saopštenju za medije generalni direktor SZO okarakterisao je kovid-19 kao pandemiju.<sup>[4]</sup>

Početak pandemije predstavljao je značajnu prekretnicu za javno zdravlje, sa posledicama koje su se odrazile ne samo na sve segmente zdravstvenog sistema, već i na šire društvene tokove i svakodnevni život pojedinca. Uticaj ove pandemije jedinstven je u savremenoj istoriji, naročito u polju zdravstva, prevashodno posmatrano kroz prizmu preopterećenosti zdravstvenih radnika i iscrpljenosti svih resursa u borbi protiv pandemije, ali i psiholoških fenomena koji prate sprovođenje mera socijalne izolacije. Uz sve navedeno, pandemija je izazvala i velike ekonomske posledice, koje se osećaju i nakon njenog završetka. Od samog početka pandemije, postojala je ogromna potreba za novim istraživanjima radi razumevanja mehanizama koji leže u osnovi imunskog odgovora specifičnog za SARS-CoV-2, radi pronalaženja što efikasnije prevencije širenja virusa i nastajanja teških oblika bolesti. Nikada pre zabeležen nivo rasprostranjenosti naučne saradnje, doveo je do ogromnih pomaka u polju imunologije i ispitivanja vakcina. Bili smo svedoci kako su naučna istraživanja neposredno oblikovala strategije javnog zdravlja, prelazeći iz apstrakcije u konkretne primene. Zahvaljujući tim intenzivnim istraživačkim naporima, već devet meseci nakon proglašenja pandemije, u decembru 2020. godine, prve vakcine dobile su odobrenje za hitnu upotrebu (eng. *emergency use authorization*, EUA) od strane regulatornih tela kao što su Evropska agencija za lekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) i Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. *United States Food and Drug Administration*, FDA SAD).

Srbija je među prvima u regionu započela kampanju vakcinacije i obezbedila vakcine iz različitih izvora, uključujući i zapadne i istočne proizvođače, sa prvim vakcinama dostupnim stanovništvu već od decembra 2020. godine. Posebna odlika odgovora na pandemiju u Srbiji predstavljala je upravo ta, rana i simultana upotreba različitih vakcinalnih platformi, i to inaktivisanih, vektorskih i RNK vakcina. Ovaj širok dijapazon izbora vakcina predstavljao je jedinstvenu i retku priliku za sprovođenje komparativnog imunološkog ispitivanja uticaja različitih vakcina, ali i same infekcije, na imunski odgovor u realnim okvirima, van strogo kontrolisanih uslova kliničkih studija i pod okriljem jednog istraživačkog poduhvata. Izrada ove doktorske disertacije otpočela je u vreme kada su i naučna zajednica i šira javnost bile suočene sa brojnim neizvesnostima uzrokovanim pandemijom. U nastavku uvoda biće ukratko predstavljeni klasifikacija i istorijat koronavirusa, osnovna struktura viriona SARS-CoV-2, patogeneza kovid-19, imunski odgovor na infekciju i vakcinaciju, prikaz pojedinačnih vakcina primenjivanih u Srbiji, kao i budući pristupi u borbi protiv ove bolesti.

## 1.1. Klasifikacija koronavirusa

Koronavirusi su virusi sferičnog oblika, sa omotačem i pozitivnom jednolančanom RNK koji čine porodicu *Coronaviridae*, u okviru reda Nidovirales. Ovi virusi, osim kod ljudi, mogu izazvati infekciju i kod više različitih kičmenjaka kao što su sisari, ptice i određeni vodozemci, pokazujući i svoj zoonotski potencijal.<sup>[5]</sup> Jedni su od najvećih do sada otkrivenih RNK virusa.<sup>[5]</sup>

Porodica *Coronaviridae* sadrži tri potporodice, od kojih se humani koronavirusi (eng. *human coronavirus*, HCoV) nalaze u *Orthocoronavirinae* potporodici, i to u redovima *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus*. Ukupno je do sada otkriveno sedam humanih koronavirusa, od toga su četiri virusa izazivači blagih, sezonskih respiratornih infekcija (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 i HCoV-HKU1), dok su ostala tri humana koronavirusa sposobna da pokrenu epidemije i pandemije, sa mogućnošću izazivanja veoma teških kliničkih formi – SARS-CoV, SARS-CoV-2 i koronavirus Bliskoistočnog respiratornog sindroma (eng. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*, MERS-CoV).<sup>[6]</sup>

Prema najnovijoj klasifikaciji Međunarodnog komiteta za virusnu taksonomiju (*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV)), humani koronavirusi dobili su nove nazive i to *Alphacoronavirus chicaoense* (HCoV-229E), *Alphacoronavirus amsterdamense* (HCoV-NL63), *Betacoronavirus gravedinis* (HCoV-OC43), *Betacoronavirus hongkonense* (HCoV-HKU1), *Betacoronavirus cameli* (MERS-CoV) i *Betacoronavirus pandemicum* (gde spadaju SARS-CoV i SARS-CoV-2).<sup>[5]</sup> Za potrebe ove disertacije, korišće se stari, već ustaljeni nazivi.

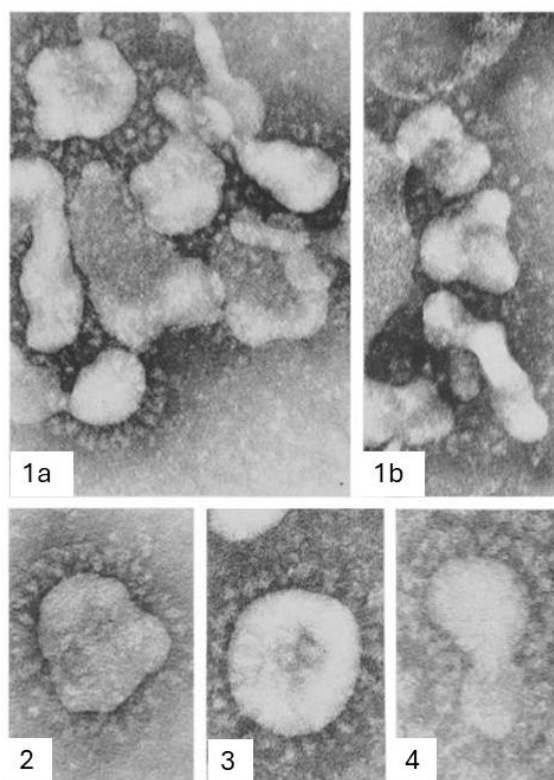
## 1.2. Istorijat humanih koronavirusa

Virusi iz porodice *Coronaviridae* prvobitno su opisani u veterinarskoj medicini i to pre gotovo devet decenija. Godine 1937. izolovan je virus infektivnog bronhitisa ptica (eng. *infectious bronchitis virus*, IBV), a zatim 1949. godine i virus mišjeg hepatitisa (eng. *murine hepatitis virus*, MHV), predstavljajući, istorijski gledano, prve izolovane koronavirusne.<sup>[7]</sup> Iako su kod ovih virusa tokom narednih decenija, upotrebom elektronskog mikroskopa primećene filamentozne projekcije, prsten oko virusne čestice, „šiljci“ ili „spikule“, danas uveliko prepoznatljiv naziv koronavirusa, koji potiče upravo od te specifične morfologije, skovan je tek trideset godina nakon izolacije IBV, usled pronalaska prvih humanih koronavirusa.<sup>[8-11]</sup>

Šezdesetih godina XX veka primećena je otežana kultivacija virusa koji su izazivali blage infekcije gornjih respiratornih puteva, a koji nisu po svojim karakteristikama spadali pod tada poznate uzročnike sezonskih prehlada.<sup>[12]</sup> Posebno vrstom kultivisanja ovih virusa u kulturama organa napravljenih od epitela humane embrionalne traheje, metodologijom Bertina Horna (*Bertin Hoorn*), Dejvid Tirel (*David Tyrell*) i njegovi saradnici izolovali su 1965. godine virus iz uzoraka dečaka sa simptomima prehlade, koji će kasnije biti prepoznat kao prvi identifikovan humani koronavirus – B814.<sup>[12,13]</sup>

Naučnica Džun Almeida (*June Almeida*), čije su tehnike bile revolucionarne i jedinstvene u dijagnostičkoj elektronskoj mikroskopiji, uspešno je uočila i fotografisala strukture B814 virusa i te rezultate objavila zajedno sa Tirelom 1967. godine (Slika 1-1).<sup>[14]</sup> Specijalnom tehnikom kultivisanja i uz ekspertizu Almeide, i virus 229E, identifikovan gotovo istovremeno kad i B814, takođe je uspešno vizuelizovan i opisan u istoj publikaciji (Slika 1-1).<sup>[14,15]</sup> Virus 229E izolovan je prvobitno iz uzoraka studenata medicine sa simptomima respiratorne infekcije od strane Doroti Hamre (*Dorothy Hamre*) i Džona Proknova (*Jonh Procknow*). Almeida se prethodno u svojoj karijeri tokom proučavanja virusa iz animalnih uzoraka, koristeći identičnu metodologiju, već susrela sa virusima morfološki nalik na B814 i 229E, a to su upravo bili IBV i MHV, virusi dobro poznati veterinarskoj medicini. Pre otkrića B814 i 229E i njihove sličnosti sa ovim animalnim virusima, Almeidin naučni rad u kome je proučavanjem strukture IBV i MHV uočila da se radi o novoj grupi virusa, odbijen je usled mišljenja recenzenata da su slike koje predstavljaju neobične izdanke ovih virusa samo loše

slikani virusi influence i da nije u pitanju značajan dodatak virusološkoj literaturi.<sup>[16]</sup> Nakon izolacije B814 i 229E virusa i MekIntoš (*McIntosh*) i saradnici 1967. godine pronalaze još šest virusa sa morfologijom sličnom IBV, takođe iz uzoraka poteklih od ispitanika sa akutnim respiratornim simptomima, koristeći istu metodologiju Horna i Tirela.<sup>[17]</sup> Almeidinim pronalaskom morfološke sličnosti i na predlog još sedmoro virusologa (uključujući Tirela, MekIntoša i Hamre), novi virusi svrstani su u istu grupu i nazvani koronavirusi, zbog specijalnog haloa oko virusne partikule u vidu krune ili solarne korone (lat. *corona*) (Slika 1-1).<sup>[7,8]</sup> Zbog otežane propagacije i održavanja u kulturi ćelija, virus B814 vremenom je izgubljen, kao i još pet izolata od MekIntoša i saradnika (OC16, OC37, OC38, OC44 i OC48), dok su istraživanja nastavljena i decenijama kasnije na virusima 229E i OC43.<sup>[18]</sup>



**Slika 1-1.** Na slikama 1a,b i 2 prikazane su čestice soja 229E, dok je na slikama 3 i 4 prikazan virus B814. Izvor: Almeida i Tyrrell, *The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture*, 1967.<sup>[14]</sup>

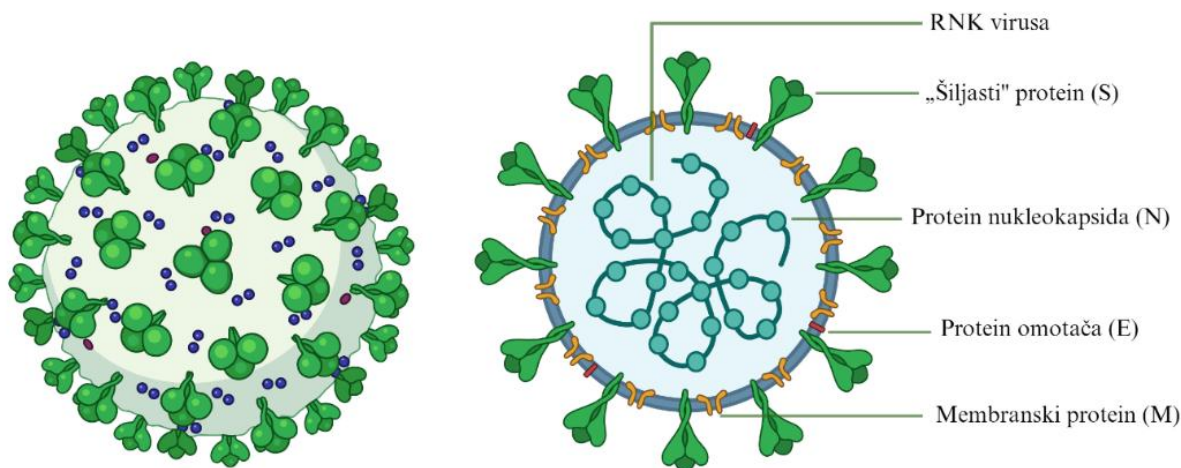
Početakom XXI veka, 2003. godine, izbila je velika epidemija izazvana tada novim zoonotskim virusom - SARS-CoV, prvim visoko patogenim humanim koronavirusom, u kojoj je bilo gotovo 8000 zaraženih i više od 700 smrtnih slučajeva.<sup>[19]</sup> Međutim, SARS-CoV, bez obzira na svoj nagli početak i mogućnost izazivanja životno ugrožavajućih pneumonija, cirkulisao je u populaciji svega osam meseci.<sup>[19]</sup> Nepunih deset godina kasnije, 2012. godine, novi humani koronavirus, MERS-CoV, izazvao je epidemiju u Saudijskoj Arabiji, primarno kod ljudi koji su bili u kontaktu sa zaraženim kamilama, posledično zahvativši 26 država, sa 609 smrtnih slučajeva registrovanih do 2016. godine.<sup>[19]</sup> Dakle, epidemija MERS-CoV odlikovala se daleko višim procentom smrtnosti zaraženih. Godine 2020. izolovan je i treći patogeni koronavirus, SARS-CoV-2, na samom početku pandemije kovid-19. Tokom trajanja pandemije, do aprila 2024. godine, registrovano je više od 704 miliona infekcija SARS-CoV-2 i preko sedam miliona smrtnih slučajeva, dok se procenjuje da je stvarni broj zaraženih i preminulih znatno veći.<sup>[20]</sup>

Smatra se da su zoonotski slučajevi koronavirusne infekcije često bivali propušteni, usled neadekvatnog sistema praćenja na globalnom planu u periodu koji je prethodio kovid-19 pandemiji.<sup>[21]</sup> U slučaju MERS-CoV, postojali su serološki dokazi, pronađeni još tokom trajanja

MERS epidemije, da je ovaj virus cirkulisao kod kamila od osamdesetih godina XX veka, dok u literaturi postoje i prikazi različitih slučajeva humane infekcije u kojima su detektovani goveđi, pseći i mačiji koronavirusi kod pacijenata sa respiratornim simptomima ili nespecifično povišenom temperaturom, objavljivani i pre, ali i tokom kovid-19 pandemije.<sup>[21]</sup> Poslednjih decenija, zoonotski virusi često su dovođeni u vezu sa slepim miševima, uključujući i SARS-CoV i SARS-CoV-2. Najnovije analize rađene *in vitro* sa HKU5-CoV-2, jednim od koronavirusa slepih miševa, pokazale su da ovaj virus može da inficira humane ćelijske linije, kao i humane respiratorne i enterične organoide, ukazujući na njegov zoonotski potencijal.<sup>[22]</sup> Direktna transmisija virusa sa slepih miševa na ljude nije česta, međutim, oni imaju mnogo važniju ulogu, pre svega kao rezervoara ancestralnih virusa, koji preskakanjem vrste dolaze do sekundarnog domaćina, gde mogu steći tropizam za humane ćelije.<sup>[23]</sup> Imajući u vidu upravo široki tropizam koronavirusa i čitav kako istražen, tako i neistražen rezervoar potencijalnih zoonotskih virusa u okviru ove porodice, određeni stepen opasnosti od pojave novih pretećih humanih koronavirusa predstavlja konstantu na globalnom nivou.

### 1.3. Struktura viriona i genom SARS-CoV-2

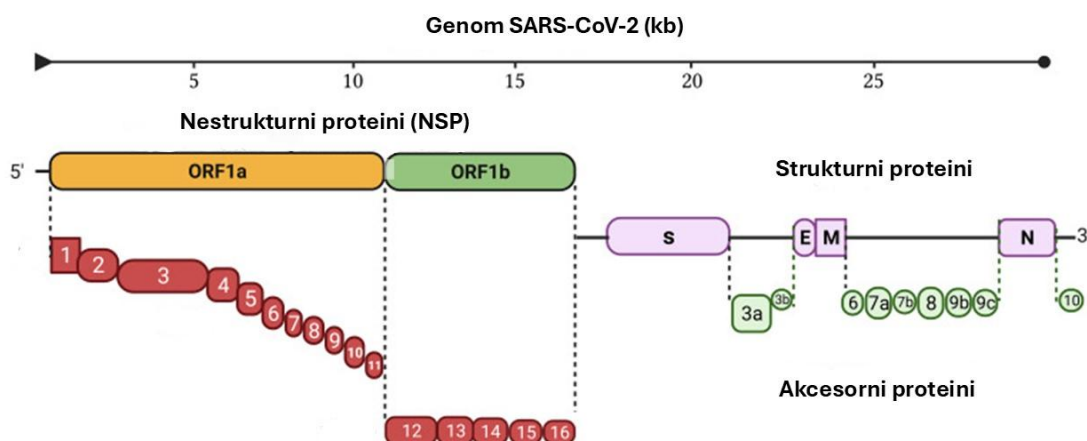
SARS-CoV-2 je virus sferičnog oblika, sastavljen od pet strukturnih, 16 nestrukturnih (NSP) i devet akcesornih proteina.<sup>[24]</sup> Strukturne proteine čine takozvani „šiljasti“ (eng. *spike*, S) protein, membranski (M) protein, nukleokapsidni (N) protein i protein omotača (eng. *envelope*, E), koji svojom organizacijom i spajanjem formiraju nove virione (Slika 1-2).<sup>[6,25]</sup> S protein važan je za prepoznavanje ciljnih ćelija, vezivanje za njihove receptore i posledičan ulazak u ćeliju domaćina.<sup>[24]</sup> N protein zadužen je za strukturnu organizaciju nukleokapsida i obuhvatanje čitavog genoma, a važan je i za replikaciju virusa, dok je M protein neophodan za finalno sklapanje viriona i njegovu egzocitozu.<sup>[26]</sup> Najsitniji i najmanje istražen strukturni protein, E protein, predstavlja viroporin i ima ulogu u protoku jona, a interakcijom sa M proteinom doprinosi očuvanju morfološke stabilnosti viriona.<sup>[27]</sup>



**Slika 1-2.** Shematski prikaz SARS-CoV-2 virusa, sa označenim strukturnim proteinima i jednolančanom pozitivnom RNK. Izvor: Lijeskić i sar. *Humoralni imunski odgovor na SARS-CoV-2: značaj specifičnih antitela.*<sup>[25]</sup>

Genom SARS-CoV-2 veličine je oko 30kb i najduži je među RNK virusima.<sup>[6]</sup> Otvoreni okvir čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) na 5' kraju sadrži gene (*ORF1a* i *ORF1b*) koji kodiraju 16 nestrukturnih proteina, dok na se na 3' kraju nalaze geni za strukturne i akcesorne proteine (*ORF3a*, *ORF3b*, *ORF6*, *ORF7a*, *ORF7b*, *ORF8*, *ORF9b*, *ORF9c* i *ORF10*). NSP proteini su neophodni za replikaciju SARS-CoV-2, jer čine enzime kao što su od RNK-zavisna RNK polimeraza, egz nukleaza sa jedinstvenom funkcijom popravke (eng. *proofreading*) (*ExoN*), kao i nidovirusna RNK uridilat-

specifična endoribonukleaza (*EndoU*), dok su akcesorni proteini zaduženi pre svega za izbegavanje imunskog odgovora domaćina (Slika 1-3).<sup>[24,28]</sup>



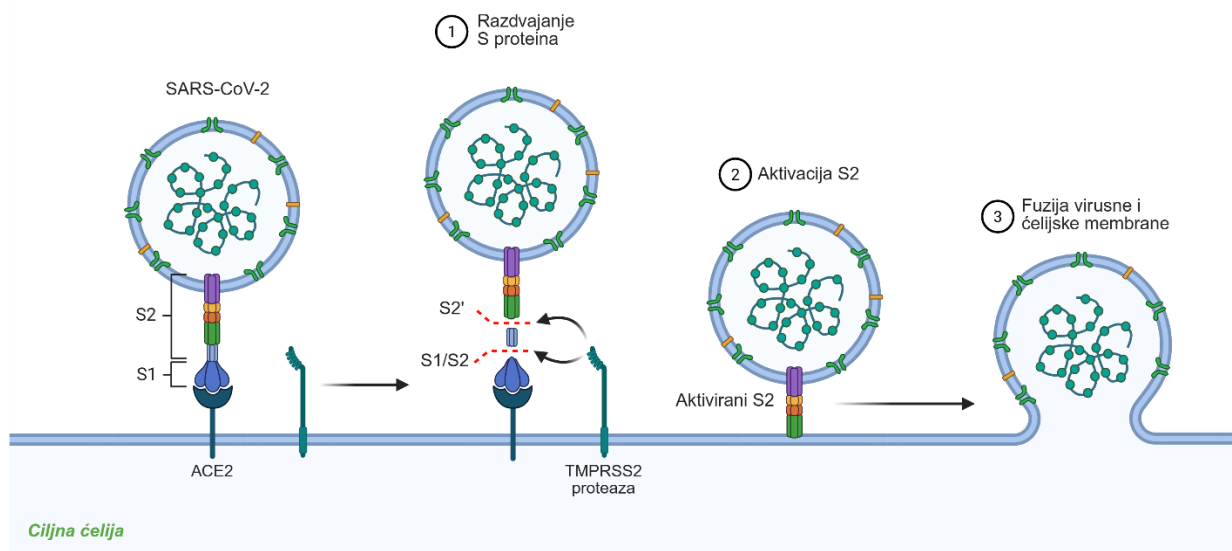
**Slika 1-3.** Shematski prikaz genoma SARS-CoV-2. Preuzeto i modifikovano prema: *Rashid i sar. Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion, 2022.*<sup>[24]</sup>

#### 1.4. Ulazak SARS-CoV-2 u ćelije domaćina

Angiotenzin konvertujući enzim 2 (eng. *angiotensin converting enzyme 2*, ACE2) identifikovan je kao ciljni receptor na ćelijama domaćina, za koji se vezuje SARS-CoV-2. Osim prisutnosti ACE2 u plućima i krvnim sudovima, ovaj receptor eksprimira se u raznim organima kao što su srce, bubrezi, testisi, gastrointestinalni trakt i centralni nervni sistem, ukazujući i na potencijalne druge kliničke posledice SARS-CoV-2 infekcije.<sup>[29]</sup>

S protein ključan je za ulazak virusa u ćelije domaćina. Na S1 podjedinici ovog važnog strukturalnog proteina, nalazi se receptor-vezujući domen (eng. *receptor binding domain*, RBD), koji se direktno vezuje za ACE2 na ćelijama domaćina.<sup>[30]</sup> Nakon kontakta sa ćelijom i konformacionih promena S proteina, proteaze domaćina - furin i transmembranska serin proteaza 2 (eng. *transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2), dovode do presecanja S proteina na S1/S2 spoju i razotkrivanja fuzionog peptida na S2 podjedinici (Slika 1-4).<sup>[6,30]</sup> Iako je za ovaj virus povoljnija aktivacija putem TMPRSS2, ukoliko prilikom vezivanja za ACE2 virus ne dođe u kontakt sa ovom proteazom, raskidanje S2' veze može biti sprovedeno i katepsinom L (eng. *cathepsin L*)<sup>[31]</sup>. U tom slučaju, nakon vezivanja za ACE2 virus endocitozom ulazi u ćeliju, a u samom endozomu se razotkrivanje S2 podjedinice sprovodi katepsinima. Fuzijom ćelijske membrane domaćina i virusa, bilo putem TMPRSS2 ili katepsina, genetski materijal se ubacuje u ćeliju, kada se završava uloga S proteina.<sup>[31,32]</sup>

Ulaskom virusa u ćeliju, uz pomoć ribozoma domaćina vrši se translacija RNK SARS-CoV-2 u poliproteine, koji proteolizom formiraju NSP, čija je zatim glavna uloga formiranje replikacijsko/transkripcionih kompleksa u okviru vezikula sa duplim membranama (eng. *double membrane vesicles*).<sup>[33]</sup> Ovaj kompleks dalje vrši replikaciju i sintezu strukturalnih i akcesornih proteina. Novi virioni se sklapaju uz pomoć N i M proteina upotrebljavajući endoplazmatski retikulum i Goldžijev kompleks domaćina, do egzocitoze i izbacivanja virusa u vanćelijski prostor.<sup>[33]</sup>



**Slika 1-4.** Shematski prikaz ulaska SARS-CoV-2 u ćeliju domaćina. Receptor-vezujući domen koji se nalazi na S1 podjedinici SARS-CoV-2, veže se za angiotenzin-konvertujući enzim 2 (ACE2), receptor na ćelijama domaćina. Nakon vezivanja, transmembranska serin proteaza 2 (TMPRSS2) dovodi do isecanja S1/S2 spoja i razotkrivanja S2 proteina (1), a zatim i do aktivacije S2 (2). Fuzijom virusa i ćelijske membrane, genetski materijal SARS-CoV-2 ubacuje se u ćeliju domaćina (3). Ilustracija je napravljena uz pomoć *BioRender.com* softvera.

## 1.5. Kliničke manifestacije kovid-19

Transmisija SARS-CoV-2 najčešće se odvija putem respiratornih kapljica i aerosola, a inkubacija u najvećem broju slučajeva iznosi 4-5 dana.<sup>[34,35]</sup> Nakon vezivanja za ćelije epitela u gornjem respiratornom traktu, SARS-CoV-2 započinje svoju replikaciju i migriranje ka alveolama.<sup>[35]</sup> U određenom procentu ova infekcija može proći asimptomatski, mada se najčešće ispoljava u vidu blagih ili srednje teških kliničkih formi. Simptomatska infekcija prezentuje se kašljem, povišenom telesnom temperaturom, glavoboljom, mijalgijom, anosmijom i ageuzijom, sa nešto ređim zahvatanjem i gastrointestinalnog trakta, u vidu dijareje ili mučnine.<sup>[34]</sup>

Teški klinički oblici kovid-19 manifestuju se u vidu dispneje, hipoksemije i respiratorne insuficijencije. Brza replikacija virusa u plućima može izazvati jak imunski odgovor, a posledična prekomerna produkcija citokina (nazvana citokinska oluja) dovodi do akutnog respiratornog distres sindroma (eng. *acute respiratory distress syndrom*, ARDS).<sup>[34,35]</sup> Ovakav oblik kovid-19 može dovesti i do ekstrapulmonalnih manifestacija, kao što su akutna oštećenja srca, bubrega i jetre, uz aritmije, rabdmiolizu, koagulopatiju i stanje šoka, a opisana je i višestruka organska disfunkcija.<sup>[34]</sup> Histopatološki nalaz ukazuje na bilateralne i difuzne promene u alveolama, uz formiranje hijalinih membrana, deskvamacije pneumocita i depozita fibrina.<sup>[35]</sup>

Svi pripadnici opšte populacije su podložni SARS-CoV-2 infekciji, nezavisno od uzrasta. Međutim, kliničke manifestacije su ozbiljnije kod starije populacije, posebno uz pridružene komorbiditete, i samim tim je ova populacija sklonija hospitalizaciji i smrtnom ishodu kovid-19.<sup>[34,35]</sup> Mlađa populacija i deca najčešće imaju blage oblike bolesti ili asimptomatsku infekciju.<sup>[35]</sup>

## 1.6. Imunski odgovor domaćina na SARS-CoV-2 infekciju

Urođena imunost, kao prva linija odbrane od infekcije, nije specifična za određene patogene, već prepoznaje i reaguje na širok spektar mikroorganizama koristeći slične mehanizme, detektujući njihovo prisustvo putem receptora za prepoznavanje obrazaca (eng. *pattern recognition receptors*, PRR). PRR se vezuju za molekulske obrasce patogena (eng. *pathogen-associated molecular patterns*,

PAMP), koji potiču od samog infektivnog agensa, kao i molekulske obrasce oštećenja (eng. *damage-associated molecular patterns*, DAMP), koji predstavljaju molekule oštećenih ćelija domaćina. Neutrofili, monociti, makrofagi, dendritske ćelije i urođenoubilačke ćelije (eng. *natural killer cells*, NK) okosnica su urođenog imunskog odgovora.<sup>[36]</sup> Ove ćelije opremljene su različitim klasama PRR. Pet primarnih familija PRR uključuju receptore slične *Toll*-u (eng. *Toll-like receptors*, TLR), receptore nalik receptorima za retinoičnu kiselinu (eng. *retinoic acid-inducible gene 1 like receptors*, RLR), nukleotid-vezujućem oligomerizacionom domenu (NOD)-slične receptore (eng. *NOD-like receptors*, NLR), C-tip lektinske receptore (CLR) i receptore slične AIM2 (eng. *Absent in melanoma 2-like receptors*, ALR).<sup>[37,38]</sup> Posebno su TLR, RLR i NLR receptori evoluirali kao odličan nadzorni sistem u detekciji PAMP virusnog porekla.<sup>[39]</sup> Sprovođenje signala putem ovih receptora u ćelijama urođene imunosti, kao odgovor na prepoznavanje PAMP ili DAMP obrazaca, dovodi do proizvodnje proinflamatornih citokina, poput interleukina (IL)-6, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , raznih hemokina, kao i do indukcije ćelijske smrti.<sup>[37]</sup>

RNK viruse, kao što je to SARS-CoV-2, urođena imunost prepoznaje na dva načina.<sup>[39]</sup> Prvi se odnosi na prepoznavanje slobodne jednolančane ili dvolančane RNK, putem neinficiranih ćelija. Specijalizovane plazmacitoidne dendritske ćelije preuzimaju slobodnu virusnu RNK i u endozomima je detektuju uz pomoć TLR7 receptora.<sup>[39]</sup> Sličan način prepoznavanja virusne RNK prisutan je u raznim ćelijama, kao što su to klasične dendritske ćelije, monociti, makrofagi i epitelne ćelije respiratornog trakta, koji se sprovodi uz pomoć receptora TLR3 i/ili TLR8.<sup>[39]</sup> Stoga, ćelije kao što su alveolarni makrofagi i epitelne ćelije respiratornog trakta, prva su linija odbrane prilikom SARS-CoV-2 infekcije. Drugi način prepoznavanja prisustva virusa u ćelijama domaćina odnosi se na prepoznavanje RNK unutar inficiranih ćelija, tokom replikacije virusa, uz pomoć citosolnih senzora kao što su RLR receptori.<sup>[39]</sup>

Nakon prepoznavanja virusa kao uzročnika infekcije, odbrana od strane urođene imunosti sastoji se od oslobađanja i produkcije interferona tipa I i III (IFN I, IFN III).<sup>[30,38]</sup> IFN I, u koje spadaju IFN- $\alpha$  i IFN- $\beta$ , imaju širok spektar uticaja kod različitih tipova ćelija, dok IFN III, odnosno IFN- $\lambda$ , utiče pre svega na epitelne barijere (kao što su epitel respiratornog i gastrointestinalnog trakta), a oba tipa interferona deluju na ekspresiju interferonom-stimuliranih gena (eng. *interferon stimulated genes*, ISG) preko ISGF3 kompleksa, produbljujući time antivirusnu odbranu odnosno indukujući antivirusno stanje u obližnjim ćelijama.<sup>[40]</sup> Vezivanjem IFN za receptore na obližnjim ćelijama dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva i ekspresije gena putem ISGF3 kompleksa, čiji produkti dovode do inhibicije virusne replikacije, translacije, razgradnje RNK i poboljšane prezentacije antigena. Osim produkcije interferona, dolazi i do aktivacije jedarnog faktora kB (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-kB), transkripcionog faktora koji pokreće transkripciju gena za citokine, hemokine, adhezijske molekule i proteine akutne faze. Ćelije urođene imunosti kao što su dendritske ćelije i makrofagi, predstavljaju i antigen-prezentujuće ćelije, koje su ključne za predstavljanje virusnih antigena T-ćelijama adaptivne imunosti i njihovu posledičnu aktivaciju. Kod pacijenata sa teškim oblicima kovida-19, uočena je smanjena produkcija IFN I kod plazmacitoidnih dendritskih ćelija, što narušava efikasnost antivirusnog odgovora i prezentaciju antigena ćelijama adaptivne imunosti, zatim primećeno je da NK ćelije pokazuju znake funkcionalne iscrpljenosti, a uočena je i prekomerna aktivacija monocita i makrofaga, koja može biti praćena nekontrolisanom sekrecijom citokina, što može dovesti do citokinske oluje, stanja sa potencijalnom fatalnim ishodom.<sup>[39]</sup> Međutim, kada su svi mehanizmi urođene imunosti funkcionalni, replikacija virusa se usporava na mestu infekcije i dobija se na vremenu potrebnom za aktivaciju adaptivnog imunskog odgovora i nastanka efektorskih i memorijskih antigen-specifičnih ćelija.<sup>[40]</sup>

Adaptivna imunost je, za razliku od urođene imunosti, uvek usmerena na specifičan infektivni agens. Glavne ćelije adaptivne imunosti čine B-limfociti u okviru humoralnog imunskog odgovora, i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfociti, kao predstavnici ćelijskog imuniteta. Za ovakvu vrstu visoko-specijalizovane odbrane neophodno je pokrenuti procese kojima je potrebno vreme, stoga je potpun razvoj efektorskih mehanizama uvek sporiji kod adaptivnog odgovora. Složen odnos između

imunološkog statusa domaćina i glavnih komponenti adaptivnog imuniteta utiče na intenzitet, trajanje i kvalitet imunskog odgovora, koji može biti zaštitnog ili patološkog karaktera.

Humoralni imunski odgovor posredovan je antitelima koja deluju u cirkulaciji, tkivima i lumenima mukoznih organa.<sup>[36]</sup> Preko svog regiona za vezivanje antigena (eng. *fragment antigen-binding region*, Fab) antitela mogu vršiti neutralizaciju virusa, blokirajući njegovo vezivanje za ciljne receptore, dok preko Fc regiona (eng. *fragment cristallizable region*) i Fc receptora na imunskim ćelijama, između ostalog dovode do aktivacije komplementa, ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitela (eng. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) i antitelima posredovane fagocitoze (eng. *antibody-dependent phagocytosis*, ADP).<sup>[41]</sup> Kada je u pitanju SARS-CoV-2, pokazano je da se imunodominantni epitopi nalaze upravo na S proteinu.<sup>[42]</sup> Neutrališuća antitela (eng. *neutralizing antibodies*, NAb) su u preko 90% slučajeva usmerena na RBD S proteina, a u manjoj meri na njegov N-terminalni domen.<sup>[43]</sup> NAb blokiraju interakciju virusa sa ćelijama domaćina i presudni su faktor koji ograničava infekciju jer direktno onemogućavaju ulazak virusa u ćelije domaćina i njegovu dalju replikaciju. Serokonverzija nastaje u prve dve nedelje nakon početka simptoma, simultano za IgM, IgA i IgG antitela, a prati je i pojava NAb, sa tim da kod određenih rekonvalescenata, naročito nakon blage kliničke slike, nivo ovih antitela može biti veoma nizak.<sup>[42]</sup> Takođe, primećeno je da kod pacijenata sa teškom kliničkom slikom dolazi do ekspanzije monocita i pojave viših nivoa IgA i IgG antitela, što nije slučaj kod blage kliničke slike i asimptomatskih pacijenata.<sup>[44]</sup>

U okviru ćelijskog imunskog odgovora specifičnog za SARS-COV-2, pokazano je da su CD4<sup>+</sup> T-ćelije prominentnije od CD8<sup>+</sup> odgovora i da postoji korelacija njihovih viših nivoa sa ograničavanjem primarne SARS-CoV-2 infekcije.<sup>[42]</sup> U studiji *Grifoni* i saradnika u kojoj je ispitivana ćelijska imunost kod rekonvalescenata, CD4<sup>+</sup> T-ćelijski odgovor bio je usmeren na gotovo sve ispitivane SARS-CoV-2 proteine, sa izuzetkom nekolicine onih najmanjih antigena koji uglavnom nisu prepoznati (kao što su ns1 i E protein).<sup>[45]</sup> Međutim, kao i za NAb, najveći broj efektorskih ćelija usmeren je na S protein. Utvrđeno je da se T-ćelijski odgovor može detektovati veoma rano, čak 2-4 dana nakon početka simptoma.<sup>[42]</sup> CD4<sup>+</sup> ćelije su sposobne da se diferenciraju u plejadu pomoćničkih ćelija i njihovi glavni zadaci su da koordiniraju adaptivnu imunost, pomažu B-ćelijama i CD8<sup>+</sup> T-ćelijama, saraduju sa urođenim imunskim odgovorom i započnu reparaciju tkiva nakon razornog dejstva infekcije i inflamacije. U virusnim infekcijama CD4<sup>+</sup> ćelije se najčešće diferenciraju u pravcu pomoćničkih Th1 ćelija i folikularnih pomoćničkih ćelija (eng. *T follicular helper cells*, Tfh). Th1 ćelije proizvode razne citokine i IFN- $\gamma$ , dok Tfh pomažu B-ćelijama u stvaranju NAb i aktivno učestvuju u formiranju memorijskih ćelija. Povećano prisustvo SARS-CoV-2 specifičnih Tfh cirkulišućih ćelija dovedeno je u korelaciju sa blažom kliničkom slikom.<sup>[42]</sup> Osim toga same Th1 ćelije, svojim citokinima, učestvuju u uništavanju inficiranih ćelija. CD8<sup>+</sup> T ćelije su glavne efektorske ćelije, koje imaju sposobnost da direktno ubiju inficiranu ćeliju i premda su manje zastupljene od CD4<sup>+</sup> odgovora, njihova pojava je povezana sa boljim ishodom kovid-19.<sup>[46]</sup>

Dosadašnji podaci o trajanju imuniteta nakon preležane infekcije ukazuju na to da humoralni i ćelijski imunski odgovor opadaju vremenom, ali kod većine populacije ostaju detektabilni najmanje godinu dana.<sup>[47]</sup> Istovremeno, broj i kvalitet memorijskih B-ćelija specifičnih za S protein raste tokom prvih pet meseci, uz povećanu stopu somatske hipermutacije i afiniteta, što ukazuje na razvijanje i jačanje imunološke memorije.<sup>[48]</sup> Ovi nalazi potkrepljeni su i nalazima kod srodnih koronavirusa, gde su specifične T-ćelije detektovane čak 11 godina nakon SARS-CoV infekcije.<sup>[49]</sup> Međutim, činjenice da su reinfekcije zabeležene i u periodu od 5 do 12 meseci nakon primarne infekcije, ukazale su na to da je zaštita od ponovnih infekcija u slučaju SARS-CoV-2 ipak ograničenog trajanja, što je predstavljalo dodatnu otežavajuću okolnost prilikom pokušaja kontrole širenja virusa u populaciji početkom pandemije.<sup>[50]</sup>

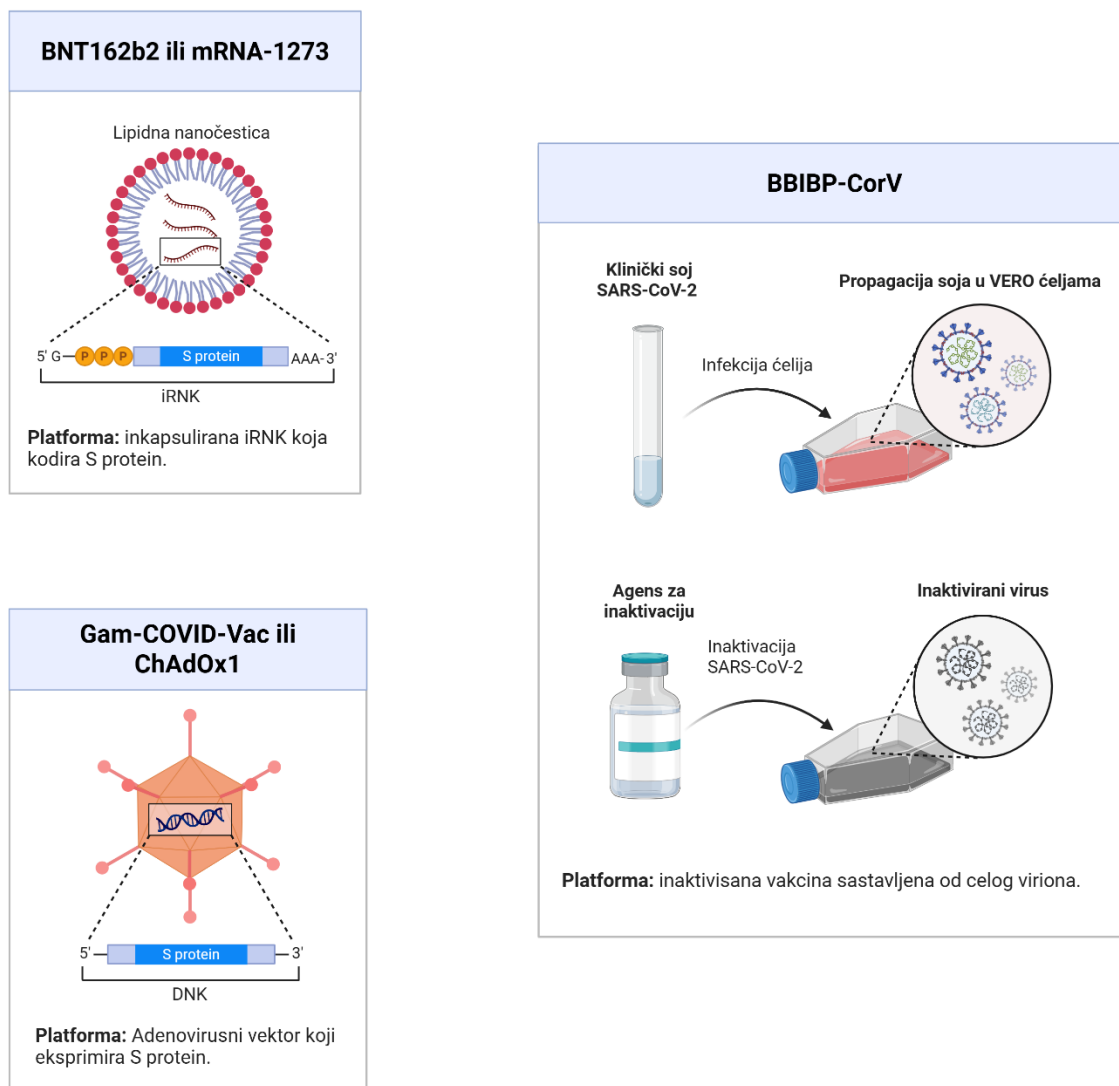
## 1.7. Vakcine protiv kovid-19

Udruženi istraživački naponi preduzeti širom sveta sa ciljem pronalaženja efikasnog načina prevencije SARS-CoV-2 infekcije i teških oblika kovid-19 doneli su kandidate za nove vakcine bazirane na različitim platformama za manje od godinu dana. Vakcinalne platforme upotrebljene tokom kovid-19 pandemije mogu se klasifikovati u tri velike kategorije: tradicionalne platforme, platforme koje su osnova vakcina odobrenih za upotrebu u skorijoj istoriji, i savremene, odnosno moderne platforme.<sup>[51]</sup> Predstavnicima tradicionalnih platformi su inaktivisane vakcine, kod kojih se mikroorganizam inaktivira primenom hemijskog ili fizičkog sredstva. Druga vrsta platformi, koje su dovele do pojave skorašnjih licenciranih proizvoda, jesu pre svega subjedinične vakcine sa rekombinovanim proteinima mikroorganizama, koji se eksprimiraju u različitim sistemima poput ćelija insekata, sisara, kvasaca i biljaka; a zatim i vektorske vakcine, gde se u vektor, najčešće adenovirus, ubacuju geni radi ekspresije proteina mikroorganizma od interesa.<sup>[51]</sup> Vektori mogu imati očuvanu sposobnost replikacije, kada su najčešće napravljeni od atenuisanih sojeva virusa koji eksprimiraju transgen, ili mogu biti bez mogućnosti replikacije, kada se delecijom delova genoma onemogućava replikacija *in vivo* (tada su vektori češće poreklom od adenovirusa, virusa influenze, parainfluente ili Sendai virusa).<sup>[51]</sup> Treću platformu predstavljaju vakcine sa takozvanim modernim pristupom, koje do ove pandemije nikada nisu bile licencirane i u njih spadaju DNK i RNK vakcine. RNK vakcine, koje su okosnica prevencije u kovid-19 pandemiji, sadrže informacionu RNK (iRNK) za ključni protein mikroorganizma – u ovom slučaju S protein, kako bi se isti nakon aplikacije vakcine sintetisao u ćelijama primaoca, koristeći humane mehanizme za translaciju.

Prva vakcina odobrena za upotrebu u široj javnosti bila je BNT162b2 (*BioNTech/Pfizer, SAD*), RNK vakcina, koja je početkom decembra 2020. godine počela da se distribuira u SAD i Evropi.<sup>[52]</sup> Druga RNK vakcina, mRNA-1273 (*Moderna, SAD*), iako inicijalno odobrena od strane SAD-a kad i BNT162b2, postala je nešto kasnije dostupna u Evropi, početkom januara 2021. godine.<sup>[52]</sup> Nedugo zatim, kineske vakcine BBIBP-CorV (*Sinopharm, Kina*) i CoronaVac (*Sinovac, Kina*), kao predstavnici inaktivisanih, tradicionalnih platformi, počele su da se koriste u Kini krajem decembra 2020. godine, a globalno tokom 2021. godine, predstavljajući najbrojnije vakcine korišćene u zemljama sa ograničenim pristupom novijim tehnologijama.<sup>[53]</sup> ChAdOx1 vakcina (*AstraZeneca, Velika Britanija*), predstavnik vektorskih vakcina, odobrena je za upotrebu takođe krajem decembra 2020. godine u Ujedinjenom kraljevstvu, a kasnije tokom 2021. i u ostalim zemljama Evrope.<sup>[54,55]</sup> Gam-COVID-Vac (*Gamaleya Research Institute, Rusija*), kao drugi predstavnik adenovirusnih vakcina, odobrena je u decembru 2020. godine u Belorusiji i Argentini, a u februaru 2021. godine i u Mađarskoj i Ujedinjenim Arapskim Emiratima, ali sa značajno manjom distribucijom u Evropi u odnosu na sve ostale vakcine protiv kovid-19.<sup>[56]</sup> U Srbiji su prve vakcine bile dostupne već krajem decembra 2020, odnosno početkom januara 2021. godine i ubrzo je opštoj populaciji bio na raspolaganju čitav dijapazon vakcina i to upravo BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, BNT162b2 i nešto kasnije i mRNA-1273 (Slika 1-5).<sup>[57]</sup> Ove vektorske i RNK vakcine indukuju produkciju imunskog odgovora usmerenog isključivo na S protein, dok inaktivisane vakcine pored anti-S antitela mogu dovesti i do razvoja antitela specifičnih za druge proteine SARS-CoV-2 (Slika 1-5).

Različite platforme koje su korišćene prilikom razvoja vakcina protiv kovid-19 imale su i svoja specifična ograničenja.<sup>[58]</sup> Tradicionalne vakcine zahtevaju složeniju, sporiju proizvodnju skopčanu sa povećanim rizicima, a odlikuju se i slabijom imunogenošću, što bi često zahtevalo dodatne doze i adjuvanse. Sa druge strane, savremenije platforme kao što su vektorske i RNK vakcine, iako omogućavaju brz razvoj nose svoje tehničke izazove, pa tako vektorske vakcine mogu imati smanjenu efikasnost zbog prethodno postojećeg imuniteta na vektor, dok RNK vakcine zahtevaju veoma niske temperature skladištenja radi održavanja stabilnosti vakcine.<sup>[58]</sup> Uprkos nedostacima, RNK vakcine predstavljale su ogroman iskorak u borbi protiv pandemije, jer su omogućile brzu i masovnu proizvodnju vakcina i distribuciju širom sveta, usled čega se od njih očekivao ključni doprinos u povećanju obuhvata vakcinacijom i suzbijanju transmisije virusa, što

druge vakcine usled komplikovanih procesa proizvodnje nisu mogle da ispune u kratkom vremenskom roku.<sup>[59]</sup>



**Slika 1-5.** Shematski prikaz vakcinalnih platformi dostupnih u Srbiji i mehanizama na kojima su bazirane. Ilustracija je napravljena uz pomoć *BioRender.com* softvera.

### 1.7.1. BBIBP-CorV vakcina

BBIBP-CorV je vakcina kineskog proizvođača *Sinopharm* i primer je tradicionalne platforme, gde se kao antigen koristi čitav inaktivisan SARS-CoV-2. Virus se primarno propagira u ćelijskim linijama bubrega zelenog afričkog majmuna (*Vero*), a zatim se inaktivira  $\beta$ -propiolaktonom, ostavljajući intaktnu virusnu partikulu, čemu se dodaje adjuvant aluminijuma.<sup>[57]</sup> Ova vakcina primenjuje se intramuskularno, u dve doze, u razmaku od tri nedelje.

Rezultati pretkliničke faze ispitivanja *Wang* i saradnika pokazali su da se od tri potencijalne varijante virusa izolovanih iz pacijenata, 19nCoV-CDC-Tan-HB02 soj pokazao kao veoma stabilan u kulturi, sa najoptimalnijom brzinom replikacije u *Vero* ćelijama i najboljim prinosom virusa, zbog čega je i izabran za dalju produkciju BBIBP-CorV vakcine.<sup>[60]</sup> Seropozitivnost kod *BALB/c* miševa u ovoj fazi istraživanja iznosila je 100% sedam dana nakon druge doze, a najviši nivo NAb utvrđen je kod davanja druge doze 21. dana. Imunogenost i zaštita od infekcije ispitivana je na rezus makakijima, kada je pokazano da je sedam dana nakon infekcije, u eksperimentalnoj grupi kojoj je

data vakcina, nivo virusa u nazofarinksu bio značajno niži nego kod *placebo* grupe, dok je nivo NAb bio značajno viši u vakcinisanoj grupi. Maksimalna tolerabilna doza, ispitivana na *Sprague-Dawley* pacovima, iznosila je 24mg/pacovu, što iznosi 900 puta veću dozu od humane i ukazuje na potencijalnu bezbednost primene BBIBP-CorV kod ljudi.

U prvoj fazi kliničkih ispitivanja, objavljene od strane *Xia* i saradnika, najčešća neželjena reakcija bila je povišena telesna temperatura, zatim zamor, nedostatak apetita, mučnina, konstipacija, mukokutane promene, glavobolja, povraćanje i svrab van mesta aplikacije vakcine; dok su u drugoj fazi istraživanja reakcije bile blagog do srednjeg intenziteta, a najčešća sistemska reakcija bila je groznica.<sup>[61]</sup> Nešto manja učestalost neželjenih reakcija je primećena u grupi starijoj od 60 godina, gde su najčešće prijavljivani povišena telesna temperatura (za najvišu dozu), zamor i bol u zglobovima. Titar NAb bio je visok i 42 dana od prve doze, obećavajući dugotrajnu zaštitu nakon ove vakcine. Nivo NAb je bio značajno viši u grupama koje su primale dve doze od po 4 µg u različitim režimima (dve doze u razmaku od 14, 21 ili 28 dana), nego u grupi sa jednodoznim režimom od 8 µg.

U trećoj fazi ispitivanja, na 12.726 ispitanika, koju su objavili *Al Kaabi* i saradnici, ustanovljena je efikasnost BBIBP-CorV vakcine od 78,1% u periodu praćenja od 77 dana nakon vakcinacije, dok je zaštita od teške kliničke slike iznosila 100%.<sup>[62]</sup> Vakcinom indukovani nivoi NAb su bili slični kao u fazama I i II. Najčešće neželjene reakcije bile su bol na mestu aplikacije vakcine i glavobolja, dok je procenat serokonverzije iznosio 99% nakon dve doze.

### **1.7.2. Gam-COVID-Vac vakcina**

Gam-COVID-Vac je vektorska vakcina protiv SARS-Cov-2 virusa, napravljena od dva rekombinantna humana adenovirusa, primarno razvijena u dva oblika – zamrznutom i liofiliziranom. Vakcina koja je u primeni sastoji se od dve komponentne: komponenta I uključuje rekombinantni adenovirusni vektor zasnovan na humanom adenovirusu serotipa 26, dok komponenta II sadrži vektor zasnovan na humanom adenovirusu serotipa 5; oba vektora sadrže gen za S protein SARS-CoV-2.<sup>[57]</sup> Ove dve komponente daju se kao prva i druga doza, intramuskularno, u razmaku od 21. dana. Pretklinička ispitivanja ove vakcine nisu objavljena, ali se u publikacijama prve i druge faze spominju i navode podaci o uspešnosti vakcine u indukciji humoralnog i ćelijskog imunskog odgovora u primatima i zaštite nakon letalne doze virusa SARS-CoV-2 kod imunosuprimiranih hrčaka.<sup>[63]</sup>

U fazama I/II, čiji su rezultati objavljeni od strane *Logunov* i saradnika, učestvovalo je 76 ispitanika, podeljenih u dve grupe za dve različite formulacije vakcine.<sup>[63]</sup> Oba oblika vakcine su bila bezbedna za upotrebu i ispitanici su dobro podneli dve doze. Najčešće neželjene reakcije bile su bol na mestu aplikacije, povišena telesna temperatura, glavobolja, astenija i bol u mišićima i zglobovima. Svi ispitanici su imali detektabilna antitela na S protein, serokonverzija je bila potpuna kod svih, sa tim da je titar antitela u proseku bio viši kod zamrznutog oblika vakcine, kao i titar NAb. Pokazano je da jedino kombinacija oba vektora dovodi do produkcije NAb kod 100% ispitanika. Ćelijski odgovor je bio prisutan kod svih ispitanika 28. dana, i to nešto jači kod zamrznutog oblika vakcine. Vakcina je dovela i do formiranja antigen-specifičnih CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelija, kao i do porasta koncentracije IFN-γ.

U primarnu analizu treće faze kliničkih ispitivanja bilo je uključeno 19.866 ispitanika.<sup>[64]</sup> Efikasnost vakcine u ovoj fazi istraživanja iznosila je 91,6%. Nijedna ozbiljna neželjena reakcija nije bila povezana sa primenom vakcine. Imunogenost vakcine se pokazala gotovo ista kao u prethodnoj fazi istraživanja, sa tim da je dodatno pokazano da je vakcina uspešno pokrenula neutrališući humoralni odgovor i kod pacijenata starijih od 60 godina. Efikasnost u ovoj grupi ispitanika nije se statistički značajno razlikovala od grupe mlađih ispitanika. Šestoro ispitanika nije razvilo odgovor na vakcinu, najverovatnije zbog imunoloških komorbiditeta.

### 1.7.3. ChAdOx1 vakcina

ChAdOx1 je takođe vektorska vakcina, ali bazirana na adenovirusu šimpanza kome je isključena mogućnost replikacije i koji eksprimira čitav gen za S protein SARS-CoV-2. U jednoj dozi vakcine, koja je u opštoj primeni, nalazi se najmanje  $2,5 \times 10^8$  virusnih partikula rekombinantnog adenovirusa koji kodira S protein.<sup>[57]</sup> Vakcina se primenjuje intramuskularno, u dve doze, ali u razmaku od 12 nedelja.

U prekliničkim istraživanjima grupe *van Doremalen* i saradnika ustanovljeno je da ova vakcina kod *BALB/c* i *outbred* miševa indukuje i humoralni i ćelijski imunski odgovor i to nakon samo jedne doze.<sup>[65]</sup> Primećen je jak Th1 odgovor, što je potkrepljeno visokim nivoima IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  i niskim nivoima IL-4 i IL-10. Jedna doza vakcine je takođe izazvala i humoralni i ćelijski odgovor kod rezus makakija, kod kojih su 14 dana nakon vakcinacije detektovana NAb. *Folegatti* i saradnici prikazali su rezultate I/II faze istraživanja za ChAdOx1 vakcinu na 543 ispitanika.<sup>[66]</sup> Najčešće sistemske reakcije na vakcinu bili su zamor i glavobolja. Antitela na S protein rasla su do 28. dana nakon prve doze, a zatim je detektovan porast antitela i nakon primene druge doze. NAb detektovana su kod gotovo svih ispitanika nakon jedne doze (u zavisnosti od eseja koji je korišćen, detektabilnost se kretala od 91-100%). Nakon druge doze svi ispitanici imali su NAb, koja su korelirala sa nivoima antitela na S protein. Adenovirusne vektorske vakcine su poznate po indukovanju jakog ćelijskog odgovora i ChAdOx1 nije izuzetak od tog pravila. Uočeno je da se efektorske T-ćelije specifične za S protein pojavljuju od sedmog dana nakon prve doze, dostižu svoj maksimum 14. dana i održavaju se do 56. dana. Međutim, nakon druge doze nije došlo do nove promene u ćelijskom odgovoru. U narednom preseku utvrđeno je da je druga doza bezbedna kao i da se bolje podnosi od prve doze vakcine.<sup>[67]</sup> Ovo istraživanje je takođe pokazalo da titar NAb, kao i odgovori posredovani Fc fragmentom antitela, uključujući fagocitozu posredovanu antitelima, aktivaciju komplementa i NK ćelija, rastu nakon druge doze. Imunski odgovor nakon dve doze vakcine bio je veoma sličan imunskom odgovoru rekonvalescenata. Međutim, primećena je kvalitativna razlika, s obzirom na to da su viši titrovi S antitela IgA i IgM klase uočeni kod rekonvalescenata u odnosu na vakcinisane ispitanike.

U narednoj fazi kliničkih ispitivanja, na 560 ispitanika pokazano je da su lokalne i sistemske reakcije slične onima opisanim u prethodnim fazama ispitivanja i da su bile učestalije kod mlađe populacije (< 56 godina).<sup>[68]</sup> Nivoi antitela su rasli do 28. dana nakon druge doze i bili slični u svim uzrasnim kohortama, dok su NAb bila prisutna i 42 dana nakon druge doze. T-ćelijski odgovor je dostigao svoj vrhunac 14. dana nakon prve doze ChAdOx1 vakcine, što se poklapalo sa rezultatima iz prethodne faze.

Primarna analiza na 11.636 ispitanika koji su primili dve standardne doze ChAdOx1 pokazala je efikasnost od 62,1%.<sup>[69]</sup> U grupi ispitanika koji su primili nižu prvu i standardnu drugu dozu efikasnost je iznosila 90%, a kombinovana efikasnost obe grupe - 70,4%. Jedan slučaj transverzalnog mijelitisa 14. dana nakon druge doze vakcine je prijavljen kao potencijalno povezan sa vakcinacijom, međutim nezavisan tim neurologa je doneo odluku da je najverovatnije u pitanju idiopatska etiologija segmentne demijelinizacije. Nivoi antitela bili su dva puta viši u grupi koja je drugu dozu primila 12. nedelje, nego u grupi koja je primala drugu dozu pre isteka šest nedelja od prve doze, a zanimljivo je da je i efikasnost bila viša u grupi sa dužim intervalom (81,3%), što je dovelo do uvođenja potpuno drugačijeg režima davanja ovih vakcina i u opštoj populaciji.<sup>[70]</sup>

Nakon kliničkih ispitivanja u opštoj populaciji vakcinisanih ChAdOx1 uočena je pojava retkih imunoloških trombocitopenija koje su izazvane antitelima na trombocitni faktor 4.<sup>[71]</sup> Komisija za farmakovigilancu i procenu rizika Evropske agencije za lekove prepoznala je retke slučajeve tromboze sa trombocitopenijom kao potencijalno povezane sa ChAdOx1 vakcinom i objavila da je zaključno sa junom 2021. godine prijavljeno 479 suspektnih slučajeva ovog retkog sindroma.<sup>[72]</sup> Takođe, komisija je skrenula pažnju na potencijalnu povezanost vakcine sa *Guillan-Barre* sindromom, jer je notirano 227 slučajeva na 51,4 miliona doza ChAdOx1 vakcine.

#### 1.7.4. BNT162b2 i mRNA-1273 vakcina

Vakcina BNT162b2, glavni predstavnik RNK platformi i jedna od najčešće primenjivanih vakcina u Srbiji, sadrži informacionu RNK sa modifikovanim nukleozidom u lipidnim česticama, omogućavajući dopremanje nereplikujuće RNK do ćelija domaćina i posledičnu ekspresiju SARS-CoV-2 S antigena.<sup>[57]</sup> I ova vakcina se primenjuje intramuskularno, u dve doze u razmaku od 21. dana, a prema smernicama proizvođača optimalna zaštita postiže se sedam dana od druge doze vakcine. Druga dostupna RNK vakcina (mRNA-1273) korišćena je u Srbiji inicijalno kod manjeg broja stanovnika zbog znatno kasnijeg uvođenja u plan imunizacije, usled čega neće biti u daljem tekstu opisana njena preklinička i klinička ispitivanja, mada se svakako učinak ove vakcine poklapa i sa imunogenošću BNT162b2. Vakcina mRNA-1273 koristi istu tehnologiju, ali za razliku od BNT162b2, upotrebljena je nešto drugačija formulacija lipida koji služe za zaštitu i isporuku iRNK u ćelije, omogućavajući stabilniju i nešto praktičniju temperaturu skladištenja od -15 do -25°C (dok je temperatura za čuvanje BNT162b2 iznosila -60 do -90°C).<sup>[57]</sup> I ova RNK vakcina primenjuje se po istom protokolu, sa tim što je preporučen razmak između dve doze 28 dana.

U prekliničkim istraživanjima grupe *Vogel* i saradnika, ispitivana su dva oblika BNT162b RNK vakcine: BNT162b1 i BNT162b2, oba kodirajući S proteine SARS-CoV-2.<sup>[73]</sup> N1-metilpseudouridin modifikacija iRNK, za oba oblika vakcine, ima za cilj da priguši urođeni imunski odgovor i poveća efikasnost translacije *in vivo*. BNT162b1 RNK kodirala je RBD S proteina zajedno sa N terminusom, dok je za BNT162b2 upotrebljen čitav S protein. Oba oblika vakcine su proizvela visoke nivoe NAb u *BALB/c* miševima, kao i jake Tfh i Th1 CD4<sup>+</sup> T-ćelijske odgovore. Takođe, oba oblika su proizvela CD8<sup>+</sup> T-ćelijski odgovor kod miševa, sa tim da je BNT162b2 bila efikasnija u stvaranju antigen-specifičnih citotoksičnih IFN- $\gamma$  CD8<sup>+</sup> T-ćelija. Dalja ispitivanja su nastavljena na BNT162b2 zbog šireg dijapazona epitopa usled korišćenja čitavog S proteina, kao i zbog boljeg podnošenja i imunogenosti, koje su dokazane u sledstvenim kliničkim ispitivanjima.

*Walsh* i saradnici objavili su rezultate prve faze kliničkog ispitivanja na 195 ispitanika.<sup>[74]</sup> Ispitanici su bili podeljeni u grupe na osnovu oblika vakcine (BNT162b1, BNT162b2), na osnovu uzrasta i doze (10  $\mu$ g, 20  $\mu$ g, 30  $\mu$ g i 100  $\mu$ g). Lokalne reakcije nakon primanja oba tipa vakcine bile su uglavnom blage i uključivale su bol na mestu aplikacije, koji se češće prijavljivao nakon druge doze. Primena BNT162b2 bila je praćena nižom incidencijom i težinom sistemskih reakcija od BNT162b1. Sistemske reakcije kao što su visoka temperatura, umor, glavobolja, groznica, bolovi u mišićima i zglobovima prijavljivani su češće kod mlađih pacijenata (od 18-55 godina) nego kod starijih (od 65-85 godina). Najviši titar NAb zapažen je sedmog i četrnaestog dana nakon druge doze. Oba oblika vakcine su proizvela niže vrednosti NAb kod starije populacije. Međutim, nakon dve doze od 30  $\mu$ g BNT162b2 čak je i starija grupa ispitanika imala nivoe NAb više od rekonvalescenata.

Studija na 43.448 ispitanika u okviru treće faze ispitivanja BNT162b2 vakcine sprovedena je od strane tima *Polack-a* i saradnika.<sup>[75]</sup> Lokalne reakcije bile su slične kao i u prethodnim fazama i svodile su se na bol na mestu aplikacije vakcine, a broj prijavi lokalnih reakcija nije porastao nakon druge doze u ovom istraživanju. Sistemski efekti su takođe češće bili prijavljivani u mlađoj populaciji (od 16 do 55 godina) i to nakon druge doze. Temperatura od ili preko 38°C zabeležena je kod 16% mlađih i 11% starijih ispitanika. Četiri ozbiljna neželjena događaja prijavljena su u eksperimentalnoj grupi i to povreda ramena povezana sa primenom vakcine, desna aksilarna limfadenopatija, paroksizmalna ventrikularna aritmija i parestezije u desnoj nozi. Dve nedelje nakon druge doze utvrđena je efikasnost vakcine od 95%.

#### 1.8. Evolucija SARS-CoV-2

Koronavirusi imaju različite strategije izbegavanja urođenog imunskog odgovora, kao što su nizak nivo genomskih citozin-fosfat-guanozin ostrvaca (CpG), zaštita virusne RNK od razgradnje, maskiranje potencijalnih epitopa i inhibicija produkcije interferona.<sup>[30]</sup> Međutim, najvažniji mehanizam za izbegavanje imunskog odgovora domaćina i to adaptivne imunosti nakon prethodne

infekcije, ali i vakcinalnog imuniteta, jeste pojava novih varijanti virusa. Kao i većina RNK virusa, koronavirusi, uključujući i SARS-CoV-2, evoluiraju brzo.<sup>[76]</sup> Te brze promene genoma nalaze se u osnovi njihove sposobnosti da izazovu bolest u novom domaćinu, kao i da izbegnu vakcinom podstaknut imunski odgovor.<sup>[77]</sup> Ove promene koje virus pretrpi tokom vremena najčešće ne dovode do značajnih devijacija u strukturi virusa, međutim određene aminokiselinske zamene mogu promeniti svojstva virusnih proteina, pa time i strukturnih odnosno funkcionalnih odlika samog virusa. Odobrene vakcine protiv kovid-19, osim inaktivisanih koje koriste ceo virion u svojoj formulaciji, usmerene su isključivo na stvaranje imunskog odgovora na S protein. Samim tim, svaka nukleotidna promena u regionu koji kodira aminokiseline u sastavu ovog proteina može uticati na efektivnost vakcina.

Prva mreža referentnih laboratorija SZO za SARS-CoV-2 osnovana je u januaru 2020. godine, sa početnim ciljem da obezbedi potvrdno testiranje zemljama koje nemaju ili imaju malo kapaciteta za testiranje na SARS-CoV-2.<sup>[78]</sup> Tokom pandemije, SZO je odlučila da proširi postojeću i uspostavi novu mrežu za praćenje koronavirusa (eng. World Health Organization Coronavirus Network, CoViNet) sa poboljšanim kapacitetima, uključujući praćenje zdravlja životinja i nadzora životne sredine, drugih koronavirusa i identifikaciju novih koronavirusa koji bi mogli negativno uticati na ljudsko zdravlje, uključujući i praćenje evolucije SARS-CoV-2.<sup>[78]</sup> U svrhu praćenja SARS-CoV-2 definisani su pojmovi varijante pod nadzorom (eng. variants under monitoring, VUM), varijante od interesa (eng. variants of interests, VOI) i zabrinjavajuće varijante (eng. variants of concern, VOC).<sup>[79]</sup> VUM je termin koji se koristi za signaliziranje zdravstvenim ustanovama da nova varijanta može zahtevati detaljnije praćenje, kao i da je potrebno istražiti da li može predstavljati dodatnu pretnju po javno zdravlje. VOI predstavlja varijantu SARS-CoV-2 sa promenama za koje se zna da utiču na ponašanje virusa ili njegov potencijalni uticaj na ljudsko zdravlje, kao što su povećana sposobnost transmisije ili izazivanja teške kliničke slike. VOC opisuje varijantu SARS-CoV-2 koja ispunjava definiciju VOI, ali takođe i jedan od sledećih kriterijuma: mogućnost izazivanja promene u kliničkoj slici, uticaj na sposobnost zdravstvenih sistema da pruže negu pacijentima ili značajno smanjenje efikasnosti dostupnih vakcina. VOC varijantama SARS-CoV-2 u sklopu naziva dodeljuje se grčko slovo.

Prvih osam meseci pandemije, SARS-CoV-2 je pokazao relativno ograničenu genetsku raznolikost, a najznačajnija promena tokom ovog perioda bila je supstitucija D614G u aprilu 2020. godine, koja je povećala infektivnost virusa.<sup>[76]</sup> Tri varijante SARS-CoV-2 koje su se primarno izdvojile bile su Alfa, Beta i Gama, nastale individualno u različitim krajevima sveta.<sup>[76]</sup> U maju 2021. postala je dominantna Delta varijanta, prisutna u cirkulaciji još od oktobra 2020. godine. Promene u patogenosti primarno su prijavljene za Alfa VOC, a zatim je svaka sledeća VOC, zaključno sa Deltom, dovela do češćih hospitalizacija i većeg procenta smrtnosti u odnosu na ancestralni soj.<sup>[76]</sup> Pojavom Omikron VOC novembra 2021. godine, započela je nova faza pandemije.<sup>[76]</sup> Primećeno je da ova VOC ima veću sposobnost transmisije, da izaziva blažu kliničku sliku, ali i da ima mnogo veći kapacitet da izazove ponovnu infekciju nego bilo koja varijanta virusa pre nje, a sa svakom novom podvarijantom Omikrona akumulirale su se dodatne mutacije u S proteinu, dovodeći do pada sposobnosti neutralizacije vakcinisanih ili osoba prethodno inficiranih nekom drugom VOC.<sup>[76]</sup> Praćenje Omikrona uključuje i BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5 i ostale potencijalne podvarijante, kao i novije rekombinantne forme. Ove rekombinantne varijante, kao što je XBB, nastale su kada su dve različite Omikron podvarijante inficirale istog domaćina i razmenile genetski materijal. Jedan od potomaka XBB.1.5., u široj javnosti poznat i kao *Kraken*, privukao je pažnju zbog svoje visoke stope transmisije i delimične rezistencije na NAb, dok je podvarijanta XBB.1.16 bila interesantna zbog izuzetne sposobnosti izbegavanja imunskog odgovora.<sup>[80]</sup> EG.5.1 podvarijanta, poznatija i kao Eris, po grčkoj boginji haosa, izazvala je nove slučajeve širom Istočne i Jugoistočne Azije, kao i Severne Amerike tokom proleća 2023. godine.<sup>[81]</sup> JN.1 kao nova VOI detektovana je u decembru 2023. godine, dok je KP.2 podvarijanta detektovana početkom 2024. godine.<sup>[82]</sup> KP.2 je brzo postala dominantna u Indiji, šireći se i drugim krajevima sveta. U trenutku pisanja ove disertacije, aktuelne VUM su KP.3; KP31.1; LB.1; XEC; LP.8.1 i NB.1.8.1.<sup>[82]</sup>

## 1.9. Imunski odgovor na različite varijante SARS-CoV-2 nakon vakcinacije

Sve vakcine dostupne u Srbiji su, kao što je već navedeno, u trećoj fazi kliničkih ispitivanja pokazale značajan nivo efikasnosti u zaštiti od simptomatske bolesti, koja se kretala od 78-95%, što je značajno prelazilo granicu od 50% koju je inicijalno postavila SZO.<sup>[83]</sup> Ove vrednosti bitne su za odobravanje i licenciranje vakcina, ali one ne oslikavaju nužno pravu sliku uticaja vakcinacije u realnim okvirima, pre svega kada su klinička istraživanja fokusirana isključivo na mlađu populaciju, bez značajnih komorbiditeta.<sup>[83]</sup> Rezultati seroepidemioloških istraživanja sprovedenih u vakcinisanoj populaciji širom sveta, van strogo kontrolisanih uslova kliničkih studija, ukazali su na razlike u imunogenosti i efektivnosti među vakcinama u različitim vakcinisanim populacijama i okruženjima, kao i u zavisnosti od tipa platforme korišćene u vakcinama.<sup>[84-86]</sup>

U jednoj od prvih studija efektivnosti za BBIBP-CorV vakcinu, utvrđeno je da je do serokonverzije došlo kod 95% vakcinisanih i to češće u mlađoj populaciji.<sup>[87]</sup> Vakcinisani ispitanici su imali slične nivoe antitela na tada novu Delta varijantu kao i rekonvalescenti, sa sniženim sposobnostima neutralizacije. BBIBP-CorV vakcina indukovala je i T- i B-ćelijski odgovor, međutim stepen ovog odgovora bio je niži nego kod drugih vakcina. Već je poznato u literaturi da su inaktivisane vakcine po pravilu slabije imunogene, kao i da predominantno stimulišu humoralni imunski odgovor sa ograničenim T-ćelijskim odgovorom.<sup>[81]</sup> Pojavom novijih varijanti virusa (Alfa, Beta, Gama, Jota i Delta), uočeno je da neutralizacione sposobnosti antitela podstaknutih ovom vakcinom značajno opadaju, dok je najdrastičniji pad uočen kod Omikron varijante.<sup>[88,89]</sup>

Efektivnost ChAdOx1 vakcine u opštoj populaciji iznosila je 86,2% nakon prve doze vakcine.<sup>[90]</sup> CD4<sup>+</sup> Th1 ćelije specifične za S protein i CD8<sup>+</sup> T ćelijski odgovori bili su povišeni nakon dve doze, ali i pokazali su visok stepen funkcionalnosti kod ispitanika svih uzrasnih grupa.<sup>[91]</sup> Dve doze nisu pokazale dovoljan nivo protekcije od blagog i srednje teškog oblika kovid-19 izazvane Beta varijantom.<sup>[92]</sup> Takođe, titar neutrališućih antitela protiv Delta soja bio je nizak.<sup>[93]</sup> Značajna redukcija neutralizacione sposobnosti i kod ispitanika bez prethodne infekcije pre vakcinacije i kod ispitanika sa prethodnom infekcijom, uočena je i za Omikron varijantu.<sup>[94]</sup> Pre pojave Omikrona, i druga vektorska vakcina, Gam-COVID-Vac, imala je efektivnost koja je dostizala svoj maksimum u prva dva meseca nakon vakcinacije i iznosila do 91,8%, opadajući na 57,8% nakon šest meseci.<sup>[95]</sup> Humoralni imunski odgovor nakon dve doze ove vakcine bio je visok i čak viši u poređenju sa drugim pomenutim vakcinama, iako je uočen trend pada tokom prvih šest meseci.<sup>[85]</sup> Međutim, tokom perioda Delta varijante, efektivnost vakcine opala je na 56%.<sup>[96]</sup> Sposobnost neutralizacije Omikron soja do šest meseci nakon vakcinacije, značajno je opadala tokom vremena i nakon ove vakcine.<sup>[97]</sup>

Istraživanje u Izraelu, koje je obuhvatilo 596.618 ispitanika vakcinisanih BNT162b2 pokazalo je efektivnost vakcine sedam dana nakon druge doze od 94% za simptomatsku infekciju, 87% za hospitalizaciju i 92% za ispoljavanje teškog oblika kovid-19.<sup>[98]</sup> U studiji *San Segundo* i saradnika, dokazano je postojanje odgovora T-ćelija specifičnih za S protein u 90% slučajeva, a trideset dana nakon druge doze primećen je porast Th1 memorijskih ćelija, kao i perifernih memorijskih Tfh ćelija.<sup>[99]</sup> Mesec dana nakon vakcinacije, titar NAb u studiji *Lopera* i saradnika bio je niži za sve ispitivane varijante virusa (Alfa, Gama, Delta i Mu), sa najznačajnijom redukcijom za Delta i Mu varijante.<sup>[100]</sup> Takođe, uočen je i dramatičan pad nivoa antitela do šest meseci nakon vakcinacije, za sve varijante virusa.<sup>[100]</sup> Gotovo više od pola ispitanika u studiji *Moy* i saradnika nakon dve doze ove vakcine nije više imalo detektabilna NAb antitela specifična za Omikron.<sup>[101]</sup>

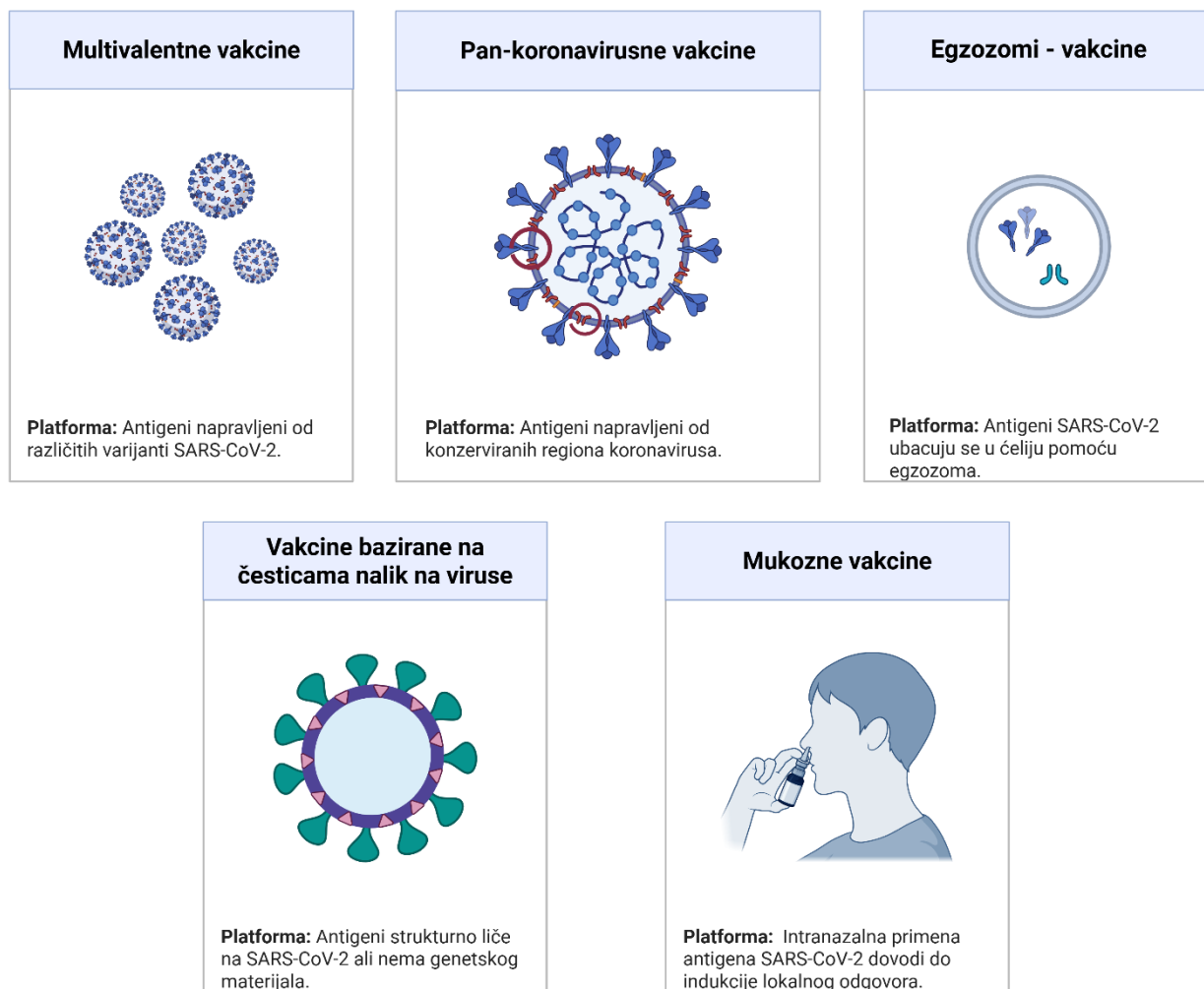
Uočen porast infekcija nakon vakcinacije, ali i reinfekcija nakon kovid-19, ukazivao je na slabljenje imunskog odgovora tokom vremena, što je uporedo sa pojavom novih varijanti virusa i pada neutralizacione sposobnosti nakon primarne serije vakcinacije, nezavisno od platforme vakcine, ukazivalo na potrebu za novom, trećom dozom vakcine.<sup>[102]</sup> Na osnovu ovih nalaza agencije za javno zdravlje i regulatorna tela kao što su CDC, EMA i SZO preporučile su uvođenje treće doze vakcine, čime bi se kompenzovalo slabljenje humoralnog imunskog odgovora, posebno u rizičnim populacijama.

## 1.10. Treća doza vakcine i novi pristupi prevenciji

Premisa davanja nove doze vakcine zasnovana je na činjenici da naredna doza može ponovo stimulisati prethodno uspostavljen imunski odgovor, utičući i na humoralnu i na ćelijsku imunost. U Srbiji je treća doza vakcine protiv SARS-CoV-2 uvedena u upotrebu od avgusta 2021. godine, u periodu pojave Delta varijante, koja je bila povezana sa ozbiljnijim kliničkim manifestacijama.<sup>[57]</sup> Vrsta vakcine za treću dozu mogla je biti ista kao i primarna serija, što je predstavljao homologni pristup, ili različita, što bi predstavljao heterologni pristup revakcinaciji. SZO je odobrila i podržavala upotrebu i homolognih i heterolognih pristupa revakcinaciji, posebno u situacijama kada je teško bilo obezbediti istu vakcinu za sve tri doze vakcine. U početku, heterologne kombinacije koristile su se samo u specifičnim okolnostima, međutim pretpostavljalo se da kombinacija vakcinalnih platformi može poboljšati zaštitu i to pre svega kombinacijama RNK vakcina nakon vektorskih ili inaktivisanih, uzevši u obzir sve dostupnije dokaze o njihovoj većoj sposobnosti indukcije imunskog odgovora nakon primarne serije vakcinacije.

Ubrzo nakon implementacije treće doze vakcine, došlo je do pojave Omikron varijante i u Srbiji. Uprkos činjenici da su sve do tada primljene vakcine bile zasnovane na prvobitnoj sekvenci virusa, podaci iz literature sugerisali su da se primenom treće doze indukuje dodatni stepen zaštite i od Omikron soja.<sup>[103]</sup> Studija *Costa Clemens* i saradnika ukazala je na padanje nivoa antitela šest meseci nakon treće doze, ali i na to da je zaštita od teške kliničke slike perzistirala čak i do devet meseci, bez obzira na prisustvo novih Omikron podvarijanti u populaciji.<sup>[104]</sup> Svakako, trajanje imunskog odgovora nakon treće doze i dalje ostaje u području aktivnog istraživanja, pre svega uzevši u obzir zastupljenost različitih kombinacija u literaturi, koje nisu dovoljno ispitane, ali i neodlučnost populacije da prihvati nove doze vakcine nakon već preležanih infekcija posle vakcinacije.<sup>[81]</sup>

*Saha* i saradnici u svom preglednom radu ukazuju na to da bi periodično davanje novih doza vakcine, potencijalno prilagođenih aktuelnim varijantama virusa, bilo potrebno da se održi adekvatan imunski odgovor na nivou populacije.<sup>[81]</sup> Dalje razvijanje vakcina protiv kovid-19 ide u pravcu izazivanja imunskog odgovora širokog spektra i dugotrajne zaštite i od budućih varijanti SARS-CoV-2 (Slika 1-6). Formulacije vakcina koje su specifične za određene podvarijante Omikrona, kao što je XBB 1.5, već su dostupne i njihova se efikasnost i efektivnost ispituju u populaciji.<sup>[80]</sup> Takođe, multivalentne vakcine, koje uključuju u svojoj formulaciji antigene više varijanti, istražuju se radi potencijalnog smanjenja potrebe za čestim dodatnim dozama vakcina.<sup>[81]</sup> Osim toga, ispituje se i uključivanje drugih proteina, kao što je N protein, ali i potencijal mukoznih vakcina koje mogu da obezbede lokalni imunitet na mestima ulaska samog virusa, čime bi se ograničio i dalji prenos infekcije.<sup>[81]</sup> U fokusu su i vakcine bazirane na egzozomima, malim ekstarcelularnim vezikulama čija prirodna sposobnost da inkapsuliraju i isporuče molekule predstavlja obećavajuću platformu za isporuku antigena, bez živih virusa; kao i vakcine bazirane na česticama nalik virusima (eng. *virus-like particles*), koje strukturno podsećaju na viruse, ali im nedostaje genetski materijal, čineći ih bezbednijim.<sup>[80]</sup> Istraživanja su usmerena i na razvijanje univerzalne pan-koronavirusne vakcine, koja bi sadržala konzervirane regione virusa i bila sposobna da proizvede zaštitu od svih prisutnih, ali i budućih varijanti SARS-CoV-2, a potencijalno i od novih humanih koronavirusa.<sup>[80]</sup>



**Slika 1-6.** Shematski prikaz različitih platformi novih generacija vakcina protiv kovid-19. Slika je napravljena u *BioRender.com* softveru, po ugledu na prilog iz rada: *Alhamlan i Al-Qahtani. SARS-CoV-2 Variants: Genetic insights, epidemiological tracking, and implications for vaccine strategies, 2025.*<sup>[80]</sup>

### 1.11. Testovi za detekciju i praćenje humoralnog imunskog odgovora

Dugotrajna, prospektivna ispitivanja imunskog odgovora nakon SARS-CoV-2 infekcije, ali i vakcinacije, najčešće se oslanjaju na detekciju humoralnog imunskog odgovora, zbog skuplje, dugotrajnije i teže procedure detekcije ćelijskog imuniteta. Osim praktičnih razloga, humoralni imunski odgovor predstavlja i adekvatan indikator zaštite, zahvaljujući sposobnosti direktnog ograničavanja infekcije, a samim tim i dalje transmisije virusa u populaciji. Antitela koja se detektuju klasičnim serološkim testovima predstavljaju takozvana „vezujuća“ ili „ukupna“ antitela (eng. *binding antibodies*, BAb), odnosno antitela koja prepoznaju virusne antigene i igraju ulogu u odbrambenom mehanizmu kroz svoje funkcije preko Fc receptora, kao što su ADCC, ADP i aktivacija komplementa.<sup>[105]</sup> Međutim, samo mali procenat BAb pokazuje neutralizacionu aktivnost – odnosno mogu biti okarakterisana kao NAb.

Zlatni standard detekcije NAb predstavlja test neutralizacije redukcijom plakova baziran na vizualizaciji citopatogenog efekta (eng. *plaque reduction neutralization test*, PRNT), koji zbog kompleksnog izvođenja i upotrebe živog virusa zahteva specijalne laboratorije trećeg nivoa biološke sigurnosti, ali i specijalno obučeno osoblje.<sup>[106]</sup> Ovakav test ne omogućava testiranje velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu, uzevši u obzir da je tehnički i logistički zahtevan za izvođenje, uz dugotrajno čekanje očitavanja rezultata koje za jedan uzorak može trajati danima. Jedna

od alternativa predstavlja rekombinativni pseudovirus test neutralizacije, koji koristi manje patogeni virus kao polaznu osnovu, kao što je virus vezikularnog stomatitisa koji eksprimira S protein SARS-CoV-2, međutim ovi testovi nisu standardizovani i osim takođe dugačkog protokola, otežavaju poređenje rezultata različitih studija u zavisnosti od primenjene metodologije.<sup>[106]</sup> Iz navedenih razloga, surogat testovi neutralizacije bazirani na klasičnim enzimskim imunotestovima, u vidu blokirajućeg ELISA (eng. *enzyme-linked immunoassay*, ELISA) testa, ušli su u široku upotrebu, zbog sigurnijeg ali i bržeg ispitivanja veće količine uzoraka. Ovi testovi mogu se brzo prilagoditi i trenutno cirkulišućoj varijanti virusa.<sup>[107]</sup>

Testovi koji detektuju ukupna antitela najčešće su automatizovani, sa mogućnošću simultane analize velikog broja uzoraka i samim tim praktični za ispitivanja na velikom delu populacije.<sup>[108]</sup> Osim toga, BAb testovi koji koriste S1 ili RBD kao antigen, mogu biti praktičan, indirektan pokazatelj sposobnosti neutralizacije.<sup>[108]</sup> Komparacije studija praćenja kinetike i održavanja antitela nakon infekcije, ali i vakcinacije, često su onemogućene nedostatkom standardizacije testova, sa različitim stepenima senzitivnosti i specifičnosti i karakteristikama ispitivane populacije.<sup>[109]</sup> Iako postoji standardizacija i izražavanje jedinica seroloških testova kao BAU (eng. *binding antibody units*)/mL, radi pokušaja poboljšanja korelacije rezultata seroloških testova, značajne razlike i dalje postoje.<sup>[106]</sup>

Pregledom literature uočava se nedostatak studija koje prate imunski odgovor duži vremenski period nakon više različitih platformi, sa istom metodologijom i poređenjem sa rekonvalescentima.<sup>[110]</sup> Takođe, uočava se i oskudniji broj radova o pojedinim platformama, pre svega BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac, u odnosu na BNT162b2 i ChAdOx1. S obzirom na ove nedostatke, posebno u pogledu dugotrajnih studija koje prate ispitanike u raznim fazama pandemije (kroz prirodno stečeni, zatim vakcinalni, pa i hibridni imunitet, koji predstavlja kombinaciju prirodno stečenog i vakcinalnog imuniteta), kao i neadekvatnu količinu podataka o određenim vakcinalnim platformama, neophodno je povećati broj takvih detaljnih analiza imunskog odgovora. Uzevši u obzir i neprestanu i nepredvidivu evoluciju koronavirusa, praćenje trajanja imunskog odgovora u ovakvom, stalno promenljivom okruženju od velike je važnosti u proceni trenutka smanjenja ili čak potpunog gubitka zaštite imunskog odgovora. Cilj ovakvih istraživanja bio bi da se preciznije odredi dinamika postepenog slabljenja imunskog odgovora, što bi omogućilo pravovremenu modifikaciju postojećih strategija vakcinacije.

## **2. CILJEVI RADA**

Istraživanje predstavljeno ovom disertacijom dizajnirano je sa idejom da kroz različite talase kovid-19 pandemije prati humoralni imunski odgovor nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom, kao i nakon imunizacije različitim vakcinama dostupnim u Srbiji, primenjujući istovetnu metodologiju. Ispitivanje imunskog odgovora u uslovima realnog života, pogotovo u sredini u kojoj su opštoj populaciji bile dostupne različite vakcinalne platforme, izvan kontrolisanih uslova kliničkih ispitivanja, predstavlja važan izvor podataka o stepenu zaštite ispitanika nakon bolesti i/ili vakcinacije.

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Longitudinalno praćenje nivoa ukupnih antitela IgM i IgG klase specifičnih za RBD domen, ukupnih antitela IgG klase specifičnih za N protein, kao i neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom.
2. Longitudinalno praćenje nivoa ukupnih antitela IgM i IgG klase specifičnih za RBD domen, ukupnih antitela IgG klase specifičnih za N protein, kao i neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen SARS-CoV-2 nakon vakcinacije prvom, drugom i/ili trećom dozom, sa posebnim osvrtom na razlike između vakcina dostupnih u Srbiji posle primarne serije i nakon različitih homolognih i heterolognih pristupa davanju treće doze.
3. Poređenje dinamike nivoa specifičnih antitela detektabilnih nakon infekcije SARS-CoV-2 i vakcinacije različitim platformama protiv kovid-19 dostupnih u Srbiji, u jednakim vremenskim intervalima.
4. Ispitivanje zastupljenosti ponovnih infekcija i infekcija nakon primene vakcina protiv kovid-19 dostupnih u Srbiji, kao i njihove moguće korelacije sa nivoima IgG antitela specifičnih za RBD domen i N protein, kao i neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen.

### **3. MATERIJAL I METODE**

### 3.1. Tip studije

Istraživanje je sprovedeno kao prospektivna kohortna studija praćenja humoralnog imunskog odgovora nakon SARS-CoV-2 infekcije i vakcinacije protiv kovid-19, vakcinama dostupnim u Srbiji, baziranim na različitim platformama - BNT162b2 (*BioNTech/Pfizer*, SAD), BBIBP-CorV (*Sinopharm*, Kina), Gam-COVID-Vac (*Gamaleya Research Institute*, Rusija), ChAdOx1 (*AstraZeneca*, Velika Britanija), mRNA-1273 (*Moderna*, SAD).

### 3.2. Mesto i period praćenja ispitanika

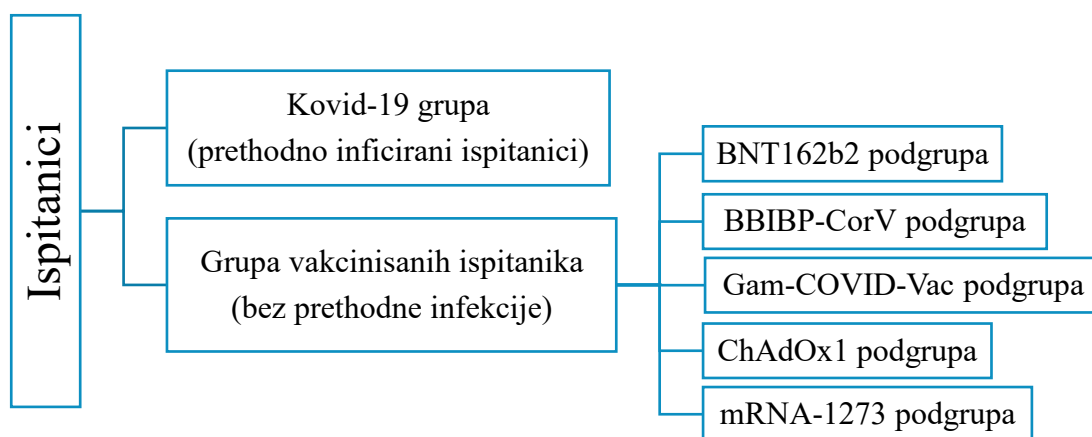
Prikupljanje uzoraka od ispitanika uključenih u ovu studiju sprovedeno je u prijemnoj ambulanti Nacionalne referentne laboratorije za toksoplazmozu, Grupe za mikrobiologiju sa parazitologijom, Instituta za medicinska istraživanja (IMI), Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u periodu od 12.08. 2020. godine do 31.03. 2023. godine.

### 3.3. Selekcija ispitanika i osnovne grupe

Prvobitnu grupu ispitanika činili su zaposleni u IMI i Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, koji su regrutovanjem pojedinaca iz njihovog ličnog i profesionalnog okruženja (članovi porodice i saradnici) po principu tzv. *snowballing* metode, doprineli uvećanju broja ispitanika.<sup>[111]</sup> Trudnice i osobe mlađe od osamnaest godina nisu bile uključene u ovu studiju. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog odbora IMI (br. EO138/2021) i Etičke komisije Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (br. 17/I-13). Svi ispitanici su pre ulaska u studiju potpisali informisani pristanak o dobrovoljnom davanju uzorka krvi i učešću u daljem toku istraživanja, sa mogućnošću da u bilo kom trenutku povuku svoju saglasnost ili odustanu od daljih kontrola.

Pri prvom dolasku ispitanici su anketirani od strane istraživača, na osnovu čega je određena njihova pripadnost osnovnoj grupi i dalja učestalost kontrola. Osnovne grupe u okviru ove studije bile su kovid-19 grupa, sa prethodno inficiranim ispitanicima, i grupa vakcinisanih ispitanika, koja se dalje delila u zavisnosti od primljene vakcine na pet podgrupa (BNT162b2, BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1, mRNA-1273) (Slika 3-1). Anketa se sastojala od pitanja o osnovnim demografskim i kontakt podacima, sa posebnim osvrtom na postojanje medicinske dokumentacije sa podacima o prethodnoj infekciji u vidu pozitivnog brzog antigenskog testa i/ili reakcije lančane polimerizacije (PCR) na prisustvo SARS-CoV-2, ali i na postojanje medicinske dokumentacije o vakcinaciji. Uzrast ispitanika, izražen u godinama, računat je prilikom obrađivanja podataka od datuma rođenja do datuma prvog uzorkovanja pri uključivanju u studiju.

Ukoliko su ispitanici preležali kovid-19, anketom su prikupljeni podaci o postojanju simptoma, kao i medicinski dokumentovane pneumonije i/ili hospitalizacije. Otpusne liste i laboratorijske izveštaje sa navedenim dijagnostičkim SARS-CoV-2 testovima ispitanici su davali na uvid istraživaču. Nulta tačka, odnosno datum koji se uzimao za početak bolesti u većini slučajeva bio je datum početka simptoma. U slučajevima kada ispitanici nisu mogli tačno da odrede datum početka simptoma, upotrebljen je datum pozitivnog dijagnostičkog testa kao nulta tačka za dalje praćenje. Kod slučajeva asimptomatskih infekcija, koji su nakon inicijalnog testiranja u našoj laboratoriji imali pozitivna antitela na SARS-CoV-2, a ukoliko je dijagnostički test bio negativan ili nije uopšte rađen, poslednji datum poznatog rizičnog kontakta upotrebljen je kao nulta tačka.



**Slika 3-1.** Shema podele ispitanika u grupe i podgrupe.

Kod vakcinisanih ispitanika, na osnovu sertifikata o vakcinaciji, notirani su tačni datumi dobijenih doza. U ovoj grupi ispitanika, anketom su se dodatno prikupljali podaci o neželjenim reakcijama nakon vakcinacije. Takođe, na svakoj sledećoj kontroli prikupljani su ponovo podaci o potencijalnim kovid-19 simptomima, dijagnostičkim testovima, dodatnim dozama vakcine i postvakcinalnim reakcijama na iste, u vremenskom periodu koji je protekao od poslednje kontrole.

### 3.4. Uzorkovanje materijala

Periferna venska krv (5-10 mL) uzorkovana je u prijemnoj ambulanti Nacionalne referentne laboratorije za toksoplazmozu, u okviru Grupe za mikrobiologiju sa parazitologijom IMI, u vakuumske epruvete sa aktivatorom zgrušavanja krvi, obložene mikronizovanim česticama silicijum dioksida radi bržeg zgrušavanja i kompletnijeg izdvajanja seruma (*Vacurette CAT Serum Clot Activator*, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija). Primarna obrada uzorka, sa upisivanjem u protokol i dodeljivanjem posebnog identifikacionog broja, izvedena je odmah nakon venepunkcije. Centrifugiranjem epruveta na 1000 x g, tokom 17 minuta, izdvajan je serum. Deo seruma prvobitno je iskorišćen za primarne serološke analize, a zatim je ostatak uzorka skladišten u zamrzivaču na -80°C (*CryoCube*, Eppendorf) do dalje obrade.

Nakon preležane infekcije, ispitanici su serološki praćeni u šest vremenskih tačaka, od početka simptoma ili pozitivnog dijagnostičkog testa do godinu dana (na tri nedelje, šest nedelja, tri meseca, šest, devet i dvanaest meseci) (Slika 3-2). Nakon vakcinacije, ispitanici su kontrolisani u regularnim intervalima računatim od prve doze vakcine, u pet vremenskih tačaka, do devet meseci (na tri nedelje, šest nedelja, tri meseca, šest i devet meseci) (Slika 3-2). Ukoliko su se ispitanici opredelili i za treću dozu vakcine, period praćenja se produžavao, tako da su kontrole vršene i u dodatne tri tačke, do šest meseci nakon treće doze vakcine (na tri nedelje, tri meseca i šest meseci) (Slika 3-2). Ukoliko je došlo do pojave infekcije nakon vakcinacije, ispitanici su bili isključeni iz daljeg longitudinalnog praćenja kinetike antitela. Međutim, ovi ispitanici pozivani su na jednu dodatnu kontrolu, tri nedelje nakon pozitivnog dijagnostičkog testa, odnosno početka simptoma ukoliko test nije rađen. Tačne vremenske odrednice svake tačke praćenja, u danima, izražene kao

srednje vrednosti sa pripadajućim standardnim devijacijama, prikazane su u okviru svake grupe, odnosno podgrupe ispitanika, u odeljku sa rezultatima.

#### Kontrole ispitanika kovid-19 grupe

(računate od datuma početka simptoma ili pozitivnog dijagnostičkog testa)

- Tri nedelje
- Šest nedelja
- Tri meseca
- Šest meseci
- Devet meseci
- Dvanaest meseci

#### Kontrole vakcinisanih ispitanika

(računate od datuma primanja prve doze)

- Tri nedelje
- Šest nedelja
- Tri meseca
- Šest meseci
- Devet meseci

#### Kontrole ispitanika koji su vakcinisani trećom dozom

(računate od datuma primanja treće doze)

- Tri nedelje
- Tri meseca
- Šest meseci

#### Kontrola ispitanika koji su nakon vakcinacije imali kovid-19

(računato od datuma početka simptoma ili pozitivnog dijagnostičkog testa)

- Tri nedelje

**Slika 3-2.** Prikaz seroloških kontrola za ispitanike nakon kovid-19 i/ili nakon vakcinacije.

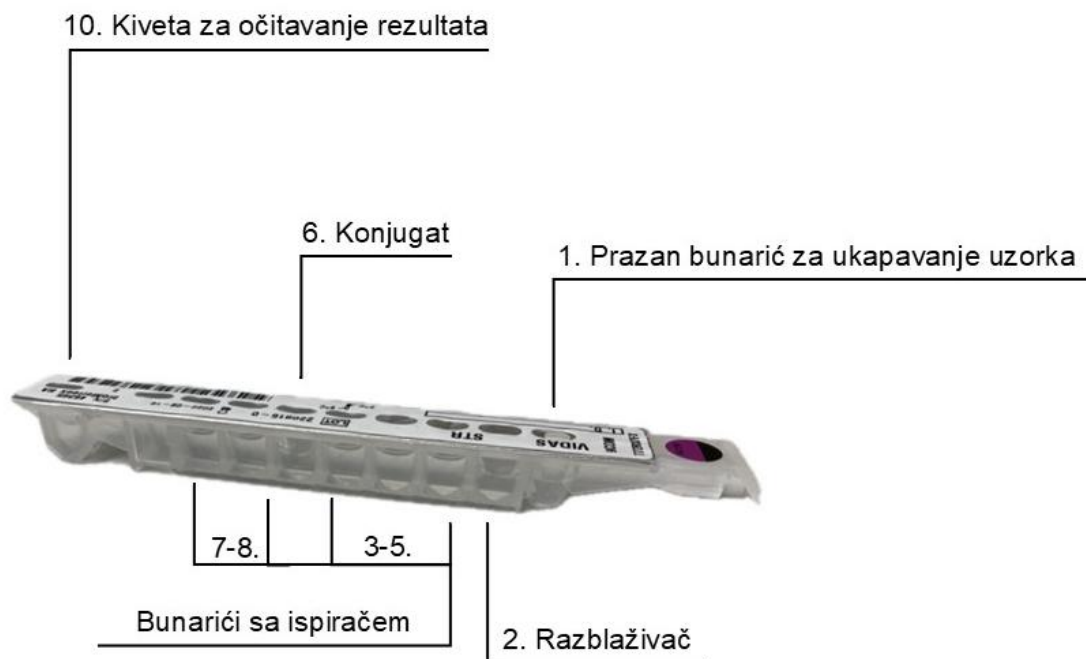
Ukoliko ispitanik nije bio u mogućnosti da dođe u zadatom terminu kontrole, blagovremeno je bio obavešten o narednoj kontroli, osim ukoliko nije odustao od daljeg učestvovanja u studiji. Nakon dve propuštene kontrole, bez odgovora ispitanika, smatralo se da je ispitanik odustao od učestvovanja u istraživanju. Uzorci uzeti van predviđenih vremenskih okvira, nisu ušli u analizu kinetike humoralnog imunskog odgovora.

### 3.5. Određivanje ukupnih IgG antitela specifičnih za RBD domen

RBD-specifična IgG antitela, detektovana su komercijalnim VIDAS SARS-CoV-2 IgG II testom (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, Francuska), na potpuno automatizovanoj mini-VIDAS platformi. Ovaj test baziran je na tehnici koja kombinuje tzv. *sandwich* (eng.) enzimski imunosorbentni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) sa krajnjom detekcijom fluorescencije (eng. *enzyme-linked fluorescence assay* - ELFA).

Test pribor za ispitivanje individualnih uzoraka sastoji se od plastične test-trake (eng. *strip*) koja obuhvata deset udubljenja sa U-dnom (tzv. bunarića), ispunjena unapred pripremljenim reagensima (razblaživač, ispirać, konjugat i supstrat) (Slika 3-3). Test-trake su čvrsto zatvorene folijom, sa naznačenim jedinstvenim bar-kodom, sa otvorom na prvom bunariću, namenjenim za

ukapavanje uzorka. Uz test-trake, u sastav test kompleta ulaze i odgovarajuće plastične pipete (eng. *solid-phase receptable*, SPR), čija je unutrašnjost presvučena rekombinantnim SARS-CoV-2 antigenom, RBD domenom S proteina (RBD/S). Prilikom otvaranja svakog novog kompleta testova, potrebno je izvršiti kalibraciju upotrebom seta standarda i kalibratora koji se nalaze u datom kompletu, kao i svaki sledeći put kada mini-VIDAS analizator izda obaveštenje o istekloj kalibraciji. Ovim putem regulišu se varijacije signala samih testova, tokom njihovog roka trajanja i čuvanja na +2 do +8 °C.



**Slika 3-3.** Primer test-trake (eng. *strip*) za VIDAS SARS-CoV-2 IgM i VIDAS SARS-CoV-2 IgG II testove. Deveti bunarić je prazan.

Nakon ukapavanja 100  $\mu$ L dobro vorteksovanog i temperiranog uzorka u prvi bunarić, test-traka se ubacuje u mini VIDAS aparat, zajedno sa pripadajućom SPR pipetom. Sledeći koraci izvode se u samom aparatu. SPR pipetom se uzorak iz prvog bunarića, prebacuje u naredni, radi razblaživanja. Kako uzorak cirkuliše kroz pipetu, IgG antitela specifična za RBD, ukoliko postoje u ispitivanom uzorku, vezuju za antigen na samoj SPR pipeti. Od trećeg do petog koraka, serijom ispiranja odbacuju se sve komponente koje se nisu vezale za antigen. U šestom bunariću nalaze se mišja monoklonska anti-humana IgG antitela, konjugovana sa alkalnom fosfatazom, koja se vezuju za RBD-IgG antitela, prisutna u SPR pipeti. Ponovnim ispiranjem sve nevezane komponente se odbacuju i pristupa se finalnoj detekciji. U kiveti, odnosno desetom i poslednjem bunariću, nalazi se supstrat 4-metilumbeliferil fosfat (0,6 mmol/L) koji SPR pipeta uvlači i vraća ponovo u isti bunarić. Prilikom prolaska 4-metilumbeliferil fosfata kroz SPR, alkalna fosfataza hidrolizuje ovaj supstrat u fluorescentni produkt 4-metil-umbeliferon. Fluorescencija se meri dva puta za svaki ispitivani uzorak – prvo čitanje predstavlja pozadinsku vrednost samog supstrata (eng. *background reading*), dok se drugo čitanje izvršava na 450 nm, nakon inkubacije supstrata i enzima u okviru SPR pipete.

Nivo ispitivanih antitela u uzorku direktno je proporcionalan intenzitetu izmerene fluorescencije. Relativna vrednost fluorescencije (eng. *relative fluorescence value*, RFV) dobija se kada se od vrednosti fluorescencije ispitivanog uzorka oduzme *background* vrednost. Krajnje

rezultate, u vidu indeksa, aparat automatski računa na osnovu vrednosti standarda, iz važeće kalibracije, i vrednosti ispitivanog uzorka, i to putem sledeće formule:

$$\text{Rezultat testa} = \frac{\text{RFV uzorka}}{\text{RFV standarda}}$$

**Tabela 3-1.** Tumačenje rezultata SARS-CoV-2 IgG II VIDAS i SARS-CoV-2 IgM VIDAS testova.

Indeks	Tumačenje
< 1,00	Negativan rezultat
≥ 1,00	Pozitivan rezultat

Tumačenje rezultata testa prikazano je u Tabeli 3-1. Indeks od jedne jedinice, po uputstvima proizvođača, procenjen je kao ekvivalentan vrednosti od 20,33 BAU/mL (eng. *binding antibody units*, BAU) prvog internacionalnog standarda za detekciju anti-SARS-CoV-2 antitela (Svetska zdravstvena organizacija, NIBSC, kod 20/136). Usled toga, vrednosti indeksa RBD-IgG antitela u okviru ovog istraživanja, preračunate su i prikazane kao BAU/mL uz pomoć faktora korekcije od 20,33.

### 3.6. Određivanje ukupnih IgM antitela specifičnih za RBD domen

RBD-specifična IgM antitela, detektovana su komercijalnim VIDAS SARS-CoV-2 IgM testom (*bioMérieux*, Marcy-l'Étoile, Francuska), baziranim na identičnom ELFA principu kao kod testa za detekciju RBD-specifičnih IgG antitela, na automatizovanoj mini VIDAS platformi.

U bunarić za uzorak ukapava se 100 µL ispitivanog uzorka, a svi naredni koraci identični su kao i kod IgG II testa (Slika 3-3). Jedina razlika, predstavlja korak konjugacije – u ovom testu koriste se mišja monoklonska anti-humana IgM antitela, konjugovana sa alkalnom fosfatazom. SPR pipete takođe su i u ovom testu presvučene rekombinovanim SARS-CoV-2 antigenom, RBD domenom S proteina.

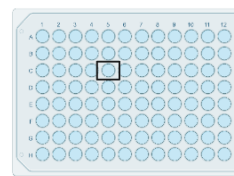
Rezultati se, analogno SARS-CoV-2 IgG II testu, dobijaju nakon dvostrukog merenja fluorescencije u kivetu, prvo merenjem pozadinske vrednosti supstrata a zatim i fluorescencije ispitivanog uzorka. Razlikom ove dve vrednosti dobija se RFV uzorka, a zatim se daljim deljenjem sa RFV vrednošću važećeg standarda, dobija vrednost indeksa za dat uzorak. Tumačenje dobijenih rezultata prikazano je u Tabeli 3-1. Rezultati se po uputstvu proizvođača izražavaju kao indeks i tako su prikazani u okviru ovog istraživanja.

### 3.7. Određivanje ukupnih IgG antitela specifičnih za N protein

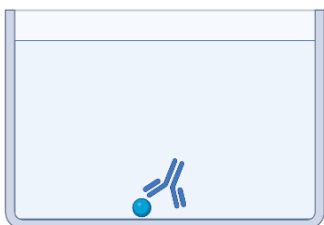
Ukupna IgG antitela specifična za N protein detektovana su komercijalnim ELISA testom (*EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika*, Libek, Nemačka). Test je zasnovan na principu indirektnog ELISA testa. Dno mikrotitracionih ploča obloženo je modifikovanim nukleokapsidnim proteinom SARS-CoV-2. Nakon inkubacije sa uzorkom, ukoliko u istom postoje IgG antitela specifična za N protein, vezaće se za samo dno bunarića. Ispiranjem, nevezane komponente će se odbaciti, a zatim se za ispitivana antitela u uzorku vezuje konjugat - peroksidazom obeležena anti-humana IgG antitela. Peroksidaza po dodatku hromogen/supstrata (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dovodi do enzimske reakcije i oksidacije TMB reagensa, menjajući boju u plavu. Ova reakcija se zaustavlja dodavanjem sumporne kiseline, kada se boja menja u žutu (Slika 3-4, 3-5).

# ELISA

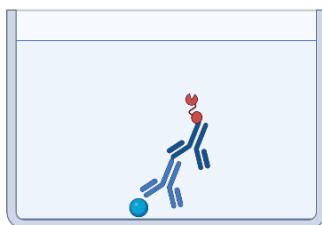
## Detekcija N-specifičnih IgG antitela



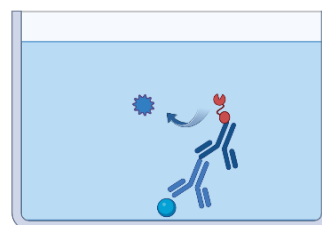
- 1 Na dnu bunarića nalaze se nukleokapsidni proteini kao antigeni, za koje se vezuju N-specifična IgG antitela ukoliko postoje u uzorku,



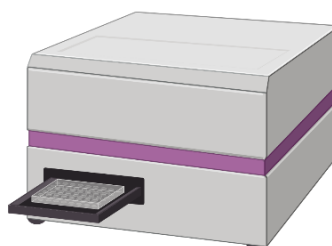
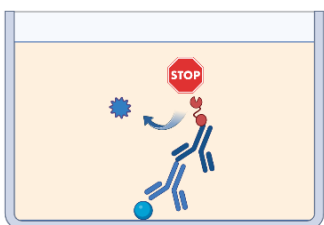
- 2 Dodavanjem konjugata, za N-specifična antitela vezuju se anti-humana IgG antitela, konjugovana sa peroksidazom.



- 3 Po dodatku hromogen/supstrata (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dolazi do enzimске reakcije i promene boje u plavu.



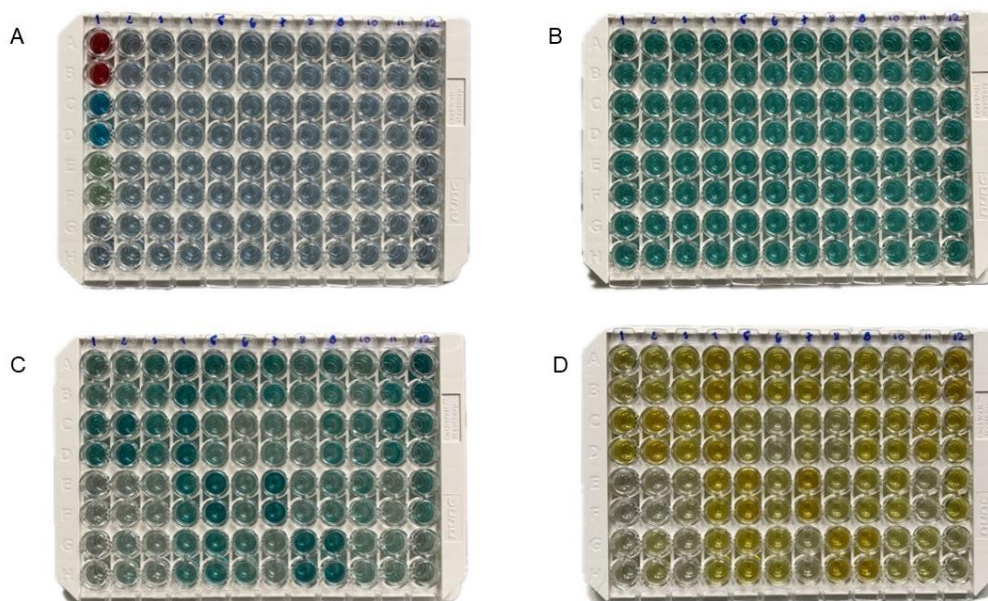
- 4 Dodavanjem HCl, reakcija se zaustavlja, a boja se menja u žutu.



Rezultati se očitavaju nakon zaustavljanja reakcije na 450nm i 620nm.

**Slika 3-4.** Shematski prikaz principa indirektnog ELISA testa za detekciju N-specifičnih IgG antitela. Slika je napravljena uz pomoć *BioRender.com* programa.

Ovaj test je rađen ručno, na mikrotitracionim ELISA pločama od 96 bunara (Slika 3-5). Procedura testa zahtevala je prvo temperiranje svih komponenti komercijalnog kompleta, a zatim su ispitivani uzorci prvo razblaženi puferom za uzorke u odnosu 1:101. U 1mL pufera, ukapavano je 10 $\mu$ L ispitivanog seruma, a zatim dobro izmešano na vorteksu. U mikrotitracionu ploču sipano je po 100  $\mu$ L pozitivne i negativne kontrole, kalibratora i razblaženih uzoraka po prethodno pripremljenom planu testiranja. Sve kontrole, kalibrator i uzorci testirani su u duplikatu, po preporuci proizvođača. Po ukapavanju, ploča je zatvarana zaštitnom folijom i inkubirana na 37°C, sat vremena. Nakon detaljnog ispiranja u tri ciklusa, u bunariće ELISA ploče sipano je po 100  $\mu$ L konjugata, kada je ploča ponovo zatvorena folijom i inkubirana na sobnoj temperaturi (18-25°C), 30 minuta. Ponovnim ispiranjem, nevezane komponente su odbačene, a zatim je u svaki bunarić dodato po 100  $\mu$ L hromogen/supstrata, kada je usledila inkubacija od 15 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Za zaustavljanje reakcije ukapano je po 100  $\mu$ L 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, prateći redosled dodavanja hromogena. Merenje apsorbance izvršeno je na ELISA čitaču (*Thermo Multiskan EX*) na talasnoj dužini od 450 nm, sa korekcijom i referentnom talasnom dužinom na 620 nm, odmah po zaustavljanju reakcije.



**Slika 3-5.** Prikaz etapa u izvođenju EUROIMMUN testa za detekciju N-specifičnih IgG antitela. Prvobitno su sipane kontrole, kalibrator i razblaženi uzorci u duplikatu (A), a zatim je nakon inkubacije i ispiranja dodat konjugat (B). Posle ponovne inkubacije i dodatnog ispiranja, u bunariće ploče dodat je hromogen (C), a enzimska reakcija je zaustavljena sumpornom kiselinom 15 minuta kasnije (D).

Vrednost očitana na 620 nm, kao korekcija, oduzima se od vrednosti očitane na 450 nm i dobija konačna očitana vrednost uzorka. Zatim se, radi dalje analize rezultata, kako su svi uzorci testirani u duplikatu, izračuna srednja vrednost za sve duplikate. Radi očitavanja rezultata kao semikvantitativnih, po uputstvu proizvođača, primenjuje se sledeća formula:

$$\text{Odnos} = \frac{\text{Ekstinkcija kontrole ili uzorka pacijenta}}{\text{Ekstinkcija kalibratora}}$$

Tumačenje rezultata prikazano je u Tabeli 3-2. Rezultati u okviru ove studije izraženi su semikvantitativno, kao odnos ekstinkcija.

**Tabela 3-2.** Tumačenje rezultata EUROIMMUN SARS-CoV-2 testa za detekciju ukupnih IgG antitela specifičnih za N protein.

Odnos	Tumačenje
< 0,8	Negativan rezultat
≥ 0,8 do <1,1	Graničan rezultat
≥ 1,1	Pozitivan rezultat

### 3.8. Određivanje neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen

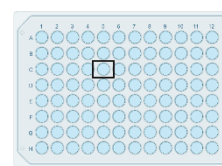
Detekcija neutrališućih antitela specifičnih za RBD domen vršena je komercijalnim surogat testom neutralizacije *cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit*, GenScript, Nju Džerzi, SAD. U okviru kompleta nalazi se rekombinovani RBD domen SARS-CoV-2, konjugovan sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) (HRP-RBD), kao i humani protein - ACE2 receptor. Naime, ovaj test je zasnovan na direktnoj interakciji HRP-RBD i ACE-2, koja se odigrava

na ELISA ploči, i može biti blokirana od strane visoko specifičnih neutrališućih antitela, ukoliko su ista prisutna u uzorku.

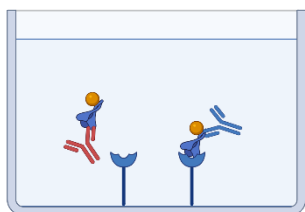
Test je u okviru ove studije rađen ručno, sa dve prazne, sterilne mikrotitracione ploče i pločom koja je dobijena u okviru kompleta, sa dnom obloženim ACE-2 proteinom. Prvi korak prilikom započinjanja procedure testa, osim temperiranja svih uzoraka i reagenasa, jeste pravljenje HRP-RBD rastvora. Neophodno je razblažiti HRP-RBD sa puferom za razblaživanje u odnosu 1:1000. Uzorci i kontrole su testirani u duplikatu, po preporuci proizvođača. U prvoj sterilnoj mikrotitracionoj ploči, potrebno je primarno razblažiti sve uzorke i kontrole u odnosu 1:9, po pripremljenom planu testiranja. U novu, sterilnu mikrotitracionu ploču, sipaju se uzorci i rastvor HRP-RBD u odnosu 1:1. Prvo se doda po 60  $\mu\text{L}$  HRP-RBD rastvora u svaki bunarić, a zatim prebaciti 60  $\mu\text{L}$  razblaženih uzoraka iz prethodne mikrotitracione ploče, nakon čega se ova mešavina inkubira na 37°C, 30 minuta, da bi došlo do vezivanja antitela specifičnih za HRP-RBD kompleks.

## Surogat neutralizacioni test

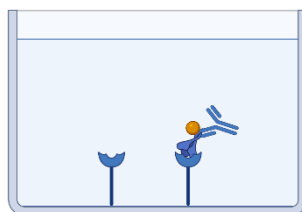
### Detekcija neutrališućih antitela



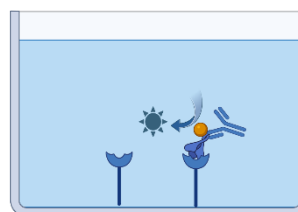
1 U bunarić se dodaje uzorak prethodno inkubiran sa HRP-RBD kompleksom. Ukoliko neutrališuća antitela postoje u uzorku, sprečiće vezivanje HRP-RBD kompleksa za ACE2 receptore na dnu bunarića.



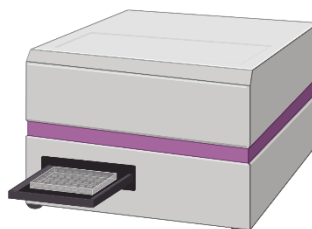
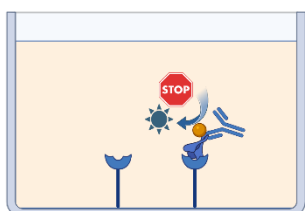
2 Nakon ciklusa ispiranja, za HRP-RBD/ACE2 kompleks ostaju vezana antitela koja nisu neutrališuća.



3 Po dodatku supstrata (TMB), usled prisustva HRP peroksidaze, dolazi do enzimske reakcije i promene boje u plavu.



4 Dodavanjem HCl, reakcija se zaustavlja, a boja se menja u žutu.



Rezultati se očitavaju nakon zaustavljanja reakcije na 450nm i 620nm.

Očitana vrednost obrnuto je proporcionalna vrednosti prisutnih neutrališućih antitela.

**Slika 3-6.** Princip rada surogat neutralizacionog testa. Slika je napravljena uz pomoć *BioRender.com* programa.

Nakon inkubacije, iz ploče se prebacuje 100  $\mu\text{L}$  smeše u ploču koja je deo kompleta testa, u kojoj se na dnu bunarića nalazi ACE2 protein. Ova ploča se takođe inkubira na 37°C, ali 15 minuta, nakon čega se vrši ciklus ispiranja četiri puta. Tokom ispiranja, nevezani HRP-RBD kompleksi, ali i svaki HRP-RBD vezan za antitela koja nisu neutrališuća, ostaju na dnu ploče, dok se ciljna neutrališuća antitela vezana za HRP-RBD gube tokom ispiranja. Posle ispiranja, dodaje se 100  $\mu\text{L}$  TMB u svaki bunarić i ploča se inkubira na 20-25°C, 15 minuta, u mraku. Peroksidaza vezana za RBD, oksiduje TMB, što dovodi do pojave plave boje. Dodavanjem 50  $\mu\text{L}$  hlorovodonične kiseline reakcija se zaustavlja i boja se menja u žutu. Ploča se odmah čita na ELISA čitaču, na 450 nm, sa korekcijom na 620 nm. Dobijena apsorbancija obrnuto je proporcionalna nivou SARS-CoV-2 neutrališućih antitela (Slika 3-6).

Pre analize rezultata, proverava se kvalitet samog testa. Očitane apsorbance (eng. *optical density*, OD) morale bi iznositi > 1,0 za pozitivnu kontrolu, odnosno < 0,3 za negativnu kontrolu. Ukoliko kontrole ispunjavaju ovaj uslov, pristupa se interpretaciji rezultata. Za određivanje procenta inhibicije, korišćena je sledeća formula:

$$\text{Procenat inhibicije} = \left(1 - \frac{\text{OD vrednost uzorka}}{\text{OD vrednost negativne kontrole}}\right) \times 100$$

Princip tumačenja rezultata, prema uputstvu proizvođača, prikazan je u Tabeli 3-3.

**Tabela 3-3.** Tumačenje rezultata cPASS GenScript testa za detekciju neutrališućih IgG antitela specifičnih za RBD.

Procenat inhibicije	Tumačenje
< 30%	Negativan rezultat
≥ 30%	Pozitivan rezultat

### 3.9. Statistička analiza

U ovoj studiji su korišćene metode deskriptivne i inferencijalne statistike. Od metoda deskriptivne statistike upotrebljene su: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (standardna devijacija i interkvartilni rang) i relativni brojevi. Normalnost raspodele podataka analizirana je Kolmogorov-Smirnovim i Šapiro-Vilkovim testovima, a zatim i grafičkim prikazom – Q-Q dijagramom. U zavisnosti od broja opservacija, učestalosti su poređene Hi-kvadrat testom ili Fišerovim testom tačne verovatnoće, a numeričke varijable t-testom ili testom sume rangova – Man-Vitnijev test, u zavisnosti od distribucije. Korelacija je analizirana Spirmanovim testom.

Poređenje nivoa antitela između različitih grupa, izvršeno je upotrebom Kraskal-Volisovog testa sa Danovim *post-hoc* testom. Poređenje nivoa antitela između dve vremenske tačke, u vidu parnih uzoraka u okviru grupe/podgrupe, izvršeno je Vilkoksonovim testom ekvivalentnih parova ili t-testom za vezane uzorke, u zavisnosti od distribucije. Radi uočavanja tipa kinetike antitela na uzorcima kovid-19 grupe, tokom vremenskog perioda praćenja, na dijagramu rasipanja (eng. *scatter plot*) je primenjena neparametarska lokalna regresija (eng. *locally estimated scatterplot smoothing*, LOESS), sa 95% intervalom poverenja (eng. *confidence interval*, CI). Za analizu kinetike i nivoa IgG antitela u zavisnosti od različitih faktora (kao što su biološki pol, godine, tip vakcine, vremenska tačka), upotrebljen je linearni miks model (eng. *linear mixed model*, LMM). Modeli su prilagođeni koristeći ograničenu maksimalnu verovatnoću (eng. *restricted maximum likelihood*, REML), a t-test vrednosti za fiksne efekte izračunate su pomoću *Satterthwaite* aproksimacije. Pretpostavke modela su proverene korišćenjem dijagnostičkih grafika rasipanja reziduala.

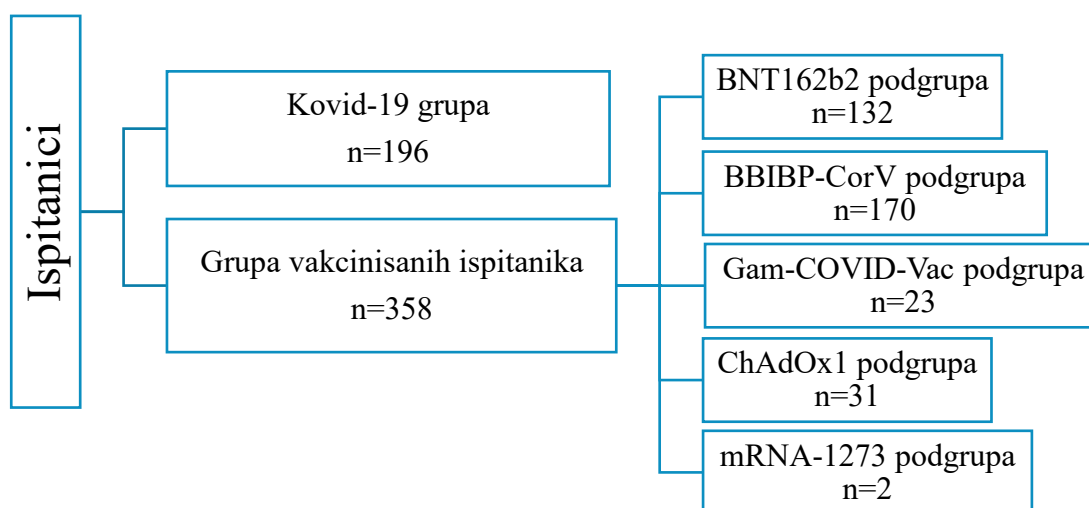
Statistička značajnost u ovoj studiji bila je 0,05. Za statističke analize i pravljenje grafika korišćeni su: *GraphPad Prism for Windows*, verzija 8.0, *GraphPad Software*, La Džola, SAD i *JASP* (verzija 0.19.3), *JASP Team 2024*, Amsterdam, Holandija. Za LMM upotrebljen je R programski jezik (verzija 5.4.0), koristeći *lmerTest* paket, dok su prateći grafici koji su opisivali trendove i poređenje procenjenih srednjih vrednosti napravljeni u *JASP* programu.

## **4. REZULTATI**

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su ispitanici koji su inicijalno klasifikovani u dve primarne grupe na osnovu kovid-19 statusa i/ili vakcinacije. U okviru svake grupe prvobitno su prikazani demografski podaci i opšti podaci, a zatim praćenje RBD-specifičnih IgG antitela, RBD-specifičnih IgM antitela, primena linearnih miks modela na kinetiku, kao i posebni odeljci svojstveni svakoj grupi i/ili podgrupi. Na Slici 4-1 prikazana je podela ispitanika po glavnim grupama.

Radi praćenja kinetike, odnosno nivoa RBD-specifičnih antitela kroz vreme, primenjeni su nešto striktniji uslovi za uključanje u analizu (videti Materijal i metode, odeljak 3.4), dok se ukupan broj prikupljenih uzoraka koristio za demografsku analizu, prikaz kriva kinetike, kao i analizu neželjenih reakcija na vakcinu, incidenciju reinfekcija i infekcija nakon vakcinacije. Broj ispitanika u okviru svake analize naznačen je na početku odgovarajućeg pasusa.

Poređenje humoralnog imunskog odgovora vršeno je po vremenskim tačkama unutar svake grupe ispitanika, između podgrupa, ali i između glavnih grupa – grupe nevakcinisanih ispitanika nakon SARS-CoV-2 infekcije i grupe vakcinisanih ispitanika, u zavisnosti od primljene vakcine.



**Slika 4-1.** Shema podele ispitanika u grupe i podgrupe, sa prikazanim brojem ispitanika (n).

#### 4.1. Grupa nevakcinisanih ispitanika nakon SARS-CoV-2 infekcije

Grupa nevakcinisanih ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (skr. kovid-19 grupa) obuhvatala je ukupno 196 ispitanika (Tabela 1). U okviru ove grupe, na osnovu anamnestičkih podataka i inicijalnih seroloških testova, ispitanici su klasifikovani u sledeće podgrupe:

- Podgrupa 1 - ispitanici kod kojih je kovid-19 potvrđen dijagnostičkim testom, odnosno pozitivnim PCR ili brzim antigenskim testom (Ag test) (n=108),
- Podgrupa 2 - ispitanici kod kojih kovid-19 nije potvrđen dijagnostičkim testom, ali su tokom ove studije detektovana IgM i/ili IgG antitela specifična za RBD domen S proteina SARS-CoV-2, uz pozitivne anamnestičke podatke o postojanju karakterističnih respiratornih simptoma i/ili direktnog kontakta sa SARS-CoV-2 pozitivnom osobom (n=72),
- i Podgrupa 3 - ispitanici kod kojih je dijagnostički test bio pozitivan (PCR ili brzi Ag test) ili ELISA test u drugoj laboratoriji, neposredno nakon početka bolesti, ali u okviru ove studije nisu detektovana antitela specifična za RBD S proteina SARS-CoV-2 (n=16).

##### 4.1.1. Demografski podaci kovid-19 grupe

U Tabeli 4-1. prikazani su osnovni demografski podaci čitave kovid-19 grupe. Podgrupe se nisu statistički značajno razlikovale po starosti ispitanika (Kruskal-Volisonov test,  $p=0,06$ ), niti po raspodeli polova unutar podgrupa (Hi-kvadrat,  $p=0,19$ ). Štaviše, gledano na ukupnom broju ispitanika kovid-19 grupe, muški i ženski pol je zastupljen u istom odnosu. Deo ispitanika u sastavu kovid-19 grupe se nakon vakcinacije opredelio da nastavi svoje učešće u studiji (35,20%), na osnovu čega su dalje praćeni u okviru grupe vakcinisanih.

**Tabela 4-1.** Prikaz osnovnih demografskih karakteristika grupe nevakcinisanih ispitanika nakon SARS-CoV-2 infekcije.

Podgrupa	Broj ispitanika	Pol		Godine starosti	Broj vakcinisanih*
	N (%)	M (%)	Ž (%)	Medijana (IQR)	N (%)
Podgrupa 1	108 (55,10)	60 (55,56)	48 (44,44)	44,50 (33,00-55,00)	48 (44,44)
Podgrupa 2	72 (36,74)	32 (44,44)	40 (55,56)	38,00 (30,25-48,00)	20 (27,78)
Podgrupa 3	16 (8,16)	6 (37,50)	10 (62,50)	37,00 (33,00-44,25)	1 (6,25)
Ukupno	196 (100,00)	98(50,00)	98 (50,00)	40,00 (33,00-53,00)	69 (35,20)

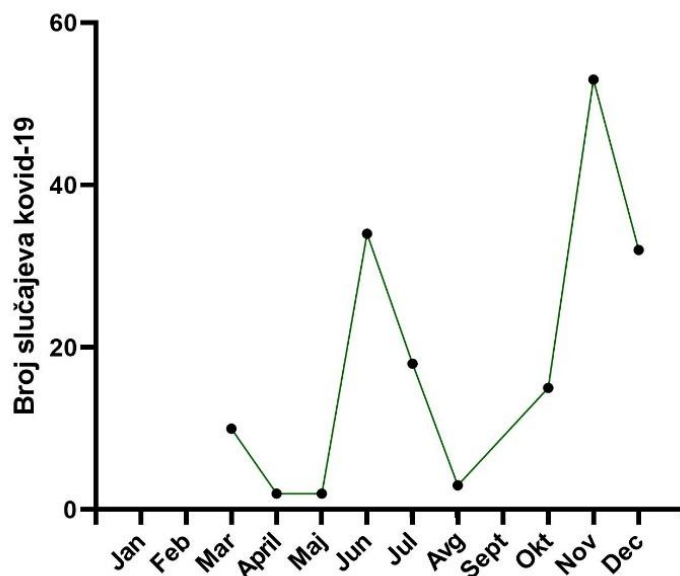
\*Broj ispitanika koji je kasnije vakcinisan i praćen dalje u okviru grupe vakcinisanih u ovoj studiji. N – broj ispitanika, M – muški pol, Ž – ženski pol, IQR – interkvartilni opseg.

##### 4.1.2. Učestalost infekcije SARS-CoV-2 tokom perioda praćenja

Najveći broj kovid-19 slučajeva u ovoj studiji u okviru grupe nevakcinisanih, čak 87,24% (171/196), zabeležen je tokom 2020. godine. Uvođenjem vakcinacije, broj ispitanika u kovid-19 grupi je opadao, usled čega je mali broj novih slučajeva, kod prethodno naivnih ispitanika, registrovano tokom 2021. godine. Naime, samo 10,71% (21/196) novih kovid-19 ispitanika regrutovano je u 2021. godini, pri čemu u taj broj nisu uključeni ispitanici sa reinfekcijom i ispitanici inficirani nakon vakcinacije, koji su takođe registrovani tokom ovog istraživanja, već isključivo prethodno neinficirani i nevakcinisani (tzv. naivni), *de novo* inficirani ispitanici. Od ukupnog broja ispitanika u

okviru kovid-19 grupe, kod šest ispitanika nisu postojali anamnestički podaci o direktnom kontaktu sa inficiranom osobom, niti je mogao biti utvrđen datum početka bolesti.

Na Slici 4-2. prikazan je broj slučajeva kovid-19, registrovanih u ovoj studiji tokom 2020. godine. Uočavaju se dva skoka, koja odgovaraju drugom i trećem talasu kovid-19 pandemije u Srbiji.



Slika 4-2. Broj slučajeva kovid-19 po mesecima tokom 2020. godine.

#### 4.1.2.1. Zastupljenost simptoma kovid-19

Od 196 ispitanika iz kovid-19 grupe, ukupno je 17 (8,67%) imalo asimptomatsku infekciju. Sa druge strane, simptomatske infekcije najčešće su se ispoljavale kao povišena telesna temperatura, malaksalost, mijalgija i gubitak čula ukusa i/ili mirisa (Tabela 4-2).

Povišena telesna temperatura češće je prijavljivana u prvoj podgrupi potvrđenih SARS-CoV-2 infekcija, u odnosu na drugu i treću podgrupu ( $p_{1:2}=0,002$ ,  $p_{1:3}=0,004$ ). Takođe, malaksalost, mijalgija, pneumonija i hospitalizacija značajno češće su notirani u podgrupi 1 u odnosu na podgrupu 2 ( $p_{malaksalost}=0,002$ ,  $p_{mijalgija}=0,0005$ ,  $p_{pneumonija}=0,029$ ,  $p_{hospitalizacija}=0,009$ ) (Tabela 4-2).

Određivanje ozbiljnosti i težine kliničke slike kovid-19 u ovoj studiji ograničeno je isključivo na postojanje dijagnostikovane pneumonije i hospitalizacije. Kada se kao parametri ozbiljnosti uračunaju slučajevi dijagnostikovane penumonije koja je lečena u kućnim uslovima, hospitalizacije zbog pneumonije, ali i hospitalizacije koje nisu vršene zbog pneumonije, procenat prisustva teške kliničke slike iznosi 22,22% (24/108) u prvoj, odnosno 6,94% (5/72) u drugoj podgrupi, što predstavlja statistički značajnu razliku ( $p=0,007$ ). Osim toga, jedino su godine starosti korelirale statistički značajno sa težinom kliničke slike ( $r=0,287$ ,  $p < 0,001$ ).

U Tabeli 4-2. osim učestalosti simptoma po podgrupama, navedeni su i anamnestički podaci o rizičnim kontaktima ispitanika. U gotovo polovini slučajeva u okviru svake podgrupe, ispitanici su prijavili poznat rizičan kontakt, koji je rezultirao infekcijom SARS-CoV-2.

**Tabela 4-2.** Učestalost pojedinačnih simptoma i poznat rizičan kontakt kod ispitanika kovid-19 grupe.

		Podgrupa 1 N=108	Podgrupa 2 N=72	Podgrupa 3 N=16
Poznat rizičan kontakt	n (%)	56 (51,85)	41 (56,94)	7 (43,75)
Asimptomatska infekcija	n (%)	2 (1,85)	14 (19,44)	1 (6,25)
Povišena temperatura	n (%)	95 (87,96)	49 (68,06)	9 (56,25)
Najviša izmjerena temperatura	Medijana (IQR)	38,00 (37,50-38,50)	37,85 (37,50-38,50)	37,60 (37,28-38,38)
Nosna kongestija i rinoreja	n (%)	12 (11,11)	4 (5,56)	2 (12,50)
Gastrointestinalne tegobe	n (%)	13 (12,04)	6 (8,33)	0
Gubitak čula ukusa i/ili mirisa	n (%)	52 (48,15)	29 (40,28)	10 (62,50)
Bol u grlu	n (%)	5 (4,63)	5 (6,94)	3 (18,75)
Malaksalost	n (%)	69 (63,89)	29 (40,28)	10 (62,50)
Mijalgija	n (%)	52 (48,15)	16 (22,22)	8 (50,00)
Kašalj	n (%)	30 (27,78)	20 (27,78)	3 (18,75)
Pneumonija	n (%)	21 (19,44)	5 (6,94)	0
Hospitalizacija	n (%)	16 (14,81)	2 (2,78)	0

N, n – broj ispitanika, IQR – interkvartilni opseg.

#### 4.1.3. Kinetika RBD-specifičnih IgG antitela

Tokom perioda praćenja nivoa RBD-specifičnih IgG antitela do godinu dana od početka simptoma, od ukupno svih ispitanika Podgrupe 1 i Podgrupe 2, šest ispitanika je postalo seronegativno (3,33%, 6/180). Medijana godina ispitanika koji su postali seronegativni iznosila je 42 (IQR 34,25-56,50) godine, a vreme od početka bolesti do seronegativizacije 145,5 (IQR 106,3-239,5) dana. Svi ispitanici imali su blage simptome tokom kovid-19, a dva slučaja (2/6) bila su asimptomatska. Medijana koncentracije antitela pri prvoj kontroli ovih ispitanika iznosila je 33,03 (IQR 25,47-40,87) BAU/mL. Osim toga, kod šest ispitanika (3,33%, 6/180) nisu nikada detektovana RBD-IgG antitela, nego isključivo RBD-IgM antitela, i ovi ispitanici biće opisani u posebnom odeljku.

Analiza kinetike RBD-specifičnih IgG antitela u kovid-19 grupi uključivala je sve seropozitivne ispitanike Podgrupe 1 i Podgrupe 2, kod kojih je bilo moguće utvrditi tačan datum početka infekcije (početak simptoma i/ili datum pozitivnog dijagnostičkog testa) ili tačan datum rizičnog kontakta kod asimptomatskih infekcija. Uzorci ispitanika koji su tokom praćenja imali očigledan porast nivoa antitela u sklopu reinfekcije, uz pozitivnu anamnezu o rizičnom kontaktu ili postojanju simptoma, nisu uključeni u dalju analizu kinetike. Uzorci su prikupljeni u šest vremenskih tačaka: tri nedelje, šest nedelja; tri, šest, devet i dvanaest meseci od početka simptoma (Tabela 4-3). Kada se izuzmu ispitanici čiji uzorci nisu spadali u opseg vremenskih tačaka, ukupan broj ispitanika Podgrupe 1 i Podgrupe 2 uključenih u analizu iznosio je 136. Svi uzorci van opsega navedenih

vremenskih tačaka nisu statistički analizirani u okviru praćenja kinetike po određenim vremenskim tačkama, ali su zbirno prikazani i analizirani u narednim odeljcima.

U srednje vrednosti koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela prikazanih u Tabeli 4-3., grupisane po gore navedenim vremenskim tačkama, nisu uključeni uzorci ispitanika koji su se u toj vremenskoj tački negativizirali.

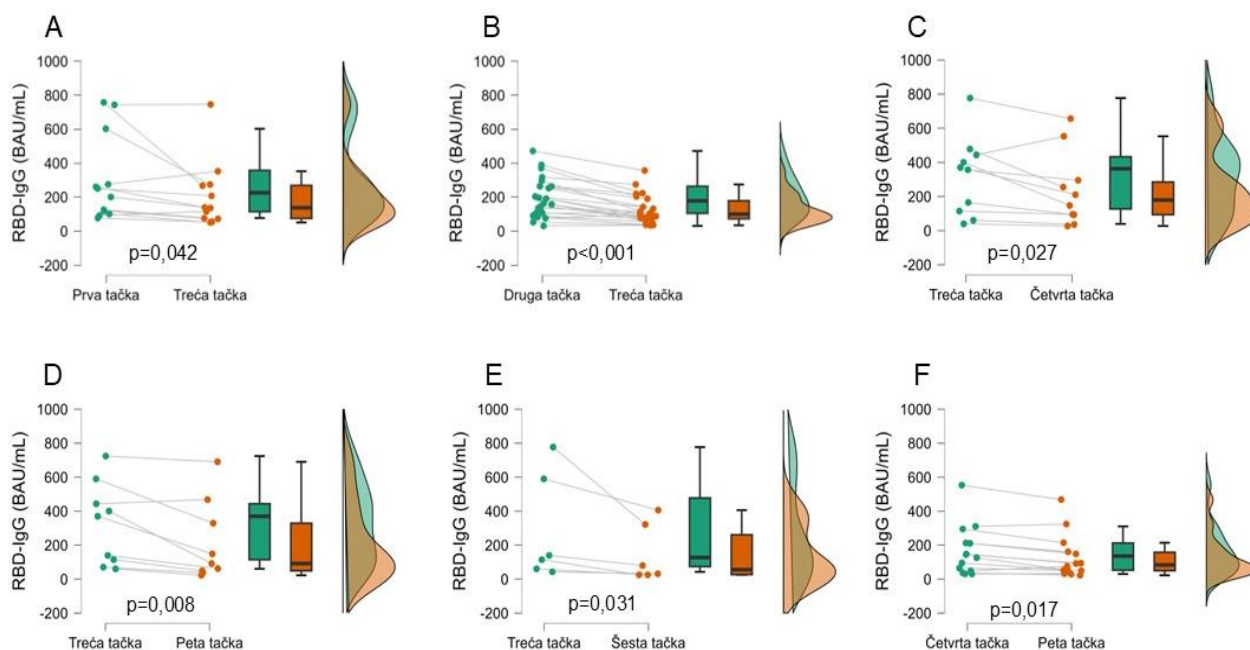
**Tabela 4-3.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela kovid-19 ispitanika sa odgovarajućim interkvartilnim opsegom, po vremenskim tačkama praćenja.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD- IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG (n/N)*
1 Tri nedelje	25,05 ± 3,33	122,69 (64,19-250,42)	22/22
2 Šest nedelja	38,81 ± 4,02	148,41 (93,73-258,50)	31/31
3 Tri meseca	85,47 ± 10,10	134,18 (71,51-322,48)	74/78
4 Šest meseci	182,64 ± 5,89	112,83 (62,87-265,25)	36/37
5 Devet meseci	275,19 ± 11,37	83,15 (42,39-157,35)	27/28
6 Dvanaest meseci	349,27 ± 17,56	67,90 (28,66-90,47)	11/12

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg, n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Uzevši u obzir da su ispitanici bili uključeni u studiju po dolasku (ne nužno uvek od prve vremenske tačke), ali i da nisu dolazili uvek u tačno vreme kontrole, uzorci van ispitivanog opsega za odgovarajuću vremensku tačku nisu bili uključeni u statističku analizu kinetike, usled čega imamo ispitanike sa samo jednim ili dva uzorka i nebalansirani broj uzoraka po vremenskoj tački praćenja (videti Materijal i metode, odeljci 3.3. i 3.4.). Broj pozitivnih uzoraka koji je prikazan u Tabeli 4-3. se odnosi na broj uzoraka u okviru određene vremenske tačke i zavisi od broja ispitanika koji su tada došli na kontrolu. Shodno tome, poređenje koncentracije antitela između tačaka praćenja vršeno je Vilkoksonovim testom ekvivalentnih parova, kao neparametarskom analizom koja poredi dva vezana tj. zavisna uzorka.

Na Slici 4-3. grafički je predstavljeno poređenje koncentracija IgG antitela u dvema sukcesivnim vremenskim tačkama, kod ispitanika od kojih su uzeti vezani uzorci, prikupljeni u te obe vremenske tačke. Između prve i treće (Slika 4-3 A;  $p=0,042$ ), druge i treće (Slika 4-3 B;  $p<0,001$ ), treće i četvrte (Slika 4-3 C,  $p=0,027$ ), treće i pete (Slika 4-3 D;  $p=0,008$ ), treće i šeste (Slika 4-3 E;  $p=0,031$ ) i četvrte i pete tačke (Slika 4-3 F;  $p=0,009$ ) postoji statistički značajna razlika u koncentraciji RBD-specifičnih IgG antitela, dok ta razlika ne postoji između četvrte i pete tačke u poređenju sa šestom tačkom. Kada se gledaju samo vezani uzorci, uočava se da dolazi do pada koncentracije antitela kroz vremenske tačke. Broj parnih uzoraka između prve i druge tačke nije bio dovoljan za analizu.



**Slika 4-3.** Vezani uzorci ispitanika kovid-19 grupe sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) u različitim vremenskim tačkama: A – tri nedelje i tri meseca, B – šest nedelja i tri meseca, C – tri meseca i šest meseci, D – tri meseca i devet meseci, E – tri meseca i dvanaest meseci, F – šest meseci i dvanaest meseci od datuma početka simptoma i/ili pozitivnog dijagnostičkog testa. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.1.3.1. Nalaz N-specifičnih IgG i neutrališućih antitela kod ispitanika kojima je nivo RBD-IgG antitela pao ispod praga detekcije tokom perioda praćenja

RBD-seronegativni ispitanici (n=6), čiji su se nalazi negativizirali tokom perioda praćenja, prikazani su u Tabeli 4-4. Iz vezanih uzoraka može se uočiti da su svi ispitanici na prethodnoj kontroli već imali nalaz veoma niskog indeksa RBD-IgG antitela. Gotovo kod svih ispitanika (5/6) nalaz N-IgG antitela bio je pozitivan u prvom uzorku, dok je na narednoj kontroli ostao pozitivan u polovini slučajeva (3/6), sa uočenim blagim padom (ali ne statistički značajnim, p=0,26). Procenat inhibicije neutrališućih antitela bio je negativan u svim vezanim uzorcima, to jest i pre i posle negativizacije RBD-IgG nalaza. Prisustvo N-IgG antitela, ali i niskih nivoa RBD-IgG antitela, nisu bili povezani sa prisustvom neutrališućih antitela.

**Tabela 4-4.** Indeks RBD-specifičnih IgG antitela, N-specifičnih IgG antitela i procenat inhibicije neutrališućih antitela u vezanim uzorcima ispitanika pre i nakon ustanovljene negativizacije RBD-IgG antitela. Sve pozitivne vrednosti su označene *bold* fontom, a granične *italic* fontom.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (indeks)		N-IgG antitela (odnos)		Neutrališuća antitela (% inhibicije)		Vremenski razmak između drugog uzorka i početka kovid-19 (dan)
	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle	
1	<b>1,03</b>	0,57	<b>3,281</b>	<b>2,815</b>	2,47	-3,52*	156
2	<b>1,32</b>	0,77	<b>3,189</b>	<b>1,503</b>	9,20	1,85	135
3	<b>1,05</b>	0,66	<b>2,944</b>	<b>2,858</b>	7,71	1,45	120
4	<b>1,95</b>	0,99	<i>1,026</i>	0,013	9,34	7,93	142
5	<b>1,81</b>	0,93	<b>1,401</b>	0,745	4,18	-0,66*	228
6	<b>1,08</b>	0,88	0,510	0,185	10,35	8,54	274

\*Vrednosti sa negativnim predznakom niže su od negativne kontrole testirane u istoj reakciji. Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

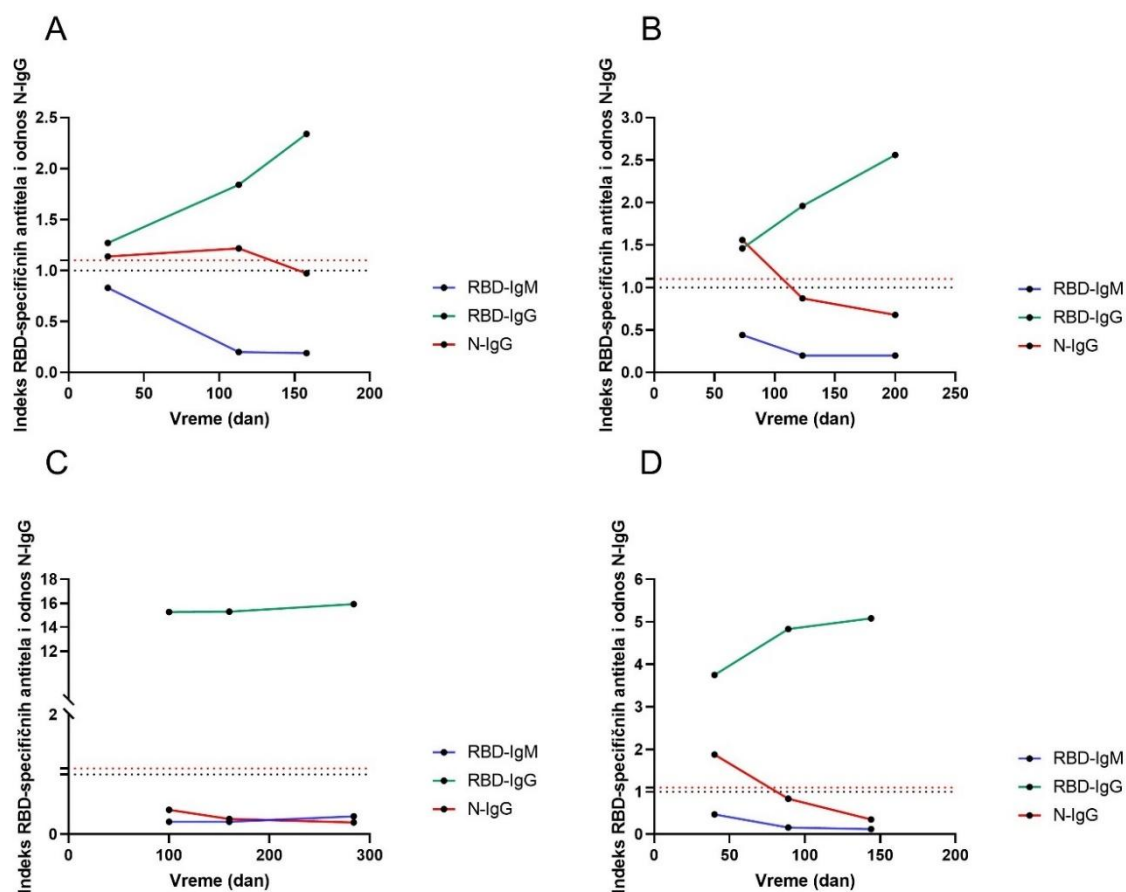
#### 4.1.3.2. Tipovi evolucije RBD-specifičnih IgG antitela u kovid-19 grupi

Tokom perioda praćenja uočena su dva tipa evolucije RBD-specifičnih IgG antitela u Podgrupi 1 i Podgrupi 2. Ukoliko posmatramo sve uzorke uzete u okviru ove studije, iako postoji opaženi trend pada nivoa antitela kroz vreme kod većine (85%, 153/180), uočene su fluktuacije u nivoima RBD-IgG antitela kod 28 ispitanika.

Kod 15 ispitanika (8,33%, 15/180) je uočen porast nivoa antitela najčešće zabeležen u prvih 150 dana nakon infekcije, dok je kod 13 ispitanika (7,22%, 13/180) primećen porast nešto kasnije i to do 360 dana nakon infekcije. Od toga, samo je kod četiri ispitanika (2,22%, 4/180) porast primećen na tri uzastopne kontrole, koji se može okarakterisati i kao stabilna koncentracija kroz vreme. Ova četiri ispitanika su stoga izdvojeno prikazana na Slici 4-4.

Radi razlikovanja od reinfekcije, ispitanicima je urađen i test za detekciju N-specifičnih IgG antitela u vezanim uzorcima, pre i iz uzorka gde je uočen skok RBD-IgG antitela. Uočen je statistički značajan pad u nivoima N-IgG antitela pri poređenju ovih vezanih uzoraka (Vilkoksonov test,  $p < 0,0001$ ). Uzorci koji su bili negativni u N-IgG testu, ostali su negativni i u sukcesivnom uzorku, osim u jednom slučaju gde je detektovana granična vrednost, tik iznad granice testa. Kod prethodno pozitivnih ispitanika došlo je do pada nivoa antitela i u dva slučaja do negativizacije nalaza. Prikaz vrednosti RBD-IgG antitela i N-IgG antitela nalazi se u Tabeli 4-5.

RBD-IgM antitela rađena su takođe u istim vezanim uzorcima, gde je kod 9 ispitanika uočen pad nivoa, u okviru kojih je u tri slučaja došlo do negativizacije, dok je kod jednog ispitanika uočeno održavanje na gotovo istom nivou. Kod ostalih 19 ispitanika, koji su inicijalno bili negativni, nije došlo do pojave pozitivnih nalaza.



**Slika 4-4.** Prikaz nivoa RBD-IgM, RBD-IgG i N-IgG antitela za četiri pojedinačna ispitanika (A, B, C, D), kod kojih je na tri uzastopne kontrole primećen porast RBD-IgG antitela. Crnom isprekidanom linijom označena je granična vrednost testa od jednog indeksa, iznad kog se sve vrednosti za RBD-IgM i RBD-IgG smatraju pozitivnim. Crvenom isprekidanom linijom označena je granična vrednost za N-IgG (odnos od 1,1), iznad koje se sve vrednosti smatraju pozitivnim. Za potrebe grafičkog prikaza, vrednosti RBD-IgG antitela takođe su izražene kao indeks (vrednost indeksa 1 iznosi 20,33 BAU/mL).

**Tabela 4-5.** Medijana i interkvartilni opseg (IQR) koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) i nivoa N-specifičnih IgG antitela za dva sukcesivna uzorka 28 ispitanika sa fluktuacijama u nivou RBD-IgG antitela.

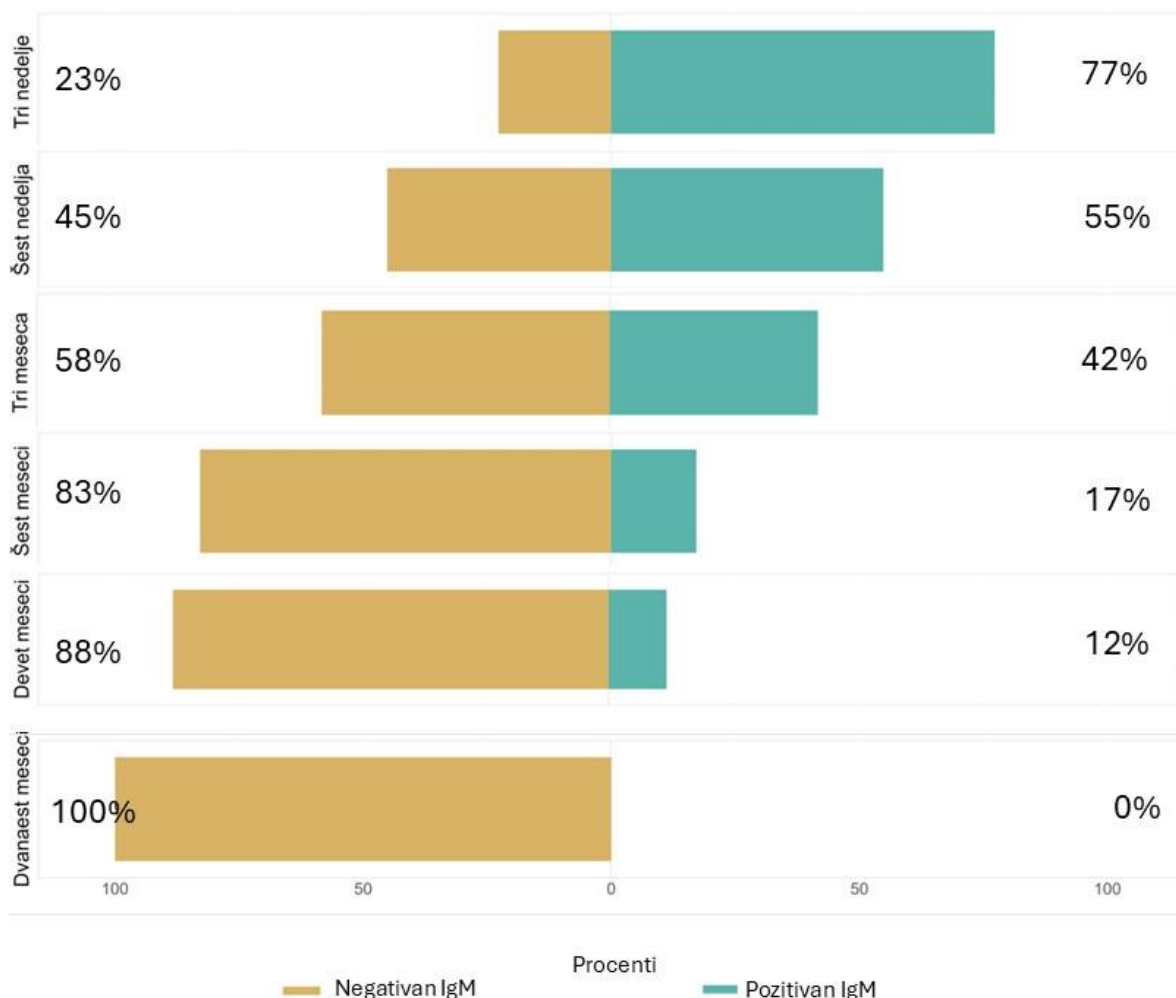
	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	n/N	N-IgG antitela izražena kao odnos (Med i IQR)	n/N
Prvi uzorak	85,69 (32,88-355,07)	28/28	2,90 (1,82-4,82)	18/28
Drugi uzorak	111,92 (40,81-404,67)	28/28	1,94 (1,22-3,15)	17/28

Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg, n/N - odnos ispitanika sa pozitivnim nalazom i ukupnog broja ispitanika. Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL; N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ .

#### 4.1.4. Kinetika RBD-specifičnih IgM antitela

Procenat pozitivnosti RBD-specifičnih IgM antitela bio je najveći u prvim vremenskim tačkama, od treće nedelje do tri meseca nakon infekcije, sa postepenim padom do devet meseci (Slika 4-5).

Vrednosti medijana nivoa RBD-specifičnih IgM antitela u svakoj vremenskoj tački, za isključivo pozitivne uzorke, prikazane su u Tabeli 4-6. Uočava se blagi pad nivoa antitela kroz vreme, sa platoon u četvrtoj i petoj tački praćenja. U tabeli nisu prikazane vrednosti za šestu vremensku tačku, odnosno dvanaest meseci nakon infekcije, zato što je 100% (12/12) testiranih uzoraka bilo negativno (Tabela 4-6, Slika 4-5). Na Slici 4-6. grafički su prikazani poređeni nivoi IgM antitela između vezanih uzoraka određenih vremenskih tačaka, na osnovu Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova. Statistički značajna razlika postoji između prve i treće (Slika 4-6 A;  $p=0,004$ ), druge i treće (Slika 4-6 B;  $p<0,001$ ) i treće i četvrte vremenske tačke (Slika 4-6 C;  $p=0,012$ ), dok između četvrte i pete tačke ne postoji statistički značajna razlika (Slika 4-6 D;  $p=0,673$ ), kao ni između pete i šeste vremenske tačke ( $p=0,250$ ). Između ostalih tačaka nije postojao dovoljan broj parnih uzoraka.

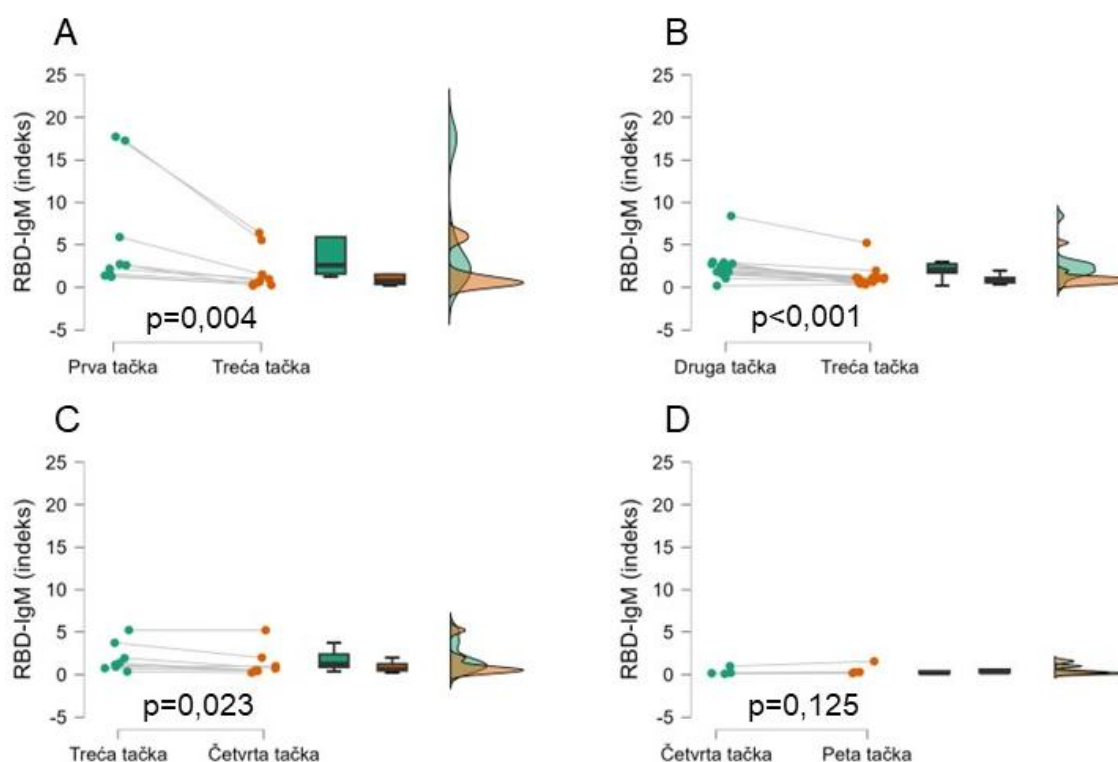


Slika 4-5. Pozitivnost RBD specifičnih IgM antitela u odnosu na vremensku tačku praćenja.

**Tabela 4-6.** Medijane nivoa RBD-specifičnih IgM antitela kovid-19 ispitanika sa odgovarajućim interkvartilnim opsegom, po vremenskim tačkama praćenja.

Vremenska tačka	Opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	Indeks RBD-IgM antitela (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgM antitela (n/N)
1 Tri nedelje	24,88 ± 2,83	3,18 (1,49-5,46)	17/22
2 Šest nedelja	38,18 ± 4,04	2,43 (1,83-2,97)	17/31
3 Tri meseca	82,92 ± 10,89	2,02 (1,25-5,32)	26/63
4 Šest meseci	180,83 ± 3,87	1,54 (1,39-2,81)	6/35
5 Devet meseci	260,50 ± 12,02	1,56 (1,95-2,35)	2/17

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg, n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgM antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. Ref. vrednosti: RBD-IgM, pozitivno  $\geq 1$ ;



**Slika 4-6.** Vezani uzorci ispitanika kovid-19 grupe sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgM antitela (indeks) u različitim vremenskim tačkama: A – tri nedelje i tri meseca, B – šest nedelja i tri meseca, C – tri meseca i šest meseci, D – šest meseci i devet meseci od datuma početka simptoma i/ili pozitivnog dijagnostičkog testa. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.1.4.1. Ispitanici sa pozitivnim RBD-IgM antitelima u odsustvu RBD-IgG antitela

U okviru Podgrupe 1 i Podgrupe 2 kovid-19 grupe kod šest ispitanika detektovana su RBD-specifična IgM antitela, u odsustvu RBD-specifičnih IgG antitela. Od šest ispitanika, infekcija je potvrđena u jednom slučaju PCR i u druga dva slučaja brzim Ag testom. Jedan ispitanik je imao asimptomatsku infekciju, dok je ostalih pet ispitanika prijavilo postojanje blažih simptoma.

Kod svih ispitanika rađeni su surogat neutralizacioni test i test detekcije N-specifičnih IgG antitela. Detektovano je prisustvo RBD-neutrališućih antitela kod tri ispitanika, dok su rezultati N-specifičnih IgG antitela bili granični kod dva, a pozitivni kod tri ispitanika (Tabela 4-7). Kod petog ispitanika, čija je infekcija jedina bila potvrđena PCR testom, uz pozitivan nalaz RBD-IgM antitela, nalaz N-specifičnih IgG antitela takođe je bio pozitivan (Tabela 4-7). Procenat inhibicije bio je tik iznad granice pozitivnosti (30%) kod ispitanika koji nemaju potvrđni dijagnostički test (33,84 % i 36,86 %), a nešto viši kod ispitanika sa pozitivnim PCR testom (71,66 %), dok je kod jedinog ispitanika bez simptoma procenat inhibicije bio negativan (25,17 %) (Tabela 4-7).

**Tabela 4-7.** Prikaz rezultata seroloških analiza kod ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgM antitela. Za ispitanike pod rednim brojem 1, 2, 3 i 4 prikazani su vezani uzorci.

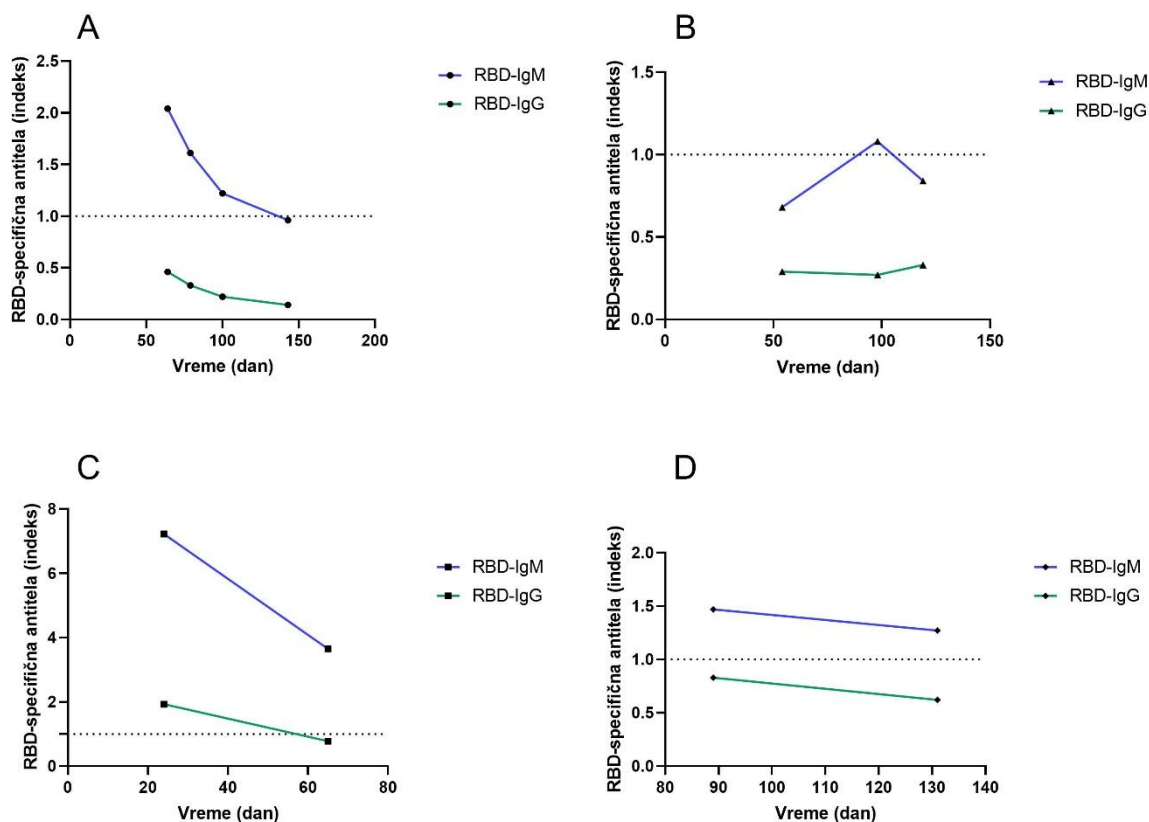
Ispitanik	RBD-IgG (indeks)	RBD-IgM (indeks)	N-IgG (odnos)	Neutrališuća antitela (% inhibicije)	Dan od početka simptoma ili pozitivnog testa
1	0,46	<b>2,04</b>	<b><i>0,896</i></b>	26,89	64
	0,22	<b>1,22</b>	<b><i>0,831</i></b>	<b>33,84</b>	100
	0,14	0,96	0,175	19,12	143
2	<b>1,93</b>	<b>7,22</b>	<b>1,848</b>	24,83	24
	0,78	<b>3,65</b>	<b><i>1,003</i></b>	9,38	65
3	0,27	<b>1,08</b>	0,714	25,17	98
	0,33	0,84	<b>1,116</b>	2,82	119
4	0,83	<b>1,47</b>	<b><i>0,808</i></b>	<b>36,86</b>	89
	0,62	<b>1,27</b>	0,765	13,39	131
5	0,95	<b>1,19</b>	<b>1,477</b>	19,90	70
6	0,52	<b>1,88</b>	0,674	<b>71,66</b>	184

Pozitivne vrednosti označene su *bold* fontom, a granične *italic* fontom. Ref. vrednosti: RBD-IgM, RBD-IgG pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos). Procenat inhibicije, pozitivno  $\geq 30\%$ .

U Tabeli 4-7. prikazani su i svi dostupni vezani uzorci za određene ispitanike, gde se može uočiti kod ispitanika pod rednim brojem 1 pad vrednosti N-IgG antitela uporedo sa padom RBD-IgM indeksa, dok je procenat inhibicije neutralizacije značajno varirao u zavisnosti od vremena uzorkovanja. Uočava se kod većine ispitanika (3/4 ispitanika sa dostupnim vezanim uzorcima) da je negativizacija ili pad nivoa indeksa RBD-IgM antitela bio praćen i padom vrednosti procenta inhibicije neutrališućih antitela, kao i padom N-IgG antitela. Međutim, u jednom slučaju (Tabela 4-7, ispitanik br. 3) detektovan je pozitivan nalaz N-IgG antitela, nakon prethodnog negativnog nalaza, uprkos padu svih ostalih ispitivanih vrednosti.

Na Slici 4-7. grafički su prikazani vezani uzorci ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgM testa, koji su se odazvali na naredne kontrole. Pod A i D prikazani su ispitanici sa pozitivnim nalazom RBD-IgM i negativnim nalazom RBD-IgG u uzastopnim uzorcima. Pod B prikazan je ispitanik kod kojeg je nalaz RBD-IgM antitela bio pozitivan u svega jednom uzorku tokom praćenja, dok kod ispitanika pod C nakon negativiziranja nalaza prethodno postojećih RBD-IgG antitela, ostaje pozitivan nalaz RBD-IgM antitela značajno iznad granice detekcije samog testa.

Osim gore opisanih ispitanika, još jedan ispitanik sa incidentalno utvrđenom asimptomatskom infekcijom, gde se nije mogao utvrditi tačan datum infekcije, imao je u dva sukcesivna uzorka veoma visoka RBD-IgM antitela, u prisustvu niskih koncentracija RBD-IgG antitela. U prvom uzorku indeks RBD-IgM antitela iznosio je 12,69 a koncentracija RBD-IgG 39,24 BAU/mL, dok je dve nedelje kasnije došlo do blagog pada u obe klase antitela, kada je indeks IgM antitela iznosio 11,4, a koncentracija IgG antitela 37,21 BAU/mL. U prvom uzorku procenat inhibicije neutrališućih antitela iznosio je čak 77,03%.



**Slika 4-7.** Prikaz vrednosti RBD-specifičnih IgM i RBD-specifičnih IgG antitela, izraženih kao indeks, za vezane uzorke četiri pojedinačna ispitanika (A, B, C, D), kod kojih je ustanovljeno prisustvo RBD-IgM antitela u odsustvu RBD-IgG antitela. Isprekidanom linijom označena je granična vrednost za oba testa (indeks od 1), iznad koje se sve vrednosti smatraju pozitivnim.

#### 4.1.5. Podgrupa 3 kovid-19 grupe

U Podgrupi 3 kovid-19 grupe nalaze se, kao što je već prethodno navedeno, ispitanici koji su imali potvrđen kovid-19 dijagnostički testom (PCR ili brzi Ag test) ili ELISA testom u drugoj laboratoriji, na početku bolesti, ali RBD-specifična antitela IgG i IgM klase nisu bila detektovana u njihovim uzorcima seruma u okviru ove studije. Od 16 ispitanika, koliko ih se nalazi u ovoj podgrupi, samo jedan ispitanik je imao u potpunosti asimptomatsku infekciju (6,25%, 1/16). Ostali ispitanici su imali blažu kliničku sliku, bez slučajeva hospitalizacije i/ili pneumonije (Tabela 4-2).

Ispitanici su prvi put uključeni u studiju u različitim periodima nakon infekcije, stoga je najveći broj prvih uzoraka dobijen u okviru druge tačke praćenja (6/16), zatim treće (5/16), četvrte (4/16) i na kraju pete tačke (1/16). Usled negativnih rezultata u okviru studije, ovi ispitanici nisu dalje praćeni (Tabela 4-8). Kod četiri ispitanika detektovana su N-IgG antitela, a kod jednog je nalaz ovih antitela bio graničan.

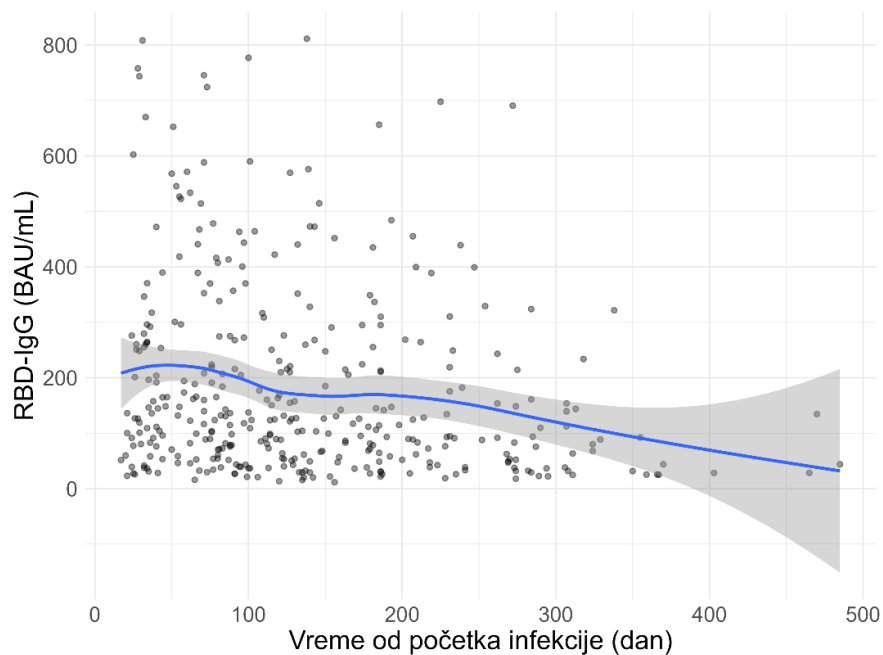
**Tabela 4-8.** Podaci ispitanika Podgrupe 3, koji su u okviru ove studije imali negativan nalaz SARS-CoV-2-specifičnih antitela, a prethodno potvrđen kovid-19 dijagnostičkom metodom ili utvrđeno prisustvo antitela ELISA testom u drugoj laboratoriji. Pozitivne vrednosti za N-specifična IgG antitela su označene *bold* fontom, dok su granične vrednosti označene *italic* fontom.

Pol	Godine	RBD-IgM (indeks)	RBD-IgG (indeks)	N-IgG (odnos)	Neutrališuća antitela (% inhibicije)	Pozitivan prethodni test	Dan uzorkovanja u odnosu na početak bolesti
Ž	33	0,68	0,73	<b>1,297</b>	6,78	ELISA	32
Ž	27	0,11	0,03	0,313	-6,3*	ELISA	36
Ž	42	0,25	0,01	<i>0,900</i>	-5,46*	ELISA	39
M	36	0,93	0,96	<b>2,914</b>	8,28	Ag	39
M	46	0,52	0,82	<b>1,809</b>	2,16	Ag	40
Ž	42	0,35	0,09	0,152	0,97	PCR	41
Ž	47	0,58	0,02	0,088	-2,91*	PCR	71
Ž	64	0,79	0,43	<b>2,900</b>	2,82	PCR	73
Ž	33	0,24	0,37	0,535	5,11	PCR	77
Ž	32	0,24	0,08	0,070	-6,52*	ELISA	97
M	34	0,67	0,41	0,696	-3,96*	PCR	99
M	45	0,14	0,52	0,155	1,98	PCR	155
M	38	0,11	0,28	0,274	-4,67*	PCR	163
Ž	32	0,29	0,00	0,058	-8,01*	ELISA	175
Ž	38	0,11	0,01	0,052	-4,62*	PCR	196
M	36	0,13	0,42	0,207	6,52	PCR	245

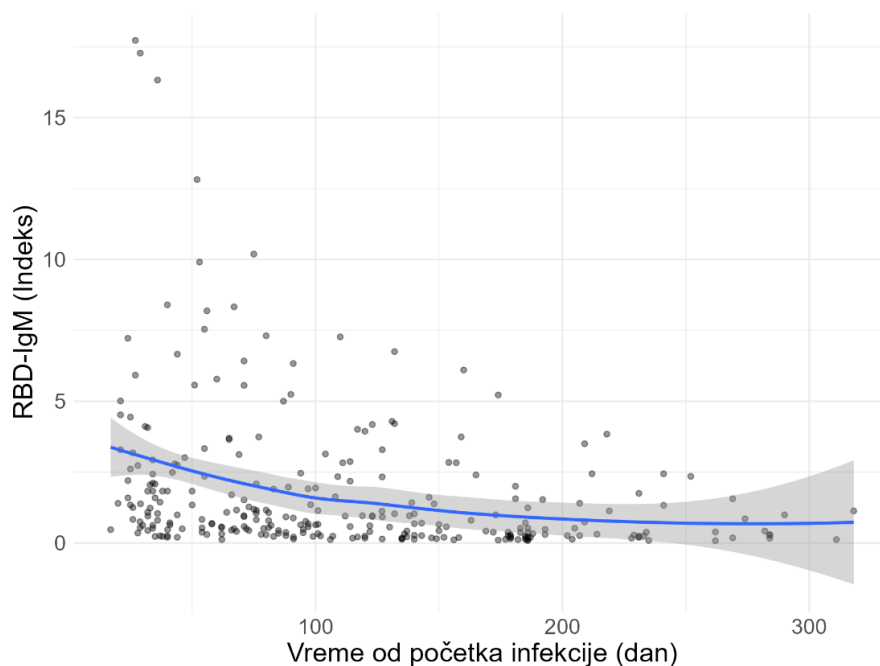
\*Vrednosti sa negativnim predznakom niže su od negativne kontrole testirane u istoj reakciji. Ž - ženski pol, M - muški pol, Ag - brzi antigenski test. Pozitivne vrednosti su označene podebljanim fontom, a granične kurzivom. Ref. vrednosti: RBD-IgM, RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos). Procenat inhibicije, pozitivno  $\geq 30\%$ .

#### 4.1.6. Prikaz kinetike RBD-specifičnih antitela u odnosu na težinu kliničke slike, pol i godine starosti

Radi uočavanja tipa kinetike RBD-IgG i RBD-IgM antitela prvobitno je na dijagramu rasipanja (eng. *scatter plot*), koji prikazuje vrednosti antitela za pojedinačne uzorke svakog ispitanika u odnosu na dan praćenja, nezavisno od definisane vremenske tačke, primenjena neparametarska lokalna regresija (LOESS) (Slika 4-8, 4-9). Prikazana LOESS kriva sa 95% intervalom poverenja ukazala je na postojanje blagog skoka nivoa RBD-IgG antitela u prva tri meseca praćenja, ali i na primetan pad nivoa antitela tokom vremena (Slika 4-8), dok je kod IgM antitela grafik ukazao na konstantan pad nivoa antitela tokom čitavog perioda praćenja (Slika 4-9).



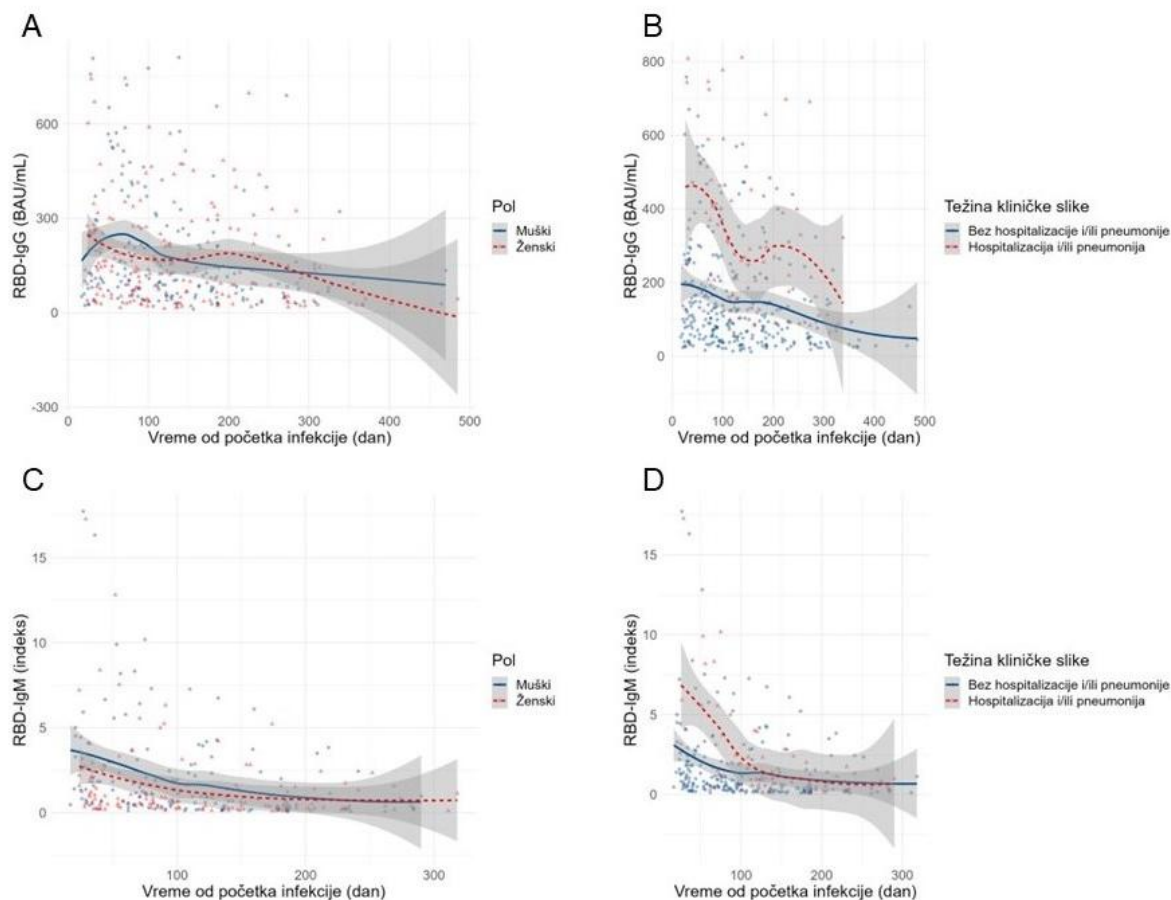
**Slika 4-8.** Prikaz kinetike RBD-specifičnih IgG antitela kod kovid-19 grupe primenom neparаметarske regresione krive (eng. *locally estimated scatterplot smoothing*, LOESS), sa označenim intervalom poverenja od 95%.



**Slika 4-9.** Prikaz kinetike RBD-specifičnih IgM antitela kod kovid-19 grupe primenom neparаметarske regresione krive (eng. *locally estimated scatterplot smoothing*, LOESS), sa označenim intervalom poverenja od 95%.

Kada ispitanike podelimo po polu, primenjene LOESS krive izgledaju nešto drugačije (Slika 4-10). Kinetika IgG antitela se naizgled razlikuje između polova, međutim postoje velika preklapanja intervala poverenja dve LOESS krive (Slika 4-10A). Sa druge strane, kada se LOESS kriva primeni na grafik gde su ispitanici podeljeni po težini kliničke slike na one koji su bili hospitalizovani i/ili imali dijagnostikovanu pneumoniju i one koji to nisu, uočava se značajno različit tip kinetike između ove dve grupe, sa minimalnim preklapanjem intervala poverenja (Slika 4-10B). Kada ispitanike podelimo po polu u prikazu kinetike za IgM antitela, LOESS krive izgledaju gotovo identično, sa

potpunim preklapanjem intervala poverenja (Slika 4-10C), dok se kriva za tešku kliničku sliku u prvih 100 dana značajno razlikuje od krive primenjene kod grupe ispitanika koji nisu bili hospitalizovani i/ili imali pneumoniju (Slika 4-10D).



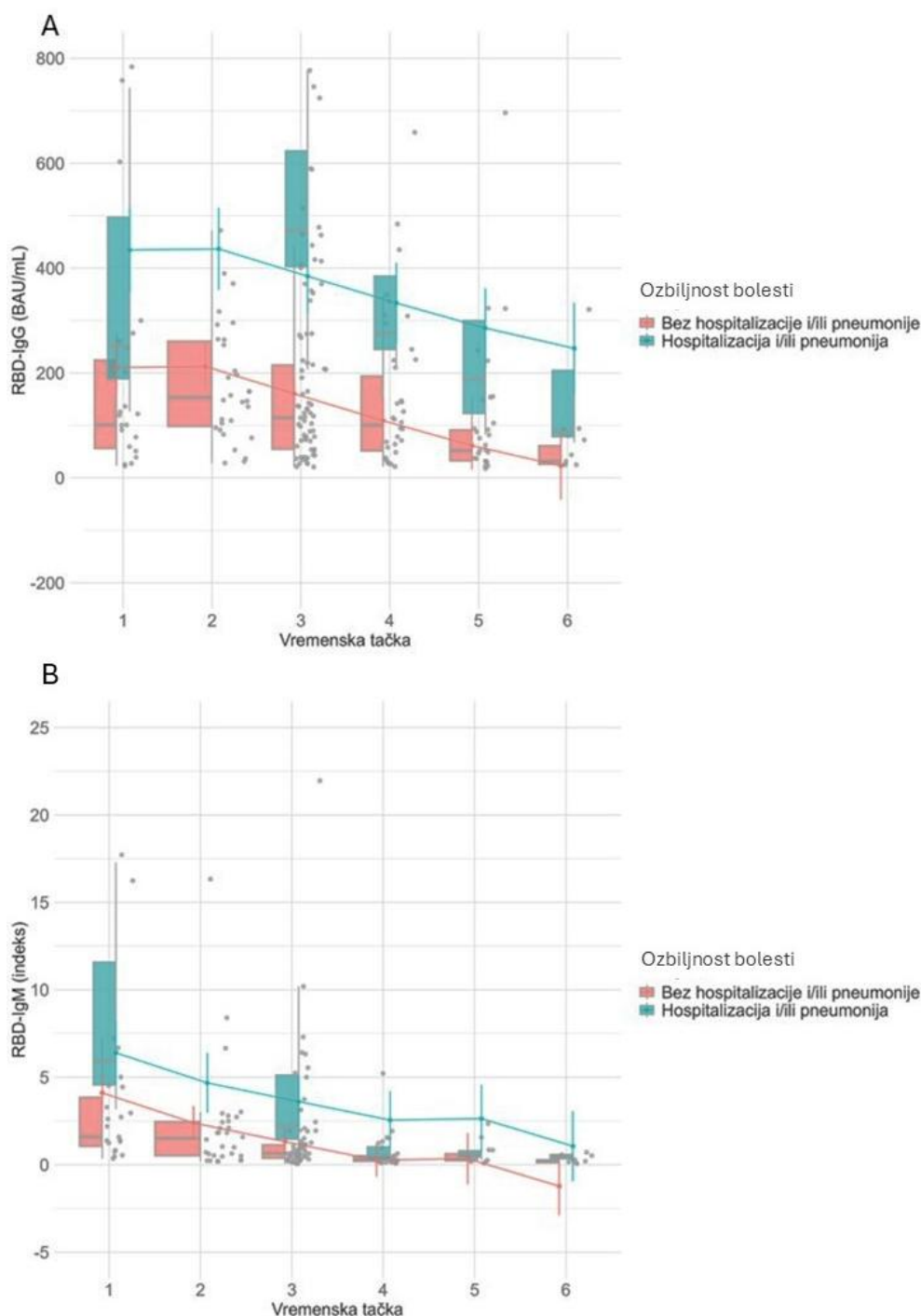
**Slika 4-10.** Prikaz kinetike RBD-specifičnih antitela kovid-19 grupe primenom neparametarske regresione krive (eng. *locally estimated scatterplot smoothing*, LOESS), sa označenim intervalom poverenja od 95%. LOESS kriva RBD-specifičnih IgG antitela u zavisnosti od pola ispitanika (A) i težine kliničke slike (B). LOESS kriva RBD-specifičnih IgM antitela kod kovid-19 grupe u zavisnosti od pola ispitanika (C) i težine kliničke slike (D).

#### 4.1.6.1. Uticaj težine kliničke slike, pola i uzrasta na nivoe RBD-specifičnih antitela

LOESS metoda iako eksplorativna, neparametarska i korisna za uočavanje evolucije i promene određenog parametra, ne daje statističke parametre, neophodne za predikciju kinetike. Usled toga, za pravljenje modela kinetike RBD-specifičnih antitela upotrebljen je linearni mik model (LMM). Za LMM analizu kinetike specifičnih IgG antitela kao zavisna kontinuirana varijabla postavljena je koncentracija antitela izražena u BAU/mL, dok su vremenska tačka, pol, težina kliničke slike i uzrast označeni kao fiksni efekti (*fixed effects*). Za grupišući faktor odabran je identifikacioni broj ispitanika (*random effects grouping factor*). Model je prilagođen koristeći ograničenu maksimalnu verovatnoću (eng. *restricted maximum likelihood*, REML). Reziduali su bili približno normalno raspoređeni, što je uočeno na Q-Q grafikonima i histogramima, a nije primećena značajna heteroskedastičnost ni za jedan model.

Analizom modela utvrđeno je da su starost ispitanika ( $\beta = 2,89$ ;  $SE=0,93$ ;  $p = 0,002$ ) i težina kliničke slike ( $\beta = 353,10$ ;  $SE=67,49$ ;  $p < 0,001$ ) povezani sa višim nivoima IgG antitela, dok to nije bilo pokazano za pol ( $p=0,221$ ). Koncentracija antitela značajno je opala tokom šest vremenskih tačaka do 12 meseci od početka bolesti ( $\beta = -35,43$ ;  $SE=6,51$ ;  $p < 0,001$ ). Značajna interakcija između

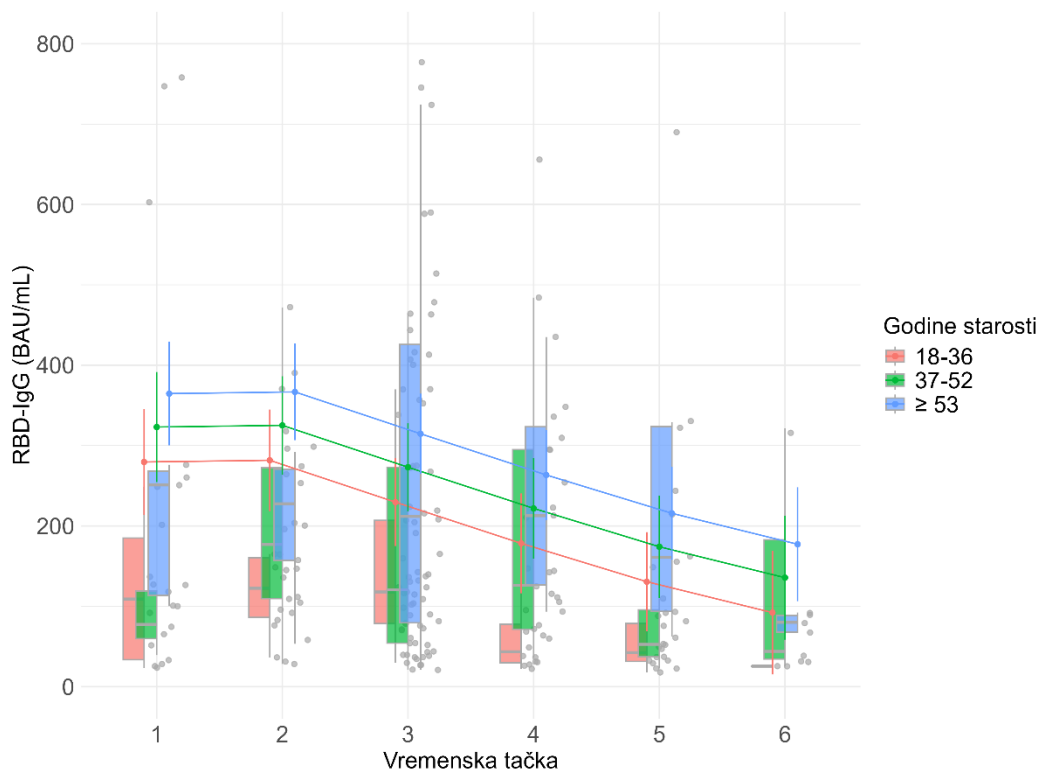
težine kliničke slike i vremenske tačke ( $\beta = -39,89$ ;  $SE=16,26$ ;  $p = 0,015$ ) ukazuje na to da su nivoi IgG iako inicijalno viši, brže opadali kod osoba sa teškim oblikom bolesti. Kada se rezultati raspodele prema težini kliničke slike, uočava se razlika u dinamici. Kod ispitanika sa blagom kliničkom slikom, nivoi antitela značajno su opadali između prvih i poslednjih tačaka, sa razlikom od 140 BAU/mL, dok je sličan trend primećen i u grupi ispitanika sa ozbiljnijom kliničkom slikom, samo što je pad nivoa RBD-IgG antitela između prvih i kasnijih tačaka iznosio više od 300 BAU/mL.



**Slika 4-11.** Prikaz predikcije srednjih vrednosti nivoa RBD-specifičnih IgG antitela (A) i RBD-specifičnih IgM antitela (B) tokom perioda praćenja, u zavisnosti od težine kliničke slike, izračunatih linearnim miks modelom. Vremenske tačke: 1 - tri nedelje, 2 - šest nedelja, 3 - tri meseca, 4 - šest meseci, 5 - devet meseci, 6 - dvanaest meseci od datuma početka simptoma i/ili pozitivnog dijagnostičkog testa.

Analiza identično postavljenog LMM, samo za RBD-IgM antitela umesto RBD-IgG, takođe je pokazala brz pad nivoa tokom vremena i za ispitanike sa blagom i za ispitanike sa težom kliničkom slikom ( $p=0,003$ ;  $p < 0,001$ ). Razlike kod ispitanika sa blažom kliničkom slikom iznosile su do četiri jedinice do poslednje tačke praćenja, dok je kod ispitanika sa teškom kliničkom slikom ta razlika iznosila do 9 jedinica. Uticaj pola i starosti ispitanika nije bio značajan za RBD-IgM antitela ( $p=0,10$ ;  $p=0,59$ ).

Predikcija srednjih vrednosti sa intervalima poverenja za RBD-specifična IgG i IgM antitela u zavisnosti od kliničke slike prikazana je na Slici 4-11. Procenjeni nivoi antitela ovde su označeni kao *boxplot*-ovi različitih boja u zavisnosti od težine kliničke slike, sa intervalima poverenja (95%) koji su izračunati u okviru samog modela, dok su na Slici 4-12. prikazani procenjeni nivoi RBD-IgG antitela po istom principu, u zavisnosti od uzrasta ispitanika.



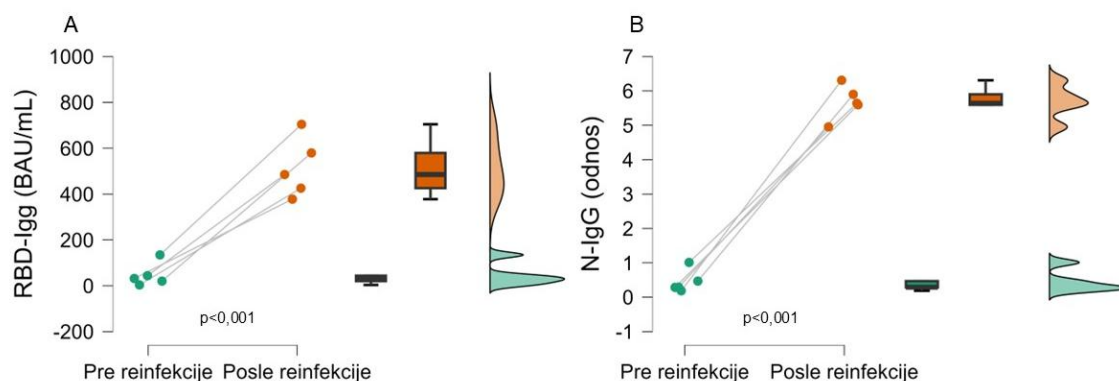
**Slika 4-12.** Prikaz predikcije srednjih vrednosti nivoa RBD-specifičnih IgG antitela tokom perioda praćenja, u zavisnosti od godina starosti ispitanika, izračunatih linearnim miksm modelom. Vremenske tačke: 1 - tri nedelje, 2 - šest nedelja, 3 - tri meseca, 4 - šest meseci, 5 - devet meseci, 6 - dvanaest meseci od datuma početka simptoma i/ili pozitivnog dijagnostičkog testa.

#### 4.1.7. Reinfekcije u kovid-19 grupi

U Podgrupi 1 i Podgrupi 2, od svih ispitanika, ukupno je zabeleženo pet reinfekcija (2,78%, 5/180), od toga četiri simptomatske i jedna asimptomatska. Od simptoma prijavljena je temperatura u sva četiri slučaja, mijalgija i malaksalost u tri i u po jednom slučaju nosna kongestija i bol u grlu. Ispitanik sa asimptomatskom infekcijom prijavio je rizičan kontakt mesec dana pre kontrole.

Dijagnostički test je rađen kod samo jednog ispitanika Podgrupe 1, kada je potvrđena reinfekcija brzim antigenskim testom. Međutim, u svih pet slučajeva došlo je do statistički značajnog skoka u koncentraciji RBD-IgG antitela ( $p < 0,001$ ), kao i statistički značajnog skoka u nivoima N-IgG antitela ( $p < 0,001$ ) (Slika 4-13). Nalaz RBD-IgM antitela bio je negativan u svih pet slučajeva. Dva ispitanika su imala nalaz negativnih RBD-IgG antitela, a četiri ispitanika nalaz negativnih N-IgG antitela, na poslednjoj kontroli pre reinfekcije. Jedina asimptomatska reinfekcija detektovana je u periodu kada je Delta varijanta bila dominantna, dok su sve ostale reinfekcije nastale nakon početka

2022. godine i pojave Omikrona u Srbiji. Medijana razmaka između pojave simptoma primarne infekcije i reinfekcije iznosila je 611 (IQR 87, 304-687) dana. U dva slučaja primarna infekcija je bila asimptomatska, a jedan ispitanik je imao isključivo pozitivan nalaz RBD-IgM antitela u primarnoj infekciji, do potpune negativizacije na drugoj kontroli.



**Slika 4-13.** Prikaz koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela (A) i nivoa N-specifičnih IgG antitela (B) pre i posle reinfekcije kod parnih uzoraka ispitanika kovid-19 grupe. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele. P vrednosti dobijene su t-testom za zavisne uzorke.

## 4.2. Grupa vakcinisanih ispitanika nakon primarne serije vakcinacije

Grupa vakcinisanih ispitanika, podeljena je na osnovu primarne serije (odnosno prve dve doze vakcine) na sledeće podgrupe:

- BBIBP-CorV,
- Gam-COVID-Vac,
- ChAdOx1,
- BNT162b2 i
- mRNA-1273.

Nakon treće doze vakcine, ove podgrupe se dalje računaju, u zavisnosti od vrste kombinacije primarne vakcine i vakcine izabrane za treću dozu i biće opisane u posebnom odeljku (Rezultati 4.3).

### 4.2.1. Demografski podaci grupe vakcinisanih ispitanika nakon primarne serije

U Tabeli 4-9. prikazani su osnovni demografski podaci grupe vakcinisanih ispitanika nakon prve dve doze vakcine, odnosno primarne serije, raščlanjene na pet podgrupa u zavisnosti od tipa vakcine.

Na osnovu prikazanih podataka uočava se da se najveći broj ispitanika opredelio za BBIBP-CorV (47,49%) i BNT162b2 vakcinu (36,87%). U odnosu na pol ispitanika, statistički značajna razlika u raspodeli uočena je isključivo između BNT162b2 i ChAdOx1 podgrupe (Fišerov test,  $p=0,04$ ). Statistički značajne razlike u medijani godina starosti ustanovljene su između BNT162b2 i BBIBP-CorV podgrupe (Kruskal-Voliss,  $p<0,0001$ ) i između BBIBP-CorV i ChAdOx1 podgrupe ( $p=0,0002$ ); a u oba slučaja je uzrast ispitanika bio značajno viši u okviru BBIBP-CorV podgrupe. Pre uvođenja primarne serije vakcine, određeni procenat ispitanika testirao se preventivno u okviru ove studije, u periodu od avgusta 2020. do maja 2021. godine (Tabela 4-9), a svi uzorci su bili negativni u obe klase RBD-specifičnih antitela.

**Tabela 4-9.** Prikaz osnovnih demografskih karakteristika grupe vakcinisanih ispitanika nakon primarne vakcinacije.

Podgrupa	Broj ispitanika		Pol		Godine starosti	Kovid-19 pre vakcine	Broj negativnih ispitanika pre vakcinacije
	N (%)	M (%)	Ž (%)	Medijana (IQR)	N (%)	N (%)	
BBIBP-CorV	170 (47,49)	78 (45,88)	92 (54,44)	56,50 (40,00-66,25)	32 (18,93)	24 (14,20)	
Gam-COVID-Vac	23 (6,42)	13 (56,52)	10 (41,67)	45 (37,00-53,00)	12 (50,00)	3 (12,5)	
ChAdOx1	31 (8,61)	18 (58,06)	13 (41,93)	38 (32,00-50,00)	10 (32,26)	5 (16,13)	
BNT162b2	132 (36,87)	48 (36,36)	84 (63,64)	44 (33,00-55,00)	34 (25,76)	52 (39,39)	
mRNA-1273	2 (0,56)	0	2 (100,00)	28,50 (26,00-31,00)	0	1 (50,00)	
Ukupno	358 (100,00)	157 (43,85)	201 (56,14)	48 (36,00-62,00)	88 (24,58)	85 (23,74)	

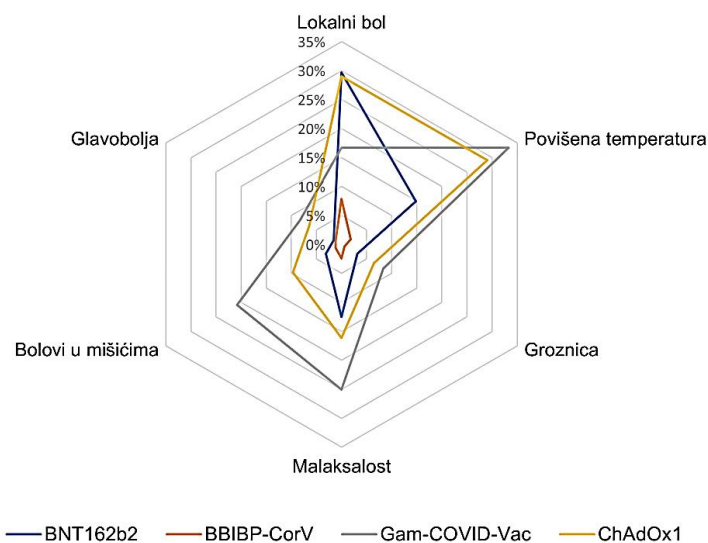
N - broj ispitanika, M - muški pol, Ž - ženski pol, IQR - interkvartilni opseg.

Tri ispitanika BBIBP-CorV podgrupe, 12 ispitanika ChAdOx1 i pet ispitanika BNT162b2 podgrupe nisu primili drugu dozu vakcine, odnosno nisu došli na kontrolu nakon druge doze vakcine. Medijana razmaka između prve i druge doze vakcine merena u danima za BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac i BNT162b2 podgrupe iznosila je 21 dan, dok je za mRNA-1273 podgrupu medijana bila nešto viša 33,50 (IQR 28-39). ChAdOx1 podgrupa je imala značajno veći razmak između dve doze, što je i bila zvanična preporuka (medijana 84, IQR 83-85). U dva slučaja nakon prve doze BNT162b2, druga doza vakcine je bila odložena na 40 i 49 dana, dok je u BBIBP-CorV podgrupi čak četiri slučaja bilo sa odloženom vakcinacijom (56, 60, 64 i 131 dan nakon prve doze). Od šest odloženih vakcinacija, pet se odnosilo na produženje perioda do druge doze zbog pozitivnog SARS-CoV-2 dijagnostičkog testa nakon prve doze vakcine.

#### 4.2.2. Neželjene reakcije nakon prve i druge doze vakcine

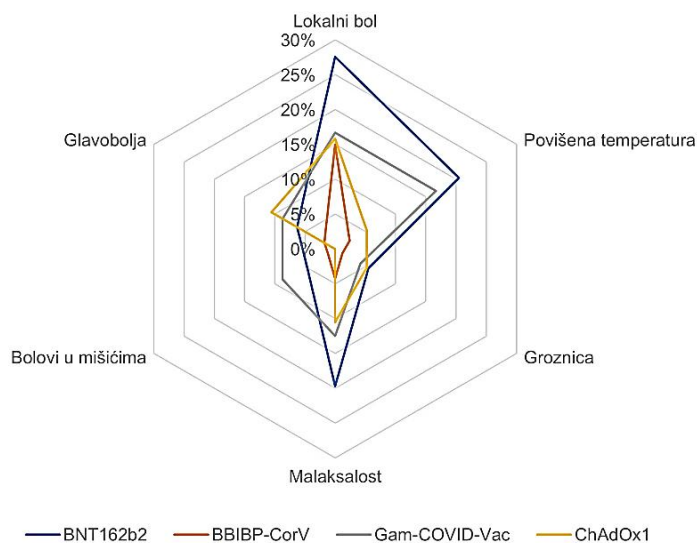
Najčešće prijavljene neželjene reakcije nakon prve doze vakcine protiv SARS-CoV-2 bile su lokalni bol na mestu aplikacije vakcine (18,51%), povišena temperatura (11,39%) i malaksalost (8,83%). Na Slici 4-14. postvakcinalne reakcije nakon prve doze prikazane su u odnosu na tip primenjene vakcine. Može se uočiti da je lokalni bol bio najčešći kod BNT162b2 podgrupe (29,68%), a sve ostale reakcije kod Gam-COVID-Vac podgrupe (povišena temperatura - 34,78%, groznica - 8,69%, malaksalost - 26,08%, bolovi u mišićima - 21,74% i glavobolja - 8,69%). Ubedljivo najmanji procenat reakcija prijavljen je nakon BBIBP-CorV vakcine (Slika 4-14). Podaci za mRNA-1273 nisu prikazani zbog malog broja ispitanika (n=2). Osim navedenih reakcija, ispitanici su nakon prve doze vakcine prijavljivali i mučninu (BNT162b2 (n=3), BBIBP-CorV (n=1), Gam-COVID-Vac (n=2)). U jednom slučaju se nakon prve doze Gam-COVID-Vac javilo otežano disanje, dok se nakon ChAdOx1

kod jednog ispitanika javio bol u stomaku, a kod drugog limfadenopatija na vratu i aksilarnom predelu na strani aplikacije vakcine.



**Slika 4-14.** Prikaz zastupljenosti neželjenih reakcija nakon prve doze vakcine, izraženo u procentima (0-35%) za svaku primenjenu vakcinu (BNT162b2, BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1). Podaci za mRNA-1273 nisu prikazani zbog malog broja ispitanika.

Nakon druge doze, distribucija neželjenih reakcija po vakcinama je nešto drugačije izgledala (Slika 4-15). Kao i nakon prve doze, najčešće prijavljene neželjene reakcije bile su lokalni bol na mestu aplikacije vakcine (19,82%), malaksalost (10,95%) i povišena temperatura (10,65%). Međutim, u odnosu na tip primenjene vakcine, može se uočiti da su lokalni bol (27,56%), povišena temperatura (20,47%), malaksalost (19,68%) i groznica (5,51%) bili najčešći kod BNT162b2 podgrupe, dok je glavobolja bila najčešća kod ChAdOx1 podgrupe (10,53%), a bolovi u mišićima kod Gam-COVID-Vac podgrupe (8,69%) (Slika 4-15). Najmanji broj reakcija prijavljen je nakon BBIBP-CorV vakcine, sa tom razlikom da je u odnosu na prvu dozu češće prijavljivan lokalni bol (čak 14,97%, dok je nakon prve doze ovaj procenat iznosio 7,65%) (Slika 4-15).



**Slika 4-15.** Neželjene reakcije nakon druge doze vakcine, prikazane kao procenti za svaku primenjenu vakcinu (BNT162b2, BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1). Podaci za mRNA-1273 nisu prikazani zbog malog broja ispitanika.

Osim navedenih reakcija, ispitanici su i nakon druge doze vakcine prijavljivali mučninu (BNT162b2 (n=3), BBIBP-CorV (n=2)). Za razliku od prve doze, jedan ispitanik prijavio je prisustvo urtikarije nakon BNT162b2 vakcine, u trajanju od jednog dana, drugi ispitanik uvećane tonzile i treći limfadenopatiju aksilarnog predela nakon BBIBP-CorV vakcine.

#### 4.2.3. RBD-specifična antitela nakon prve doze vakcine, pre kompletirane primarne serije

Deo ispitanika iz grupe vakcinisanih odazvao se na kontrolu do tri nedelje nakon primljene prve doze vakcine ( $20,72 \pm 2,48$  dana), a pre kompletirane primarne serije (odnosno pre primljene druge doze vakcine). Ukupna seropozitivnost RBD-specifičnih IgG antitela po podgrupama u ovoj vremenskoj tački iznosila je 66,67% (6/9) za BBIBP-CorV, 100% za Gam-COVID-Vac (5/5) i ChAdOx1 (15/15) i 94,34% (50/53) za BNT162b2. Međutim, kada se ispitanici nakon prve doze vakcine podele na naivne, odnosno one koji nisu imali potvrđenu SARS-CoV-2 infekciju pre vakcinacije i na ispitanike koji su imali kovid-19, uviđamo da se seronegativni ispitanici nalaze isključivo u okviru naivnih podgrupa, kako nakon BNT162b2, tako i nakon BBIBP-CorV vakcine. Takođe, iako je seropozitivnost za ChAdOx1 vakcinu iznosila 100% u prve tri nedelje nakon prve doze, dodatni ispitanici koji su usled velikog predviđenog razmaka između dve doze ove vakcinalne platforme došli kasnije na kontrolu, a nisu ušli u analizu nivoa antitela u ovoj sekciji, promenili su informacije o seropozitivnosti nakon prve doze ove vakcine. Naime, od ukupno 26 uzoraka sakupljenih u prva tri meseca – šest je bilo seronegativno, promenivši seropozitivnost nakon ove vakcine na 76,92%.

Kada u analizu nivoa RBD-specifičnih IgG antitela nakon prve doze vakcine kod naivnih ispitanika uključimo samo pozitivne uzorke, statistički značajna razlika uočava se između BNT162b2 i ChAdOx1 podgrupe ( $p=0,02$ ) (Tabela 4-10). Jedan ispitanik Gam-COVID-Vac podgrupe nije imao potvrđen kovid-19 pre vakcinacije, međutim zbog visoke koncentracije RBD-IgG antitela, testiran je i na prisustvo N-IgG antitela i zbog pozitivnog nalaza (indeks 1,365) svrstan je u ispitanike sa prethodnim kovid-19. Ukoliko se uporede uzorci kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, uočava se da su medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela BNT162b2, Gam-COVID-Vac i ChAdOx1 podgrupa daleko više nego kod BBIBP-CorV podgrupe (Tabela 4-10). Međutim, zbog malog broja ispitanika u okviru Gam-COVID-Vac podgrupe, statistički značajne razlike pronalaze se isključivo između BNT162b2 i BBIBP-CorV ( $p=0,0004$ ), kao i ChAdOx1 i BBIBP-CorV podgrupe ( $p=0,001$ ).

**Tabela 4-10.** Pozitivni nalazi RBD-IgG antitela ispitanika nakon prve doze vakcine, prikazani u podgrupama u zavisnosti od tipa primljene vakcine i prethodne SARS-CoV-2 infekcije.

Podgrupa	Broj naivnih ispitanika	RBD-specifična IgG antitela (BAU/mL)	Broj kovid-19 ispitanika	RBD-specifična IgG antitela (BAU/mL)
	n (N)	Medijana (IQR)	n (N)	Medijana (IQR)
BBIBP-CorV	3 (9)	NP*	6 (9)	312,37 (181,19-340,27)
Gam-COVID-Vac	2 (5)	347,85 (57,33-638,36)	3 (5)	855,28 (815,23-959,78)
ChAdOx1	8 (15)	60,69 (33,64-174,12)	7 (15)	781,69 (480,80-875,82)
BNT162b2	44 (53)	157,56 (103,89-358,93)	9 (53)	834,75 (755,06-859,96)

N - ukupan broj ispitanika u datoj vremenskoj tački; NP - nije primenljivo, svi ispitanici u ovoj podgrupi su bili seronegativni. Ref. vrednosti: RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Viši nivoi RBD-specifičnih IgG antitela uočeni su kod svih ispitanika koji su imali potvrđen kovid-19 pre vakcinacije prvom dozom u odnosu na naivne ispitanike (Tabela 4-10). Naime, statistički visoko značajna razlika postojala je između naivnih ispitanika i ispitanika sa prethodnim kovid-19 u okviru BNT162b2 ( $p < 0,0001$ ) i ChAdOx1 podgrupe ( $p = 0,0003$ ). Iako očigledna razlika postoji i u okviru Gam-COVID-Vac podgrupe, ona ipak nije bila značajna usled nedovoljne veličine uzorka. Takođe, ovo poređenje nije bilo moguće sprovesti za BBIBP-CorV podgrupu, zbog seronegativnosti naivnih ispitanika.

#### 4.2.4. RBD-specifična IgG antitela nakon dve doze vakcine

Nakon kompletirane primarne serije, odnosno dve primljene doze vakcine, ispitanici su praćeni u pet vremenskih tačaka - šest nedelja, tri meseca, šest meseci, devet meseci i dvanaest meseci od prve doze vakcine. Ove tačke neznatno su varirale (mereno u danima) u zavisnosti od podgrupe, odnosno tipa vakcine i detaljnije su određene u tabelama u okviru analize svake podgrupe ponaosob. Štaviše, tačka određena na dvanaest meseci iako predviđena studijom, nije ispunjena ni u jednoj podgrupi, dok je tačka na devet meseci imala minimalan broj ispitanika koji su se odazvali na kontrolu. Razlog tome je uvođenje mogućnosti primanja treće doze vakcine nakon isteka šest meseci od primarne serije, ali i pojava infekcija nakon vakcinacije. U daljem tekstu biće obrađene pojedinačne podgrupe, sa analizom kinetike RBD-specifičnih IgG i IgM antitela, kako kod naivnih tako i kod ispitanika sa potvrđenom kovid-19 infekcijom pre vakcinacije. Podgrupa nakon dve doze mRNA-1273 vakcine nije obrađena u ovom odeljku, usled malog broja ispitanika ( $n=2$ ).

##### 4.2.4.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BBIBP-CorV vakcine kod prethodno naivnih ispitanika

U okviru ovog istraživanja prijavljeno je 132 prethodno naivna ispitanika nakon primljene dve doze BBIBP-CorV vakcine. Nakon isključenja, ukupan broj ispitanika uključen u analizu kinetike RBD-IgG u ovoj podgrupi iznosio 125. Uzorak jednog ispitanika isključen je iz analize imunskog odgovora zbog ustanovljenog značajnog drastičnog asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela nakon kontrole, uz pozitivan nalaz RBD-IgM i N-IgG antitela (uzorci pre skoka uključeni su u analizu).

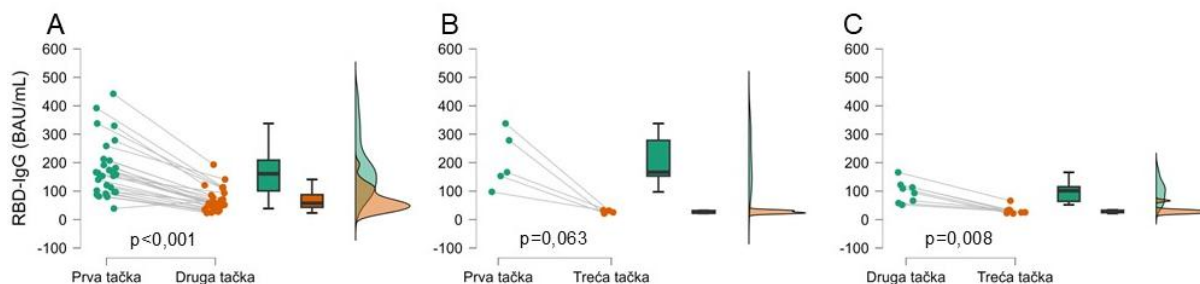
U Tabeli 4-11. prikazane su medijane koncentracije RBD-IgG antitela u tri vremenske tačke: šest nedelja, tri meseca i šest meseci nakon prve doze BBIBP-CorV vakcine. Seropozitivnost u prvoj vremenskoj tački iznosila je 79% (79/100), zatim 65,71% (46/70) u drugoj i 29,63% (8/27) u trećoj vremenskoj tački tj. šest meseci nakon prve doze. Nakon negativizacije ispitanici nisu ponovo pozivani na kontrolu u okviru praćenja kinetike RBD-IgG antitela.

**Tabela 4-11.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod naivnih ispitanika nakon BBIBP-CorV primarne serije vakcine. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
1 Šest nedelja	47,82 ± 8,33	97,58 (63,02-173,62)	79/100
2 Tri meseca	88,76 ± 12,03	57,13 (33,79-113,24)	46/70
3 Šest meseci	181,75 ± 5,04	28,46 (23,33-33,54)	8/27

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Usled česte negativizacije a i uvođenja treće doze vakcine, četvrta tačka praćenja – devet meseci nakon prve doze vakcine nije postojala za BBIBP-CorV podgrupu. Prilikom poređenja vezanih uzoraka tokom perioda praćenja dobijen je statistički značajan pad nivoa antitela između prve i druge (Slika 4-16 A;  $p < 0,001$ ) i druge i treće vremenske tačke (Slika 4-16 C;  $p = 0,008$ ). Između prve i treće tačke nije bilo statistički značajne razlike (Slika 4-16 B;  $p = 0,063$ ), zbog malog broja vezanih uzoraka, usled negativizacije.



**Slika 4-16.** Vezani uzorci naivnih ispitanika BBIBP-CorV grupe sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) u različitim vremenskim tačkama: A - šest nedelja i tri meseca, B - šest nedelja i šest meseci, C - tri meseca i šest meseci. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.2.4.1.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BBIBP-CorV vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

U okviru BBIBP-CorV podgrupe, nakon dve doze vakcine, bilo je 30 ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije, ali je nakon isključenja u analizu kinetike uključeno 27 ispitanika. Osim toga, u dva uzorka postojao je asimptomatski skok koncentracije RBD-IgG antitela, uz pozitivan nalaz N-IgG antitela usled čega ti uzorci nisu uključeni u analizu.

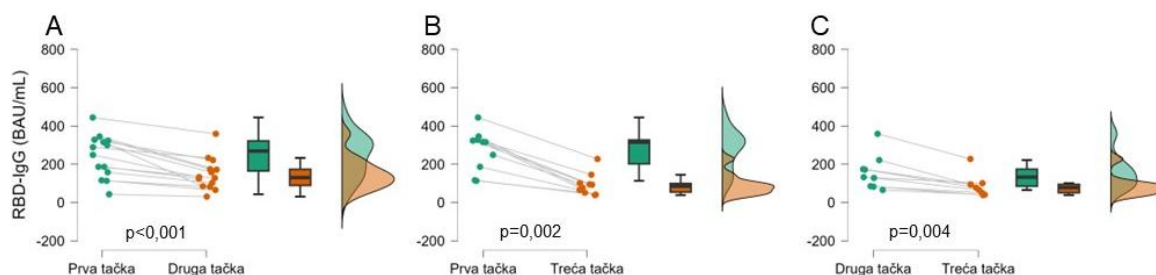
**Tabela 4-12.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom nakon BBIBP-CorV primarne serije vakcine kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG (n/N)
1 Šest nedelja	43,50 ± 4,43	253,82 (147,60-324,67)	22/22
2 Tri meseca	91,39 ± 7,54	130,32 (79,08-217,33)	18/18
3 Šest meseci	184,17 ± 5,87	85,28 (43,25-134,08)	12/13

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Seropozitivnost ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom iznosila je 100% u prve dve tačke praćenja, dok je u trećoj iznosila 92,31% (12/13). U Tabeli 4-12. uočava se postepen pad nivoa antitela do šest meseci nakon prve doze. Poređenjem parnih uzoraka dobijene su statistički

značajne razlike između prve i druge (Slika 4-17 A;  $p < 0,001$ ), prve i treće (Slika 4-17 B;  $p = 0,002$ ), kao i druge i treće tačke praćenja (Slika 4-17 C;  $p = 0,004$ ).



**Slika 4-17.** Parni uzorci ispitanika BBIBP-CorV grupe sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) u različitim vremenskim tačkama: A - šest nedelja i tri meseca, B - šest nedelja i šest meseci, C - tri meseca i šest meseci. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.2.4.2. RBD-specifična IgG antitela nakon Gam-COVID-Vac vakcine kod prethodno naivnih ispitanika

U studiju je uključeno 11 prethodno naivnih ispitanika koji su se opredelili za dve doze Gam-COVID-Vac vakcine. Međutim, jedan ispitanik nije uključen u analizu kinetike RBD- IgG antitela po vremenskim tačkama, zbog uzorkovanja van vremenskih opsega, usled čega je ukupan broj ispitanika uključenih u analizu kinetike iznosio 10. Tokom perioda praćenja, u okviru grupe prethodno naivnih ispitanika nije došlo do asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela, ali je u kod jednog ispitanika nivo antitela u prve dve tačke praćenja bio gotovo identičan – odnosno održavao se na platou. Nalaz N-specifičnih IgG antitela iz oba uzorka pomenutog ispitanika bio je negativan.

**Tabela 4-13.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod naivnih ispitanika nakon Gam-COVID-Vac primarne serije vakcine. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

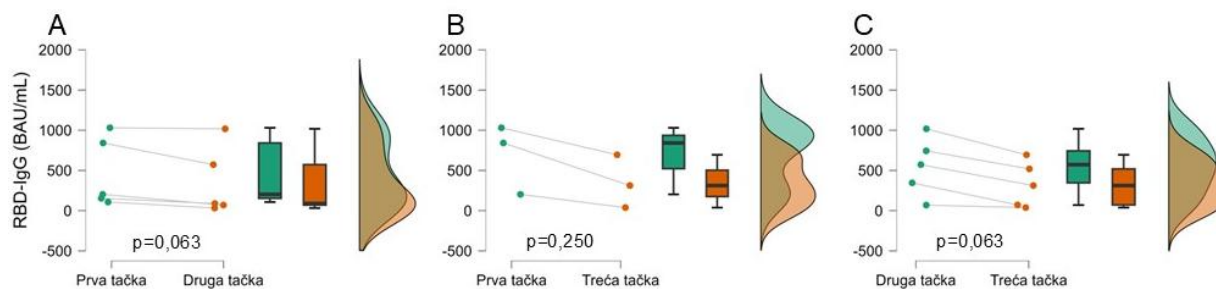
Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
1 Šest nedelja	41,14 $\pm$ 6,56	202,69 (107,14-841,87)	7/7
2 Tri meseca	93,00 $\pm$ 8,88	345,81 (69,33-744,08)	7/7
3 Šest meseci	187,00 $\pm$ 6,26	191,72 (33,95-563,09)	6/8

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

U Tabeli 4-13. prikazane su medijane koncentracije RBD-IgG antitela u tri vremenske tačke nakon prve doze Gam-COVID-Vac vakcine. Seropozitivnost u prvoj i drugoj vremenskoj tački iznosila je 100% (7/7), a 75% (6/8) u trećoj vremenskoj tački. Još jedan ispitanik se negativizirao nakon predviđene četvrte tačke, ali je uzorkovanje izvršeno van vremenskog opsega, stoga nije ušao u analizu kinetike. Na tabelarnom prikazu vrednosti RBD-IgG antitela, uočava se porast medijane

koncentracije antitela do tri meseca i pad do šest meseci nakon prve doze Gam-COVID-Vac (Tabela 4-13).

Uočene su velike individualne varijacije u odgovoru na dve doze ove vakcine kod prethodno naivnih ispitanika, na šta ukazuje i širok interkvartilni opseg. Poređenjem vezanih uzoraka tokom perioda praćenja nije dobijen statistički značajan pad nivoa antitela, iako je on uočljiv između prve i treće i druge i treće tačke (Slika 4-18 B, C), što se može pripisati nedovoljnoj veličini uzorka i velikoj individualnoj varijaciji u koncentraciji antitela.



**Slika 4-18.** Parni uzorci naivnih ispitanika Gam-COVID-Vac grupe u različitim vremenskim tačkama (A - šest nedelja i tri meseca, B - šest nedelja i šest meseci, C - tri meseca i šest meseci), sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL). Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.2.4.2.1. RBD-specifična IgG antitela nakon Gam-COVID-Vac vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

U okviru Gam-COVID-Vac podgrupe, nakon dve doze vakcine, bilo je 12 ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije. Jedan ispitanik, od ukupno 12, nije došao na kontrolu u predviđenom vremenskom okviru, što ostavlja 11 kao ukupan broj ispitanika za analizu kinetike. Kod dva ispitanika postojao je asimptomatski skok nivoa antitela, usled čega ti uzorci nisu uključeni u analizu kinetike, ali prethodni uzorci jesu. Nalaz specifičnih N-IgG antitela bio je pozitivan u uzorcima sa asimptomatskim porastom nivoa RBD-IgG.

**Tabela 4-14.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, a nakon Gam-COVID-Vac primarne serije. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca, šest meseci i devet meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)	
1	Šest nedelja	47,60 ± 5,68	807,51 (664,18-921,97)	5/5
2	Tri meseca	89,67 ± 9,49	802,02 (551,76-889,03)	7/7
3	Šest meseci	181,60 ± 4,51	288,89 (148,92-490,06)	5/5
4	Devet meseci	280,00 ± 18,38	356,39 (229,73-483,04)	2/2

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Svi ispitanici bili su seropozitivni tokom perioda praćenja. U Tabeli 4-14. prikazane su koncentracije RBD-IgG antitela po tačkama praćenja, gde se uočava pad u medijanama koncentracija antitela tokom vremenskog perioda praćenja. Zbog malog broja uzoraka, Vilkoksonov test ekvivalentnih parova nije primenjen na poređenje po vremenskim tačkama.

#### 4.2.4.3. RBD-specifična IgG antitela nakon ChAdOx1 vakcine kod prethodno naivnih ispitanika

U okviru ChAdOx1 podgrupe bilo je 11 prethodno naivnih ispitanika. Tokom perioda praćenja, u okviru grupe naivnih ispitanika u jednom uzorku je došlo do asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela, uz pozitivan nalaz N-IgG antitela. Taj uzorak nije uključen u analizu kinetike nivoa antitela, ali su prethodni uzorci tog ispitanika uzeti u obzir.

Usled specifičnog režima davanja druge doze, na 12 nedelja a ne na standardne tri nedelje, vremenske tačke u kojim su praćeni ispitanici ChAdOx1 grupe počinju od broja dva – odnosno od tri meseca (a ne od šest nedelja kao za ostale vakcine). U Tabeli 4-15. prikazane su medijane koncentracije RBD-IgG antitela u tri vremenske tačke: tri meseca, šest meseci i devet meseci nakon prve doze ChAdOx1 vakcine. Seropozitivnost u drugoj vremenskoj tački iznosila je 100% (8/8), dok je u trećoj tački praćenja iznosila 85,71% (6/7). Nakon negativizacije ispitanici nisu ponovo pozivani na kontrolu. Na tabelarnom prikazu koncentracija RBD-IgG antitela nakon ChAdOx1 vakcine, uočava se pad nivoa antitela kroz vreme, do devet meseci nakon prve doze (Tabela 4-15). Međutim, usled malog broja vezanih uzoraka po vremenskoj tački, statistička analiza Vilkoksonovim testom ekvivalentnih parova nije bila moguća.

**Tabela 4-15.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod naivnih ispitanika nakon ChAdOx1 primarne serije vakcine. Vremenske tačke od tri meseca, šest meseci i devet meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG (n/N)
2 Tri meseca	101,38 $\pm$ 3,11	340,73 (156,08-596,74)	8/8
3 Šest meseci	180,17 $\pm$ 5,34	230,44 (86,76-293,82)	6/7
4 Devet meseci	277,00 $\pm$ 8,66	54,48 (21,96-167,72)	3/3

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq$  20,33 BAU/mL.

#### 4.2.4.3.1. RBD-specifična IgG antitela nakon ChAdOx1 vakcine kod ispitanika sa potvrđenom prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

U okviru ChAdOx1 podgrupe bilo je 8 ispitanika sa potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije. Nije došlo do seronegativizacije u okviru ove grupe ispitanika. Tokom perioda praćenja, kod jednog ispitanika nivo antitela je u drugoj i trećoj tački praćenja bio gotovo identičan, međutim nalaz N-specifičnih IgG antitela iz drugog uzorka pomenutog ispitanika bio je negativan, usled čega je ovaj uzorak svakako uključen u dalju analizu.

U Tabeli 4-16. prikazane su medijane koncentracije RBD-IgG antitela u tri vremenske tačke: tri meseca, šest meseci i devet meseci nakon prve doze vakcine. Može se uočiti pad koncentracija RBD-IgG antitela nakon ChAdOx1 vakcine do šest meseci nakon prve doze, ali i blagi porast u medijani do devet meseci nakon prve doze (Tabela 4-16). Međutim, kao i kod prethodno naivnih ispitanika, usled malog broja vezanih uzoraka po vremenskoj tački, statistička analiza Vilkoksonovim

testom ekvivalentnih parova nije sprovedena, osim za drugu i treću vremensku tačku – gde uprkos očiglednoj razlici u vrednostima, ona nije bila statistički značajna ( $p=0,069$ ).

**Tabela 4-16.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod ispitanika nakon ChAdOx1 primarne serije vakcine, sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. Vremenske tačke od tri meseca, šest meseci i devet meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
2 Tri meseca	99,00 $\pm$ 4,33	549,32 (511,20-763,80)	6/6
3 Šest meseci	183,43 $\pm$ 2,88	275,88 (186,43-563,75)	7/7
4 Devet meseci	276,00 $\pm$ 1,73	477,76 (172,20-713,58)	3/3

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija; Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

#### 4.2.4.4. RBD-specifična IgG antitela nakon BNT162b2 vakcine kod prethodno naivnih ispitanika

Od 95 naivnih ispitanika koji su primili dve doze BNT162b2 vakcine, u analizu kinetike RBD-IgG antitela po određenim vremenskim tačkama uključeno je 86 naivnih ispitanika, koji su došli u okviru vremenskih odrednica na kontrolu (Tabela 4-17).

Ispitanicima kojima je detektovan asimptomatski porast nivoa RBD-IgG antitela, rađen je test za detekciju N-IgG antitela (n=10). Jedan ispitanik je imao pozitivan nalaz N-IgG antitela i jedan granično pozitivnu vrednost. Uzorci ovih ispitanika nakon porasta nivoa RBD-IgG antitela, nisu uključeni u analizu kinetike. Ovi uzorci detaljnije će biti obrađeni u okviru odeljka o postvakcinalnim infekcijama.

**Tabela 4-17.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela naivnih ispitanika vakcinalne grupe nakon BNT162b2 primarne serije vakcine, sa odgovarajućim interkvartilnim opsegom. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca, šest meseci i devet meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

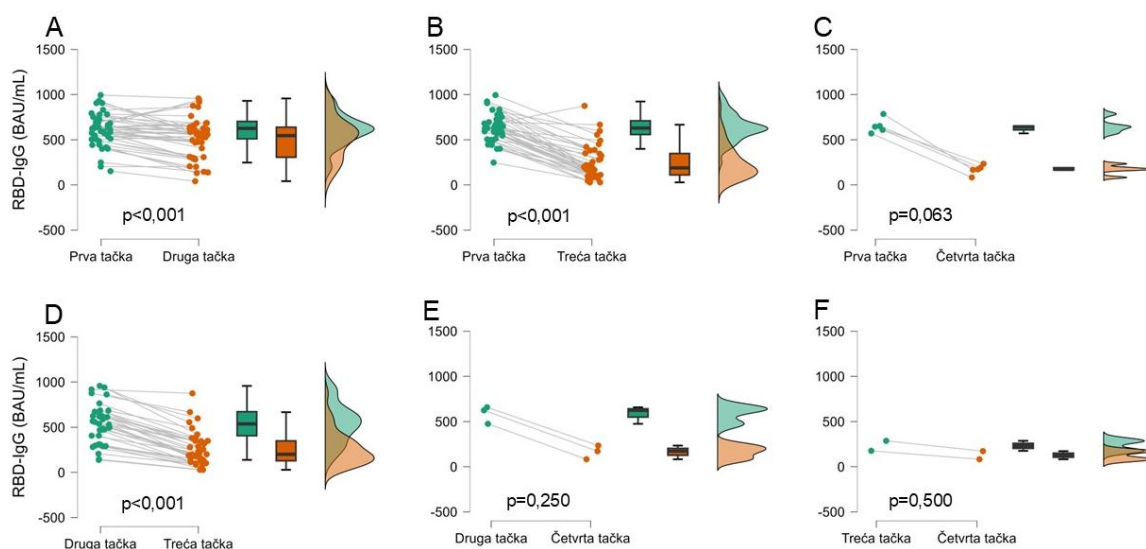
Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
1 Šest nedelja	42,52 $\pm$ 1,96	634,30 (558,16-737,07)	67/67
2 Tri meseca	89,93 $\pm$ 6,13	547,69 (330,57-641,01)	58/58
3 Šest meseci	183,88 $\pm$ 4,59	193,85 (110,49-322,38)	52/54
4 Devet meseci	280,40 $\pm$ 8,79	172,19 (167,11-190,49)	5/5

$\bar{x}$  - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; Med - medijana; IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

U Tabeli 4-17. prikazane su vremenske tačke praćenja i njihov opseg u danima u okviru BNT162b2 podgrupe sa odgovarajućom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela naivnih

ispitanika nakon dve doze ove vakcine. Seropozitivnost naivnih ispitanika iznosila je 100% (67/67) u prvoj vremenskoj tački nakon druge doze BNT162b2. Tokom perioda praćenja, dva ispitanika su postala seronegativna u trećoj tački praćenja (96,29%, 52/54), dok je nalaz kod trećeg ispitanika postao negativan u periodu između treće i četvrte tačke praćenja. U okviru tabele, prikazani su isključivo uzorci sa pozitivnim vrednostima i to upravo oni koji su uzorkovani u okviru datih vremenskih odrednica (Tabela 4-17).

U Tabeli 4-17. uočava se drastičan pad koncentracije antitela kroz vreme, do devet meseci nakon prve doze BNT162b2 vakcine (četvrta tačka praćenja). Radi poređenja nivoa antitela po tačkama, urađen je Viloksonov test ekvivalentnih parova, kojim je utvrđen statistički značajan pad nivoa antitela između prve i druge tačke ( Slika 4-19 A,  $p < 0,001$ ), prve i treće (Slika 4-19 B,  $p < 0,001$ ), kao i druge i treće tačke praćenja (Slika 4-19 D,  $p < 0,001$ ). Statistički značajna razlika ne postoji između parova poređenja sa četvrtom tačkom (Slika 4-19 C, E, F), iako postoji očigledan pad koncentracije antitela, što se najverovatnije može pripisati malom broju parnih uzoraka, usled slabijeg odziva ispitanika devet meseci nakon prve doze.



**Slika 4-19.** Vezani uzorci naivnih ispitanika BNT162b2 grupe sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) u različitim vremenskim tačkama: A - šest nedelja i tri meseca, B - šest nedelja i šest meseci, C - šest nedelja i devet meseci, D - tri meseca i šest meseci, E - tri meseca i devet meseci, F - šest i devet meseci. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Viloksonovog testa ekvivalentnih parova.

#### 4.2.4.4.1. RBD-specifična IgG antitela nakon BNT162b2 vakcine kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

U okviru BNT162b2 podgrupe ispitanika 31 ispitanik imao je potvrđenu SARS-CoV-2 infekciju pre vakcinacije. Međutim, nakon svih isključenja, u analizu nivoa antitela kroz vreme uključeno je ukupno 27 ispitanika. U osam uzoraka registrovan je porast koncentracije RBD-IgG antitela. Nalaz N-IgG antitela bio je pozitivan kod pet ispitanika, čiji su odgovarajući uzorci kao i svi sukcesivni izbačeni iz analize kinetike, ali se obrađuju u okviru odeljka o infekcijama nakon vakcinacije.

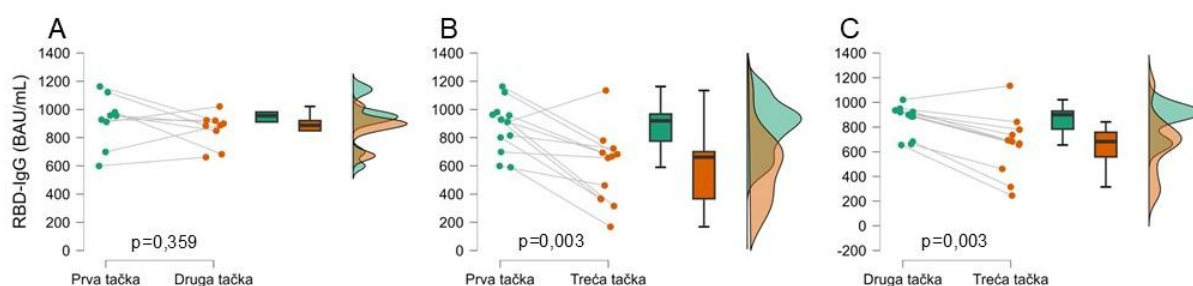
Ispitanici ove podgrupe, za razliku od naivnih ispitanika, ostali su seropozitivni tokom čitavog perioda praćenja. Štaviše, na osnovu tabelarnog prikaza medijana uočavaju se visoki nivoi antitela od početka vakcinacije do navršenih devet meseci praćenja (Tabela 4-18). Poređenjem vezanih uzoraka tokom perioda praćenja nije dobijen statistički značajan pad nivoa antitela između

prve i druge vremenske tačke (Slika 4-20 A;  $p=0,359$ ), dok je statistički značajna razlika dobijena kod poređenja uzoraka prve i treće (Slika 4-20 B,  $p=0,003$ ) i druge i treće vremenske tačke (Slika 4-20 C;  $p=0,003$ ). Usled malog broja uzoraka, poređenje nije vršeno sa vremenskom tačkom od devet meseci (četvrta tačka).

**Tabela 4-18.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom kod ispitanika sa potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije, u okviru vakcinalne grupe, nakon BNT162b2 primarne serije vakcine. Vremenske tačke od šest nedelja, tri meseca, šest meseci i devet meseci računane su od datuma primanja prve doze vakcine.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
1 Šest nedelja	43,80 $\pm$ 3,27	925,02 (811,77-967,45)	20/20
2 Tri meseca	89,87 $\pm$ 4,66	894,12 (807,45-926,44)	12/12
3 Šest meseci	184,67 $\pm$ 4,28	656,45 (320,81-729,94)	19/19
4 Devet meseci	277,60 $\pm$ 11,37	519,94 (457,68-558,21)	4/4

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika u određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.



**Slika 4-20.** Vezani uzorci ispitanika BNT162b2 grupe sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (pre vakcinacije), sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL) u različitim vremenskim tačkama: A - šest nedelja i tri meseca, B - šest nedelja i šest meseci, C - tri meseca i šest meseci. Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Viloksonovog testa ekvivalentnih parova.

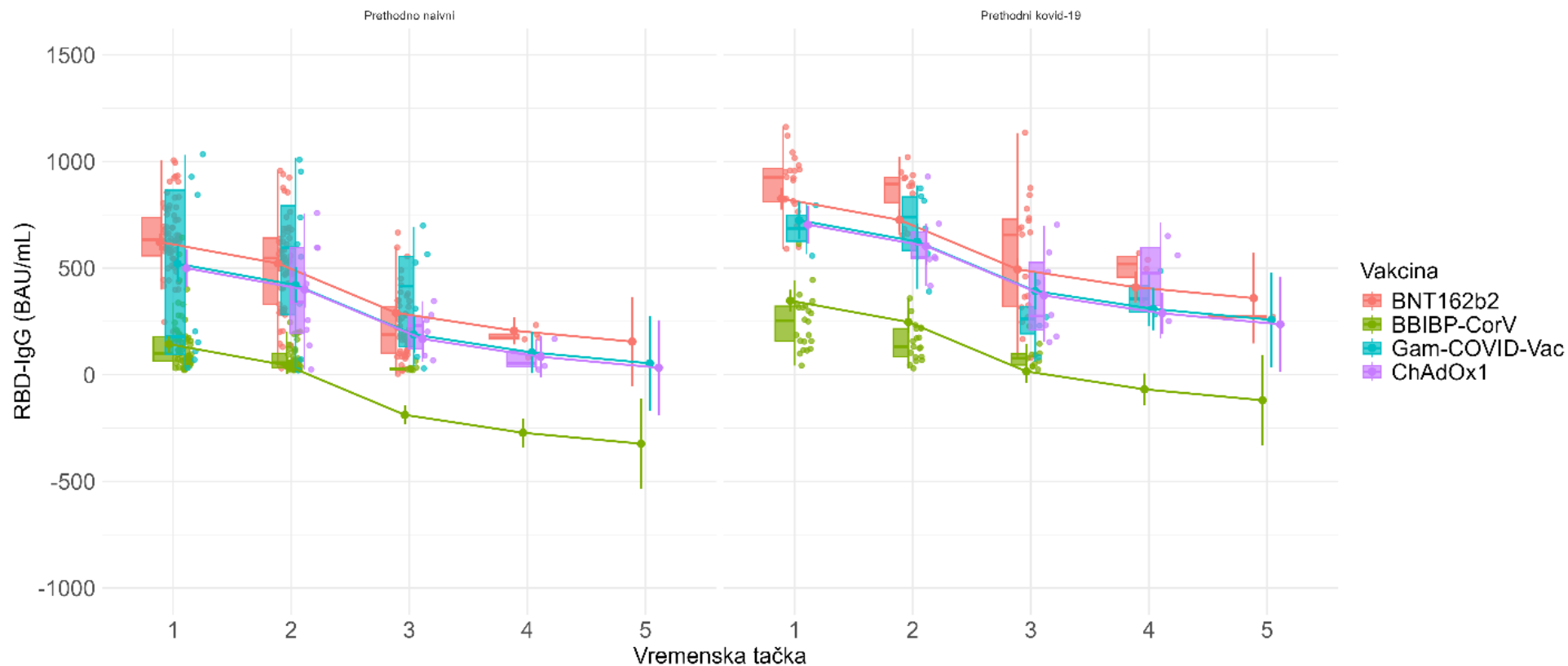
#### 4.2.5. Uticaj pola, starosti, tipa vakcine i prethodnog kovid-19 na nivoe RBD-specifičnih IgG antitela nakon primarne serije

Za LMM analizu kinetike specifičnih IgG antitela kao zavisna kontinuirana varijabla postavljena je koncentracija antitela izražena u BAU/mL, dok su vremenska tačka, pol, tip vakcine, prethodna infekcija SARS-CoV-2 pre vakcinacije i uzrast označeni kao fiksni efekti (*fixed effects*). Za grupišući faktor odabran je identifikacioni broj ispitanika (*random effects grouping factor*). Model je prilagođen koristeći REML. Reziduali su bili približno normalno raspoređeni i nije primećena značajna heteroskedastičnost ni za jedan model.

Opazjen je značajan uticaj tipa vakcine i vremena na nivoe IgG antitela. Ako se za referentnu vakcinu uzme BNT162b2, BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac podgrupe imale su značajno niže nivoe antitela ( $p < 0,001$ ;  $p = 0,006$ ), dok između BNT162b2 i ChAdOx1 nije bilo statistički značajne razlike. Prethodna infekcija dovela je do viših koncentracija RBD-IgG nakon vakcinacije ( $\beta = 197,7$ ;  $SE = 25,0$ ;  $p < 0,001$ ). Pol i uzrast ispitanika nisu bili značajni prediktori RBD-IgG odgovora nakon dve doze vakcine ( $p > 0,2$ ).

U poređenju sa prvom vremenskom tačkom, RBD-IgG antitela značajno su bila niža u drugoj vremenskoj tački ( $\beta = -108,1$ ;  $SE = 15,7$ ;  $p < 0,001$ ), trećoj ( $\beta = -380,1$ ;  $SE = 15,7$ ;  $p < 0,001$ ), četvrtoj ( $\beta = -452,4$ ;  $SE = 35,2$ ;  $p < 0,001$ ) i petoj vremenskoj tački ( $\beta = -488,1$ ;  $SE = 97,1$ ;  $p < 0,001$ ). Poređenja procenjenih srednjih vrednosti (eng. *estimated marginal means*), prilagođena Tukijevom metodom, pokazala su značajne razlike u nivoima IgG antitela u odnosu na tip vakcine. Tako su u prvoj tački najviši nivoi antitela bili nakon BNT162b2 vakcine, u poređenju sa BBIBP-CorV ( $p < 0,0001$ ) i Gam-COVID-Vac vakcinom ( $p = 0,016$ ); dok je u drugoj vremenskoj tački značajna razlika postojala između BNT162b2 i BBIBP-CorV vakcine ( $p < 0,0001$ ), kao i BNT162b2 i ChAdOx1 vakcine ( $p = 0,024$ ). U trećoj vremenskoj tački značajna razlika postojala je samo između BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac vakcine ( $p = 0,007$ ). Razlika između Gam-COVID-Vac i ChAdOx1 vakcine nije bila statistički značajna ni u jednoj vremenskoj tački ( $p > 0,81$ ). U kasnijim vremenskim tačkama, nivoi IgG antitela su nastavili da opadaju, međutim mnogi kontrasti nisu više bili statistički značajni ili nisu mogli biti određeni usled manjeg broja uzoraka. Rezultati poređenja uprosečeni su na osnovu kovarijanti – pol, godine, prethodni kovid-19 status.

Predikcija srednjih vrednosti RBD-specifičnih IgG antitela u zavisnosti od vakcine i prethodnog kovid-19 statusa prikazani su na Slici 4-21. Procenjeni nivoi antitela ovde su označeni kao *boxplot*-ovi različitih boja, sa intervalima poverenja (95%) koji su izračunati u okviru samog modela. Na slici se uočava predviđena potpuna seronegativizacija nakon treće tačke praćenja za BBIBP-CorV vakcinu, ali i najviši odgovor nakon BNT162b2 vakcine, dok se krive za ChAdOx1 i Gam-COVID-Vac gotovo preklapaju. Poređenjem prikaza vrednosti ispitanika bez i sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, uočavaju se viši nivoi kod ispitanika koji su pre vakcinacije bili u kontaktu sa virusom (Slika 4-21).



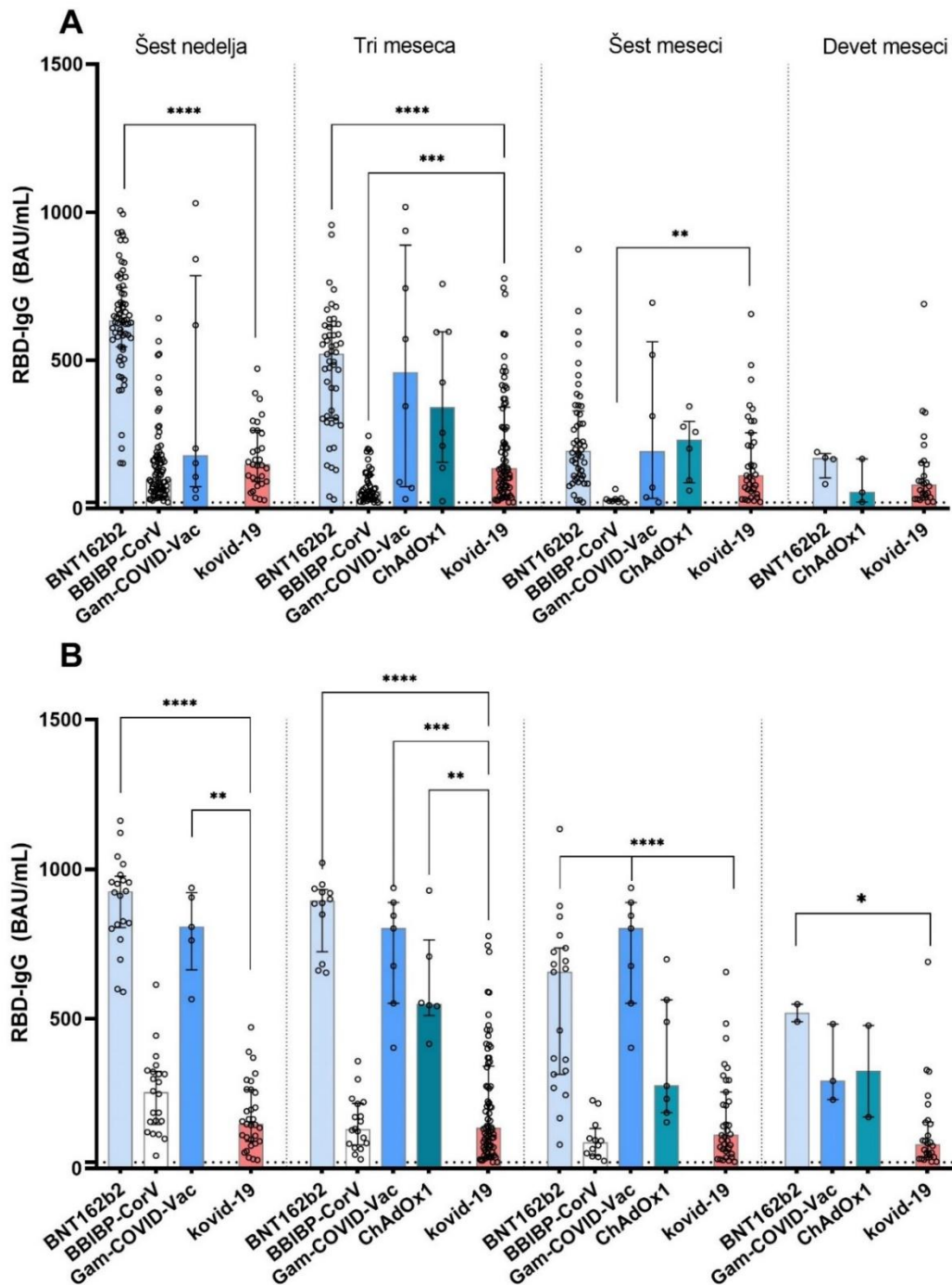
**Slika 4-21.** Prikaz predikcije srednjih vrednosti nivoa RBD-specifičnih IgG antitela tokom perioda praćenja, u zavisnosti od vakcine i prethodne SARS-CoV-2 infekcije, izračunatih linearnim miks modelom. Vremenske tačke: 1 – šest nedelja, 2 - tri meseca, 3 - šest meseci, 4 – devet meseci i 5 – dvanaest meseci od datuma primanja prve doze vakcine

#### **4.2.6. Poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela između vakcina nakon primarne serije i kovid-19 grupe ispitanika**

Poređenje koncentracije RBD-IgG antitela nakon primarne serije kod vakcinisane grupe ispitanika i kovid-19 grupe ispitanika zahtevalo je izmene u nazivima vremenskih tačaka. Naime, prva tačka kod vakcinacije podrazumeva šest nedelja od prve doze, dok je u kovid-19 grupi prva tačka praćenja tri nedelje od početka simptoma ili pozitivnog testa. Stoga, radi izbegavanja zabune, tačke praćenja na graficima nazvane su po približnim nedeljama/mesecima praćenja kojima odgovaraju.

U okviru svake vremenske tačke praćenja upotrebljen je Kruskal-Volisov test, sa Danovom korekcijom za višestruka poređenja, tako da je kovid-19 grupa označena kao kontrolna grupa sa kojom su se poredile sve ostale podgrupe (tj. vakcine). U vremenskoj tački određenoj na šest nedelja od vakcinacije/početka bolesti statistički značajna razlika registrovana je jedino prilikom poređenja prethodno naivnih ispitanika BNT162b2 podgrupe i kovid-19 grupe (Slika 4-22 A,  $p < 0,0001$ ). Na tri meseca, statistički značajno viša antitela ponovo su detektovana kod BNT162b2 podgrupe u odnosu na kovid-19 grupu (Slika 4-22 A,  $p < 0,0001$ ), dok je koncentracija antitela kod BBIBP-CorV podgrupe bila statistički značajno niža u odnosu na kovid-19 grupu (Slika 4-22 A,  $p = 0,0006$ ). Šest meseci nakon prve doze odnosno početka bolesti, statistički značajna razlika postojala je isključivo između BBIBP-CorV i kovid-19 grupe (Slika 4-22 A,  $p = 0,006$ ), odnosno statistički značajno niže koncentracije antitela ponovo su detektovane u BBIBP-CorV podgrupi. Devet meseci nakon vakcinacije statistički značajna razlika nije postojala u odnosu na kovid-19 grupu.

Kada se porede koncentracije antitela nakon vakcinacije kod ispitanika koji su imali kovid-19 pre prve doze vakcine, sa ispitanicima kovid-19 grupe, statistički značajne razlike postoje za sve četiri vremenske tačke prilikom poređenja BNT162b2 i kovid-19 grupe (Slika 4-22 B). Naime, koncentracija RBD-IgG antitela nakon ove vakcine kod ispitanika sa prethodnom infekcijom bila je značajno viša u vremenskim tačkama praćenja od šest nedelja, tri meseca, šest meseci (za sva tri poređenja;  $p < 0,0001$ ) i devet meseci ( $p = 0,043$ ), u odnosu na ispitanike kovid-19 grupe. Takođe, na šest nedelja, tri meseca i šest meseci od vakcinacije i Gam-COVID-Vac podgrupa je pokazala statistički značajno više koncentracije antitela u odnosu na kovid-19 grupu (Slika 4-22 B,  $p = 0,001$ ,  $p = 0,0004$ ,  $p < 0,0001$ ), dok je viša koncentracija za ChAdOx1 podgrupu u odnosu na kovid-19 grupu registrovana isključivo tri meseca nakon prve doze (Slika 4-22 B,  $p = 0,004$ ). Razlika u koncentraciji RBD-IgG BBIBP-CorV podgrupe ispitanika i kovid-19 grupe nije bila statistički značajna ni u jednoj vremenskoj tački (Slika 4-22 B).



**Slika 4-22.** Prikaz koncentracije RBD-specifičnih antitela u grupi vakcinisanih nakon primarne serije vakcinacije, kod naivnih ispitanika (A) i kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (B), u poređenju sa kovid-19 grupom. Period praćenja označen je na početku grafika (šest nedelja, tri meseca, šest meseci, devet meseci) i računat je od prve doze za vakcinisane, odnosno od početka bolesti za kovid-19 grupu. Označene su medijane i interkvartilni opseg, a isprekidanom horizontalnom linijom označena je i granica pozitivnosti testa - 20,33 BAU/mL. Poređenje je vršeno Kraskal-Volisovim testom i notirane su isključivo statistički značajne razlike. \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \* -  $p < 0,05$ .

#### 4.2.7. RBD-specifična IgM antitela nakon vakcinacije

Pozitivan nalaz RBD-IgM antitela nakon prve doze vakcine detektovan je kod prethodno naivnih ispitanika isključivo u okviru BNT162b2 podgrupe (n=13, medijana indeksa antitela 2,13; IQR 1,49-3,31), dok su uzorci naivnih ispitanika nakon ostalih vakcina bili negativni. Kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, RBD-specifična IgM antitela detektovana su nakon prve doze BBIBP-CorV (n=2, medijana 2,48; IQR 1,37-3,59) i ChAdOx1 podgrupe (n=2, medijana 1,92; IQR 1,48-2,36).

Kao i kod analize RBD-IgG antitela, nakon dve primljene doze vakcine, ispitanici su praćeni u pet vremenskih tačaka - šest nedelja, tri meseca, šest, devet i dvanaest meseci od prve doze vakcine. Analiza RBD-IgM odgovora vršena je u okviru svake podgrupe kao i pri poređenju ovih podgrupa. Takođe, kao i za RBD-IgG antitela, podgrupa nakon dve doze mRNA-1273 vakcine neće biti prikazana u ovom odeljku, usled malog broja ispitanika (n=2). U Tabeli 4-19. prikazana je zastupljenost pozitivnih nalaza RBD-IgM antitela a u Tabeli 4-20. indeks RBD-IgM antitela šest nedelja nakon prve doze.

**Tabela 4-19.** Seropozitivnost RBD-IgM šest nedelja nakon prve doze vakcine kod prethodno naivnih ispitanika i kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije, raščlanjena po vakcinama.

Vakcina	Pozitivan nalaz RBD-specifičnih IgM antitela		P
	Prethodno naivni ispitanici (n/N, %)	Ispitanici sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (n/N, %)	
BBIBP-CorV	19/94 (20,21)	4/22 (18,18)	0,99
Gam-COVID-Vac	0/7	0/5	NP
ChAdOx1	2/8 (25)	2/6 (33,33)	0,99
BNT162b2	32/67 (46,76)	4/19 (21,05)	0,06

n - ukupan broj ispitanika sa pozitivnim nalazom, N - ukupan broj testiranih ispitanika, NP -nije primenljivo. P vrednosti izračunate su Fišerovim testom tačne verovatnoće.

**Tabela 4-20.** Indeks RBD-specifičnih IgM antitela kod prethodno naivnih i ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, nakon dve doze vakcine. Rezultati za Gam-COVID-Vac vakcinu nisu prikazani usled negativnih nalaza RBD-IgM antitela u ovoj podgrupi.

Vakcina	RBD-specifična IgM antitela (indeks)		P
	Prethodno naivni ispitanici (Med i IQR)	Ispitanici sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom (Med i IQR)	
BBIBP-CorV	1,49 (1,16-2,13)	1,42 (1,28-1,68)	0,84
ChAdOx1	1,38 (1,06-1,71)	1,56 (1,16-1,97)	0,99
BNT162b2	1,82 (1,19-3,33)	1,56 (1,07-6,79)	0,78

Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. P vrednosti izračunate su Man-Vitnijevim testom.

#### **4.2.7.1. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine**

Seropozitivnost ispitanika nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine u prvoj vremenskoj tački praćenja iznosila je 20,21 % (19/94 urađenih) za naivne ispitanike, odnosno 18,18% (4/22) za ispitanike sa prethodnim kovid-19. Ova razlika u seropozitivnosti nije bila statistički značajna (Fišerov test,  $p=0,99$ ) (Tabela 4-19). Ispitanicima koji nisu imali pozitivan IgM na prvoj kontroli, nije ponavljan test pri sledećoj kontroli, osim u slučaju asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela ili potvrđenog kovid-19 nakon vakcinacije. U drugoj tački praćenja, seropozitivnost je iznosila 6,89% (2/29 urađenih) kod predvakcinalno naivnih, a oba ispitanika negativizirala su se u narednoj tački praćenja. Kod ispitanika sa prethodnim kovid-19, u drugoj tački praćenja tri ispitanika imala su pozitivan nalaz IgM antitela (od četiri testiranih).

Medijane indeksa RBD-IgM antitela kod naivnih i kod ispitanika sa prethodnom infekcijom nisu bile statistički značajno različite (Man-Vitnijev test,  $p=0,84$ ) (Tabela 4-20). I kod BBIBP-CorV podgrupe, poređenjem parnih indeksa RBD-IgM antitela (kako pozitivnih, tako i negativnih) sa pripadajućim indeksom RBD-IgG antitela kod prethodno naivnih ispitanika dobija se statistički značajna pozitivna, srednje jaka korelacija (Spirmanov koeficijent  $r=0,37$ ;  $p=0,003$ ), dok ista korelacija u grupi ispitanika sa prethodnom infekcijom nije bila statistički značajna ( $p=0,64$ ).

#### **4.2.7.2. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze Gam-COVID-Vac vakcine**

Nakon dve doze Gam-COVID-Vac vakcine u prvoj tački praćenja, kako kod naivnih tako i kod ispitanika sa prethodnim kovid-19, nisu bila detektovana RBD-specifična IgM antitela ni u jednom slučaju. Ispitanicima nije ponavljan test pri sledećoj kontroli, kako nisu imali pozitivan IgM na prvoj kontroli, osim u slučaju asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela. Dva ispitanika sa asimptomatskim porastom RBD-IgG i pozitivnim nalazom N-IgG antitela, imali su negativan nalaz RBD-IgM antitela takođe. Medijana negativnih indeksa RBD-IgM antitela iznosila je 0,35 (IQR 0,22-0,51) kod naivnih, odnosno 0,24 (0,16-0,34) kod ispitanika sa prethodnom infekcijom.

#### **4.2.7.3. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze ChAdOx1 vakcine**

U prvoj tački praćenja, kod naivnih ispitanika detektovana su kod 25% (2/8) ispitanika RBD-IgM, dok su kod ispitanika sa prethodnim kovid-19 detektovana RBD-IgM antitela u 33,33% (2/6) slučajeva (Tabela 4-19). Ispitanicima nije ponavljan test pri sledećoj kontroli, osim u slučaju asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela. U oba slučaja porasta nivoa RBD-IgG, nalaz RBD-IgM antitela bio je negativan. Medijana indeksa pozitivnih nalaza RBD-IgM antitela kod naivnih ispitanika i medijana kod ispitanika sa prethodnom infekcijom nisu se značajno razlikovale ( $p=0,99$ ) (Tabela 4-20).

#### **4.2.7.4. RBD-specifična IgM antitela nakon dve doze BNT162b2 vakcine**

Seropozitivnost nakon dve doze BNT162b2 vakcine u prvoj vremenskoj tački praćenja iznosila je 47,76 % (32/67) za naivne ispitanike, odnosno 21,05% (4/19) za ispitanike sa prethodnim kovid-19, kod kojih je rađen RBD-IgM test (u zavisnosti od količine dostupnog seruma). Procenat nije bio statistički značajno različit između ove dve grupacije ispitanika (Fišerov test tačne verovatnoće,  $p=0,06$ ) (Tabela 4-19). Ispitanicima koji nisu imali pozitivan nalaz IgM antitela na prvoj kontroli, nije ponavljan test pri sledećoj kontroli, osim u slučaju asimptomatskog skoka nivoa RBD-IgG antitela. Stoga, u trećoj tački praćenja seropozitivnost je iznosila 11,11% (5/45) za naivne, odnosno 22,22% (2/9) za ispitanike sa prethodnim kovid-19, dok za analizu četvrti i pete tačke nije bilo dovoljno uzoraka usled prethodne seronegativizacije. Ispitanici sa asimptomatskim skokom RBD-IgG antitela, koji nije potvrđen kao infekcija prisustvom N-IgG antitela, nisu imali pozitivan nalaz RBD-IgM antitela u podgrupi ispitanika sa prethodnim kovid-19 (3/3), dok su u podgrupi naivnih dva ispitanika imala pozitivan nalaz RBD-IgM antitela (2/10), doduše u padu u odnosu na prethodni vezan uzorak.

Medijane indeksa RBD-IgM antitela u prvoj tački kod naivnih i kod ispitanika sa prethodnom infekcijom, nisu bile statistički značajno različite (Man-Vitnjev test,  $p=0,78$ ). Kada se uporede nalazi RBD-IgM antitela (kako pozitivni, tako i negativni) sa pripadajućim indeksom RBD-IgG antitela kod prethodno naivnih vakcinisanih ispitanika dobija se statistički značajna pozitivna, umerena korelacija (Spirmanov koeficijent  $r=0,305$ ;  $p=0,012$ ). Nasuprot tome, korelacija u grupi prethodno inficiranih ispitanika vakcinisanih sa dve doze BNT162b2 nije bila statistički značajna ( $p=0,73$ ).

#### **4.2.7.5. Poređenje učestalosti RBD-specifičnih IgM antitela između vakcina nakon primarne serije i kovid-19 grupe ispitanika**

Šest nedelja nakon početka infekcije u kovid-19 grupi procenat pozitivnosti nalaza RBD-specifičnih IgM antitela iznosio je 54,84% (17/31). Analogno, već opisani procenti seropozitivnosti za svaku vakcinu ponaosob, sumirani su u Tabeli 4-19.

Razlika u učestalosti između kovid-19 grupe i BNT162b2 podgrupe naivnih ispitanika nije bila značajna (Hi-kvadrat,  $p=0,52$ ), kao ni u poređenju sa ChAdOx1 podgrupom (Fišerov test,  $p=0,23$ ), dok je između kovid-19 grupe i BBIBP-CorV podgrupe naivnih ispitanika razlika bila statistički visoko značajna (Hi-kvadrat,  $p=0,0002$ ). Takođe, pozitivni nalazi RBD-IgM antitela kod ispitanika bili su više zastupljeni u okviru BNT162b2 podgrupe, nego kod BBIBP-CorV podgrupe (Hi-kvadrat,  $p=0,0002$ ), dok razlika između ovih podgrupa i ChAdOx1 podgrupe nije bila statistički značajna ( $p_{\text{ChAdOx1 i BNT162b2}}=0,28$ ;  $p_{\text{ChAdOx1 i BBIBP-CorV}}=0,67$ ) (Tabela 4-19). Kada se uporede indeksi RBD-IgM antitela, statistički značajna razlika uočena je jedino između kovid-19 grupe (medijana 2,43; IQR 1,83-2,97) i BBIBP-CorV (medijana 1,49; IQR 1,16-2,13) podgrupe, kod koje je nađena niža vrednost indeksa antitela (Man-Vitnjev test,  $p=0,009$ ).

Kada se porede učestalosti pozitivnih nalaza između kovid-19 grupe i BNT162b2 podgrupe i BBIBP-CorV podgrupe prethodno pozitivnih ispitanika, statistički značajna razlika se uočava između kovid-19 grupe i BBIBP-CorV podgrupe (Fišerov test,  $p=0,004$ ), ali i kovid-19 grupe i BNT162b2 podgrupe (Fišerov test,  $p=0,04$ ). Takođe, indeks RBD-IgM antitela bio je statistički značajno niži u podgrupi BBIBP-CorV ispitanika sa prethodnom infekcijom (medijana 1,42; IQR 1,28-1,68), u odnosu na kovid-19 grupu (Man-Vitnjev test,  $p=0,02$ ). I kod naivnih i kod prethodno obolelih ispitanika BNT162b2 podgrupe, indeksi RBD-IgM antitela nisu bili statistički značajno različiti od kovid-19 grupe ( $p_{\text{naivni}}=0,14$ ,  $p_{\text{prethodna infekcija}}=0,36$ ).

#### **4.2.8. Prisustvo N-specifičnih IgG i RBD-specifičnih antitela u vezanim uzorcima ispitanika koji su pre primanja BBIBP-CorV vakcine imali kovid-19**

Kod ispitanika BBIBP-CorV podgrupe koji su pre vakcinacije imali kovid-19, a čiji su vezani uzorci bili dostupni odmah nakon početka simptoma ili pozitivnog dijagnostičkog testa i šest nedelja nakon prve doze BBIBP-CorV vakcine, poređeni su rezultati RBD-specifičnih antitela i N-IgG antitela (Tabela 4-21).

Iako se uočava porast u koncentraciji RBD-IgG antitela nakon vakcinacije, ova razlika u odnosu na uzorak nakon kovid-19 nije bila statistički značajna ( $p=0,12$ ). Takođe, statistički značajna razlika nije pokazana ni za RBD-IgM antitela ( $p=0,62$ ), niti za N-IgG ( $p=0,12$ ) (Tabela 4-21). Štaviše, uočava se pravilnost u nalazima N-IgG antitela, gde se gotovo identični nivoi generišu nakon kovid-19 i nakon primljene BBIBP-CorV vakcine kod istih ispitanika. Ovakav odnos nije uočen za RBD-IgM antitela.

**Tabela 4-21.** Koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela, indeks RBD-specifičnih IgM antitela i N-specifičnih IgG antitela u vezanim uzorcima ispitanika koji su imali kovid-19 pre vakcinacije BBIBP-CorV vakcinom. Rezultati su prikazani za prvi uzorak nakon početka simptoma ili pozitivnog dijagnostičkog testa i na prvoj kontroli nakon prve doze BBIBP-CorV vakcine. Sve pozitivne vrednosti su označene *bold* fontom.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (BAU/mL)		RBD-IgM antitela (indeks)		N-IgG antitela (odnos)		Vremenski razmak od početka simptoma do uzorkovanja (dan)	
	Kovid-19	Vakcina	Kovid-19	Vakcina	Kovid-19	Vakcina	Kovid-19	Vakcina
1	<b>28,26</b>	<b>345,00</b>	0,71	<b>1,68</b>	<b>3,719</b>	<b>3,281</b>	41	41
2	<b>389,12</b>	<b>444,21</b>	0,5	0,37	<b>5,169</b>	<b>4,758</b>	67	39
3	<b>317,35</b>	<b>288,89</b>	0,25	0,25	<b>1,513</b>	<b>1,238</b>	37	41
4	<b>100,23</b>	<b>248,84</b>	<b>5,01</b>	0,3	<b>7,497</b>	<b>7,179</b>	21	41
5	<b>91,49</b>	<b>299,87</b>	<b>2,2</b>	<b>1,42</b>	<b>4,860</b>	<b>5,109</b>	24	43

Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL; RBD-IgM pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos).

#### 4.2.9. N-specifična IgG antitela i neutrališuća antitela kod RBD seronegativnih ispitanika nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine

Kao što je već navedeno u prvoj sekciji o naivnim ispitanicima u okviru BBIBP-CorV podgrupe, seropozitivnost nakon vakcinacije, odnosno šest nedelja nakon prve doze vakcine nije iznosila 100%. Tačnije, seronegativnih ispitanika, kada su u pitanju RBD-specifična antitela, bilo je 21/100 (21%) – ni IgM, ni IgG antitela specifična za RBD S proteina nisu detektovana u ovim uzorcima (za dva ispitanika nije bila dovoljna količina uzorka za analizu RBD-IgM).

Zbog činjenice da BBIBP-CorV kao vakcina sadrži čitav virion, a ne samo S protein, kod određenog broja seronegativnih ispitanika rađen je i test detekcije N-specifičnih IgG antitela (Tabela 4-22). Sve vrednosti ovog testa ispod 0,800 smatraju se negativnim, te se može iz priložene tabele uočiti da ni u jednom testiranom uzorku nisu detektovana N-IgG antitela. Osim toga, radi finalne potvrde, svi uzorci su testirani i u surogat neutralizacionom testu, radi detekcije potencijalno prisutnih neutrališućih antitela. Međutim, procenat inhibicije signala, kao mera ovog testa, bio je ispod stepena pozitivnosti za svaki testirani uzorak (Tabela 4-22).

Kada se godine RBD-IgG seronegativnih ispitanika - 64 (IQR 57,50-72,50), porede sa naivnim ispitanicima koji su imali pozitivan odgovor nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine u prvoj vremenskoj tački praćenja – 61 (IQR 40-67), dobija se statistički značajna razlika ( $p=0,03$ ). Tri meseca nakon vakcinacije naivni seropozitivni ispitanici bili su uzrasta medijane 56 (IQR(42-67)), dok su seronegativni ispitanici bili nešto stariji 65 (52-71), međutim ova razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,16$ ). Odnos bioloških polova u prvoj vremenskoj tački nije bio statistički značajno različit između ispitanika koji su imali detektabilan odgovor i onih koji nisu (Hi-kvadrat test,  $p=0,55$ ).

**Tabela 4-22.** Indeks RBD-specifičnih IgG antitela, N-specifičnih IgG antitela i procenat inhibicije signala neutrališućih antitela, u uzorcima naivnih ispitanika nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine.

Ispitanik	Godine	Pol	RBD-IgG antitela (indeks)	N-IgG antitela (odnos)	Neutrališuća antitela (% inhibicije)	Vreme od prve doze do uzorkovanja (dan)
1	81	M	0,04	0,077	2,08	32
2	62	M	0,1	0,130	3,68	41
3	87	M	0,72	0,165	17,97	39
4	58	Ž	0,48	0,081	16,45	43
5	64	Ž	0,03	0,183	-1,87*	43
6	62	Ž	0,17	0,060	-13,53*	39
7	67	Ž	0,35	0,072	-4,16*	42
8	71	Ž	0,48	0,146	8,68	44
9	56	M	0,48	0,051	24,98	47
10	65	Ž	0,28	0,151	8,61	44
11	47	M	0,19	0,042	12,58	43
12	64	Ž	0,22	0,202	14,02	45
13	70	M	0,55	0,086	7,91	46
14	74	M	0,06	0,044	7,70	49
15	57	Ž	0,57	0,473	14,92	49
16	45	M	0,2	0,067	17,97	59
17	82	Ž	0,76	0,142	16,45	55
18	40	Ž	0,87	0,148	19,64	51
19	61	M	0,69	0,077	22,42	60
20	52	M	0,08	0,032	3,75	69
21	65	M	0,17	0,255	0,04	38

\*Vrednosti sa negativnim predznakom niže su od negativne kontrole testirane u istoj reakciji. Ref. vrednosti: RBD-IgM, RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

#### **4.2.9.1. N-specifična IgG antitela i neutrališuća antitela kod ispitanika BBIBP-CorV podgrupe čiji su nalazi RBD-IgG antitela pali ispod praga detekcije tokom perioda praćenja**

Ispitanici kod kojih se nalaz RBD-IgG antitela negativizovao tokom perioda praćenja, prikazani su u Tabeli 4-23. Kod ovih ispitanika poređeni su nivoi RBD-IgG i N-IgG antitela u vezanim uzorcima, pre i posle negativizacije RBD-IgG antitela. Iz drugog uzorka, sa RBD-negativnim nalazom, određivan je i procenat inhibicije neutralizacije, odnosno prisustvo neutrališućih antitela. Analizom rezultata vezanih uzoraka uočava se statistički značajan pad u nivoima RBD-IgG antitela pre i posle negativizacije ( $p < 0,0001$ ), kao i značajan pad u nivoima N-IgG antitela ( $p = 0,008$ ). Međutim, korelacija RBD-IgG nalaza i N-IgG nalaza nije bila statistički značajna ni pri prvom, ni pri drugom uzorkovanju ( $p = 0,46$ ;  $p = 0,25$ ). Neutrališuća antitela bila su prisutna samo kod dva ispitanika sa negativnim RBD-IgG nalazom, dok je procenat inhibicije bio ispod granice pozitivnosti kod svih ostalih ispitanika, bez obzira na pozitivnost N-IgG nalaza (Tabela 4-23).

**Tabela 4-23.** Indeks RBD-specifičnih IgG antitela i N-specifičnih IgG antitela u vezanim uzorcima ispitanika BBIBP-CorV podgrupe pre i nakon ustanovljene negativizacije RBD-IgG antitela. Procenat inhibicije neutrališućih antitela prikazan je za drugi uzorak. Sve pozitivne vrednosti su označene *bold* fontom, dok su granične vrednosti označene *italic* fontom.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (indeks)		N-IgG antitela (odnos)		Neutrališuća antitela (% inhibicije)	Vremenski razmak između prve doze vakcine i prvog uzorka (dan)	Vremenski razmak između prve doze vakcine i drugog uzorka (dan)
	Pre	Posle	Pre	Posle			
1	<b>1,32</b>	0,75	0,010	<b>1,030</b>	-0,09*	46	66
2	<b>3,21</b>	0,5	0,305	0,126	-6,12*	43	63
3	<b>2,70</b>	0,8	0,099	0,070	13,53	48	89
4	<b>1,78</b>	0,61	0,252	0,404	7,44	49	91
5	<b>2,08</b>	0,88	<b>0,811</b>	<b>1,109</b>	11,32	54	89
6	<b>3,67</b>	0,49	<b>3,444</b>	<b>1,169</b>	0,04	42	86
7	<b>1,54</b>	0,4	<b>1,130</b>	0,533	4,71	41	90
8	<b>2,35</b>	0,9	0,149	0,126	3,87	44	92
9	<b>3,63</b>	0,99	0,125	0,159	15,19	43	91
10	<b>1,73</b>	0,75	0,114	0,073	2,86	43	91
11	<b>3,10</b>	0,88	0,648	0,152	-2,11*	43	91
12	<b>1,79</b>	0,4	0,368	0,139	4,58	39	88
13	<b>3,52</b>	0,53	<b>0,946</b>	0,079	7,62	44	108
14	<b>1,14</b>	0,21	0,325	0,102	15,34	90	191
15	<b>2,8</b>	0,4	0,377	0,129	-2,20*	91	185
16	<b>1,57</b>	0,28	0,341	0,083	-4,71*	91	182
17	<b>1,92</b>	0,21	<b>1,132</b>	0,255	14,01	89	177
18	<b>5,94</b>	0,99	0,599	0,209	21,31	90	178
19	<b>2,38</b>	0,19	0,106	0,042	12,14	91	181
20	<b>3,77</b>	0,69	0,113	0,099	<b>51,86</b>	91	177
21	<b>3,65</b>	0,62	0,719	0,245	9,85	49	113
22	<b>1,2</b>	0,34	0,093	0,123	-0,62*	90	176
23	<b>8,04</b>	0,74	0,295	0,096	-13,78*	42	181
24	<b>6,09</b>	0,49	0,325	0,096	-8,85*	42	181
25	<b>4,21</b>	0,51	<b>1,596</b>	0,425	23,43	81	172
26	<b>1,97</b>	0,59	0,427	0,116	10,00	94	179
27	<b>2,88</b>	0,51	0,222	0,477	23,45	89	195
28	<b>2,82</b>	0,43	0,285	0,079	-0,57*	80	181
29	<b>3,19</b>	0,63	0,672	0,077	28,18	89	178
30	<b>2,34</b>	0,38	0,659	0,072	10,13	89	178
31	<b>2,28</b>	0,88	<b>1,275</b>	0,513	<b>51,91</b>	84	189
32	<b>1,06</b>	0,23	0,076	0,139	-5,28*	91	182

\*Vrednosti sa negativnim predznakom niže su od negativne kontrole testirane u istoj reakciji. Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

#### 4.2.10. Neutrališuća antitela kod ispitanika Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 podgrupe čiji su nalazi RBD-IgG antitela pali ispod praga detekcije tokom perioda praćenja

Ispitanici čiji se nalaz RBD-specifičnih antitela negativizovao nakon dve doze Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 vakcina prikazani su u Tabeli 4-24. Kod ovih ispitanika rađena je detekcija neutrališućih antitela iz uzoraka sa negativnim RBD-IgG nalazom, a u već pomenutoj tabeli prikazane su vrednosti RBD-IgG antitela pre i posle negativizacije (Tabela 4-24).

Očekivan i statistički značajan pad nivoa antitela uočen je između uzorka pre i posle negativizacije nalaza RBD-IgG antitela ( $p=0,02$ ). Procenat inhibicije neutralizacije bio je ispod nivoa detekcije kod svih ispitanika, nezavisno od platforme, u uzorcima gde je ustanovljen negativan nalaz RBD-IgG antitela. U Tabeli 4-24, jedino se kod ispitanika pod rednim brojem sedam, sa inicijalno višim nivoima RBD-IgG antitela, procenat inhibicije održava relativno blizu praga pozitivnosti (od 30%).

U poređenju sa prethodnom Tabelom 4-23. iz odeljka 4.2.9.1, utvrđeno je da je negativizacija nakon BBIBP-CorV vakcine statistički značajno ranije detektovana ( $140,97 \pm 47,37$ ) u odnosu na sve ostale vakcine prikazane u Tabeli 4-24. ( $212,29 \pm 47,23$ ) ( $p=0,0005$ ).

**Tabela 4-24.** Indeks RBD-specifičnih IgG antitela za vezane uzorke ispitanika pre i posle negativizacije RBD-IgG nalaza, nakon primljene dve doze BNT162b2, Gam-COVID-Vac i ChAdOx1 vakcina. Procenat inhibicije neutrališućih antitela prikazan je za uzorke posle negativizacije. Sve pozitivne vrednosti su označene *bold* fontom.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (indeks)				Neutrališuća antitela (% inhibicije)
	Prvi uzorak	Dan*	Drugi uzorak	Dan*	
Gam-COVID-Vac					
1	<b>1,57</b>	88	0,38	184	-13,12
2	<b>4,37</b>	89	0,78	202	7,97
3	<b>1,88</b>	181	0,76	307	-7,17
ChAdOx1					
4	<b>1,23</b>	98	0,89	180	3,26
BNT162b2					
5	<b>2,02</b>	89	0,2	189	7,79
6	<b>6,42</b>	93	0,92	181	2,69
7	<b>16,26</b>	92	0,91	243	24,48

\*Određnica dan se odnosi na vreme proteklo od primanja prve doze vakcine do uzorkovanja. Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

#### 4.2.11. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon prve doze vakcine

Nakon prve doze vakcine protiv kovid-19, SARS-CoV-2 infekcija dijagnostikovana je kod 1,51% (2/132) ispitanika BNT162b2 podgrupe, 3,53% (6/170) ispitanika BBIBP-CorV podgrupe i kod 3,23% (1/31) ispitanika ChAdOx1 podgrupe (Tabela 4-25). Razlike u učestalosti nisu bile statistički značajne. Svi ispitanici bili su naivni pre vakcinacije, odnosno nisu imali prethodni kontakt sa SARS-CoV-2. Takođe, sve infekcije nakon prve doze vakcine bile su potvrđene ili pozitivnim PCR-om ili pozitivnim brzim antigenskim testom. Infekcije nakon prve doze, a pre primljene druge doze, nisu registrovane u Gam-COVID-Vac, niti mRNA-1273 podgrupi.

Vremenski period između prve doze vakcine i početka simptoma u većini slučajeva iznosio je 10-18 dana (n=6). Međutim, bilo je i izuzetaka. Simptomi kovid-19 pojavili su se u jednom slučaju dva dana nakon prve doze ChAdOx, u drugom slučaju pet dana nakon prve doze BBIBP-CorV i u trećem slučaju osam dana nakon prve doze BNT162b2. Niko od ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon prve doze nije bio hospitalizovan, međutim pneumonija jeste bila dijagnostikovana kod jednog ispitanika nakon BBIBP-CorV vakcine, kod koga su simptomi počeli dvanaestog dana nakon vakcinacije.

Tri ispitanika propustila su naznačeni termin kontrole nakon infekcije (jedan ispitanik iz BNT162b2 i dva iz BBIBP-CorV podgrupe), međutim, za ostale ispitanike (n=6) koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela na prvoj kontroli nakon potvrđene infekcije iznosila je 77,05 BAU/mL za BNT162b2 (n=1); 452,55 (IQR 267,90-611,88) za BBIBP-CorV (n=4); i 217,33 za ChAdOx1 podgrupu (n=1) (Tabela 4-25). Nalaz N-specifičnih antitela bio je negativan kod ispitanika iz BNT162b2 i ChAdOx1 podgrupe, dok su svi ispitanici BBIBP-CorV podgrupe imali pozitivan nalaz (Tabela 4-25). Broj dana od infekcije do serološke kontrole iznosio je  $50,83 \pm 12,42$ . Nalaz RBD-specifičnih IgM antitela bio je pozitivan kod 3/6 ispitanika i njihova medijana indeksa iznosila je 4,23 (2,63-8,23), od toga dva uzorka u BBIBP-CorV i jedan u ChAdOx1 podgrupu (Tabela 4-25).

**Tabela 4-25.** Prikaz broja infekcija SARS-CoV-2 infekcija nakon prve doze vakcine, kao i RBD-specifična IgG i IgM antitela i N-IgG antitela na prvoj kontroli nakon infekcije.

Vakcina	SARS-CoV-2 infekcija (n/N, %)	RBD-IgG, BAU/mL (Med i IQR)	N-IgG, indeks (Med i IQR)	RBD-IgM, indeks (Med i IQR)
BBIBP-CorV	6/170 (3,53)	452,55 (267,90-611,82)	3,87 (2,32-5,19)	6,23 (4,23-8,23)
ChAdOx1	1/31 (3,23)	217,33	NP	2,63
BNT162b2	2/132 (1,51)	77,05	NP	NP

n - broj ispitanika sa infekcijom nakon prve doze, N - ukupan broj vakcinisanih ispitanika. Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg, NP - nije primenljivo.

#### 4.2.12. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon druge doze vakcine

Simptomatska SARS-CoV-2 infekcija nakon druge doze vakcine zabeležena je u 15 slučajeva (4,19%, 15/358 ispitanika u zbirnoj grupi vakcinisanih). Naime, kada slučajeve grupišemo na osnovu primarne vakcine, 5,88% (10/170) slučajeva zabeleženo je u BBIBP-CorV podgrupi, 4,34% (1/23) u Gam-COVID-Vac podgrupi i 3,03% (4/132) u okviru BNT162b2 podgrupe. Od ukupno 15 ispitanika sa simptomatskom infekcijom nakon druge doze vakcine, četiri ispitanika imalo je već kovid-19 pre prve doze vakcine i to dva ispitanika iz BBIBP-CorV, jedan iz Gam-COVID-Vac i jedan iz BNT162b2 podgrupe.

Četiri infekcije (4/15) potvrđene su PCR-om, osam (8/15) pozitivnim brzim antigenskim testom, dok u tri slučaja nije rađen potvrdni test (3/15). U slučajevima koji nisu potvrđeni dijagnostičkim testom, detektovana su N-specifična IgG antitela u prisustvu simptoma kovid-19 (kod ispitanika nakon BBIBP-CorV, rađeno je poređenje u paru sa prethodnim uzorkom, kada je uočen i skok nivoa N-IgG antitela). U ostalim slučajevima, potvrđenim dijagnostičkim testom (n=12), samo jedan ispitanik nije imao pozitivan nalaz N-IgG antitela (uzorak je uzet dva meseca nakon infekcije), dok je medijana indeksa kod ispitanika sa pozitivnim nalazom iznosila 4,428 (3,927-5,226). RBD-IgM antitela detektovana su u 35,71% (5/14) dostupnih uzoraka, i to u tri slučaja nakon BBIBP-CorV vakcine (3/10) i dva nakon BNT162b2 vakcine (2/4). Medijana za BBIBP-CorV podgrupu iznosila je 20,29 (10,20-21,93), a za BNT162b2 podgrupu nešto niže 1,21 (1,14-1,28). Razlika nije bila statistički značajna, uzevši u obzir mali broj uzoraka.

Vreme u danima između datuma druge doze vakcine i datuma početka simptoma iznosilo je  $130,30 \pm 109,05$  dana za BBIBP-CorV i  $196,25 \pm 27,32$  dana za BNT162b2 podgrupu. Iako su infekcije nakon vakcinacije češće registrovane kasnije kod BNT162b2 ispitanika, ova razlika u danima nije statistički značajna, usled velike standardne devijacije u okviru BBIBP-CorV podgrupe (Man-Vitnijev test,  $p=0,24$ ). Takođe, razlika u starosti ispitanika između ove dve podgrupe u trenutku dijagnostikovanja SARS-CoV-2 infekcije nakon vakcinacije nije bila statistički značajna (Man-Vitnijev test,  $p=0,24$ ). Naime, srednja vrednost uzrasta ispitanika u okviru BBIBP-CorV podgrupe iznosila je  $52,90 \pm 15,22$  godina, a  $41,00 \pm 13,29$  godina za BNT162b2 podgrupu.

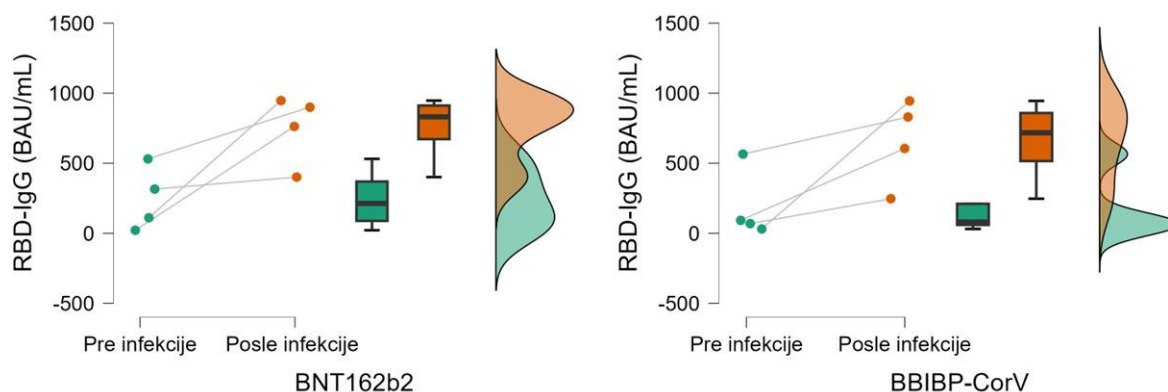
U Tabeli 4-26. prikazana je učestalost simptoma za BNT162b2 i BBIBP-CorV podgrupe, gde se može uočiti da nijedan ispitanik nije hospitalizovan, dok je samo jedan slučaj pneumonije zabeležen u okviru BNT162b2 podgrupe. Ovaj konkretan slučaj registrovan je kao pneumonija ali je lečenje sprovedeno u kućnim uslovima, uz brzu rezoluciju simptoma. Nasuprot tome, nešto češće su prijavljivane povišena telesna temperatura, nosna kongestija, gastrointestinalne tegobe i malaksalost u BBIBP-CorV podgrupi (Tabela 4-26). Takođe, jedan slučaj miokarditisa registrovan je upravo u ovoj podgrupi ispitanika. Miokarditis je razvijen u okviru kliničke slike kovid-19, 11 dana nakon primljene druge doze BBIBP-CorV vakcine. Jedini ispitanik iz Gam-COVID-Vac podgrupe sa infekcijom nakon druge doze vakcine, nije prikazan u Tabeli 4-26. U ovom slučaju razvijena klinička slika kovid-19 uključivala je povišenu temperaturu, malaksalost i kašalj, 237. dana nakon primljene druge doze vakcine.

**Tabela 4-26.** Prikaz simptoma kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon druge doze vakcine u okviru BNT162b2 i BBIBP-CorV podgrupa.

	Ukupno n/N (%)	BBIBP-CorV n/N (%)	BNT162b2 n/N (%)
Povišena telesna temperatura	10/15 (66,67)	7/10 (70,00)	2/4 (50,00)
Nosna kongestija i rinoreja	6/15 (40,00)	5/10 (50,00)	0/4
Bol u grlu	0/15	0/10	0/4
Gastrointestinalne tegobe	2/15 (13,33)	2/10 (20,00)	0/4
Gubitak čula ukusa i mirisa	8/15 (53,33)	5/10 (50,00)	3/4 (75,00)
Malaksalost	7/15 (46,67)	5/10 (50,00)	1/4 (25,00)
Mijalgija	6/15 (40,00)	4/10 (40,00)	2/4 (50,00)
Kašalj	7/15 (46,67)	4/10 (40,00)	2/4 (50,00)
Pneumonija	1/15 (6,67)	0/10	1/4 (25,00)
Hospitalizacija	0/15	0/10	0/4

n - broj ispitanika sa određenim simptomima, N - ukupan broj ispitanika.

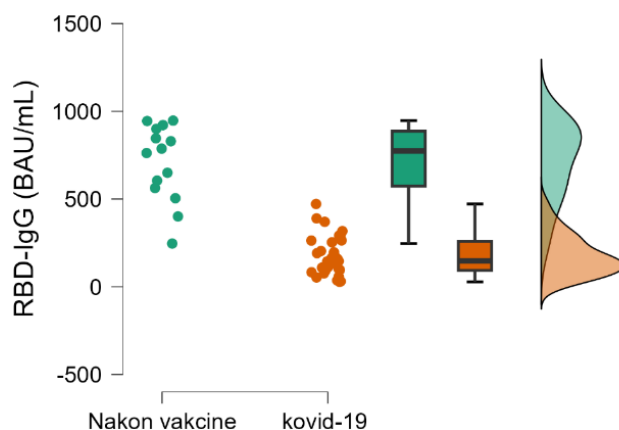
Iako razlika u skoku nivoa RBD-IgG antitela nakon infekcije posle druge doze vakcine nije statistički značajna ni za BBIBP-CorV, niti za BNT162b2 podgrupu (Vilkoksonov test,  $p=0,125$ ), ona se ipak može uočiti za obe podgrupe na Slici 4-23. Rezultati su prikazani samo za dostupne vezane uzorke.



**Slika 4-23.** Prikaz koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela za parne uzorke ispitanika pre i posle infekcije SARS-CoV-2, nakon druge doze BNT162b2 i BBIBP-CorV vakcine. Na slici su prikazani *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka.

#### 4.2.12.1. Infekcije nakon vakcinacije: poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela posle simptomatske infekcije nakon vakcinacije sa nivoima RBD-specifičnih IgG antitela ispitanika iz kovid-19 grupe

Nivoi RBD-specifičnih IgG antitela nakon dijagnostikovane SARS-CoV-2 infekcije koja je usledila posle primarne serije vakcinacije, bili su statistički značajno viši u odnosu na nivoe RBD-IgG antitela kod nevakcinisanih ispitanika nakon preležanog kovid-19 (Man-Vitnijev test,  $p < 0,001$ ). Pri poređenju uzeti su isključivo uzorci prikupljeni u prvih mesec dana ili do dva meseca nakon pozitivnog testa (Slika 4-24).



**Slika 4-24.** Uporedni prikaz nivoa RBD-IgG antitela kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon primarne serije vakcinacije i nevakcinisanih ispitanika nakon kovid-19. Na slici su prikazane pojedinačne vrednosti, sa *boxplot* i *raincloud* elementima.

#### 4.2.13. Asimptomatske infekcije nakon druge doze vakcine

Osim potvrđenih i simptomatskih infekcija, u okviru praćenja imunskog odgovora na različite vakcine detektovani su i slučajevi asimptomatskog skoka koncentracije RBD-IgG antitela. U tim uzorcima rađena je detekcija N-specifičnih IgG antitela, radi potvrde infekcije, a za potrebe BBIBP-CorV rađena je detekcija ovih antitela i u prethodnom uzorku, ukoliko je bio dostupan.

U okviru grupe naivnih ispitanika asimptomatski skok nivoa antitela uočen je kod 2,27% (3/132) ispitanika nakon BBIBP-CorV vakcine, 9,09% (1/11) nakon ChAdOx1 i 10,53% (10/95) nakon BNT162b2 vakcine. Samo u dva uzorka od 10 u okviru prethodno naivnih BNT162b2

ispitanika detektovana su N-IgG antitela i to je jedan rezultat bio granično pozitivan, u BBIBP-CorV podgrupi nalaz je bio pozitivan u dva od tri slučaja, kao i kod jedinog ispitanika ChAdOx1 podgrupe. Jedan ispitanik BBIBP-CorV podgrupe imao je asimptomatski i drastičan skok koncentracije RBD-IgG antitela i to od potpune seronegativizacije do 618,84 BAU/mL, dok u drugom slučaju prethodni uzorak nije bio dostupan za poređenje, ali kako je ispitaniku detektovana izuzetno visoka koncentracija za taj period praćenja (tri meseca od prve doze vakcine – 840,03 BAU/mL) i uzveši u obzir i visok indeks N-IgG od 3,764, može se pretpostaviti da je ispitanik bio u kontaktu sa SARS-CoV-2.

Nasuprot tome, kod ispitanika sa prethodno potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije, asimptomatski skok nivoa RBD-IgG nakon vakcinacije uočen je kod 6,67% (2/30) ispitanika BBIBP podgrupe, dva ispitanika Gam-COVID-Vac podgrupe (2/12), jednog ispitanika ChAdOx1 podgrupe (1/8) i 29,03% (8/31) ispitanika BNT162b2 podgrupe. Kod BNT162b2 podgrupe pozitivan nalaz N-IgG antitela pronađen kod pet od osam ispitanika, u okviru BBIBP-CorV podgrupe porast je detektovan samo u jednom slučaju, a u Gam-COVID-Vac podgrupi kod oba ispitanika, dok to nije bio slučaj sa ispitanikom ChAdOx1 podgrupe, čiji je N-IgG nalaz bio negativan.

Sumirano, uzevši u obzir i prethodno naivne i ispitanike koji su preležali kovid-19 pre vakcinacije, potencijalnih asimptomatskih infekcija, potvrđenih N-IgG pozitivnim nalazom, ukupno je bilo tri u BBIBP-CorV, dve u Gam-COVID-Vac, jedna u ChAdOx1 i 7 u BNT162b2 podgrupi. Nalaz RBD-IgM antitela bio je pozitivan u jednom slučaju nakon BNT162b2 vakcine (indeks 1,32) i u dva nakon BBIBP-CorV vakcine (indeks 14,84 i 4,73).

Ukoliko ove potencijalne infekcije spojimo sa brojem potvrđenih, simptomatskih infekcija, učestalosti infekcija nakon dve doze vakcine iznosile bi 7,65% (13/170) za BBIBP-CorV, 12,5% (3/23) za Gam-COVID-Vac, 3,23%(1/31) za ChAdOx1 i 8,33% (11/132) za BNT162b2 podgrupu.

### **4.3. Grupa vakcinisanih ispitanika nakon treće doze vakcine**

Odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije od avgusta 2021. godine, nakon isteka šest meseci od kompletne primarne serije vakcinacije, građani su imali priliku da se prijave i za treću dozu vakcine i to po svojoj želji, nezavisno od tipa platforme primarne vakcine. Ukupan broj ispitanika ove studije, koji se odlučio da primi treću dozu i učestvuje u daljem praćenju, iznosio je 129, i uključivao je jedanaest različitih kombinacija primarne serije i treće doze vakcine. U Tabeli 4-27. prikazani su osnovni demografski podaci ispitanika vakcinisanih trećom dozom vakcine.

U okviru tri najbrojnije podgrupe ispitanika vakcinisanih trećom dozom (BNT162b2/BNT162b2, BBIBP-CorV/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV), razmak između druge i treće doze statistički se značajno razlikovao između homolognog BNT162b2 pristupa i heterologne BNT162b2 vakcine nakon BBIBP-CorV primarne serije (Kruskal-Voliz poređenje tri najveće grupe,  $p < 0,0001$ ). Uočava se najveća zastupljenost BNT162b2 homologne treće doze vakcine u ispitivanoj populaciji, čak 44,96% (58/129), dok je tik iza po učestalosti heterologna kombinacija BBIBP-CorV primarne serije sa BNT162b2 trećom dozom vakcine – 31,78% (41/129). Na trećem mestu po učestalosti u okviru ove studije nalazi se homologna BBIBP-CorV vakcinacija – 10,08 % (13/129), dok su ostale homologne i heterologne kombinacije daleko ređe zastupljene.

**Tabela 4-27.** Demografski podaci ispitanika vakcinisanih trećom dozom vakcine.

Primarna serija	Treća Doza	N	Pol (M/Ž)	Godine (aritmetička sredina ± SD)	Prethodni kovid-19 (n/N, %)	Vremenski razmak* (dan)
BBIBP-CorV	BBIBP-CorV	13	6/7	61,85 ± 15,12	5/13 (38,46)	203,08 ± 15,26
Gam-COVID-Vac	Gam-COVID-Vac	1	0/1	60	0	195
BNT162 b2	BNT162b2	58	18/40	43,70 ± 12,92	10/58 (17,54)	227,86 ± 53,66
mRNA-1273	mRNA-1273	1	0/1	31	0	122
BBIBP-CorV	Gam-COVID-Vac	2	1/1	67,50 ± 3,54	0	186 ± 5,66
BBIBP-CorV	BNT162b2	41	24/17	53,34 ± 15,53	8/41 (19,51)	198,46 ± 18,30
Gam-COVID-Vac	BBIBP-CorV	1	1/0	41	1/1 (100,00)	186
Gam-COVID-Vac	BNT162b2	4	2/2	54,00 ± 14,67	2/4 (50,00)	233,25 ± 39,63
ChAdOx1	BNT162b2	6	2/4	53,67 ± 11,31	4/6 (66,67)	195,83 ± 19,24
ChAdOx1	mRNA-1273	1	1/0	47	0	186
BNT162b2	BBIBP-CorV	1	0/1	52	0	240

N - broj ispitanika; SD - standardna devijacija. \*Vremenski razmak između datuma druge doze i treće doze vakcine (za više ispitanika prikazan je kao aritmetička sredina ± SD).

Kada se poredi uzrast u godinama za tri grupe sa najviše ispitanika, dobija se statistički značajna razlika između BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacija treće doze (Man-Vitnijev test,  $p=0,0018$ ), kao i između BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV ispitanika (t-test,  $p<0,0001$ ). Razlika između BBIBP-CorV/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV ispitanika u godinama nije bila statistički značajna (Man-Vitnijev test,  $p=0,102$ ). Razlika u raspodeli polova bila je statistički značajna jedino između BBIBP-CorV/BNT162b2 i BNT162b2/BNT162b2 podgrupa, sa značajno većim udelom muškog pola kod ispitanika sa BBIBP-CorV primarnom serijom (Hi kvadrat,  $p=0,006$ ). Raspodela ispitanika sa prethodnom kovid-19 infekcijom, pre primljene treće doze, nije statistički značajno varirala u tri ispitivane podgrupe.

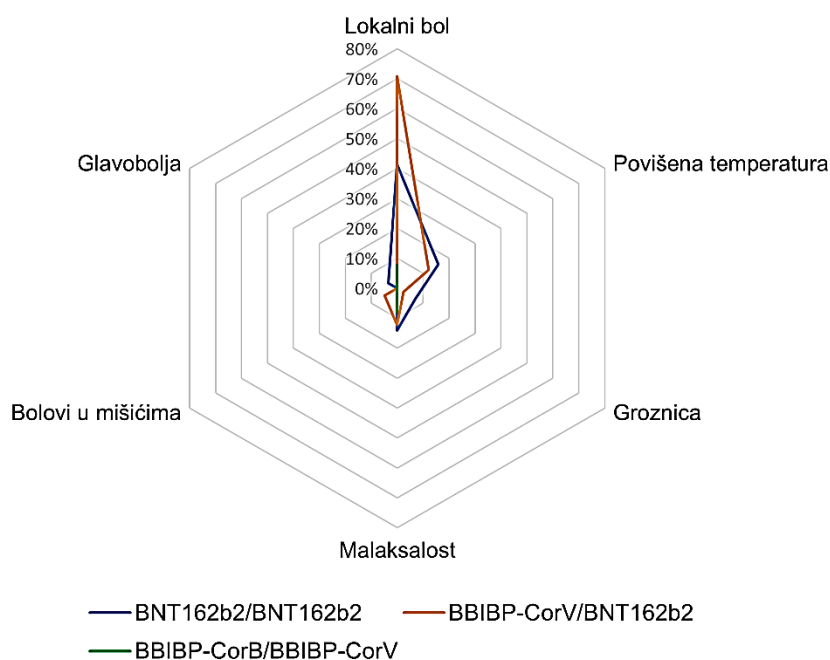
#### 4.3.1. Neželjene reakcije nakon treće doze vakcine

Najčešće neželjene reakcije nakon treće doze vakcine protiv SARS-CoV-2, za sve ukupne kombinacije vakcinalnih platformi, bile su kao i nakon druge doze vakcine, lokalni bol na mestu aplikacije (45,73%), povišena temperatura (13,17%) i malaksalost (11,63%). Kada uporedimo ove učestalosti sa reakcijama istih ispitanika nakon druge doze vakcine (bilo koje platforme), uočavamo statistički značajno nižu pojavu lokalnog bola (19,82%) (Hi kvadrat,  $p<0,0001$ ).

Na Slici 4-25. prikazane su reakcije nakon homologne BNT162b2/BNT162b2 i heterologne BBIBP-CorV/BNT162b2 treće doze, usled najvećeg broja ispitanika u ovim podgrupama. Uočava se drastičan skok u učestalosti prijavljivanja lokalnog bola kod heterologne grupe, na čak 70,73%

(29/41). U odnosu na homolognu BNT162b2/BNT162b2 kombinaciju, kod koje je lokalni bol prijavljen u 41,38% (24/58) slučajeva, razlika u učestalosti prijave ove reakcije statistički je značajna (Hi kvadrat,  $p=0,004$ ). Ukoliko uporedimo učestalost lokalnih reakcija istih ispitanika nakon druge doze BBIBP-CorV i nakon treće heterologne doze BNT162b2, dobija se statistički značajna razlika (Hi kvadrat,  $p<0,0001$ ). Ostale neželjene reakcije nakon treće doze bile su gotovo identično zastupljene u obe prikazane podgrupe (Slika 4-25). Najmanji broj reakcija prijavljen je nakon BBIBP-CorV/BBIBP-CorV treće doze vakcine (Slika 4-25). U ovoj podgrupi od trinaest ispitanika, samo jedan ispitanik je prijavio lokalni bol na mestu aplikacije vakcine, a drugi ispitanik samo pojavu malaksalosti.

Osim standardnih reakcija, navedenih u prethodnom pasusu, jedna ispitanica je navela aksilarnu limfadenopatiju na strani primljene vakcine i osip po vratu, sa spontanom rezolucijom u roku od tri dana nakon BNT162b2/BNT162b2 treće doze. Ova ispitanica nije imala slične reakcije na prethodne dve doze vakcine.



**Slika 4-25.** Neželjene reakcije nakon treće doze vakcine, prikazane kao procenti za homologne BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV kombinacije i heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinaciju.

#### 4.3.2. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi prethodno naivnih ispitanika

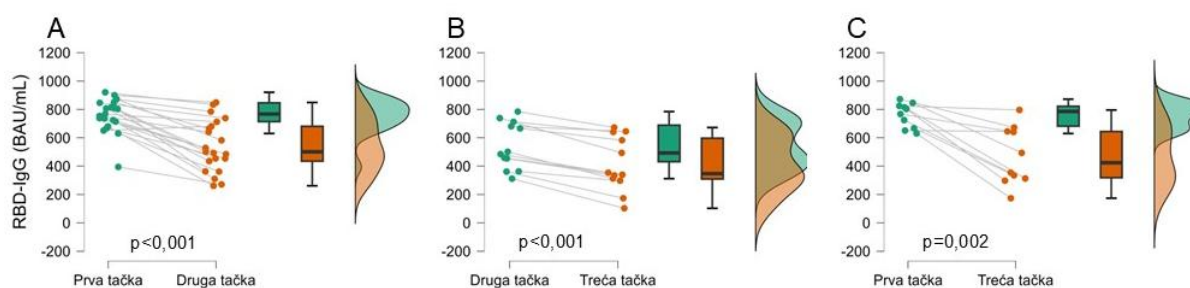
U BNT162b2/BNT162b2 podgrupu primarno je bilo 47 prethodno naivnih ispitanika, a u analizu kinetike, nakon isključenja, uključeno je 45 ispitanika. Tokom perioda praćenja nije došlo do seronegativizacije ni u jednoj ispitivanoj tački. U Tabeli 4-28. prikazane su vrednosti RBD-IgG antitela za tri tačke praćenja – tri nedelje, tri meseca i šest meseci nakon treće doze, sa odgovarajućim vremenskim odrednicama.

**Tabela 4-28.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom nakon treće doze vakcine kod naivnih ispitanika BNT162b2/BNT162b2 podgrupe. Vremenske tačke od tri nedelje, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja treće doze.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj pozitivnih nalaza RBD-IgG antitela (n/N)
1 Tri nedelje	23,29 ± 5,13	784,33 (693,15-847,41)	38/38
2 Tri meseca	98,00 ± 14,89	500,93 (361,98-696,61)	29/29
3 Šest meseci	189,85 ± 13,63	358,95 (305,05-642,94)	13/13

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Tokom perioda praćenja uočava se postepeni pad koncentracije RBD-IgG antitela do šest meseci nakon ove homologne treće doze vakcine (Tabela 4-28). Statistički značajna razlika detektovana je između vezanih uzoraka u sklopu prve i druge tačke praćenja (Slika 4-26, A), druge i treće (Slika 4-26, B), kao i prve i treće tačke praćenja (Slika 4-26, C).



**Slika 4-26.** Vezani uzorci predvakcinalno naivnih ispitanika nakon tri doze BNT162b2 vakcine u različitim vremenskim tačkama, sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL). Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova. Vremenske tačke: prva tačka - tri nedelje, druga tačka - tri meseca, treća tačka - šest meseci od datuma primanja treće doze vakcine.

#### 4.3.2.1. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

Ukupno je deset ispitanika iz grupe homologne treće BNT162b2 doze imalo prethodno potvrđen kovid-19. Svi ispitanici ove grupe imali su simptomatsku ili asimptomatsku SARS-CoV-2 infekciju sredinom ili krajem 2020. godine, pre primljene prve doze vakcine, gotovo dve godine pre treće doze. Od njih 10, četiri ispitanika imala su asimptomatski porast koncentracije RBD-IgG antitela, potvrđen prisustvom N-IgG antitela, nakon druge doze vakcine.

U okviru praćenja kinetike, nakon isključenja, analizirano je sedam ispitanika (7/10). Kako je ovaj broj ispitanika mali i parnih uzoraka nema dovoljno za međusobno poređenje, nivoi antitela prikazani su isključivo tabelarno, u dve vremenske tačke (Tabela 4-29). Usled malog broja uzorka i nevezanih uzoraka na kontroli od tri meseca, vrednosti antitela poređene su Man-Vitnijevim testom, ali razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,67$ ).

**Tabela 4-29.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom nakon treće doze vakcine kod ispitanika BNT162b2/BNT162b2 podgrupe, sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. Vremenske tačke od tri nedelje i tri meseca računane su od datuma primanja treće doze.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG (n/N)
1 Tri nedelje	29,50 ± 11,26	789,62 (711,89-910,43)	4/4
2 Tri meseca	86,75 ± 9,88	773,46 (468,66-875,00)	4/4

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

#### 4.3.3. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi prethodno naivnih ispitanika

U okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe bilo je 33 naivnih ispitanika. Jedan ispitanik nije uključen u analizu humoralnog imunskog odgovora, usled dijagnoze karcinoma pluća neposredno pre primanja treće doze vakcine. Nakon svih isključenja, nivoi antitela analizirani su kod 25 ispitanika. Tokom perioda praćenja nije došlo do seronegativizacije ni u jednoj ispitivanoj tački, kao i kod prethodno analizirane podgrupe homologne BNT162b2 treće doze. U Tabeli 4-30. prikazane su vrednosti RBD-specifičnih IgG antitela za tri tačke praćenja – tri nedelje, tri meseca i šest meseci nakon treće doze, sa odgovarajućim vremenskim odrednicama.

U tabelarnom prikazu (Tabela 4-30) uočava se postepeni pad nivoa antitela kroz vreme, uz prividno održavanje platoa u trećoj vremenskoj tački, određenoj na šest meseci nakon treće doze. Kada poredimo vezane uzorke ispitanika između prve i druge tačke, dobijamo statistički značajnu razliku (Slika 4-27, A), dok razlika između druge i treće tačke nije značajna (Slika 4-27, B). Ovo se može pripisati i nedovoljno velikom uzorku. Poređenje između prve i treće tačke nije bilo moguće usled malog broja vezanih uzoraka.

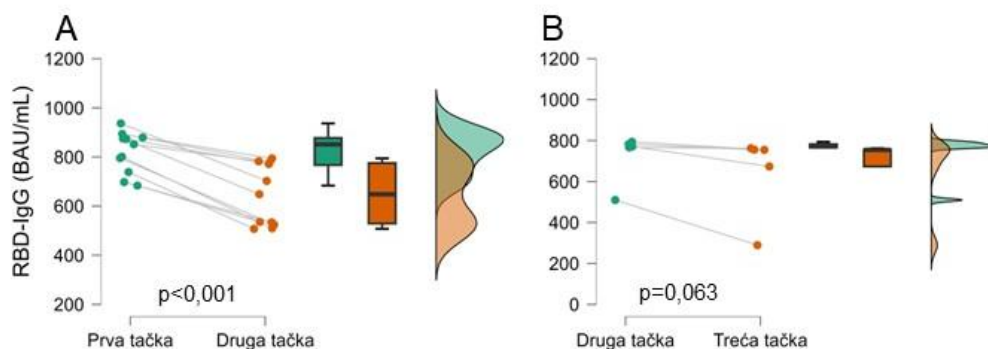
**Tabela 4-30.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom nakon treće doze vakcine kod naivnih ispitanika BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe. Vremenske tačke od tri nedelje, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja treće doze.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG antitela (n/N)
1 Tri nedelje	27,85 ± 9,78	848,27 (759,74-890,45)	20/20
2 Tri meseca	95,44 ± 15,47	754,85 (535,24-799,02)	18/18
3 Šest meseci	189,00 ± 9,50	709,42 (473,44-755,57)	8/8

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Jedan ispitanik u BBIBP-CorV podgrupi ispitanika, nakon primarne serije vakcine, u dve kontrolne tačke imao je detektabilna isključivo RBD-specifična IgM antitela, uz negativan nalaz RBD-IgG antitela. U prvoj tački, 53. dana nakon prve doze vakcine, indeks IgM antitela iznosio je 3,19, a u drugoj tački, 92. dana nakon prve doze, indeks IgM antitela bio je 1,53. Indeks RBD-IgG

antitela iznosio je 0,15 u prvoj i 0,07 u drugoj tački. Takođe, nalaz N-specifičnih IgG antitela bio je negativan (0,065) u prvoj tački, dok je procenat inhibicije neutrališućih antitela bio tik iznad granice pozitivnosti i iznosio je 30,12%. Ovaj ispitanik je nakon heterologne BNT162b2 treće doze razvio visoku koncentraciju RBD-IgG antitela – 683,09 BAU/mL, kao i visokopozitivan nalaz RBD-IgM antitela – indeks 8,04, sa procentom inhibicije neutrališućih antitela od 98,49%.



**Slika 4-27.** Parni uzorci naivnih ispitanika nakon tri doze vakcine u okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe, u različitim vremenskim tačkama, sa prikazanom koncentracijom RBD-specifičnih IgG antitela (BAU/mL). Osim individualnih vrednosti na slici su prikazani i *boxplot* elementi sa označenom medijanom i interkvartilnim opsegom, ali i *raincloud* dijagrami sa prikazom raspodele podataka. P vrednosti izračunate su uz pomoć Vilkoksonovog testa ekvivalentnih parova. Vremenske tačke: prva tačka - tri nedelje, druga tačka - tri meseca, treća tačka - šest meseci od datuma primanja treće doze vakcine.

#### 4.3.3.1. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom

U okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe, osim naivnih bilo je i osam ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, dijagnostikovanom 2020. godine, više od godinu dana pre vakcinacije trećom dozom. Tokom perioda praćenja nije došlo do seronegativizacije ni u jednoj ispitivanoj tački, kao ni kod naivnih ispitanika iste podgrupe.

**Tabela 4-31.** Medijane koncentracije RBD-specifičnih IgG antitela sa interkvartilnim opsegom nakon treće doze vakcine kod ispitanika BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe, sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. Vremenske tačke od tri nedelje, tri meseca i šest meseci računane su od datuma primanja treće doze.

Vremenska tačka	Vremenski opseg izražen u danima ( $\bar{x} \pm SD$ )	RBD-IgG antitela izražena u BAU/mL (Med i IQR)	Broj ispitanika sa pozitivnim nalazom RBD-IgG (n/N)
1 Tri nedelje	24,57 ± 6,37	811,37 (783,72-878,87)	7/7
2 Tri meseca	94,50 ± 3,14	548,50 (426,73-672,21)	6/6
3 Šest meseci	182,67 ± 3,05	486,90 (288,08-509,27)	3/3

$\bar{x}$  - aritmetička sredina, SD - standardna devijacija, Med - medijana, IQR - interkvartilni opseg. n - broj ispitanika sa pozitivnim nalazom IgG antitela, N - ukupan broj ispitanika određenoj vremenskoj tački. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL.

Kao što se može uvideti iz tabelarnog prikaza, u odnosu na naivne ispitanike, u ovoj podgrupi je značajno izražen pad nivoa antitela kroz vreme, uprkos malom broju uzoraka (Tabela 4-31). Međutim, upravo usled malog uzorka, poređenja parnih uzoraka istih ispitanika nisu pokazala statistički značajnu razliku.

#### 4.3.3.2. N-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi

Kako inaktivisana BBIBP-CorV vakcina jedina može inicijalno proizvesti humoralni imunski odgovor na N-protein, ispitivana je mogućnost ponovnog stimulisanja ovog odgovora kod ispitanika koji su primili treću dozu druge vakcinalne platforme – u ovom slučaju BNT162b2 RNK vakcinu, nakon BBIBP-CorV primarne serije. Kod naivnih ispitanika, nakon treće BNT162b2 doze nije došlo do ponovne produkcije N-specifičnih IgG antitela. Svi naivni ispitanici do 49. dana nakon primljene treće doze bili su negativni (n=19), a medijana N-IgG antitela iznosila je 0,109 (0,051-0,202). Za razliku od naivnih ispitanika, kod ispitanika koji su imali kovid-19 pre treće doze vakcine, N-IgG antitela detektovana su kod pet od šest ispitanika koji su došli u prvih mesec dana nakon treće doze (83,33%). Medijana N-IgG antitela u ovoj podgrupi ispitanika iznosila je 1,711 (1,200-3,713). Ispitanik sa negativnim nalazom N-IgG imao je kovid-19 u junu 2020. godine, dok je većina ostalih ispitanika sa pozitivnim N-IgG nalazom preležala SARS-CoV-2 infekciju nešto kasnije, u novembru 2020. godine (sa izuzetkom jedne ispitanice koja je imala kovid-19 u julu 2020. godine).

#### 4.3.4. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine: ostale kombinacije

Osim dve velike podgrupe ispitanika najčešće homologne i heterologne kombinacije primarne serije i treće doze vakcine, u okviru studije bilo je i ispitanika koji su primili i manje zastupljene kombinacije vakcina. Podgrupe ostalih kombinacija su bile male, štaviše često su sadržale samo jednog ispitanika (Tabela 4-32; 4-33).

**Tabela 4-32.** Koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela nakon različitih kombinacija primarne serije i treće doze vakcine, u tri tačke praćenja, kod naivnih ispitanika. Većina podgrupa imala je isključivo po jednog ispitanika. Prva tačka - tri nedelje, druga tačka - tri meseca, treća tačka - šest meseci od primanja treće doze vakcine.

Kombinacija vakcina	Prva tačka	n	Druga tačka	n	Treća tačka	n
BNT162b2/ BBIBP-CorV	490,36	1	NP	0	NP	0
BBIBP-CorV/ BBIBP-CorV	204,93 (101,24-379,97)	3	44,93 (31,3-58,55)	2	NP	0
BBIBP-CorV/Gam-COVID-Vac	NP	0	434,46 (217,94-650,97)	2	313,39 (100,02-526,75)	2
Gam-COVID-Vac/ BNT162b2	752,21 (620,67-883,75)	2	NP	0	NP	0
Gam-COVID-Vac/Gam-COVID-Vac	NP	0	645,07	1	NP	0
ChAdOx1/ BNT162b2	628,20	1	335,45	1	NP	0
ChAdOx1/ mRNA-1273	696,51	1	428,76	1	NP	0
mRNA-1273/ mRNA-1273	752,21	1	NP	0	NP	0

NP - nije primenljivo; n - broj ispitanika u okviru date vremenske tačke i podgrupe. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL. Vrednost antitela prikazana je kao medijana sa interkvartilnim opsegom u zagradama. Koncentracija antitela izražena je kao BAU/mL.

**Tabela 4-33.** Koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela nakon različitih kombinacija primarne serije i treće doze vakcine, u dve tačke praćenja, kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom. U trećoj tački praćenja nije bilo uzoraka. Koncentracija antitela izražena je kao BAU/mL. Prva tačka - tri nedelje, druga tačka - tri meseca od primanja treće doze.

Kombinacija vakcina	Prva tačka	n	Druga tačka	n
BBIBP-CorV/ BBIBP-CorV	210,82	1	237,66	1
Gam-COVID-Vac/ BNT162b2	881,41 (827,63-935,18)	2	643,44	1
Gam-COVID-Vac/ BBIBP-CorV	NP	0	180,94	1
ChAdOx1/ BNT162b2	720,29 (678,42-869,21)	4	NP	0

NP - nije primenljivo; n - broj ispitanika u okviru date vremenske tačke i podgrupe. RBD-IgG pozitivno  $\geq 20,33$  BAU/mL. Vrednost antitela prikazana je kao medijana sa interkvartilnim opsegom u zagradama. Koncentracija antitela izražena je kao BAU/mL.

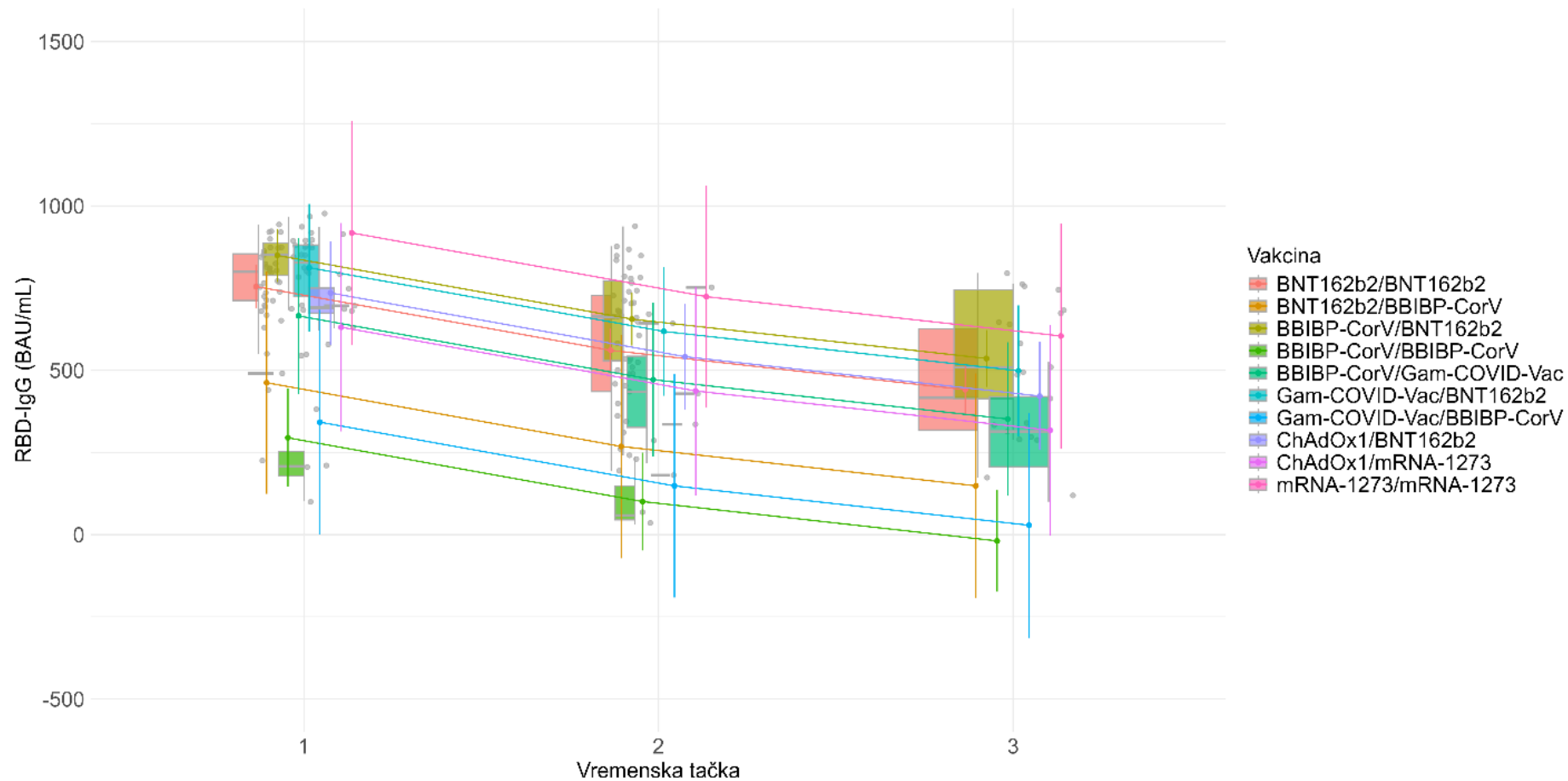
#### 4.3.5. Međusobno poređenje različitih kombinacija treće doze i uticaj pola, starosti, tipa kombinacije i prethodnog kovid-19 na nivoe RBD-specifičnih IgG antitela

Linearni miks model upotrebljen je za istraživanje efekata kombinacije različitih vakcina, tokom perioda praćenja od šest meseci, zatim pola, starosti i prethodne SARS-CoV-2 infekcije na nivoe RBD-IgG antitela. Model je prilagođen koristeći REML. Reziduali su bili približno normalno raspoređeni i nije primećena značajna heteroskedastičnost.

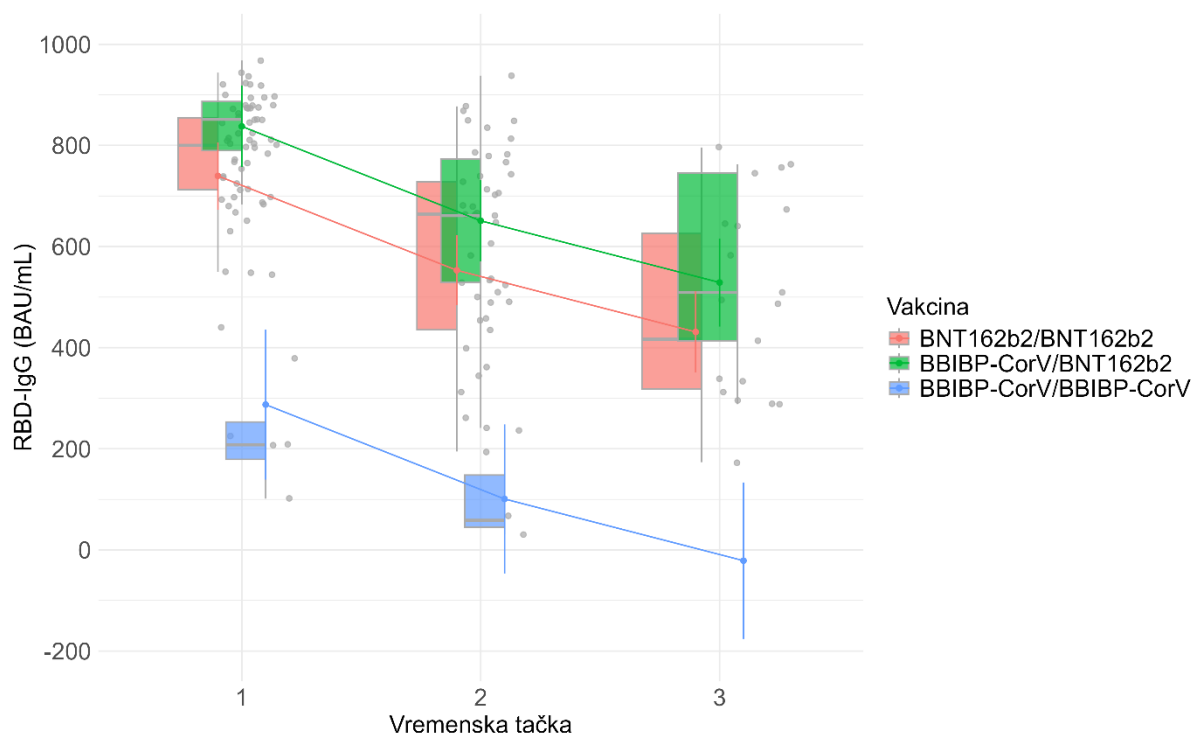
Ovim modelom pokazan je značajni uticaj tipa vakcine i vremena na nivoe IgG antitela. RBD-IgG antitela značajno su opadala tokom vremena ( $p < 0,001$ ). BBIBP-CorV/BNT162b2 heterologni pristup je u poređenju sa referentnom BNT162b2/BNT162b2 kombinacijom doveo do značajno viših nivoa IgG antitela ( $\beta = +107,1$ ;  $SE = 45,5$ ;  $p = 0,020$ ), dok su BBIBP-CorV/BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac/BBIBP-CorV podgrupe ispitanika imale značajno niže nivoe antitela ( $\beta = -494,9$ ;  $SE = 89,0$ ;  $p < 0,001$  i  $\beta = -411,8$ ;  $SE = 176,8$ ;  $p = 0,022$ ). Uticaji pola, starosti ispitanika i prethodno pozitivnog SARS-CoV-2 nalaza, nisu bili značajni. Na Slici 4-28. prikazane su krive predikcije srednjih vrednosti RBD-IgG antitela u zavisnosti od tipa kombinacije treće doze i primarne serije vakcine, tokom perioda praćenja u studiji. Procenjeni nivoi antitela označeni su kao *boxplot*-ovi različitih boja, sa intervalima poverenja (95%) koji su izračunati u okviru samog modela. Na slici se uočavaju predviđeni najviši odgovor nakon heterolognih kombinacija treće doze.

Radi smanjenja opterećenja modela i usled nepotpunog broja uzoraka za sve ostale kombinacije vakcine, LMM je primenjen i samo na tri najčešće kombinacije u okviru ovde predstavljenog istraživanja (BNT162b2/BNT162b2; BBIBP-CorV/BNT162b2; BBIBP-CorV/BBIBP-CorV). Model je pokazao takođe značajan uticaj tipa vakcine i vremena praćenja na nivoe IgG antitela. U odnosu na BNT162b2/BNT162b2 homolognu kombinaciju, BBIBP-CorV/BNT162b2 heterologna kombinacija potvrđeno je imala značajno više nivoe RBD-IgG ( $\beta = 94,9$ ;  $SE = 22,6$ ;  $p < 0,001$ ), a homologna BBIBP-CorV vakcina značajno niže ( $\beta = -452,3$ ;  $SE = 75,7$ ;  $p < 0,001$ ). Ni u ovom modelu nisu uočeni značajni efekti pola, starosti i SARS-CoV-2 infekcije pre treće doze vakcine.

Na Slici 4-29. prikazane su krive predikcije srednjih vrednosti RBD-IgG antitela u zavisnosti od tipa kombinacije treće doze i primarne serija vakcine, tokom perioda praćenja u studiji, ali samo za tri kombinacije. Uočava se najviši odgovor nakon heterologne BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacije, dok se najniži odgovor, nakon BBIBP-CorV/BBIBP-CorV kombinacije, približio negativnom rezultatu do šest meseci nakon treće doze.



**Slika 4-28.** Prikaz predikcije srednjih vrednosti nivoa RBD-specifičnih IgG antitela tokom perioda praćenja, u zavisnosti od kombinacija treće doze i primarne serije vakcine, izračunatih linearnim miksm modelom. Vremenske tačke: 1 – šest nedelja, 2 - tri meseca, 3 - šest meseci od datuma primanja treće doze vakcine.



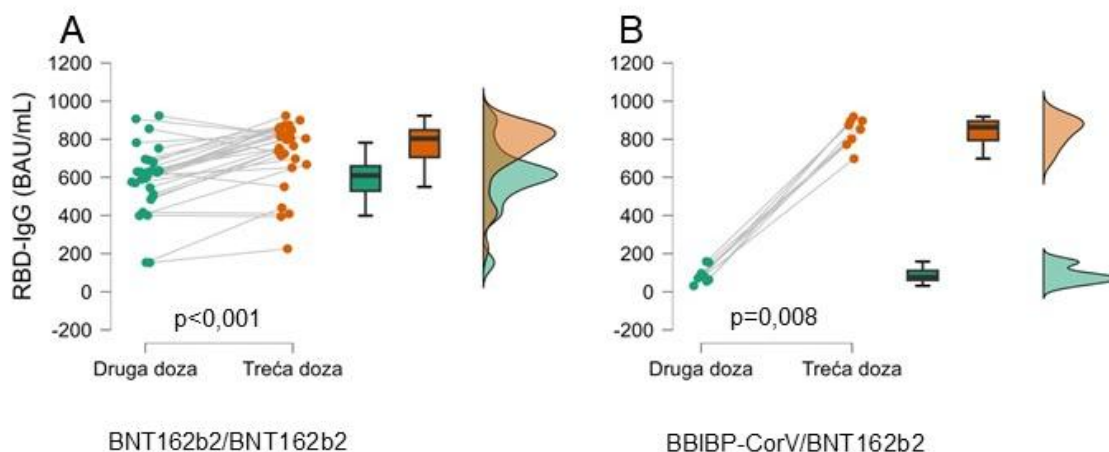
**Slika 4-29.** Prikaz predikcije srednjih vrednosti nivoa RBD-specifičnih IgG antitela tokom perioda praćenja, u zavisnosti od kombinacija treće doze i primarne serije vakcine, izračunatih linearnim miksmodelom. Na slici su prikazane BNT162b2/BNT162b2, BBIBP-CorV/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV kombinacije. Vremenske tačke: 1 - šest nedelja, 2 - tri meseca, 3 - šest meseci od datuma primanja treće doze vakcine.

Kada su se godine starosti poredile sa nivoima RBD-IgG antitela na prvim kontrolama do prva dva meseca od primanja treće doze, kod naivnih ispitanika u dve najveće podgrupe, dobijena je statistički značajna, negativna, umerena korelacija za BNT162b2 homologni pristup ( $p=0,02$ ;  $r=-0,37$ ), dok za heterologni BBIBP-CorV/BNT162b2 pristup ova korelacija nije bila značajna ( $p=0,31$ ).

#### 4.3.6. RBD-specifična IgG antitela nakon treće doze vakcine u poređenju sa drugom dozom

Koncentracija RBD-specifičnih IgG antitela ispitanika dve najveće podgrupe, kao predstavnika homolognog BNT162b2/BNT162b2 i heterolognog BBIBP-CorV/BNT162b2 pristupa, poređena je tri nedelje nakon treće doze sa odgovarajućim uzorcima istih ispitanika u prvoj vremenskoj tački nakon primarne serije vakcine – šest nedelja nakon prve doze (tri nedelje nakon druge doze).

Na Slici 4-30. uočava se statistički značajna razlika kako kod homolognog (Slika 4-30, A), tako i, čak očiglednije, kod heterolognog pristupa revakcinaciji (Slika 4-30, B). Broj parnih uzoraka u okviru BNT162b/BNT162b2 podgrupe iznosio je 31, dok je medijana koncentracije antitela, sa pripadajućim IQR iznosila 803,44 (697,52-850,61) nakon treće doze, odnosno 609,49 (511,71-680,24) nakon druge doze. Za BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu, broj parnih uzoraka bio je znatno manji ( $n=8$ ), usled velikog broja seronegativnih ispitanika nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine. Medijana koncentracije RBD-IgG antitela za ovu podgrupu iznosila je nakon treće doze 862,30 (779,25-896,10), a samo 76,64 (56,92-139,36) nakon druge doze vakcine.



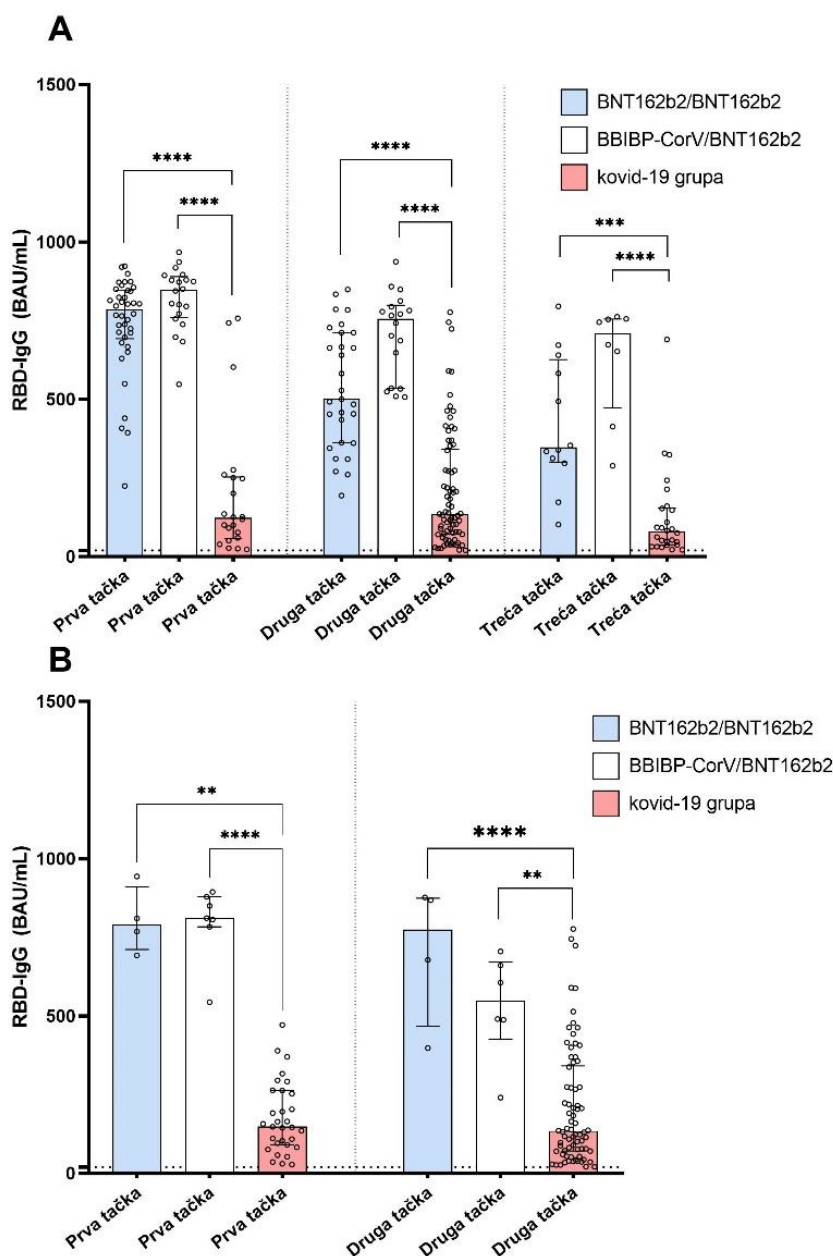
**Slika 4-30.** Parni uzorci za homologni (BNT162b2/BNT162b2) i heterologni (BBIBP-CorV/BNT162b2) pristup poređeni su tri nedelje nakon treće doze sa uzorcima istih ispitanika tri nedelje nakon druge doze prethodne primarne serije. RBD-specifična IgG antitela izražena su kao BAU/mL, a osim pojedinačnih vrednosti, grafički su prikazana i kao *boxplot* i *raincloud* dijagrami. Statistička značajnost u vidu p vrednosti izračunata je Vilkoksonovim testom ekvivalentnih parova.

Ukoliko se ne poredi prva tačka nakon primarne serije, već kontrola na šest meseci nakon prve doze vakcine, sa prvom kontrolom nakon treće doze vakcine, dobija se takođe statistički značajan porast nivoa antitela u obe podgrupe. Naime, kod parnih uzoraka BNT162b2/BNT162b2 podgrupe (n=27), pre treće doze vakcine medijana koncentracije RBD-IgG antitela iznosila je 229,12 (102,26-370,41), dok je nakon treće doze vakcine iznosila 767,46 (711,96-844,51). Ova razlika bila je statistički značajna (Vilkoksonov test,  $p < 0,0001$ ). U okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe, nije bilo parnih uzoraka za prvu tačku nakon treće doze i poslednju tačku nakon druge doze BBIBP-CorV, usled čega je rađen Man-Vitnijev test za nezavisne uzorke – i dobijena je takođe statistički značajna razlika ( $p = 0,001$ ). Medijana RBD-IgG antitela iznosila je 848,27 (759,74-890,45) nakon treće doze, što je bilo značajno iznad medijane na poslednjoj kontroli nakon druge doze – 25,01 (22,77-215,50).

Kada se porede koncentracije RBD-IgG antitela u poslednjoj vremenskoj tački nakon druge doze, sa poslednjom vremenskom tačkom treće doze – na šest meseci, uočeni su statistički značajno više koncentracije antitela nakon treće doze. Naime, u okviru BNT162b2/BNT162b2 podgrupe, kada se porede isključivo parni uzorci ispitanika koji su došli i na poslednju kontrolu nakon treće doze vakcine (n=11), medijana koncentracije antitela nakon druge doze iznosila je 219,36 (83,76-370,41), a šest meseci nakon treće doze 353,95 (297,22-645,07) (Vilkoksonov test,  $p = 0,006$ ). Za BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu nije bilo dovoljno vezanih parova, usled čega je upotrebljen Man-Vitnijev test i poređene su medijane za sve ispitanike u tim tačkama: medijana nakon druge doze iznosila je, kao što je već prethodno navedeno - 25,01 (22,77-215,50), a šest meseci nakon treće doze 745,09 (412,72-755,87) ( $p = 0,016$ ).

#### 4.3.6.1. Poređenje nivoa RBD-specifičnih IgG antitela nakon treće doze vakcine sa kovid-19 grupom

BNT162/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupa ispitanika poređene su sa kovid-19 grupom, u analognim tačkama praćenja – tri nedelje, tri meseca i šest meseci nakon početka simptoma i/ili pozitivnog dijagnostičkog testa. Prethodno naivni ispitanici vakcinisani bilo kojim od ova dva tipa kombinacije treće doze, u sve tri vremenske tačke praćenja, imali su statistički značajno više koncentracije RBD-IgG antitela nego kovid-19 ispitanici u analognoj tački (Slika 4-31, A).



**Slika 4-31.** Prikaz poređenja koncentracije RBD-IgG antitela, izražene u BAU/mL, između dva pristupa trećoj dozi – homolognog (BNT162b2/BNT162b2) i heterolognog (BBIBP-CorV/BNT162b2), sa kovid-19 grupom, kod predvokcinalno naivnih ispitanika (A) i ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije (B). Na stubičastim dijagramima označena je medijana sa interkvartilnim rangom. P vrednosti dobijene su Kraskal-Volisovim testom, sa Danovim testom za multipla poređenja. Isprekidanom linijom označena je granica pozitivnosti testa (20,33 BAU/mL). \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Vremenske tačke: prva tačka - tri nedelje, druga tačka - tri meseca, treća tačka - šest meseci od datuma primanja treće doze vakcine ili početka simptoma kovid-19 (za tu grupu ispitanika).

Kada se isto poređenje sprovede i kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, dobija se sličan rezultat, odnosno statistički značajna razlika opet se uočava između svih vakcinisanih ispitanika, kako homolognim tako i heterolognim pristupom, i kovid-19 grupe u dve tačke praćenja (Slika 4-31, B).

#### 4.3.6. Procenat inhibicije neutrališućih antitela pre i posle treće doze vakcine

Vrednosti procenta inhibicije neutrališućih antitela poređene su u dostupnim vezanim uzorcima pre i posle treće doze kod selektovanog dela ispitanika koji su primili različite kombinacije primarne serije i treće doze vakcine, a imali su poslednji negativan nalaz ili veoma nisku koncentraciju antitela specifičnih za RBD-IgG (indeks antitela < 2) pre primanja treće doze.

**Tabela 4-34.** Indeks RBD-specifičnih IgG antitela i procenat inhibicije signala neutrališućih antitela u vezanim uzorcima ispitanika nakon različitih homolognih i heterolognih pristupa revakcinaciji. Nalaz N-specifičnih antitela prikazan je za uzorke nakon treće doze. Sve pozitivne vrednosti su označene *bold* fontom.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (indeks)		Neutrališuća antitela (% inhibicije)		N-IgG antitela (odnos)
	Pre treće	Posle treće	Pre treće	Posle treće	
BNT162b2/BNT162b2					
1	0,2	<b>11,08</b>	7,79	<b>93,09</b>	0,139
2	<b>1,4</b>	<b>32,77</b>	4,45	<b>98,99</b>	0,076
3	<b>1,41</b>	<b>22,54</b>	12,20	<b>45,18</b>	0,391
4	0,91	<b>33,45</b>	24,48	<b>99,56</b>	0,089
5	0,92	<b>20,01</b>	2,69	<b>98,55</b>	0,043
BBIBP-CorV/BBIBP-CorV					
6	0,69	<b>4,98</b>	<b>51,86</b>	<b>75,45</b>	0,550
7	0,51	<b>18,69</b>	23,45	<b>99,24</b>	<b>2,108</b>
8	<b>1,25</b>	<b>1,54</b>	9,56	9,25	0,728
9	<b>1,59</b>	<b>2,39</b>	3,48	21,31	<b>0,811</b>
BBIBP-CorV/BNT162b2					
10	0,2	<b>34,33</b>	7,43	<b>99,36</b>	0,241
11	0,63	<b>43,04</b>	28,18	<b>99,36</b>	0,077
12	0,38	<b>39,13</b>	10,13	<b>99,36</b>	0,072
13	0,21	<b>43,25</b>	12,84	<b>99,36</b>	0,116
14	0,19	<b>42,95</b>	12,14	<b>99,44</b>	0,042
15	0,51	<b>39,52</b>	24,43	<b>99,38</b>	0,425
16	0,8	<b>32,52</b>	<b>51,91</b>	<b>98,54</b>	0,268
17	0,21	<b>33,79</b>	15,34	<b>99,52</b>	0,102
18	0,21	<b>41,88</b>	14,1	<b>99,52</b>	0,255
19	0,03	<b>33,62</b>	11,83	<b>98,49</b>	0,051
BBIBP-CorV/Gam-COVID-Vac					
20	<b>1,55</b>	<b>32,02</b>	16,07	<b>95,73</b>	0,056
Gam-COVID-Vac/BNT162b2					
21	0,78	<b>30,53</b>	7,97	<b>99,56</b>	0,053
ChAdOx1/BNT162b2					
22	0,89	<b>30,90</b>	3,26	<b>97,97</b>	<b>0,881</b>
ChAdOx1/mRNA-1273					
23	<b>1,08</b>	<b>34,26</b>	2,91	<b>99,56</b>	0,109

Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

U Tabeli 4-34. uočava se veliki udeo negativnih uzoraka pre vakcinacije trećom dozom, usled brze seronegativizacije ispitanika u pogledu nalaza RBD-specifičnih IgG antitela. Nakon treće doze primetan je skok u indeksu RBD-IgG antitela za sve kombinacije zajedno (Man-Vitnjev test,  $p < 0,0001$ ). Međutim, kada se kombinacije vakcina analiziraju pojedinačno, za BBIBP-CorV/BBIBP-CorV skok nivoa RBD-IgG antitela nakon treće doze nije bio statistički značajan ( $p = 0,125$ ). Takođe, značajan skok u procentu inhibicije neutralizacije primećen je prilikom analize svih pristupa revakcinaciji ( $p < 0,0001$ ), ali analizirano pojedinačno razlika nije postojala u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi, iako veoma blizu granice značajnosti ( $p = 0,06$ ), niti u BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupi ( $p = 0,25$ ). Jedino je heterologni pristup BBIBP-CorV/BNT162b2 pokazao statistički značajan skok NAb nakon treće doze vakcine ( $p = 0,002$ ).

Osim toga, jedino su se u BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupi nalazili ispitanici sa negativnim nalazom neutrališućih antitela nakon treće doze vakcine (2/4 analizirana). Svakako, viši nivoi antitela, ali i procenti inhibicije primećeni su kod heterolognih pristupa (Tabela 4-34). Kod dva ispitanika sa negativnim nalazima RBD-IgG pred treću dozu, ipak su bila detektovana neutrališuća antitela, ali nešto blago iznad granice (ispitanici pod rednim brojem 6 i 16, Tabela 4-34). Kod ispitanika pod rednim brojem 22 u Tabeli 4-34, detektovan je i granično pozitivan nalaz N-IgG antitela nakon treće doze vakcine, koji nije očekivan u ovoj kombinaciji, ukazujući na potencijalnu izloženost i/ili asimptomatsku infekciju u periodu između dve kontrole.

#### 4.3.7. Infekcije nakon vakcinacije: SARS-CoV-2 infekcija nakon treće doze vakcine

Nakon treće doze vakcine, u okviru ove studije, prijavljeno je ukupno čak 31 nova SARS-CoV-2 infekcija (24,03%, 31/129), potvrđena dijagnostičkim testom (PCR i/ili brzi antigenski test) (Tabela 4-35). Od toga su četiri infekcije bile u BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupi (potvrđene brzim Ag testom), pet u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi (jedna potvrđena PCR-om, ostale četiri brzim Ag testom), 21 u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi (sve potvrđene brzim Ag testom) i jedna u ChAdOx1/mRNA-1273 podgrupi (potvrđena PCR-om).

**Tabela 4-35.** Prikaz učestalosti SARS-CoV-2 infekcije nakon treće doze vakcine, raščlanjenih na različite podgrupe u zavisnosti od primljene kombinacije vakcina.

Kombinacija vakcina	n/N* (%)	Pozitivan dg test n/N (%)	Pozitivan nalaz N-IgG n/N (%)	Nivo N- IgG antitela (odnos)	Postojanje simptoma n/N (%)
BBIBP-CorV/BBIBP-CorV	4/13 (30,76)	4/4 (100)	4/4 (100)	5,33 (5,17-6,09)	4/4 (100)
BNT162b2/ BNT162b2	31/58 (53,45)	21/31 (64,52)	17/21 (80,95)*	2,40 (1,85-3,29)	20/21 (95,23)
BBIBP-CorV/BNT162b2	9/41 (21,95)	5/9 (55,55)	5/5 (100)	5,86 (4,51-5,87)	5/5 (100)
ChAdOx1/ BNT162b2	1/8 (12,5)	0/1	1/1	1,28	0/1
ChAdOx1/ mRNA-1273	1/1	1/1	1/1	3,13	1/1

Nivo N-specifičnih IgG antitela prikazan je kao medijana i interkvartilni opseg.\*Ukupan broj ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon treće doze (potvrđenom i dijagnostičkim testovima i N-IgG testom), kroz ukupni broj ispitanika podgrupe određene kombinacije. \*\* Jedan ispitanik imao je graničnu vrednost N-IgG antitela (0,87). Ova vrednost nije uračunata u prikaz nivoa N-IgG antitela u susjednoj koloni. N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos).

Izuzev potvrđenih slučajeva (n=31), u još 11 slučajeva detektovan je simptomatski ili asimptomatski porast nivoa RBD-specifičnih antitela, kod kojih je naknadno dokazano i prisustvo N-specifičnih IgG antitela (Tabela 4-36). Četiri ispitanika pripadala su BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi, od kojih je troje imalo asimptomatsku infekciju, a jedan ispitanik simptomatsku; sedam ispitanika pripadalo je BNT162b2/BNT162b2 podgrupi, od kojih su dva ispitanika imala asimptomatsku infekciju, a u pet slučajeva nije rađen dijagnostički test, ali je anamnestički notirana simptomatska infekcija; i u jednom slučaju u okviru ChAdOx1/BNT162b2 podgrupe došlo je do asimptomatske infekcije.

Uzevši u obzir da su ispitanici čije su infekcije potvrđene isključivo N-IgG testom u okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupe primarno vakcinisani BBIBP-CorV vakcinom, koja sadrži čitav virion i može dovesti do pojave N-IgG antitela nevezano za infekciju, ovim ispitanicima je poređen nivo N-IgG antitela odmah nakon treće doze vakcine, sa uzorkom u kom je detektovan porast RBD-IgG. Kod dva ispitanika, nalaz N-IgG antitela bio je negativan tri nedelje nakon treće doze (0,047 i 0,202), dok je u uzorku sa porastom RBD-IgG antitela, detektovano i prisustvo N-IgG antitela (2,50 i 6,03, respektivno). Kod druga dva ispitanika, u uzorcima tri nedelje nakon treće doze detektovana su N-IgG antitela (1,71 i 2,21), ali je nivo ovih antitela znatno porastao u uzorcima sa porastom i RBD-IgG antitela (3,97 i 5,88), indirektno potvrđujući postojanje infekcije SARS-CoV-2.

**Tabela 4-36.** Prikaz učestalosti SARS-CoV-2 infekcije nakon treće doze vakcine, potvrđene prisustvom N-IgG antitela, raščlanjenih na različite podgrupe u zavisnosti od primljene kombinacije vakcina.

Kombinacija vakcina	Ispitanici kod kojih nije rađen ili je negativan test n/N (%)	Nivo N- IgG antitela (odnos)	Prisustvo simptoma infekcije n/N (%)
BNT162b2/ BNT162b2	10 (32,22%)**	2,04 (1,31-3,30)	4/10 (40,00)
BBIBP-CorV/BNT162b2	4/9 (44,44%)	4,92 (2,87-5,99)	1/4 (25,00)
ChAdOx1/ BNT162b2	1	1,28	0/1

Nivo N-specifičnih IgG antitela prikazan je kao medijana i interkvartilni opseg.\*Ukupan broj ispitanika sa nepotvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom nakon vakcine, kroz ukupni broj infekcija nakon vakcinacija podgrupe određene kombinacije. \*\* Tri ispitanika imala su graničnu vrednost N-IgG antitela (0,87;0,83 i 0,92). Ove vrednosti nisu uračunate u prikaz nivoa N-IgG antitela u susednoj koloni. N-IgG, pozitivno  $\geq 1,1$ , granično 0,8-1 (odnos).

U tri dodatna slučaja u okviru BNT162b2/BNT162b2 podgrupe detektovana je granična vrednost N-IgG antitela (Tabela 4-36), uz postojanje kovid-19 simptoma i značajnog skoka nivoa RBD-IgG antitela kod dva ispitanika, i isključivo asimptomatskog porasta nivoa RBD-IgG antitela u trećem slučaju – sa 194,56 BAU/mL na 821,33 BAU/mL i uz poznat blizak rizičan kontakt, što dovodi do ukupne incidencije od 35,66% (46/129).

Kovid-19 u grupi ispitanika vakcinisanih trećom dozom najčešće je dijagnostikovao krajem 2021. ili u prva tri meseca 2022. godine, što se poklapalo sa povećanom detekcijom Delta i Omikron sojeva u Srbiji. Takođe, od 46 ispitanika sa novom infekcijom nakon treće doze vakcine, osam ispitanika je imalo reinfekciju, uzevši u obzir da su već preležali kovid-19 u prethodnom periodu (8/46; 17,39%). Od toga, jedna reinfekcija registrovana je u okviru BBIBP-CorV/BBIBP-CorV, dve u BBIBP-CorV/BNT162b2 i pet u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi. Kada se u obzir uzmu isključivo infekcije kod kojih je bio poznat tačan datum početka simptoma, najveći broj infekcija registrovan je

između druge i treće tačke praćenja, odnosno između tri i šest meseci nakon treće doze (27/34; 79,41%), dok je samo četiri infekcija prijavljeno između prve i druge tačke, a još tri nakon isteka šest meseci posle treće doze.

Učestalost infekcije u zavisnosti od primarne serije vakcine i tipa treće doze prikazana je u Tabeli 4-35. Uočava se najviša incidencija u okviru homologne BNT162b2/BNT162b2 podgrupe, a kada se porede dve najveće podgrupe dobija se statistički značajno viša incidencija u okviru BNT162b2/BNT162b2 u odnosu na heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinaciju (Fišerov test,  $p=0,002$ ).

#### 4.3.7.1. Simptomi kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon treće doze

Najčešće prijavljeni simptomi SARS-CoV-2 infekcije nakon treće doze vakcine bili su povišena telesna temperatura (29/46, 64,04%), malaksalost (27/46, 58,69%) i kašalj (23/46, 50,00%). U Tabeli 4-37. nalaze se učestalosti simptoma u zavisnosti od tri različite kombinacije: BBIBP-CorV/BBIBP-CorV, BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2. Poređenjem učestalosti između ovih vakcinalnih kombinacija nije nađena statistički značajna razlika. Može se uočiti da je osim već nabrojanih najčešćih reakcija, u BNT162b2/BNT162b2 homolognoj podgrupi vakcinisanih nešto učestalija bila i rinoreja. Nijedan ispitanik sa infekcijom nakon treće doze nije imao dijagnostikovanu pneumoniju ili hospitalizaciju. Kod jedne ispitanice (vakcinisane BNT162b2/BNT162b2 kombinacijom) postojao je pojačan obostran disajni šum na plućima, međutim nije potvrđena pneumonija radiološki. Zastupljenost asimptomatske infekcije u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi iznosila je 19,35% (6/31), a u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi 33,33% (3/9). Jedina ispitanica ChAdOx1/BNT162b2 podgrupe sa infekcijom nakon treće doze imala je takođe asimptomatsku infekciju, potvrđenu pozitivnim nalazom N-IgG antitelima.

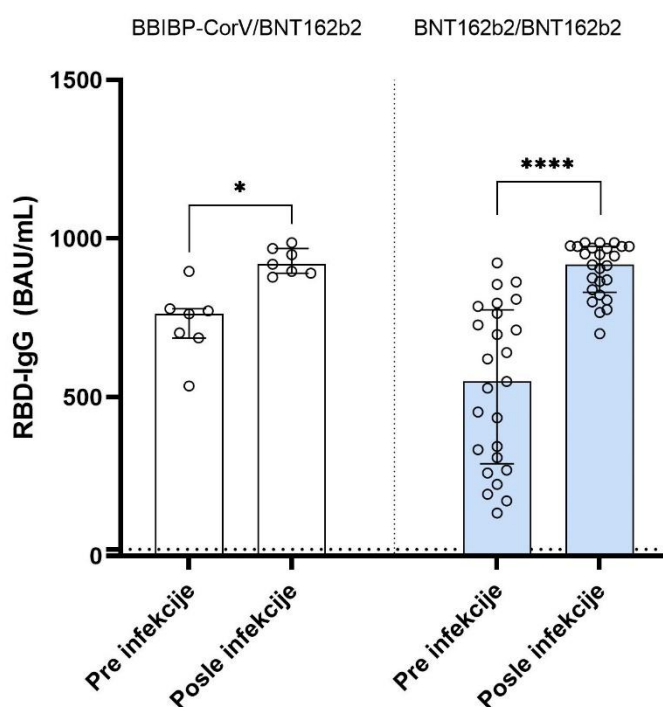
**Tabela 4-37.** Prikaz rasprostranjenosti simptoma kovid-19 kod ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon treće doze vakcine.

	BBIBP-CorV/ BBIBP-CorV n/N (%)	BNT162b2/ BNT162b2 n/N (%)	BBIBP-CorV/ BNT162b2 n/N (%)
Povišena telesna temperatura	3/4 (75,00)	21/30 (70,00)	5/9 (55,55)
Nosna kongestija i rinoreja	0	17/30 (56,67)	2/9 (22,22)
Bol u grlu	0	7/30 (23,33)	1/9 (11,11)
Gastrointestinalne tegobe	0	3/30 (10,00)	1/9 (11,11)
Gubitak čula ukusa i mirisa	1/4 (25,00)	5/30 (16,67)	1/9 (11,11)
Malaksalost	2/4 (50,00)	18/30 (60,00)	5/9 (55,55)
Mijalgija	2/4 (50,00)	8/30 (26,67)	0
Kašalj	1/4 (25,00)	16/30 (53,33)	4/9 (44,44)
Pneumonija	0	0	0
Hospitalizacija	0	0	0

n - broj ispitanika sa simptomima; N - ukupan broj ispitanika inficiranih nakon date kombinacije vakcina.

#### 4.3.7.2. Poređenje RBD-specifičnih IgG i neutrališućih antitela pre i posle infekcije nakon treće doze

RBD-specifična IgG antitela pre i posle infekcije u BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupama, kod prethodno naivnih ispitanika, bila su statistički značajno viših koncentracija nakon infekcije (Slika 4-32). Medijana antitela pre infekcije u homolognoj BNT162b2 podgrupi iznosila je u vezanim uzorcima 550,13 (290,42-775,80), a posle infekcije 917,49 (830,69-975,13) BAU/mL (Vilkoksonov test,  $p < 0,0001$ ), dok je u heterolognoj BBIBP-CorV-BNT162b2 podgrupi iznosila 762,58 (686,95-779,05) pre i 918,92 (890,66-968,93) BAU/mL posle infekcije (Vilkoksonov test,  $p = 0,012$ ). Vremenski razmak između poslednje kontrole i kontrole nakon infekcije, izražen u danima kao aritmetička sredina i standardna devijacija, iznosio je  $115,43 \pm 23,44$  za heterolognu podgrupu i  $104,04 \pm 48,79$  za homolognu podgrupu.



**Slika 4-32.** Grafički prikaz uporednih vrednosti RBD-specifičnih IgG antitela određenih u BBIBP-CorV/BNT162b2 i BNT162b2/BNT162b2 podgrupama, u prvom dostupnom uzorku pre i posle infekcije nakon treće doze vakcine. Isprekidanom linijom označena je granica pozitivnosti testa od 20,33 BAU/mL. \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Za deo predvakcinalno naivnih ispitanika ove dve podgrupe treće doze rađen je i komparativni surogat test za detekciju neutrališućih antitela. Rezultati su prikazani u vidu procenta inhibicije u Tabeli 4-38. zajedno sa RBD-IgG antitelima za ispitanike obe podgrupe pre i posle SARS-CoV-2 infekcije. Bez obzira na značajan porast u koncentraciji RBD-IgG antitela (t-test vezanih uzoraka,  $p_{\text{BNT162b2/BNT162b2}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{BBIBP-CorV/BNT162b2}} = 0,005$ ), porast procenta inhibicije nije bio statistički značajan (Vilkoksonov test,  $p_{\text{BNT162b2/BNT162b2}} = 0,359$ ,  $p_{\text{BBIBP-CorV/BNT162b2}} = 0,625$ ), kako je već bio na visokom nivou tokom prethodne kontrole.

**Tabela 4-38.** Prikaz nalaza RBD-IgG antitela i neutrališućih antitela, za deo ispitanika BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupa, pre i posle infekcije nakon treće doze vakcine.

Ispitanik	RBD-IgG antitela (BAU/mL)		Neutrališuća antitela (% inhibicije)	
	Pre infekcije	Posle infekcije	Pre infekcije	Posle infekcije
BNT162b2/BNT162b2				
1	334,63	987,43	98,42	99,38
2	310,03	806,69	98,69	99,11
3	173,62	905,70	98,14	84,39
4	261,04	776,40	99,04	99,45
5	435,27	952,26	99,11	99,04
6	453,56	987,02	99,11	99,45
7	270,80	700,37	99,24	99,52
BBIBP-CorV/BNT162b2				
1	535,70	878,66	96,01	91,68
2	779,05	896,55	99,59	99,59
3	762,58	890,66	99,59	99,52
4	896,76	968,93	99,38	99,59
5	702,60	949,41	99,52	99,52
6	686,95	918,92	99,52	99,38

Ref. vrednosti: RBD-IgG, pozitivno  $\geq 1$  (indeks); neutrališuća antitela, pozitivno  $\geq 30\%$  (procenat inhibicije).

#### 4.3.8. N-specifična IgG antitela posle treće doze i nakon postvakcinalne SARS-CoV-2 infekcije

Infekcija nakon treće doze vakcine kod ispitanika bez simptoma ili sa simptomima ali nepotvrđena dijagnostičkim testom, u okviru ove studije bila je potvrđena prisutnim pozitivnim N-specifičnim IgG antitelima. Očekivano je da se nakon treće doze RNK vakcine, u ovom slučaju BNT162b2, ne detektuju N-IgG antitela u uzorcima, osim ukoliko nije došlo do skorijeg kontakta sa SARS-CoV-2 virusom. Takođe, kod ispitanika koji su kao primarnu seriju primili BBIBP-CorV vakcinu, bilo je očekivano da su pređašnja N-specifična antitela, ukoliko su bila prisutna, do trenutka infekcije nakon primljene heterologne treće doze pala ispod nivoa detekcije, posebno kod prethodno naivnih ispitanika (videti odeljak 4.3.7.).

U okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 svi ispitanici sa infekcijom nakon treće doze imali su detektabilna N-specifična IgG antitela – medijana 5,86 (3,65-5,88). Korelacija između nivoa N-specifičnih IgG antitela i RBD-specifičnih IgG antitela u ovoj podgrupi nije bila statistički značajna (Spirmanov test,  $p=0,83$ ). Međutim, u okviru BNT162b2/BNT162b2 podgrupe ispitanika sa infekcijom nakon treće doze, nalaz N-IgG antitela nije bio pozitivan kod svih ispitanika. Kod pet ispitanika (23,81%, 5/21), sa pozitivnim dijagnostičkim testom i prisutnim kovid-19 simptomima, nisu detektovana N-IgG antitela – 0,39 (0,19-0,72). Svi ispitanici sa negativnim nalazom retestirani su u duplikatu drugom serijom istog testa, ali su rezultati ponovo bili negativni. Jedan ispitanik je testiran 93. dana od pozitivnog dijagnostičkog testa, što može uticati na negativan rezultat N-IgG antitela, dok su ostali ispitanici došli u periodu između 19. i 30. dana nakon početka simptoma. Od tih ispitanika, jedna ispitanica je primala terapiju monoklonskim antitelima, što takođe može objasniti nalaz negativnih N-IgG antitela. Ova ispitanica je nakon toga imala ponovnu reinfekciju osam meseci kasnije, kada nije primala monoklonsku terapiju – a u tom uzorku jeste detektovan nisko pozitivan nalaz N-IgG antitela (1,27). Za još dva ispitanika detektovan je novi porast u koncentraciji RBD-IgG antitela, do tri meseca nakon kontrole posle pozitivnog dijagnostičkog testa (i inicijalno negativnih

N-IgG rezultata). U prvom slučaju porast je iznosio 54,69 BAU/mL, kada je došlo do novog rizičnog kontakta, a tada su N-specifična IgG antitela bila granična – 0,94. U drugom slučaju porast je iznosio 16,87 BAU/mL, posle nešto manje od dva meseca od kontrole, ali je nalaz N-IgG antitela bio ponovo negativan (0,48). Osim negativnih ispitanika, u ovoj podgrupi bilo je i već pomenutih testova sa graničnom vrednošću (opisanih u okviru 4.3.7. odeljka), a uz njih još jedan ispitanik imao je graničnu vrednost N-IgG antitela, 34. dana, uz pozitivan dijagnostički test.

Ispitanici BNT162b2/BNT162b2 podgrupe sa pozitivnim N-specifičnim IgG antitelima imali su detektovane nivoe u iznosu od 2,17 (1,62-3,01). Ova vrednost bila je statistički značajno niža od vrednosti za BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu (Man-Vitnijev test,  $p < 0,0001$ ). Korelacija svih rezultata N-IgG antitela i RBD-IgG antitela nije bila ni u BNT162b2//BNT162b2 podgrupi statistički značajna, ali je bila blizu granice značajnosti (Spirmanov test,  $p = 0,054$ ).

## **5. DISKUSIJA**

Pandemija kovid-19 nije samo predstavljala širom sveta rasprostranjenu zdravstvenu krizu i jednu od najvećih pandemija novijeg doba, već i prelomni trenutak koji je promenio način na koji shvatamo zdravlje, društvo i naše međusobne odnose. Nakon čitave tri godine, od marta 2020. do maja 2023. godine, i konstantne neizvesnosti od novih talasa pandemije, SZO je zvanično objavila da kovid-19 više ne ispunjava kriterijume za svrstavanje u javnozdravstvenu vanrednu situaciju od međunarodnog značaja (eng. *Public Health Emergency of International Concern*, PHEIC). Do aprila 2024. godine, prijavljeno je 705 miliona infekcija i nešto više od sedam miliona smrtnih slučajeva pripisanih kovid-19, što čini ovu pandemiju petu po redu po smrtnosti u istoriji.<sup>[20]</sup> Izuzetni naponi uloženi su od samog početka u istraživanja najefikasnijih metoda prevencije SARS-CoV-2, kako bi se teški oblici kovid-19 sprečili i dalje širenje ovog virusa u populaciji onemogućilo. Udružen rad stručnjaka iz različitih oblasti medicine i biotehnologije rezultirao je razvojem novih kovid-19 vakcina već krajem prve godine pandemije. U Srbiji je Nacionalni stručni komitet za imunizaciju (eng. *National Immunization Technical Advisory Group*, NITAG) 27. novembra 2020. godine dao preporuku Ministarstvu zdravlja o vakcinaciji prioriternih grupa stanovništva protiv kovid-19, u skladu sa najaktuelnijim istraživanjima, koristeći tri faze implementacije, počevši od vakcinacije zaposlenih u zdravstvenim ustanovama.<sup>[112]</sup> Od januara 2021. godine vakcinacija je postala dostupna i opštoj populaciji, i to primenom sledećih vakcina: inaktivisanom BBIBP-CorV, zatim vektorskim Gam-COVID-Vac i ChAdOx1, kao i vakcinama razvijenim na novoj platformi baziranoj na informacionoj RNK i to prevashodno BNT162b2, a nešto kasnije tokom pandemije i mRNA-1273.<sup>[57]</sup> Neočekivana brzina širenja SARS-CoV-2 ukazala je na važnost postizanja adekvatnog humoralnog imunskog odgovora nakon vakcinacije radi smanjenja transmisije virusa u populaciji, ali i zaštite od teških oblika bolesti. Srbija je jedna od retkih država koje su tako rano tokom pandemije uvele vakcinaciju različitim vakcinama, a upravo je ovakvo okruženje stvorilo prilike za sprovođenje ispitivanja imunogenosti različitih vakcinalnih platformi u okviru iste populacije.

Razumevanje kovid-19 počevši od epidemiologije i patogeneze, preko dugotrajnih posledica infekcije, ali i primene odgovarajuće prevencije i razumevanja zaštitnog potencijala vakcina, počinje pre svega istraživanjem imunskog odgovora. Rasvetljavanjem različitih aspekata imunskog odgovora kako na sam infektivni agens, tako i na vakcinaciju, možemo oformiti adekvatnu strategiju protiv pretećih koronavirusnih bolesti u budućnosti, uzevši u obzir ubikvitarnost koronavirusa, njihov veliki zoonotski potencijal i sposobnost preskakanja vrste. Stoga, SZO i dalje uključuje kovid-19 na listu prioriternih bolesti za istraživanja i razvoj u vezi agensa, dijagnostike, lečenja i prevencije, ohrabrujući istraživačke napore u okviru ove oblasti.<sup>[113]</sup> Međutim, praćenje i poređenje humoralnog imunskog odgovora nakon kovid-19 i nakon vakcinacije otežano je usled postojeće diskrepance u literaturi koja potiče od različite metodologije, odnosno specifičnosti i senzitivnosti seroloških testova, kao i tipa upotrebljenog antigena u tim testovima (kako komercijalno dostupnim, tako i testovima razvijenim u pojedinačnim laboratorijama, tzv. *in-house* metodama), zatim od broja ispitanika, incidencije infekcija nakon vakcinacije u ispitivanoj populaciji, prisutnosti različitih varijanti od interesa u određenom geografskom regionu, ali i od same vakcinalne platforme koja je primenjena i dostupna ispitivanoj populaciji. Ovakve razlike između studija i rezultata mogle bi biti prevaziđene poređenjem sa kontrolnim serumima rekonvalescenata i dugotrajnim praćenjem različitih vakcina, u okviru jedne studije.<sup>[114]</sup> U istraživanju predstavljenom u ovoj doktorskoj disertaciji, primena istih, komercijalno dostupnih i validiranih testova u okviru iste populacije, na istom geografskom području, tokom različitih faza pandemije i prilikom uvođenja različitih vakcinalnih platformi, doprinosi jednostavnijem poređenju i ispitivanju imunskog odgovora i unapređuje metodološku konzistentnost i validnost ekstrapolacije rezultata ispitivanja nakon infekcije, vakcinacije, ali i hibridnog imuniteta.

Rezultati brojnih istraživanja na početku pandemije ukazali su na značaj i humoralne i ćelijske imunosti u uspešnoj odbrani i ograničavanju infekcije.<sup>[42]</sup> Iako se nakon infekcije imunski odgovor razvija i na strukturne i na nestrukturne proteine SARS-CoV-2, najveći broj T-ćelija usmereno je na S protein, a gotovo 90% neutrališućih antitela rekonvalescenata specifično je za RBD S1 podjedinice, usled čega se smatra da upravo ova antitela imaju ključnu ulogu u odbrani od infekcije.<sup>[42,43]</sup> Primarni testovi za detekciju humoralnog imunskog odgovora u okviru istraživanja predstavljenog ovom disertacijom, bazirani su na detekciji antitela usmerenih upravo na RBD S protein (VIDAS Biomerieux SARS-CoV-2 IgG II i SARS-CoV-2 IgM test). U pitanju su potpuno automatizovani testovi, sa CE (fra. *Conformité Européene*) oznakom – koja označava da je test proizveden u skladu sa svim evropskim regulativama. Ovi testovi su takođe, tokom trajanja pandemije, bili odobreni od strane FDA, pod ovlašćenjem za EUA upotrebu.<sup>[115,116]</sup> U studiji *Renarda* i saradnika, gde su ispitivane performanse VIDAS testova, pokazano je da ih odlikuje izuzetno visoka preciznost.<sup>[117]</sup> Reaktivnost sa drugim humanim koronavirusima bila je veoma niska za oba testa, tačnije od 18 testiranih uzoraka ispitanika sa istorijom infekcija izazvanih raznim humanim koronavirusima, samo jedan uzorak seruma HCoV-NL63 pozitivnog ispitanika bio je IgM pozitivan u VIDAS testu.<sup>[117]</sup> Specifičnost IgG testa iznosila je gotovo 100% ( $\geq 99\%$ ), zbog čega su *Renard* i saradnici smatrali ovaj test pogodnim za epidemiološki nadzor. Pozitivan procenat slaganja (eng. *positive percent agreement*, PPA) iznosio je 100% za uzorke uzete od 16. do 23. dana nakon početka simptoma za IgM test, odnosno 100% za uzorke uzete nakon 32. dana za IgG test.<sup>[117]</sup> To je u skladu sa uzorkovanjem u okviru istraživanja predstavljenog ovom disertacijom, uzevši u obzir da su prve kontrole nakon infekcije, ali i primanja vakcine, bile sprovedene upravo u okviru kada su PPA vrednosti najviše. Senzitivnost i specifičnost VIDAS testova variraju u literaturi u zavisnosti od studije, pa je tako određivana senzitivnost od 73,9%, 88,3%, 98,9% i 100%, a specifičnost od 97,1%, 98,4% i 100%.<sup>[118–121]</sup> Međutim, VIDAS testovi su se pokazali kao odlični za detekciju potencijalnih neutrališućih antitela, odnosno pokazali su odličnu korelaciju rezultata sa nivoima NAb.<sup>[120,122]</sup> Štaviše, u studiji *Younes* i saradnika rezultati VIDAS testova su pokazali odličnu korelaciju i sa rezultatima sVNT GenScript testa, korišćenog i u ovom istraživanju.<sup>[120]</sup> Ovakvi nalazi potvrđeni su i u studiji *Bubonja-Šonje* i autora, gde je takođe najснаžnija korelacija nađena upravo između ova dva testa, što nije iznenađujuće uzevši u obzir da i GenScript test detektuje NAb specifična za RBD.<sup>[121]</sup> Autori *Bal* i

saradnici, na osnovu rezultata studije sprovedene na zdravstvenim radnicima, opservirali su da je medijana indeksa RBD-IgG antitela dobijena VIDAS testom za titar NAb preko 80, određen PRNT testom, iznosila 15,4 (9,7-22,7), dok su vrednosti indeksa ispod 1,8 (3,3-9,2) korelirale sa negativnim NAb.<sup>[123]</sup> Kada se ovi indeksi pomnože faktorom konverzije, adekvatna BAU/mL vrednost donje granice iznosila bi 36,59, a gornje 313,08 BAU/mL,

Tokom infekcije SARS-CoV-2, kao što je već pomenuto, pokreće se humoralni imunski odgovor pre svega specifičan za strukturne proteine virusa. Primarni antigeni koji se ispituju prilikom istraživanja serokonverzije jesu S i N proteini, a vrednosti antitela specifičnih za ova dva antigena koreliraju sa početkom infekcije.<sup>[42]</sup> U sistematskom pregledu literature *Post* i saradnika, koji je obuhvatio 150 radova iz prve godine pandemije, nezavisno od antigena korišćenog u testu, podaci ukazuju na serokonverziju IgM antitela u prvih 4-14 dana, a za IgG antitela 12-15 dana nakon početka simptoma, sa većinskim brojem studija u kojima su IgM antitela detektovana pre IgG antitela.<sup>[124]</sup> Međutim, postoje i podaci o simultanoj detekciji ovih antitela na samom početku bolesti, pa čak i detekcije IgG antitela pre IgM antitela.<sup>[42,124]</sup> Kriva dinamike IgG antitela u istom radu *Posta* i saradnika ukazala je na pojavu skoka nivoa tri do sedam nedelja nakon pojave simptoma, zatim stanje platoa i pad nivoa dva meseca nakon početka simptoma, sa održavanjem niskih nivoa tokom perioda praćenja od 12 nedelja.<sup>[124]</sup> Kriva dinamike IgM antitela ukazivala je na skok nivoa dve to pet nedelja nakon pojave simptoma, a zatim pad nakon treće do osme nedelje od početka simptoma, dok je u najvećem broju slučajeva nivo IgM antitela padao ispod nivoa detekcije šest nedelja nakon početka bolesti.<sup>[124]</sup> NAb detektovana su između sedam i 15 dana nakon početka bolesti, dostižući svoj vrhunac u prvom mesecu nakon početka simptoma, a potom opadajući tokom perioda od šest nedelja.<sup>[124]</sup> Studija objavljena nešto kasnije u toku pandemije, prikazala je održavanje antitela i do 20 meseci nakon primarne infekcije.<sup>[125]</sup> Koncentracije svih izotipova antitela koreliraju sa težinom kliničke slike, pa se tako najniži nivoi antitela sreću kod ispitanika sa asimptomatskom ili blagom infekcijom.<sup>[109]</sup> Studije ispitivanja dugotrajnosti humoralnog imunskog odgovora nakon kovid-19 često su vrlo heterogene, kao što je već navedeno, međutim, ono što je kao opšti zaključak proizašlo iz ovih studija, jeste da antitela usmerena na N protein znatno brže padaju ispod nivoa detekcije, u odnosu na RBD-specifična antitela, koja mogu perzistirati i do godinu dana.<sup>[109]</sup>

U istraživanje predstavljeno ovom disertacijom uključeno je 196 ispitanika u okviru grupe nevakcinisanih ispitanika nakon SARS-CoV-2 infekcije, tj. kovid-19 grupe. Ovi ispitanici bili su podeljeni u tri grupe u zavisnosti od potvrde infekcije dijagnostičkim testom – pa tako u Podgrupu 1 spadaju dijagnostički potvrđeni ispitanici (PCR ili brzi Ag test) (n=106), u Podgrupu 2 ispitanici koji nisu imali potvrdni test ali su imali pozitivan nalaz RBD-specifična antitela u ovom istraživanju (n=72) i u Podgrupu 3 seronegativni ispitanici, koji su imali pozitivan PCR, Ag test ili ELISA test u drugoj laboratoriji, neposredno nakon simptoma (n=16). Demografski podaci ove tri podgrupe se nisu statistički značajno razlikovali (Tabela 4-1). Većina *de novo* slučajeva u kovid-19 grupi zabeležena je početkom pandemije (87,24%), 2020. godine, dok je ostatak infekcija registrovan 2021. godine (Slika 4-2). U Srbiji je tokom pandemije evidentirano osam kovid-19 talasa: u aprilu i julu 2020. godine, zatim od sredine oktobra do januara 2021. godine, od januara do juna, od druge polovine jula do decembra, dok je šesti talas, najveći po broju registrovanih slučajeva, trajao od januara do aprila 2022. godine.<sup>[126]</sup> Od juna do novembra 2022. registrovan je sedmi, a od kraja 2022. do sredine januara 2023. osmi kovid-19 talas.<sup>[126]</sup> *Novković* i saradnici ispitivali su sekvence genoma više od 2000 izolata SARS-CoV-2 u Srbiji, tokom trajanja svih osam talasa. Njihovi rezultati ukazali su na prisustvo Alfa varijante (B.1.1.7) od decembra 2020. do avgusta 2021. sa dominantnošću od gotovo 100% u aprilu 2021. godine. Prvi slučaj Delta varijante detektovan je u junu 2021. godine, a već je u julu dostigao gotovo 93% učestalosti, a u septembru, oktobru i novembru maksimum od 100%, do pojave Omikron varijante u decembru i njene apsolutne dominacije u januaru 2022. godine.<sup>[126]</sup> Takođe, *Miljanović* i saradnici ukazali su na to da su i u periodu od juna do oktobra 2020. godine u Srbiji, SARS-CoV-2 izolati najčešće bili klasifikovani kao Alfa (B.1.1.70) i B.1.1.1 varijanta.<sup>[127]</sup> Na osnovu toga možemo pretpostaviti, s obzirom na to da u okviru istraživanja predstavljenog ovom disertacijom nije rađena izolacija virusa, da je većina infekcija prvog i drugog talasa u Srbiji, a samim tim i slučajeva

uključenih u kovid-19 grupu, upravo bila vezana za prisustvo B.1.1.1 i Alfa varijante. Podaci o prisustvu Delta i Omikron varijante, poklapaju se sa podacima o reinfekcijama i infekcijama nakon vakcinacije u okviru ove studije, koje će u nastavku ove diskusije biti detaljnije obrađene, u odgovarajućim pasusima.

Tokom praćenja u okviru kovid-19 grupe ovog istraživanja, u šest vremenskih tačaka, uočen je blagi porast koncentracije RBD-IgG antitela do šest nedelja nakon početka bolesti, kada je medijana koncentracije iznosila 148,41 BAU/mL, što se uklapa u podatke iz literature, uzevši u obzir da je prethodno navedeni skok antitela opisan od treće do sedme nedelje nakon početka bolesti.<sup>[124]</sup> Na sukcesivnim kontrolama u ovoj studiji uočen je dalji postepen pad u koncentraciji (Tabela 4-3). Statistički značajna razlika postojala je u prvim tačkama praćenja, u dostupnim vezanim uzorcima, što ukazuje na značajan pad tokom vremena, međutim, između pete i šeste tačke razlika nije bila statistički značajna, predstavljajući potencijalni plato niskih koncentracija koji se održava od devet meseci do godinu dana nakon infekcije (Slika 4-3). Ovi nalazi su u skladu sa prethodno navedenim studijama koje potvrđuju održavanje nivoa antitela nakon infekcije do godinu dana, pa i više.<sup>[109,125]</sup> LMM model takođe je ukazao na značajan pad nivoa antitela tokom perioda praćenja. U ovde predstavljenom istraživanju u okviru Podgrupe 1 i Podgrupe 2 kod šest ispitanika (3,33% ) došlo je do seronegativizacije RBD-IgG antitela tokom perioda praćenja od 12 meseci (Tabela 4-4), a medijana vremena od početka bolesti do seronegativizacije iznosila je 145,5 dana. Iz vezanih uzoraka pre i posle negativizacije nalaza RBD-IgG antitela, može se uočiti da su svi ispitanici na prethodnoj kontroli već imali nalaz veoma niskog indeksa RBD-IgG antitela i to u većini slučajeva ispod indeksa od 1,8, koji je u studiji *Bal* i saradnika korelirao sa negativnim NAb, što se ispostavilo i za istraživanje predstavljeno ovom disertacijom.<sup>[123]</sup> Prisustvo N-IgG antitela, ali i niskih nivoa RBD-IgG antitela, nisu bili povezani sa prisustvom neutrališućih antitela (Tabela 4-4). Svi ispitanici imali su blagu kliničku sliku kovid-19, a dva slučaja (2/6) bila su asimptomatska, dok je medijana nivoa antitela ovih ispitanika pri prvom uključenju u studiju bila niska i iznosila 33,03 BAU/mL. *Kubale* i saradnici objavili su 6% detektovanih slučajeva „seroreverzije“ odnosno seronegativizacije prethodno pozitivnog nalaza, tokom praćenja S-specifičnog IgG odgovora.<sup>[128]</sup> Svi ovi ispitanici imali su inicijalno niske nivoe antitela.<sup>[128]</sup> U drugoj studiji, procenat seronegativizacije iznosio je 4,28% (3 slučaja od 70) za RBD-IgG antitela, od toga je jedan ispitanik bio imunokompromitovan, a svi su bili lečeni tokom kovid-19 na intenzivnoj nezi, ukazujući na težu kliničku sliku.<sup>[129]</sup> Takođe, u literaturi se može naći i još niža incidencija seronegativizacije tokom perioda praćenja i to 2,1%, opažena kod ispitanica koje nisu imale kovid-19 potvrđen PCR testom, ali su obe inicijalno imale nizak nivo RBD-IgG antitela i blage manifestacije infekcije.<sup>[130]</sup> Podaci dobijeni istraživanjem u okviru ove disertacije su u skladu sa prethodno navedenim studijama, jer je i za ispitanike ove studije opisana niža početna koncentracija IgG antitela, koja definitivno upućuje na potencijalni rizik od brže seronegativizacije i izloženosti novoj infekciji. Međutim, za razliku od rezultata *Iyer* i *atuora*, u ovoj studiji opisane su blage kliničke manifestacije i asimptomatske infekcije, što ipak ide u prilog tome da koncentracije antitela koreliraju sa težinom kliničke slike.

*Mioch* i saradnici ukazali su na različite evolucije odgovora IgG antitela nakon infekcije SARS-CoV-2, odnosno kod određenog broja ispitanika primećen je pad nivoa antitela kroz vreme (46,3%), dok je kod ostalih primećen izostanak pada nivoa (53,7%).<sup>[130]</sup> Ispitanici kod kojih nije uočen pad, dalje su klasifikovani u ispitanike sa stabilnim odgovorom (43,9%), sa porastom nivoa antitela (6,1%) i sa fluktuirajućim nivoima (3,7%), a osnovne karakteristike ovih grupa se nisu razlikovale značajno, ali su fluktuirajući nivoi pripisani od strane autora verovatnoj reinfekciji.<sup>[130]</sup> Rezultati predstavljeni ovom disertacijom takođe ukazuju na dva različita tipa evolucije koncentracija RBD-IgG antitela u Podgrupi 1 i Podgrupi 2. Kada se obe podgrupe posmatraju zajedno, kod 85% ispitanika uočen je pad koncentracije RBD-IgG kroz vreme, dok je kod 8,33% uočen blagi ili neznatan porast koncentracije antitela u prvih 150 dana nakon infekcije, a kod 7,22% taj porast je uočen nešto kasnije, do godinu dana nakon početka simptoma. Četvoro ispitanika imalo je neznatan porast na tri uzastopne kontrole, što je moguće okarakterisati i kao održavanje platoa (2,22%) (Slika 4-4). Ispitanici sa porastom ili platoon RBD-IgG antitela nisu imali detektovan porast u nivoima N-

IgG antitela, niti u nivoima RBD-IgM, a ukoliko su pre toga nalazi ovih antitela bili negativni, takvi su i ostali, ukazujući na to da do reinfekcije ili ponovnog kontakta sa SARS-CoV-2 najverovatnije nije došlo, već da ovi nalazi mogu predstavljati prirodnu evoluciju humoralnog imunskog odgovora kod određenog broja ispitanika (Tabela 4-5).

Procenat pozitivnosti RBD-specifičnih IgM antitela u ovoj studiji bio je najveći u periodu od treće nedelje do tri meseca nakon infekcije (77% treće nedelje, 55% šest nedelja i 42% tri meseca od početka bolesti), sa postepenim padom do negativizacije na kontroli nakon dvanaest meseci, kada su svi ispitanici koji su došli na kontrolu imali negativan nalaz RBD-IgM antitela (Slika 4-5). Ovakva kriva dinamike prati već opisane slučajeve u literaturi, gde većina ispitivane populacije ima negativan nalaz IgM antitela već oko šeste nedelje, dok je u okviru ovde predstavljenog istraživanja nešto manje od polovine nalaza bilo negativno u toj tački praćenja (45%), a taj procenat se zatim progresivno povećavao tokom narednih meseci.<sup>[124]</sup> U drugom istraživanju prikazan je sličan trend, gde je do kraja perioda praćenja od 12 meseci, seroprevalenca IgM antitela pala na 17%, što se takođe poklapa sa poslednjim tačkama praćenja u ovde predstavljenom istraživanju, gde je u devetom mesecu pozitivnost iznosila tek 11,76%.<sup>[131]</sup> U ovom istraživanju uočava se pad i nivoa RBD-IgM antitela kroz vreme, sa platoom u četvrtoj i petoj tački praćenja (Tabela 4-6). Statistički značajna razlika postojala je prilikom poređenja nivoa treće nedelje, šest nedelja, tri meseca i šest meseci nakon početka bolesti, dok poređenjem poslednjih vremenskih tačaka, u periodu od šest to 12 meseci nije postojala statistički značajna razlika u nivoima antitela vezanih uzoraka, ukazujući takođe na održavanje platoa nivoa antitela kod ispitanika sa pozitivnim nalazima krajem perioda praćenja (Slika 4-6).

U literaturi, perzistiranje RBD-IgM antitela, zajedno sa IgG antitelima uočeno je kod trećine ispitanika do šest meseci, ali i kod 23,9% ispitanika do godinu dana praćenja u drugoj kohorti.<sup>[132,133]</sup> Ovi rezultati nisu u potpunom skladu sa podacima u okviru istraživanja predstavljenog ovom disertacijom, uzevši u obzir da su u ovom istraživanju svi testirani ispitanici imali negativan RBD-IgM nalaz 12 meseci nakon infekcije. Međutim, jeste u pitanju sličan trend u održavanju seropozitivnosti za određene ispitanike i do devet meseci nakon infekcije. Usled ove osobine perzistencije, odnosno pojave takozvanih rezidualnih IgM antitela, ovaj nalaz se ne može bez rezerve interpretirati prilikom dijagnostike kao jedinstveni marker akutne infekcije. Kao potencijalni mehanizmi perzistirajućih IgM antitela navode se nekontrolisana replikacija SARS-CoV-2 ili inflamacija u okviru teške kliničke slike, koje mogu dovesti do prekomerne produkcije antitela, ali i duže održavanje virusa i njegovih antigena u ćelijama domaćina, što stimuliše humoralni imunski odgovor.<sup>[132,133]</sup> Međutim, u literaturi postoje opisi pozitivnih nalaza IgM antitela koji se održavaju dug period nakon infekcije, usled postojanja dugoživećih memorijskih IgM pozitivnih B-ćelija.<sup>[134]</sup> IgM antitela su takođe prepoznata i kao glavni prediktivni faktor težine pneumonije tokom kovid-19, a nivoi ovih antitela korelirali su do osme nedelje nakon infekcije sa pozitivnim nalazom RNK virusa.<sup>[135]</sup>

U ovom istraživanju, tokom praćenja RBD-IgM antitela u okviru Podgrupe 1 i Podgrupe 2, kod šest ispitanika (3,33%) detektovana su RBD-specifična IgM antitela, u odsustvu RBD-specifičnih IgG antitela. Od šest ispitanika, infekcija je potvrđena dijagnostičkim testom u tri slučaja. Jedan ispitanik je imao asimptomatsku infekciju, a ostalih pet ispitanika simptomatske infekcije. Detektovano je prisustvo RBD-neutrališućih antitela kod tri ispitanika, dok su nalazi N-specifičnih IgG antitela bili granični kod dva, a pozitivni kod tri ispitanika (Tabela 4-7). Uočava se da je kod većine ispitanika (3/4 ispitanika sa vezanim uzorcima) negativizacija ili pad nivoa indeksa RBD-IgM antitela, bio praćen i padom procenta inhibicije neutralizacije. Jedan ispitanik je na prethodnoj kontroli imao pozitivan nalaz RBD-IgG antitela, koji se negativizirao pre RBD-IgM antitela. Pozitivan nalaz N-IgG svakako ne može predstavljati izvor pozitivnog nalaza NAb kod ispitanika u ovoj studiji, uzevši u obzir da je test za detekciju NAb ograničen na RBD podjedinicu S proteina, što nam može ukazati na neutrališuću aktivnost RBD-IgM antitela. Takođe, ovi nalazi definitivno potvrđuju da nisu u pitanju lažno pozitivni nalazi. Kod jednog od IgM+/IgG- ispitanika koji je imao

simptomatsku infekciju, potvrđenu PCR-om, gde nije detektovano prisustvo ni RBD-IgG ni N-IgG antitela, procenat inhibicije NAb iznosio je čak 71,66%, potvrđujući mogućnost visokog procenta neutralizacije koji potiče isključivo od RBD-IgM antitela. Pozitivni nalazi IgM antitela, u odsustvu IgG antitela, idu u prilog iskazima o perzistenciji IgM antitela, ali takođe se mogu protumačiti i pripisati preranoj eliminaciji RBD-IgG ili nedovoljnoj produkciji ove klase antitela. U okviru ove studije, jedan od ispitanika sa incidentalno utvrđenom asimptomatskom infekcijom je imao u dva sukcesivna uzorka nalaz veoma visokih vrednosti indeksa RBD-IgM antitela, u prisustvu izrazito niskih koncentracija RBD-IgG antitela, sa procentom inhibicije NAb od 77,03%. Osim što ovaj nalaz potvrđuje prisustvo neutralizacije kod visoko pozitivnog nalaza RBD-IgM antitela, ukazuje i na postojanje ispitanika sa serološkim profilom niskog RBD-IgG i visokog RBD-IgM nalaza, koji ukoliko se prvi put testira u kasnijim vremenskim tačkama može prikazivati i sliku IgM+/IgG- nalaza usled brže negativizacije IgG antitela. U literaturi takođe postoje opisani slučajevi IgM+/IgG- ispitanika.<sup>[136,137]</sup> *Valdivia* i saradnici smatraju da interpretacija ovog serološkog nalaza, pogotovo u odsustvu potvrde dijagnostičkim testom, nije laka i da u okviru njihove studije polovina ispitanika sa ovim nalazom najverovatnije nije imala kovid-19, a da bi ponovljeno testiranje pomoglo u razlučivanju potencijalne infekcije od incidentalno lažno pozitivnog nalaza.<sup>[137]</sup> Takođe, nalaz pozitivnih IgM antitela može ukazivati i na unakrsnu reakciju sa drugim, sezonskim koronavirusima. Međutim, iako je uloga IgM antitela donekle kontroverzna u dijagnostici i praćenju humoralnog imunskog odgovora, interesantno je da je u literaturi opisano da prisustvo neutrališućih antitela može korelirati upravo sa nivoima anti S-IgM, što može biti objašnjenje zašto sposobnost neutralizacije u određenim slučajevima opada bez obzira na stabilan nivo IgG antitela.<sup>[138]</sup> Takođe, rezultati *Hale* i saradnika pokazali su da monoklonska IgM antitela potentno neutrališu SARS-CoV-2, kao i da mogu biti efikasnija od klonalno identičnih IgG antitela.<sup>[139]</sup>

U ovde predstavljenom istraživanju ukupno je 8,67% ispitanika imalo asimptomatsku infekciju, dok su se simptomatske infekcije najčešće ispoljavale kao povišena telesna temperatura, malaksalost, mijalgija i gubitak čula ukusa i/ili mirisa (Tabela 4-2). Pneumonija i hospitalizacija, kao odabrani parametri ozbiljnosti i težine kliničke slike, bili su statistički značajno češći u Podgrupi 1, sa dijagnostički potvrđenim kovid-19, što indirektno može ukazivati na povezanost koncentracije virusa u kliničkim uzorcima (eng. *viral load*) i shodno tome verovatnoće pozitivnog dijagnostičkog testa, sa ozbiljnošću kliničke slike. Kao što je i očekivano, usled prisustva raznih komorbiditeta, godine starosti korelirale su značajno sa težinom kliničke slike ( $r=0,287$ ,  $p < 0,001$ ). Kada poredimo kinetiku RBD-IgG antitela sa primenjenom LOESS krivom, a zatim podelimo ispitanike u odnosu na težinu kliničke slike, uočavamo značajno različite tipove kinetike kod ispitanika sa težom kliničkom slikom, dok se za RBD-IgM antitela na grafiku razlika uočava samo u prvih 100 dana praćenja (Slike 4-9, 4-10, 4-11). Naizgled, uticaj pola nije značajno uticao na krive kinetike ni RBD-IgG niti RBD-IgM antitela. Primenom LMM uočava se značajan uticaj kliničke slike na nalaz RBD-specifičnih antitela, to jest, ispitanici sa težom kliničkom slikom imali su značajno više nivoe antitela ( $p < 0,001$ ) (Slika 4-11). Međutim, značajna interakcija između težine kliničke slike i vremenske tačke ukazuje na to da su nivoi IgG iako inicijalno viši, brže opadali kod osoba sa teškim oblikom bolesti i to za 300 BAU/mL, u odnosu na 140 BAU/mL kod ispitanika sa blagom kliničkom slikom, tokom perioda praćenja. Takođe, uticaj uzrasta na humoralni imunski odgovor bio je statistički značajan ( $p=0,015$ ), usled uočenog nalaza viših nivoe RBD-IgG kod starijih ispitanika (Slika 4-12). Ovo ukazuje da je kod starijih ispitanika odgovor robusniji i duže se održava iznad praga detekcije, međutim može se i objasniti češćim prisustvom teške kliničke slike kod ovih ispitanika, koja je već sama po sebi povezana sa višim vrednostima nalaza RBD-specifičnih antitela. Pol ispitanika nije značajno uticao na RBD-IgG nivoe nakon kovid-19 u ovom istraživanju. Analiza RBD-IgM antitela u LMM modelu pokazala je brz pad nivoe tokom vremena, od četiri jedinice do poslednje tačke praćenja kod ispitanika sa blagom kliničkom slikom, do 9 jedinica za ispitanike sa težim oblikom kovid-19 (Slika 4-11). Uticaj pola i starosti ispitanika nije bio značajan za nalaz RBD-IgM antitela. Ovi rezultati sugerišu kratak period održavanja IgM odgovora, ali i da težina kliničke slike može uticati više na magnitudu odgovora, nego na dugotrajno održavanje.

U velikoj multicentričnoj studiji sprovedenoj u Izraelu početkom pandemije, utvrđeno je da postoji mala subpopulacija pacijenata, približno 5% ispitivane populacije, koja nakon simptomatskog kovid-19, potvrđenog PCR-om, ostaje potpuno seronegativna na širok spektar antigena i u više različitih seroloških testova.<sup>[140]</sup> Autori nisu pronašli jasnu razliku u starosnoj dobi, polu, postojanju hospitalizacije, težini kliničke slike i vremenskog razdoblja koje je prošlo od pozitivnog PCR testa do serološkog testiranja između seronegativnih i seropozitivnih ispitanika.<sup>[140]</sup> Različita istraživanja rezultirala su i višim procentima seronegativnosti nakon dijagnostički potvrđene bolesti, krećući se čak do 25%.<sup>[141,142]</sup> Pokazano je da nizak *viral load*, kao i visoke Ct vrednosti (eng. *cycle threshold values*), mogu dovesti do toga da se ne generišu sistemska antitela, da klinički ispoljena bolest ne garantuje pojavu serokonverzije, kao i da su seronegativni ispitanici imali niske markere inflamacije i blažu kliničku sliku.<sup>[141,143]</sup> Takođe, jedna od pretpostavki zbog čega u određenim slučajevima ne dolazi do serokonverzije nakon kovid-19, je i to da brzi ćelijski imunski odgovor može kontrolisati količinu virusa održavajući ga ispod nivoa potrebnog za aktiviranje dovoljno visokog humoralnog imunskog odgovora, koji bi bio detektabilan serološkim testovima.<sup>[144]</sup>

U okviru Podgrupe 3, u ovde predstavljenom istraživanju, opisani su ispitanici sa negativnim nalazima RBD-IgM i RBD-IgG antitela nakon infekcije potvrđene PCR-om ili Ag testom (n=11, 68,75%) ili ELISA testom u drugoj laboratoriji na početku bolesti (n=5, 31,25%). Osim jednog slučaja asimptomatske infekcije (1/16), svi ispitanici imali su blagu kliničku prezentaciju kovid-19. Serološko praćenje u istraživanju Long i saradnika pokazalo je da kod inicijalno seronegativnih ispitanika, može doći do serokonverzije tokom perioda praćenja u prvih 20 dana nakon početka simptoma, što je svakako uslov ispunjen od strane ovog istraživanja, uzevši u obzir da su svi uzorci uključeni u Podgrupu 3 uzeti posle 30. dana nakon početka simptoma, tako da se seronegativnost ne može pripisati preranom uzorkovanju.<sup>[145]</sup> Kod ispitanika kojima je bio pozitivan ELISA test u drugoj laboratoriji, u ovom istraživanju su u jednom slučaju detektovana N-IgG antitela, a u drugom je njihov nalaz bio granično pozitivan (Tabela 4-8). Kod infekcija potvrđenih dijagnostičkim testom, u još tri slučaja od 11 detektovana su N-IgG antitela. Ovakav nalaz može ukazivati na nedovoljno razvijenu produkciju RBD-specifičnih antitela ili pak njihovu bržu negativizaciju kod ispitanika sa blažom kliničkom slikom, uzevši u obzir da su neki ispitanici uključeni u studiju u kasnijem vremenskom periodu u odnosu na početak bolesti. Nalazi procenata inhibicije neutralizacije bili su negativni kod svih ispitanika ove Podgrupe. Ukoliko bi se u razmatranje uzeli isključivo ispitanici koji su uključeni u studiju do 41. dana nakon početka bolesti, incidencija seronegativnih ispitanika iznosila bi 3,06 % (6/196), što odgovara opsegu objavljenom u literaturi.<sup>[140]</sup> Ispitanici seronegativni nakon kovid-19 su pod većim rizikom od potencijalne reinfekcije, ali takođe mogu ukazivati i na potencijalan rizik od seronegativnosti istih ispitanika i nakon vakcinacije, odnosno na postojanje određene populacije ispitanika koja ne bi adekvatno reagovala na vakcinaciju.

Početkom pandemije, nakon prvih talasa, nije bilo izvesno da li je preležana infekcija zaštitni faktor od novih infekcija ili mogućnost reinfekcije postoji, imajući u vidu kratak period praćenja imunskog odgovora nakon prvog i drugog talasa kovid-19. Diskurs u okviru ove teme uzimao je u obzir da postoji mogućnost lažno negativnih PCR nalaza, a da se kod tih pacijenata nakon prestanka primene terapije, pre svega u slučajevima dugotrajnog „otpuštanja“ virusa (eng. *shedding*), prilikom ponovnog testiranja dobije pozitivan PCR rezultat. Osim toga u obzir su dolazile i reaktivacija i relaps kovid-19.<sup>[146]</sup> Mogućnost reinfekcije je u nešto kasnijem periodu ipak potvrđena, ali se smatralo da je njena incidencija niska i da je česta kod prethodno asimptomatskih slučajeva, usled niskih nivoa ukupnih antitela i NAb.<sup>[146]</sup> Upravo to može biti i razlog prividno niske incidencije, ukoliko je prvi put infekcija bila asimptomatska ili je drugi put, u okviru reinfekcije, prošla bez simptoma.<sup>[146]</sup> Rezultati sistematskog pregleda literature Nguyen i saradnika, na uzorku od 23.231 reinficiranih pacijenata, pokazali su da su reinfekcije bile češće tokom Omikron perioda i da nisu postojale značajne razlike u kliničkoj slici u odnosu na primarnu infekciju, dok su ženski pol, komorbiditeti, nedovoljna produkcija anti-N IgG antitela nakon prve infekcije, kao i nevakcinisanost, bili povezani sa višim rizikom od reinfekcije.<sup>[147]</sup> I drugi podaci iz literature ukazuju na potencijalno viši rizik od reinfekcije kod osoba ženskog pola, prethodno nedovoljno imunizovanih pacijenata, kod postojanja

hroničnih bolesti, pacijenata starijih od 60 godina, pacijenata sa teškim kliničkim oblicima u primarnoj infekciji i imunokompromitovanih.<sup>[148]</sup> Takođe, podaci iz literature ukazuju na to da su osobe sa skorašnjom infekcijom, pre pojave Delta i Omikron varijanti, imale zaštitu od ponovne infekcije od sedam do deset meseci nakon primarne infekcije.<sup>[149,150]</sup> U drugom sistematskom pregledu literature, na 34.375 slučajeva reinfekcije, primećeno je da je 41,77% ispitanika imalo asimptomatsku infekciju, kao i da je rizik od teške kliničke slike smanjen za 86% u odnosu na primarnu infekciju.<sup>[151]</sup>

U ovde predstavljenom istraživanju procenat reinfekcija u kovid-19 grupi iznosio je 2,78%, što se uklapa u prevalenciju objavljenu u sistematskom pregledu literature koja je iznosila do maksimalnih 6,8%.<sup>[147]</sup> Isključivo u jednom slučaju je reinfekcija bila potvrđena dijagnostičkim Ag testom, međutim, svojevrsnom potvrdom reinfekcije u ostala četiri slučaja može se smatrati i detektovan statistički značajan porast nivoa RBD-IgG i N-IgG antitela u dva konsektivna uzorka (Slika 4-13). Kod četiri ispitanika je nalaz N-IgG antitela bio negativan na kontroli koja je prethodila reinfekciji, a kod dva ispitanika je i nalaz RBD-IgG antitela bio negativan, što može ukazivati na nedovoljnu imunizovanost nakon blagog oblika primarne infekcije, što je i navedeno kao faktor rizika za reinfekcije u pregledima literature. Svi ispitanici imali su blagu kliničku sliku, a jedina asimptomatska reinfekcija detektovana je u periodu kada je Delta varijanta bila dominantna, dok su sve ostale reinfekcije registrovane tokom i nakon pojave Omikrona u Srbiji, što takođe odgovara podacima iz rada *Nguyen* i saradnika i opaženoj povećanoj incidenciji reinfekcija tokom Omikron talasa.<sup>[147]</sup> U preglednom radu *Ren* i saradnika najkraći razmak između prve infekcije i reinfekcije iznosio je 19 dana, a najduži 293 dana; a pri analizi pojedinačno objavljenih prikaza slučajeva kod 33 ispitanika detektovane su reinfekcije poreklom od druge varijante virusa, dok je u devet slučajeva pokazana reinfekcija istim sojem.<sup>[152]</sup> *Nguyen* i saradnici, u okviru pregleda literature, objavili su srednju vrednost sa SD od  $178,9 \pm 87,1$  dana između infekcije i reinfekcije, u opsegu od 31 do 647 dana.<sup>[147,152]</sup> U istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji, razmak između pojave simptoma primarne infekcije i reinfekcije iznosio je 611 dana (IQR 304-687), što je očekivano, uzevši u obzir da su primarne infekcije registrovane početkom pandemije u prva dva talasa, a reinfekcije tek kasnije sa pojavom novih varijanti virusa.

\*\*

Primarni cilj vakcinacije protiv kovid-19 je stvaranje imunskog odgovora koji bi sprečio razvoj teške kliničke slike, hospitalizaciju i smrtni ishod. Različiti tipovi vakcina indukuju nešto drugačiji profil humoralnog imunskog odgovora, u zavisnosti od antigena koji prezentuju i načina na koji se primenjuju. Ispitivanja uspešnosti vakcinacije u određenoj populaciji mogu biti olakšana i međusobno uporediva upotrebom korelata zaštite (eng. *correlate of protection*, CoP). Definicija CoP, prema predlogu *Plotkina* i *Gilberta*, obuhvata markere imunskog sistema koji statistički koreliraju sa efektivnošću vakcine.<sup>[153]</sup> Ovako definisan marker može biti samostalno odgovoran za protekciju, ili označen kao surogat prediktor, ne podrazumevajući direktnu ulogu u procesu stvaranja protektivnih ćelija. U literaturi postoje striktno definisane CoP vrednosti koje predstavljaju gotovo zagarantovanu zaštitu od pojedinih patogena i bolesti, kao što su tetanus, difterija, male boginje, dok se u drugim slučajevima, kao kod vakcine protiv virusa influence, definiše relativan CoP.<sup>[106]</sup> Termin „relativan“ potiče od činjenice da takav CoP podrazumeva, na konkretnom primeru influence, zaštitu kod oko 70% pacijenata, sa efektivnošću koja proporcionalno raste uz porast vrednosti CoP-a, što potvrđuje da ta vrednost jeste indikator određenog nivoa zaštite iako ne predstavlja apsolutnu zaštitu od pojave bolesti.<sup>[106]</sup> NAb specifična za RBD, ukupna antitela, kao i nivoi T-ćelija razmatrali su se kao potencijalni kandidati za CoP u slučaju kovid-19.<sup>[106,109]</sup> Međutim, kako ne postoji standardizovani metod za određivanje CoP-a, delimično i zato što on može varirati u zavisnosti od varijante virusa i tipa vakcine, do sada nije uspostavljena jedinstvena, univerzalna vrednost ovog faktora za kovid-19. *Gilbert* i saradnici predložili su da, iako ne postoji jedinstvena granična vrednost ispod koje raste rizik od SARS-CoV-2 infekcije, odnos antitela i zaštite od bolesti predstavlja negativno korelisani

kontinuum, gde je svaki porast u koncentraciji antitela povezan sa opadanjem rizika od nastanka kovid-19.<sup>[154]</sup>

U istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji ispitivani su uticaji različitih vakcina, odobrenih za upotrebu u Srbiji, na humoralni imunski odgovor, pojavu infekcije nakon vakcinacije i zaštitu od teške kliničke slike kovid-19. Ukupno je u studiju uključeno 358 ispitanika, a od njih se najveći broj opredelio za BBIBP-CorV (46,94%) i BNT162b2 vakcinu (36,87%), dok se manji broj ispitanika opredelio za ChAdOx1 (8,61%), Gam-COVID-Vac (6,67%) i mRNA-1273 vakcinu (0,56%) (Tabela 4-9). Zainteresovanost za ChAdOx1 vakcinu znatno je opadala tokom perioda regrutovanja ispitanika, pre svega nakon pojave podataka u literaturi o neželjenim dejstvima u vidu tromboembolija, dok je mRNA-1273 vakcina počela da se primenjuje u Srbiji tek krajem 2021. godine, što je rezultiralo u oba slučaja manjim brojem regrutovanih ispitanika.<sup>[155]</sup> Takođe, broj nabavljenih BBIBP-CorV i BNT162b2 vakcina, od samog početka je bio značajno veći nego za sve druge vakcine ukupno.<sup>[156]</sup> Podaci od Instituta za javno zdravlje Republike Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ prikupljeni od uspostavljanja plana vakcinacije do maja 2021. godine, pokazali su da je stanovništvo Beograda, što i jeste populacija ispitivana u ovom istraživanju, pretežno vakcinisano BBIBP-CorV vakcinom, zatim BNT162b2, a najmanje vakcinama ChAdOx1 i Gam-COVID-Vac.<sup>[156]</sup> Među vakcinisanim najbrojniji bili su građani starosne dobi od 60 do 69 godina, a kada se gleda primena bar jedne doze vakcine, najviše je vakcinisano građana u uzrastu od 70-79 godina.<sup>[156]</sup> Na početku kampanje vakcinacije protiv kovid-19 u Srbiji, BBIBP-CorV kao inaktivisana vakcina, zasnovana na tradicionalnoj platformi, bila je primarno predložena za vakcinaciju opšte populacije, a prvi su se odazvali stariji pripadnici iste.<sup>[157]</sup> Ovi podaci se odražavaju i na uzorku populacije ispitivane u ovom istraživanju, gde je BBIBP-CorV podgrupa imala statistički značajno veći broj starijih ispitanika, nego BNT162b2 i ChAdOx1 podgrupa (dok je za ostale dve vakcine broj ispitanika bio mali, da bi se postigla statistička značajnost) (Tabela 4-9).

Sve vakcine ispitivane u istraživanju predstavljenom ovom disertacijom se u primarnoj seriji primenjuju intramuskularno, u dve doze. Doze su najčešće bile u razmaku od tri nedelje, odnosno 21 dan za BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac i BNT162b2, dok je za mRNA-1273 razmak neznatno veći – 28 dana.<sup>[57]</sup> Gam-COVID-Vac vakcina, za razliku od ostalih, sastoji se od dve komponente: prvu komponentu čine rekombinantne adenovirusne čestice serotipa 26, dok drugu komponentu čine rekombinantne adenovirusne čestice serotipa 5; prva komponenta se uvek daje kao prva doza.<sup>[57]</sup> Za ChAdOx1 vakcinu, razmak između dve doze iznosi 12 nedelja, po preporuci NITAG.<sup>[57]</sup> Ispitanici ovog istraživanja uklopili su se u okvire predložene Stručno-metodološkim uputstvom Instituta za javno zdravlje „Dr Milan Jovanović Batut“, jer je medijana razmaka između prve i druge doze vakcine merena u danima za BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac i BNT162b2 podgrupe iznosila 21 dan, dok je za mRNA-1273 podgrupu medijana bila nešto viša - 33,50, a za ChAdOx1 podgrupu, očekivano najviša, i to 84 dana (IQR 83-85), što odgovara periodu od 12 propisanih nedelja. Po preporuci Stručno-metodološkog uputstva, vakcinacije drugom dozom mogu biti odložene ukoliko u periodu nakon prve doze do potencijalne primene druge doze dođe do infekcije SARS-CoV-2 virusom, ili bilo koje druge akutne infekcije, relapsa autoimunske bolesti ili primene citostatika i/ili zračne terapije.<sup>[57]</sup> Kod šest ispitanika u ovde predstavljenom istraživanju vakcinacija drugom dozom bila je odložena i to u pet slučajeva upravo zbog pozitivnog SARS-CoV-2 dijagnostičkog testa.

U literaturi, najčešće neželjene reakcije nakon primarne serije vakcinacije protiv kovid-19, prijavljivane u prvih sedam dana, delile su se na lokalne reakcije koje su podrazumevale promene na mestu primene vakcine, pre svega bol, i sistemske reakcije, kao što su povišena temperatura, malaksalost, zamor i glavobolja.<sup>[158]</sup> Učestalost reakcija zavisila je i od tipa vakcine koja je primenjena. U studiji *Ganesan* i saradnika poređene su reakcije nakon BBIBP-CorV i BNT162b2 vakcine, gde su registrovane značajno češće sistemske reakcije nakon prve doze kod ispitanika koji su primili BBIBP-CorV (78,5%), a nakon druge doze kod ispitanika koji su primili BNT162b2 vakcinu (86,6%).<sup>[159]</sup> Druga studija, *Camacho Moll* i saradnika, na više od 4000 ispitanika, ukazala je da je bar jedna reakcija najčešće prijavljena posle ChAdOx1 i Gam-COVID-Vac vakcine, u

poređenju sa BNT162b2, što nije bio slučaj nakon druge doze, gde se incidencija neželjenih reakcija nakon adenovirusnih vakcina smanjila.<sup>[160]</sup> U toj studiji najčešći lokalni simptomi bili su bol na mestu davanja vakcine, a sistemski glavobolja. Nakon prve doze ozbiljnost ispoljavanja neželjene reakcije bila je najveća u ChAdOx1 i Gam-COVID-Vac grupi, dok je nakon druge doze primat preuzela mRNA-1273 vakcina.<sup>[160]</sup> Za BBIBP-CorV vakcinu najčešća neželjena reakcija opisana u literaturi nakon prve i nakon druge doze bila je bol na mestu davanja vakcine.<sup>[161,162]</sup> Osim toga, u studiji *Meo* i saradnika prijavljene su i letargija, mijalgija i povišena temperatura.<sup>[161]</sup> U nacionalnoj studiji iz Jordana, autora *Abdel-Qader* i saradnika, sa preko 650.000 učesnika koji su se opredelili za jednu od četiri vakcine inicijalno dostupne i u Srbiji, ukupno gledano neželjene reakcije ali i alergijske reakcije su u najvećem procentu bile izazvane Gam-COVID-Vac vakcinom, u poređenju sa svim drugim vakcinama (BBIBP-CorV, ChAdOx1 i BNT162b2).<sup>[163]</sup> Malaksalost, povišena telesna temperatura i glavobolja bile su najčešće sistemske reakcije, a bol i urtikarija najčešće lokalne neželjene reakcije kod sve četiri vakcine. Sistemske reakcije su češće bile izazvane prvom dozom ChAdOx1, a u odnosu na sve ostale vakcine, ova vakcina je najčešće dovođila i do limfadenopatije (2,2%).<sup>[163]</sup> Takođe, prva doza ChAdOx1 izazivala je i klinički teže reakcije u odnosu na sve doze ostalih vakcina, sa izuzetkom BNT162b2 koja je nakon druge doze izazivala sličnu težinu simptoma kao ChAdOx1 nakon prve.<sup>[163]</sup>

I u ovde predstavljenom istraživanju najčešće neželjene reakcije nakon prve doze vakcine bile su lokalni bol na mestu aplikacije vakcine (18,51%), povišena temperatura (11,39%) i malaksalost (8,83%), što se podudara i sa učestalošću reakcija nakon druge doze (lokalni bol (19,52%), malaksalost (10,65%) i povišena temperatura (10,35%)) (Slike 4-14, 4-15). Ovi podaci su u skladu sa literaturom pomenutom u prethodnom pasusu. Nakon prve doze, lokalni bol bio je najčešći kod BNT162b2 podgrupe (29,68%), a sve ostale reakcije kod Gam-COVID-Vac podgrupe, dok je nakon dve doze najviše reakcija prijavljeno posle BNT162b2 vakcine (Slika 4-15). Urtikarija je u trajanju od jednog dana, zabeležena u ovom istraživanju nakon BNT162b2 vakcine, a opisana je kao alergijska reakcija u incidenciji od 0,4% u studiji *Abel-Quader* i saradnika, ali i u komentaru *Živanovića* i saradnika, sa zvaničnim informacijama Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije.<sup>[163,164]</sup> Ubedljivo najmanji procenat reakcija prijavljen je i nakon prve i nakon druge doze BBIBP-CorV vakcine, sa tom razlikom da je češće prijavljivani lokalni bol nakon druge doze, čemu u prilog idu i podaci iz Jordanske studije.<sup>[163]</sup> Ovaj rezultat se razlikuje od studije *Meo* i saradnika, gde su reakcije bile nešto učestalije nakon prve doze BBIBP-CorV vakcine, u odnosu na drugu dozu.<sup>[161]</sup> Međutim, BBIBP-CorV podgrupa ovde predstavljenog istraživanja imala je najveći procenat starijih ispitanika u odnosu na ostale vakcinalne podgrupe, a u literaturi postoje podaci da su ispitanici iznad 65 godina imali manje šanse za ispoljavanje teških oblika neželjenih reakcija, kao i da su visoka temperatura, glavobolja, malaksalost i mijalgija daleko češće prijavljivani u mlađim uzrasnim grupama, što može objasniti nižu učestalost reakcija u ovoj podgrupi.<sup>[163,165]</sup> Osim navedenih reakcija, mali broj ispitanika je nakon prve doze (1,67%, 6/358), ali i nakon druge doze prijavio mučninu (1,39%, 5/358), što je takođe opisano u literaturi.<sup>[163]</sup> Limfadenopatija na vratu i u aksilarnoj regiji ipsilateralno opisana je u ovom istraživanju nakon BBIBP-CorV i ChAdOx1 vakcina, u pojedinačnim slučajevima. U literaturi se limfadenopatija najčešće sreće nakon RNK vakcina, ali je prijavljivana i nakon ChAdOx1 vakcine.<sup>[166,167]</sup> Ovakva reakcija nije očekivana nakon inaktivisanih vakcina. U literaturi postoji samo jedan slučaj do sada opisane limfadenopatije u sprezi sa hipereozinofilijom i to dva meseca nakon treće doze BBIBP-CorV vakcine, što je drugačija vrsta reakcije od one koja se razvija odmah nakon vakcinacije.<sup>[168]</sup> Međutim, u dve studije, nakon CoronaVac inaktivisane vakcine, slične BBIBP-CorV, opisana je ipsilateralna limfadenopatija, ali i jedan slučaj u trećoj studiji odložene reakcije do četiri meseca nakon druge doze.<sup>[169-171]</sup> Nalaz u okviru istraživanja predstavljenog ovom disertacijom ali i navedene CoronaVac studije ukazuju na potencijal inaktivisanih vakcina da dovedu do klinički ispoljene limfadenopatije, nekad i par meseci nakon vakcinacije, što treba uzeti u obzir prilikom uzimanja anamneze i radioloških kontrola. Osim toga, u ovom istraživanju je nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine, kod jednog ispitanika došlo do pojave tonzilitisa, koji se može pripisati i aktivnoj infekciji, ukoliko je ispitanik bio u inkubacionom periodu prilikom primanja vakcine. Međutim, prema podacima američkog Sistema za prijavu neželjenih reakcija nakon vakcinacije (eng.

Vaccine Adverse Reporting System, VAERS) postoje retki opisi tonzilitisa kao reakcije na kovid-19 vakcine, pre svega RNK vakcine, učestalosti od 0,07%, stoga se ne može potpuno isključiti potencijalna povezanost tonzilitisa kao reakcije na BBIBP-CorV vakcinu.<sup>[172]</sup>

Humoralni imunski odgovor nakon prve doze vakcine varirao je u zavisnosti od primenjene vakcine i prethodnog kovid-19 serostatusa. U literaturi, seropozitivnost za ChAdOx1 vakcinu iznosila je od 80% do 98,5% što je u nekim studijama zavisilo od toga da li su uključeni i ispitanici sa prethodnom infekcijom, ali je procenat bio svakako visok i za naivne ispitanike, i to u studiji *Devi* i saradnika čak 98,5%.<sup>[173-176]</sup> Za BNT162b2 vakcinu, procenat seropozitivnosti nakon prve doze iznosio je od 92,7% - 100%.<sup>[174,176,177]</sup> Pretragom literature uočava se da je broj studija za Gam-COVID-Vac i BBIBP-CorV sa podacima o seropozitivnosti nakon prve doze vakcine znatno oksudniji nego za ChAdOx1 i BNT162b2. Prijavljen opseg za Gam-COVID-Vac vakcinu bio je nešto širi i to od 58% do 94%, dok je za BBIBP-CorV u jednoj studiji seropozitivnost naivnih ispitanika iznosila 40%, dok u drugoj nisu detektovana antitela nakon prve doze ove vakcine, što se može pripisati pre svega znatno manjem uzorku ispitanika.<sup>[53,178-181]</sup> U ovoj disertaciji, tri nedelje nakon prve doze vakcine, ukupna RBD-IgG seropozitivnost ispitanika po podgrupama iznosila je 66,67% za BBIBP-CorV, 100% za Gam-COVID-Vac i ChAdOx1 i 94,34% za BNT162b2 vakcinu. Procenat za ChAdOx1 vakcinu opadao je tokom prvih 12 nedelja nakon prve doze, usled produženog perioda davanja druge doze, do 76,92%. Ovi rezultati u poređenju sa literaturom odražavaju heterogenost podataka u zavisnosti i od ispitivane populacije, međutim uočava se pravilnost u definitivno nižoj imunogenosti prve doze inaktivisane vakcine u odnosu na ostale platforme. U ovom istraživanju, seronegativni ispitanici nakon prve doze bili su isključivo uvek naivni ispitanici, bez prethodnog kontakta sa SARS-CoV-2.

Poređenjem RBD-IgG antitela kod naivnih ispitanika koji su imali detektabilan serološki odgovor na prvu dozu vakcine, u ovde predstavljenom istraživanju uočava se statistički značajno viša koncentracija kod ispitanika nakon BNT162b2 doze, u odnosu na ChAdOx1 (Tabela 4-10). Kod ispitanika sa prethodno potvrđenom SARS-CoV-2 infekcijom, koncentracije RBD-IgG antitela bile su statistički značajno više u odnosu na naivne ispitanike, a razlika je postojala i između vakcina, gde su statistički više koncentracije detektovane kod ChAdOx1 i BNT162b2 podgrupe, u poređenju sa BBIBP-CorV. Kako naivni ispitanici BBIBP-CorV podgrupe nisu imali pozitivan nalaz RBD-IgG antitela, nije bilo moguće izvršiti poređenje između njihovih koncentracija i koncentracija ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije, ali je svakako uočljivo da su upravo prethodno seropozitivni ispitanici jedini razvili odgovor u ovoj podgrupi. Razlika je bila očigledna i pri poređenju nivoa antitela Gam-COVID-Vac i BBIBP-CorV podgrupe ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, međutim nije bila statistički značajna usled nedovoljne veličine uzorka. Kako je u okviru ovog istraživanja regrutacija ispitanika započeta odmah na početku uvođenja vakcinacije, rezultati ovog istraživanja su vrlo brzo potvrdili i prve opise koji ukazuju na to da je prva doza vakcine izazivala visok imunski odgovor kod prethodno SARS-CoV-2 pozitivnih ispitanika.<sup>[182]</sup> Autori *Manisty* i saradnici naveli su da je pređašnja infekcija mogla biti analogna imunološkom „prajmingu“ (eng. *priming*), tako da bi prva doza u ovom slučaju imala „boost“ ulogu, upravo ulogu namenjenu drugoj dozi.<sup>[182]</sup> Rezultati ovih autora ukazali su na to da je prva doza BNT162b2 vakcine dovela do povećanja koncentracija S-IgG antitela do 140 puta u odnosu na predvakcinalne nivoe.<sup>[182]</sup> Ovi rezultati su potvrđeni i u narednim studijama, gde su takođe više koncentracije specifičnih IgG antitela detektovane kod prethodno pozitivnih ispitanika nakon prve doze BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 vakcine.<sup>[53,173,175,176,178,183,184]</sup> Porast nivoa IgG antitela nakon prve doze BNT162b2 vakcine kod ove populacije ispitanika, registrovan je u studiji *Hirotsu* i saradnika čak nakon prvih 96 sati.<sup>[184]</sup> Priroda ovih podataka uticala je na regulative u različitim državama, kao što su Francuska, Holandija i Nemačka, pri implementiranju pravila da nakon kovid-19 i prve doze vakcine, nije potrebno davati drugu dozu, pre svega u svrhu čuvanja doza i rezervisanja vakcina za prethodno neimunizovane (imunološki naivne) ispitanike. Ove regulative bile su podložne promenama tokom trajanja pandemije, usled pojave novih varijanti virusa. Poređenjem nivoa antitela nakon različitih vakcina kod ispitanika sa prethodnom infekcijom, u literaturi se uočavaju značajno

viši nivo nakon prve doze mRNA-1273 i BNT162b2 vakcine, u odnosu na ChAdOx1.<sup>[176,183]</sup> Poređenja za druge vakcine nakon prve doze, kao što su BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac, nisu u trenutku pisanja bila dostupna za analizu, čime ova disertacija nudi nove informacije, iako na malom uzorku. Podaci ovog istraživanja ukazuju da kod naivnih ispitanika nakon jedne doze BBIBP-CorV vakcine nije registrovana serokonverzija, ali da čak i kod ispitanika koji su imali prethodnu infekciju i jednu dozu inaktivisane vakcine, odgovor nije u rangu RNK i adenovirusnih vakcina, što treba imati na umu prilikom donošenja odluka o potencijalnoj primeni ovakvih platformi u cilju prevencije infekcija novim pretećim agensima u budućnosti.

U okviru istraživanja obuhvaćenog ovom disertacijom, nakon primarne serije vakcinacije ispitanici su praćeni šest nedelja, tri meseca, šest meseci i devet meseci od prve doze vakcine (tačka nakon 12 meseci nije ispunjena, usled uvođenja treće doze vakcine). U ovom i narednom pasusu ukratko će biti na jednom mestu sažeti rezultati primene primarne serije vakcinacije. Nakon primarne serije, seropozitivnost naivnih ispitanika bila je najveća u okviru BNT162b2 podgrupe i iznosila je 100%, do treće tačke praćenja, šest meseci nakon prve doze, kada je pala na 96,29%, što je i dalje bilo iznad procenata drugih vakcina. U Gam-COVID-Vac podgrupi seropozitivnost u prvoj i drugoj vremenskoj tački iznosila je 100%, zatim 75% u trećoj vremenskoj tački, a za ChAdOx1 vakcinu sa 100% u drugoj vremenskoj tački opala je na 85,71% u trećoj tački. Za BBIBP-CorV vakcinu seropozitivnost bila je najniža i iznosila je 79% u prvoj, 65,71% u drugoj i 29,63% u trećoj tački. Za ispitanike sa prethodnom infekcijom seropozitivnost je bila znatno viša i iznosila je 100% u svim tačkama praćenja nakon svih vakcina, osim kod BBIBP-CorV nakon koje je ova vrednost pala na 92,31% u trećoj tački praćenja. Za BBIBP-CorV i BNT162b2 podgrupe naivnih ispitanika uočen je statistički značajan pad koncentracije antitela kroz vreme (Slike 4-16, 4-19). Kod naivnih ispitanika značajna razlika u nivoima RBD-IgG antitela nađena je u vezanim parovima od prve do treće tačke praćenja za obe vakcine, a isto i kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom kod BBIBP-CorV podgrupe, dok kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom BNT162b2 podgrupe pad između prve dve tačke praćenja nije bio značajan, ukazujući na nešto blažu krivu pada u odnosu na naivne ispitanike i potencijalni plato do trećeg meseca kod hibridnog imuniteta (Slike 4-17, 4-20). Broj ispitanika za Gam-COVID-Vac i ChAdOx1 podgrupu bio je znatno manji nego za druge dve podgrupe, utičući na veliki opseg varijacija prilikom analize rezultata. Poređenjem vezanih uzoraka nije dobijena statistički značajna razlika ni kod naivnih, ni kod prethodno bolesnih ispitanika, za obe podgrupe, iako je pad uočljiv (Tabele 4-13 do 4-16). Za obe vakcine su i nivoi antitela bili za svaku tačku očigledno viši kod ispitanika sa prethodnom infekcijom, ali takođe usled velikih interkvartilnih opsega, statistička značajnost nije postignuta.

U okviru LMM analize uočeno je da je prethodni kovid-19 statistički značajno uticao na RBD-IgG nivoe nezavisno od tipa vakcine ( $p < 0,001$ ) (Slika 4-21). Prethodno pozitivni ispitanici imali su statistički značajno više koncentracije RBD-IgG antitela u odnosu na naivne ispitanike, oslikavajući isti trend kao i nakon prve doze vakcine. Godine starosti i pol ispitanika nisu uticali na nivoe RBD-IgG, dok su osim prethodne infekcije, vreme proteklo od primanja vakcine i tip vakcine imali statistički značajan uticaj. U prvoj tački najviši nivoi antitela detektovani su nakon BNT162b2 vakcine, u poređenju sa BBIBP-CorV ( $p < 0,0001$ ) i Gam-COVID-Vac vakcinom ( $p = 0,016$ ); dok je u drugoj vremenskoj tački značajna razlika postojala između BNT162b2 i BBIBP-CorV vakcine ( $p < 0,0001$ ), kao i BNT162b2 i ChAdOx1 vakcine ( $p = 0,024$ ). U trećoj vremenskoj tački značajna razlika postojala je samo između BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac vakcine ( $p = 0,007$ ). Razlika između adenovirusnih vakcina nije bila statistički značajna ni u jednoj vremenskoj tački ( $p > 0,81$ ) (Slika 4-21). Poređenjem nivoa antitela naivnih ispitanika sa kovid-19 grupom ispitanika, odnosno nevakcinisanim rekonvalescentima, dobijamo da su u prvoj i drugoj tački praćenja značajno viši nivoi nađeni jedino kod BNT162b2 podgrupe, a niži nivoi u drugoj i trećoj tački kod BBIBP-CorV podgrupe (Slika 4-22). U četvrtoj tački praćenja, odnosno devet meseci nakon infekcije/vakcinacije, razlika u nivoima antitela nije postojala između vakcinisanih naivnih ispitanika i rekonvalescenta, što ukazuje na drastičniji pad nivoa antitela kod vakcinisanih ispitanika. Kada poredimo ispitanike sa SARS-CoV-2 infekcijom pre vakcinacije i rekonvalescentima kovid-19 grupe, dobijamo da je u

okviru BNT162b2 podgrupe koncentracija RBD-IgG antitela bila statistički značajno viša u sve četiri tačke praćenja. Isto se pokazalo i za prve tri tačke praćenja za Gam-COVID-Vac vakcinu i samo za treću tačku praćenja za ChAdOx1 vakcinu. BBIBP-CorV podgrupa nije bila statistički značajno različita u odnosu na kovid-19 grupu, ukazujući na to da ova inaktivisana vakcina jedino uz hibridni imunitet može dovesti do pojave imunskog odgovora sličnog onom nakon infekcije.

Prva studija koja je poredila imunogenost nakon BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 vakcina i imunski odgovor rekonvalescenata u prva tri meseca nakon vakcinacije objavljena je 2021. godine bazirajući se upravo na rezultatima uključenim u ovu disertaciju.<sup>[157]</sup> Vrlo brzo nakon prikaza ovih rezultata, *Petrović* i saradnici objavili su podatke za Srbiju i iste ove vakcine ali u znatno dužem periodu od prvih šest meseci nakon vakcinacije.<sup>[85,185]</sup> Autori su opisali seropozitivnost nakon BNT162b2 vakcine od 99,28% 28 dana nakon druge doze vakcine i 88,41% nakon šest meseci; za Gam-COVID-Vac ove vrednosti iznosile su 100% i 86,08%, a za BBIBP-CorV vakcinu 87,65% i 37,04%.<sup>[85]</sup> Takođe, opažen je značajan pad nivoa antitela za sve pomenute vakcine. U istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji vrednosti su bile, analogno ovim vremenskim tačkama, nešto niže za BBIBP-CorV podgrupu, iznosivši 79% i 29,63%, što se može pripisati i različitim testovima, uzevši u obzir da je u studiji *Petrovića* i saradnika upotrebljen test koji detektuje antitela specifična za S1/S2 jedinicu, a ne samo RBD. *Petrović* i saradnici detektovali su najviše nivoe antitela šest meseci nakon druge doze vakcine posle Gam-COVID-Vac vakcine, a najniži nakon BBIBP-CorV.<sup>[85]</sup> Statistički značajno više vrednosti nivoa S1/S2 IgG antitela zapažene su nakon Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 vakcine u odnosu na BBIBP-CorV i BNT162b2 u odnosu na ChAdOx1 vakcinu.<sup>[85]</sup> Autori su nakon prve tačke praćenja – 28 dana posle druge doze vakcine, opazili da su vakcinisani ispitanici nakon Gam-COVID-Vac i BNT162b2 vakcine imali više nivoe antitela nego nevakcinisani ispitanici koji su preležali kovid-19, dok je u ovde predstavljenom istraživanju za naivne ispitanike ta razlika pronađena samo za BNT162b2 podgrupu.<sup>[185]</sup> Iako je u ovom istraživanju najviše nivoe RBD-IgG antitela proizvela upravo vakcinacija BNT162b2 vakcinom, odnos ostalih opisanih vakcina u studiji *Petrovića* i saradnika i BBIBP-CorV vakcine, podudara se sa nalazima istraživanja predstavljenog ovom disertacijom.

Uporedne studije vakcina protiv kovid-19 iz ostalih krajeva sveta takođe su ukazale na značajne razlike u imunogenosti između različitih platformi. Vakcine bazirane na iRNK platformi kao što je BNT162b2, indukovale su najviše nivoe S-specifičnih IgG antitela, NAb i T-ćelijskog odgovora, nadmašujući i adenovirusne vektorske vakcine i inaktivisane vakcine, ali sa detektovanim postepenim opadanjem tokom perioda praćenja, u skladu i sa ovde predstavljenim rezultatima.<sup>[86,186-193]</sup> Adenovirusne vakcine pokazale su nešto niži, ali stabilniji humoralni imunski odgovor tokom vremena, pri čemu je za ChAdOx1 vakcinu opisan nešto duži period održavanja nivoa antitela nego za Gam-COVID-Vac vakcinu, dok je u drugoj studiji opisana viša koncentracija antitela kod Gam-COVID-Vac vakcine.<sup>[86,187,188]</sup> Nasuprot tome, BBIBP-CorV vakcina generisala je najniže koncentracije antitela, pokazujući ograničenu imunogenost, posebno kod naivnih ispitanika.<sup>[186,189-191,194]</sup> U studiji *Fodor* i saradnika, više od 50% ispitanika nakon BBIBP-CorV, ali i ChAdO1 vakcine, nije uspeo da postigne detektabilan T-ćelijski odgovor, što dodatno ograničava kapacitet ovih vakcina za dugotrajnu zaštitu.<sup>[189]</sup> Gotovo 80% ispitanika koji su primili inaktivisanu vakcinu imali su pozitivan nalaz N-specifičnih antitela, koji je bio u korelaciji sa anti-S antitelima; dok kod ispitanika koji nisu proizveli detektabilan odgovor na N-specifična antitela, nije bilo ni detektovanog ćelijskog odgovora.<sup>[86]</sup> Poređenjem nivoa antitela nakon dve doze vakcine sa nevakcinisanom grupom, prethodno inficiranom, u radu *Sereejav* i autora sve ispitivane vakcine (Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2) proizvele su više nivoe antitela od nevakcinisanih ispitanika, osim BBIBP-CorV, podudarajući se sa rezultatima predstavljenim ovom disertacijom.<sup>[191]</sup> Nivoi N-IgG antitela bili su nešto viši kod BBIBP-CorV ispitanika, u odnosu na nevakcinisanu grupu, međutim ta razlika nije bila statistički značajna.<sup>[191]</sup> Ove imunološke razlike između vakcinalnih platformi imaju jasne implikacije. Serološki podaci iz Mongolije, gde je skoro 90% odrasle populacije vakcinisano BBIBP-CorV vakcinom, otkrili su da je najveći broj infekcija u ovom periodu bio izazvan Alfa varijantom, a iz toga se može zaključiti da su infekcije nakon vakcinacije bile povezane upravo sa nižim nivoima

antitela u ovoj populaciji nakon inaktivisane vakcine, a ne prisustvom virulentnije varijante SARS-CoV-2.<sup>[186]</sup> Prilikom analiziranja nalaza ispitanika u ovom istraživanju čije su vrednosti RBD-IgG antitela pale ispod praga detekcije tokom perioda praćenja nakon vakcinacije, poređeni su nivoi antitela u vezanim uzorcima, pre i posle negativizacije RBD-IgG antitela. Kod BBIBP-CorV podgrupe, uočen je statistički značajan pad u nivoima RBD-IgG antitela ( $p < 0,0001$ ), kao i značajan pad u nivoima N-IgG antitela ( $p = 0,008$ ) (Tabela 4-23). Kod ispitanika čiji se nalaz RBD-specifičnih antitela negativizovao nakon dve doze Gam-COVID-Vac, ChAdOx1 i BNT162b2 vakcina, takođe je uočen očekivan pad nivoa RBD-IgG antitela (Tabela 4-24). NAb nisu bila prisutna ni kod jednog ispitanika sa negativnim RBD-IgG nalazom, nezavisno od platforme vakcine. Interesantno je da se jedino kod ispitanika sa najvišim nivoima RBD-IgG antitela pre negativizacije, procenat inhibicije održavao blizu praga pozitivnosti. Osim toga, uočeno je da je seronegativizacija nakon BBIBP-CorV vakcine statistički značajno ranije detektovana ( $140,97 \pm 47,37$ ) u odnosu na sve ostale ispitivane vakcine ( $212,29 \pm 47,23$ ) ( $p = 0,0005$ ), potvrđujući opaženu slabiju imunogenost ove vakcine.

U okviru ovde predstavljenog istraživanja pozitivan nalaz RBD-IgM antitela nakon prve doze vakcine detektovan je kod naivnih ispitanika isključivo nakon BNT162b2 vakcine. Nakon primarne serije, najviši procenat naivnih ispitanika sa pozitivnim RBD-IgM antitelima takođe je bio u BNT162b2 podgrupi i iznosio je 46,76%, dok je bio značajno niži nakon BBIBP-CorV vakcine (20,21%) (Tabela 4-19). U poređenju sa tim, u kovid-19 grupi, nakon infekcije, procenat pozitivnosti RBD-IgM bio je znatno viši nego kod BBIBP-CorV podgrupe (54,84%), dok razlika nije bila značajna u poređenju sa BNT162b2 vakcinom, ukazujući na aktivaciju humoralnog imunskog odgovora posle ove vakcine sličnom onom nakon infekcije. Tri meseca nakon prve doze u ChAdOx1 podgrupi procenat pozitivnih nalaza iznosio je 25%, a u okviru Gam-COVID-Vac podgrupe nije bilo pozitivnih nalaza RBD-IgM ni kod prethodno naivnih, ni kod prethodno inficiranih. Učestalost pozitivnih nalaza IgM antitela kod vakcinisanih ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom bila je nešto niža i iznosila je 21,05% u podgrupi BNT162b2, 13,64% u podgrupi BBIBP-CorV, dok je u ChAdOx1 podgrupi bilo pozitivno 33,33% nalaza (Tabela 4-19). Kada se uporede indeksi RBD-IgM antitela, statistički značajna razlika uočena je jedino između kovid-19 grupe i BBIBP-CorV podgrupe, kod koje je nađena niža vrednost indeksa antitela. Takođe, indeks RBD-IgM antitela bio je statistički značajno niži u podgrupi BBIBP-CorV ispitanika sa prethodnom infekcijom u odnosu na kovid-19 grupu (Tabela 4-20). I kod naivnih i kod prethodno obolelih ispitanika BNT162b2 podgrupe, indeksi RBD-IgM antitela nisu bili statistički značajno različiti od kovid-19 grupe, ukazujući ponovo na visoku imunogenost ove vakcine. Medijane indeksa RBD-IgM antitela nisu bile statistički značajno različite nakon dve doze vakcine između naivnih i ispitanika sa prethodnom infekcijom pre vakcinacije, ni za jednu ispitivanu vakcinu, za razliku od prethodno opisanog skoka RBD-IgG antitela. Korelacija visine RBD-IgM nalaza sa nivoima RBD-IgG antitela bila je pozitivna i statistički značajna za BBIBP-CorV i BNT162b2 podgrupu, ali samo kod naivnih ispitanika.

U studiji *Ruggiero* i saradnika kod naivnih ispitanika uočena su tri različita tipa odgovora na BNT162b2 vakcinu i to IgG+/IgM-, zatim istovremeni IgG+/IgM+ odgovor i IgG-/IgM+ odgovor.<sup>[195]</sup> Najčešće je BNT162b2 vakcina dovodila do istovremene produkcije i S-IgG i S-IgM antitela, a ovaj odgovor je bio povezan sa višim nivoima neutrališućih antitela, sugerišući da IgM antitela mogu značajno doprineti zaštiti. Od tri prepoznata tipa odgovora, autori smatraju da je jedino koordinisani IgM+/IgG+ odgovor pravi primarni imunski odgovor na vakcinaciju, ali je u njihovoj studiji on bio zastupljen u samo 37,4% vakcinisanih.<sup>[195]</sup> Kao i u istraživanju predstavljenom u okviru ove disertacije, ispitanici istraživanja *Ruggiero* i saradnika koji su imali infekciju pre vakcinacije, nakon druge doze vakcine imali su niži procenat pozitivnosti specifičnih IgM antitela.<sup>[195]</sup> Ovakav nalaz može se objasniti prevashodnim odgovorom memorijskih B-ćelija koji su nastali nakon potencijalne prethodne infekcije i već promenili klasu, što je praćeno i kasnijim pojavljivanjem IgM antitela, nakon regrutovanja novih B-ćelija. Šest nedelja nakon prve doze BNT162b2 vakcine, svi ispitanici u studiji *Jalkanen* i saradnika imali su visoke nivoe S1-IgG antitela, sa blagim porastom u nivoima IgM antitela, dok je u drugoj studiji *Romero-Pineido* i saradnika samo 11% vakcinisanih ispitanika imalo pozitivan nalaz IgM antitela osam nedelja nakon druge doze ove vakcine.<sup>[176,196]</sup> *Romero-Pineido* i

saradnici spominju serokonverziju kod starijih ispitanika, spekulirajući da imunska memorija na određene humane koronavirusne, sa kojima je starija populacija imala veću šansu da se sretne tokom života, može indukovati produkciju visokoafinitetnih IgM antitela.<sup>[176]</sup> Učestalost pozitivnog nalaza S-IgM za ChAdOx1 vakcinu u literaturi iznosila je 30% dve nedelje nakon druge doze, a nivoi antitela bili su kontinuirano niski, što se pokazalo istovetno i za ovde predstavljeno istraživanje, ali na znatno manjoj kohorti ispitanika.<sup>[197]</sup> Prilikom poređenja inaktivisane i adenovirusnih vakcina, ChAdOx1 proizvela je statistički značajan porast IgM nivoa nakon vakcinacije u odnosu na Gam-COVID-Vac i BBIBP-CorV vakcinu.<sup>[198]</sup> Iako u rezultatima predstavljenim ovom disertacijom Gam-COVID-Vac vakcina nije dovela do pojave RBD-IgM antitela, ona su detektovana u drugim istraživanjima ali u niskom nalazu i to kod prethodno naivnih ispitanika, dok je za inaktivisane vakcine u literaturi opisan širok raspon procenta ispitanika sa pozitivnim IgM odgovorom (od 3,1% do čak 43,92%).<sup>[198–201]</sup> U studiji Müller i saradnika, iako je BNT162b2 vakcina značajno ređe dovodila do pojave IgM antitela nakon vakcinacije u odnosu na ChAdOx1 vakcinu, što je različito u odnosu na ovde predstavljene rezultate, postojala je značajna korelacija između nivoa neutrališućih antitela i S-IgM.<sup>[202]</sup> Ovaj rezultat potvrđuje i ovde predstavljeno istraživanje u kom je uočena korelacija RBD-IgG i RBD-IgM antitela kod naivnih ispitanika. Međutim, opažena diskrepanca u nalazima IgM antitela u literaturi može se pripisati i upotrebljenim testovima, koji se razlikuju po pitanju osetljivosti, ali i izostanku poređenja sa rekonvalescentima.

U studiji Piubelli i saradnika ispitanici koji su razvili S-IgM odgovor nakon vakcinacije, održavali su više nivoe S-IgG antitela tokom vremena i postojala je manja verovatnoća da će razviti kovid-19 pri novom kontaktu sa SARS-CoV-2.<sup>[203]</sup> Čini se da zaštita nije povezana sa postojanjem pozitivnog S-IgM nalaza, već sa jačim i dugotrajnijim odgovorom IgG antitela upravo kod ispitanika koji su odmah nakon vakcinacije razvili S-IgM antitela.<sup>[203]</sup> Autori su u diskusiji naveli postojanje takozvanog originalnog antigenskog ili imunološkog „greha“ (eng. *original antigenic sin*, OAS), koji su definisali kao imunski odgovor koji je uslovljen prethodno stečenim imunitetom specifičnim za druge humane koronavirusne i koji može rezultirati unakrsno reaktivnim odgovorom, odnosno odgovorom na međusobno slične antigene drugih koronavirusa i SARS-CoV-2, narušavajući imunološku zaštitu, čime se može objasniti postojanje ispitanika sa niskom ili nepostojećom produkcijom IgM antitela nakon vakcinacije i u ovde predstavljenom istraživanju. Takođe, opisali su i da ukoliko druga doza vakcine ne dovede do pojave pozitivnog nalaza IgM antitela, ni infekcije nakon vakcinacije neće dovesti do pojave ovih antitela, ukazujući da je inicijalni odgovor ili imunološki otisak (eng. *immunological imprint*) nakon vakcinacije okarakterisao buduće odgovore na naredni stimulus, bilo to naredna doza vakcine ili nova infekcija.<sup>[203]</sup> Chaudhury i saradnici objavili su da je IgM odgovor specifičniji za SARS-CoV-2, dok su IgG antitela sklonija unakrsnoj reaktivnosti, potkrepljujući OAS ideju.<sup>[204]</sup> Ovakav nalaz verovatnije odražava aktivaciju memorijskih B-ćelija nastalih nakon ranijih infekcija srodnim koronavirusima, dok se veća specifičnost IgM odgovora može objasniti i činjenicom da IgM antitela potiču od naivnih B-limfocita. Kod dela ispitanika vakcinisanih BBIBP-CorV vakcinom u ovom istraživanju, koji su praćeni i pre vakcinacije usled prethodno dijagnostikovanog kovid-19, poređeni su nalazi neposredno nakon infekcije sa nalazima nakon vakcinacije, kada nije uočena statistički značajna razlika u nivoima RBD-IgG, RBD-IgM i N-IgG antitela (Tabela 4-21). Štaviše, uočava se pravilnost u nalazima N-IgG antitela, gde se gotovo identični nivoi generišu nakon kovid-19 i nakon primljene BBIBP-CorV vakcine, kod istih ispitanika, što može ukazivati na postojanje OAS fenomena kod ove vakcine, koji je odražen i na antitela specifična za druge antigene, kao što je N protein. Thomas Francis Jr. prvi je opisao i upotrebio OAS termin u naučnoj literaturi pedesetih godina XX veka, a 1960. godine dodatno definisao i objasnio ovaj koncept.<sup>[205,206]</sup> Francis je uočio, izučavajući virus influence, da je imunski odgovor na ove viruse izraženo uslovljen prvim sojem virusa sa kojim se susretnemo u životu, dovodeći do produkcije antitela specifičnih za taj soj pri svakom sledećem kontaktu sa novim, antigenim različitim sojevima.<sup>[206,207]</sup> Naknadna izlaganja novim sojevima proširuju dijapazon novonastalih antitela, ali je primarni odgovor na prvi antigen taj koji postaje dominantniji vremenom.<sup>[207]</sup> Iako Francis nije to naglasio u svojim naučnim radovima, analogija sa hrišćanskom

teologijom i konceptom praroditeljskog greha (lat. *peccatum originale*) je očigledna i dodatno naglašava dugotrajni uticaj susreta sa prvim antigenom na oblikovanje svakog narednog imunskog odgovora.

U istraživanju predstavljenom ovom disertacijom, nakon dve doze BBIBP-CorV vakcine 21% testiranih ispitanika nije razvilo ni RBD-specifična antitela, ni N-specifična antitela, niti su kod njih detektovana NAb (Tabela 4-22). Nije postojala značajna razlika u raspodeli polova prilikom poređenja sa naivnim ispitanicima koji su imali detektabilan RBD-specifičan odgovor, međutim ispitanici koji nisu razvili odgovor bili su značajno stariji u prvoj tački praćenja.<sup>[157]</sup> U skladu sa tim, *Ferenci* i *Sarkadi* objavili su da 25% ispitanika u šezdesetoj godini života i gotovo 50% ispitanika iznad 80 godina nisu proizveli detektabilna RBD-specifična antitela, nakon dve doze iste vakcine.<sup>[208]</sup> Dve godine nakon nalaza ovde predstavljenog istraživanja i prve publikacije koja je protekla iz ovih rezultata, u studiji *Zeng* i saradnika, detaljnije je analizirana grupa ispitanika koja nije razvila adekvatan odgovor na dve doze BBIBP-CorV i uočeno je da osim što su to češće bili ispitanici starijeg uzrasta (11,7%, u poređenju sa mlađom grupom ispitanika gde je procenat iznosio 7,5%), kao i u ovde predstavljenom istraživanju, početni nivoi CD4<sup>+</sup> ćelija i B-ćelija bili su kod većine ispitanika značajno niski.<sup>[209]</sup> Međutim, na malom uzorku starijih seronegativnih ispitanika (n=10), autori *Hafizoğlu* i saradnici su nakon dve doze inaktivisane vakcine drugog proizvođača, detektovali prisustvo memorijskih CD4<sup>+</sup> ćelija kod osam ispitanika, a IFN- $\gamma$  odgovor kod svih deset, ukazujući ipak na pokretanje odgovora.<sup>[210]</sup> Zanimljivo je i to da su *Wang* i saradnici objavili da se RBD-specifični odgovor pojavljivao tek nakon druge doze vakcine, dok su N- i ns8-specifična IgG antitela detektovana nakon prve doze BBIBP-CorV, što može ukazivati na nešto unikatniji profil aktiviranja imunskog odgovora kod inaktivisanih vakcina, uključujući i antitela na nestrukturane proteine, uzveši u obzir da je kao antigen upotrebljen čitav virion.<sup>[211]</sup> Osim toga, određeni ispitanici imali su povišene i nivoe ns1-, ns5- i ns7-specifičnih IgM antitela.<sup>[211]</sup> Ovakve individualne razlike u odgovoru na inaktivisanu vakcinu su značajne i moraju se detaljnije istražiti, radi buduće primene ovih vakcina, ali i radi ispitivanja mogućnosti da su RBD- i N-seronegativni ispitanici razvili humoralni imunski odgovor na neke druge proteine virusa. Međutim, iako su *Wang* i saradnici detektovali prisustvo odgovora na NSP proteine nakon prve doze vakcine, treba imati u vidu da oni nisu deo zrelog viriona i stoga je moguće da ovakvi nalazi ukazuju pre na unakrsnu reaktivnost zbog ranijih infekcija sa drugim humanim koronavirusima ili metodološka ograničenja upotrebljenih testova, te je neophodno interpretirati ovakve nalaze sa rezervom.

Nakon prve doze vakcine, novonastala SARS-CoV-2 infekcija dijagnostikovana je ukupno u devet slučajeva i to kod 1,51% (2/132) ispitanika BNT162b2 podgrupe, 3,53% (6/170) ispitanika BBIBP-CorV podgrupe i 3,23% (1/31) ispitanika ChAdOx1 podgrupe (Tabela 4-25). Simptomi su se pojavili kod tri ispitanika u prvih nedelju dana nakon prve doze vakcine i moguće je da se u ovim slučajevima period inkubacije protezao na prevakcinalni period. Niko od ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom nakon prve doze nije bio hospitalizovan, međutim pneumonija jeste bila dijagnostikovana kod jednog ispitanika nakon BBIBP-CorV vakcine. Koncentracija RBD-IgG antitela na prvoj kontroli nakon potvrđene infekcije bila je najviša u BBIBP-CorV podgrupi, a nalaz N-IgG bio je pozitivan isključivo nakon BBIBP-CorV vakcine. Takođe, u tri slučaja infekcije nakon prve doze nalaz RBD-IgM antitela bio je negativan. Ovi nalazi takođe ukazuju na potencijalnu ulogu OAS fenomena pri formiranju odgovora i kod nepotpunog hibridnog imuniteta – nepotpunog usled nekompletirane vakcinacije, takođe usled prevashodne aktivacije memorijskih B-ćelija. Ovde predstavljeni rezultati većinski se odnose na period dok je Alfa varijanta bila najaktuelnija u Srbiji. U literaturi podaci ukazuju na efektivnost prve doze vakcine od 13,8% za inaktivisane vakcine, 78,6% za Gam-COVID-Vac, 78% za ChAdOx1, 54,4%-84,8% za BNT162b2, što su sve niže vrednosti od rezultata predstavljenih ovim istraživanjem, pre svega usled malog uzorka u odnosu na multicentrične studije i velike nacionalne programe koji su pratili incidenciju infekcija nakon vakcinacije.<sup>[212-215]</sup> U sistematskom pregledu literature *Volkman* i saradnika, kod ispitanika koji su imali infekciju pre vakcinacije jedna doza RNK vakcine dovela je do porasta zaštite od nove infekcije za 8-71% tokom perioda Omikron, BA.1, BA.4/5 ili XBB varijante, dok je efektivnost u odnosu na ispoljavanje

simptomatske infekcije tokom perioda *wild-type*, Alfa i Delta soja iznosila 85-98%, potvrđujući značaj jedne doze vakcine kod osoba koje su prethodno imale kovid-19.<sup>[216]</sup>

Infekcije nakon kompletne vakcinacije - postvakcinalne infekcije (engl. *breakthrough infections*, BTI) su poznat pojam u virusološkoj literaturi. BTI su zapažene i dokumentovane nakon vakcinacije protiv malih boginja, varičela, hepatitisa i krpeljskog encefalitisa.<sup>[217-220]</sup> U slučaju SARS-CoV-2, BTI se definiše kao infekcija nastala nakon potpune primarne vakcinacije ili dodatne doze, odnosno revakcinacije. Porast učestalosti infekcija u prvih šest meseci od uvođenja vakcinacije, ukazivao je na potencijalno slabljenje imunskog odgovora ali i bržu evoluciju SARS-CoV-2, koji je uvođenjem vakcinacije trpeo pritisak selekcije. Međutim, potrebno je naglasiti da pojava BTI nakon samo prve doze vakcine ili pak u prvih 14 dana nakon druge doze vakcine, nakon čega se očekuje uspostavljanje kompetentnog humoralnog odgovora, nije neobična, s obzirom na to da je adaptivnom odgovoru potrebno vreme da odreaguje na novu dozu.<sup>[221]</sup>

Nakon primarne serije, u istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji, efektivnost zaštite od simptomatskih slučajeva, tokom perioda do Delta talasa iznosila je 94,12% za BBIBP-CorV, 95,66% za Gam-COVID-Vac i 96,97% za BNT162b2 vakcinu. Kod ispitanika sa asimptomatskim porastom RBD-IgG, N-IgG pozitivnim nalazom potvrđeno je prisustvo asimptomatske infekcije, odnosno kontakt sa SARS-CoV-2 nakon vakcinacije u još tri slučaja u BBIBP-CorV, dva u Gam-COVID-Vac, jednom u ChAdOx1 i sedam u BNT162b2 podgrupi. Ukoliko ove potencijalne infekcije spojimo sa brojem potvrđenih, simptomatskih infekcija, efektivnost zaštite od simptomatske i asimptomatske infekcije iznosila bi 92,31% za BBIBP-CorV, 86,96% za Gam-COVID-Vac, 96,77% za ChAdOx1 i 91,67% za BNT162b2 podgrupu. U jednom slučaju u BNT162b2 podgrupi zabeležena je pneumonija, uz brzu rezoluciju simptoma, dok je u BBIBP-CorV podgrupi kod jednog ispitanika dijagnostikovao miokarditis; međutim, nijedan ispitanik nije bio hospitalizovan, niti je došlo do smrtnog ishoda, ispunjavajući time primarni cilj vakcinacije protiv kovid-19 (Tabela 4-26). Vakcine protiv SARS-CoV-2 pokazale su u trećoj fazi kliničkih ispitivanja nivo efikasnosti u zaštiti od simptomatske bolesti od 50,38-95%, što je prevazilazilo granicu od 50% koju je postavila SZO.<sup>[58,83]</sup> Međutim, rezultati seroepidemioloških istraživanja, van kontrolisanih uslova kliničkih studija, ukazali su na već pomenute razlike u imunogenosti, ali i efektivnosti među različitim vakcinalnim platformama, pogotovo u ispitivanjima sprovedenim na velikom broju ispitanika. Studija *Vokó* i saradnika na više od osam miliona ispitanika, prikazala je efektivnost zaštite od hospitalizacije nakon kovid-19 infekcije u periodu od 14-120 dana od 76,6% za BNT162b2, 83,8% za mRNA-1273, 78,3% za Gam-COVID-Vac, 78,3% za ChAdOx1 i nešto nižu vrednost za BBIBP-CorV od 45,7%, dok je efektivnost zaštite od smrtnog ishoda bila još viša, sa tim da je efektivnost BBIBP-CorV vakcine i ovde bila među najnižima, svega 58,6%.<sup>[84]</sup> Moguće objašnjenje razlike nalaza za BBIBP-CorV između ovde predstavljenog istraživanja i pomenutih podataka iz literature jeste pre svega znatno manji uzorak ispitivane populacije, ali i činjenica da je veliki deo praćenja sproveden pre zvanično potvrđenih slučajeva infekcije Delta varijantom u Srbiji. *Chemaitelly* i saradnici objavili su podatke da je efektivnost zaštite od infekcije dostigla svoj maksimum od 77,5% u toku prvog meseca nakon druge doze BNT162b2 vakcine, a da je postepeno opadala tokom perioda praćenja, ubrzano padajući pet do sedam meseci nakon druge doze.<sup>[222]</sup> Efektivnost zaštite od teške kliničke slike i smrtnog ishoda dostizala je i 96% u prva dva meseca i održavala se na tom nivou do šest meseci.<sup>[222]</sup> U narativnom preglednom radu *Fiolet* i saradnika opaženo je da su inaktivisana vakcina (CoronaVac), ChAdOx1, kao predstavnik adenovirusnih vakcina i RNK vakcine, bile uspešne u prevenciji simptomatskih BTI i to Alfa, Beta, Gama soja, dok je redukovana efektivnost detektovana protiv Delta soja, što može objasniti nalaze visoke efektivnosti u ovom disertacijom predstavljenom istraživanju za sve četiri vakcine, imajući u vidu period studije i aktuelne cirkulišuće sojeve.<sup>[223]</sup>

Znatan broj faktora može uticati na pojavu BTI, kao što su imunski odgovor na vakcinu, zdravstveno stanje samog domaćina i pojava novih varijanti virusa. Starije životno doba, iako nije dovedeno u ovde predstavljenom istraživanju u vezu sa BTI posle druge doze vakcine, može biti povezano sa većim rizikom od pojave BTI, a ovaj faktor je prepoznat i početkom pandemije, kada je

primećen već pomenut uticaj uzrasta na težinu kliničke slike i lošiji klinički ishod.<sup>[224]</sup> Studija iz Srbije, *Petrovića* i saradnika, na populaciji od 134.535 ispitanika starijih od 60 godina, registrovala je efektivnost od 86,9% za BBIBP-CorV, 95% za Gam-COVID-Vac i 99% za BNT162b2 nakon dve doze, a 88,6% za ChAdOx1 nakon prve doze vakcine.<sup>[225]</sup> *Bajči* i saradnici objavili su podatke za Vojvodinu, gde se navodi da je 17,4% novih BTI registrovano u periodu od maja do juna 2021. godine, u populaciji starijoj od 65 godina, a da je primećen porast asimptomatskih i blagih formi kovid-19, uz pad pojave teške kliničke slike.<sup>[226]</sup> U nešto kasnije objavljenom studiji *Kokića* i saradnika, na opštoj populaciji Beograda, efektivnost je bila niža i iznosila je 62% za BBIBP-CorV, 54% za Gam-COVID-Vac, 60% za ChAdOx1 i 79% za BNT162b2, međutim interesantan je bio nalaz da su ove vrednosti rasle za BBIBP-CorV i BNT162b2 vakcinu sa godinama, ukazujući na ipak dobru zaštitu od BTI kod starijih ispitanika, ali i verovatno savesnije sprovedene mere prevencije.<sup>[227]</sup> Stanja imunosupresije takođe mogu uticati na kvalitet odgovora nakon vakcinacije i samim tim dovesti do češće pojave BTI. Retrospektivnom kohortnom studijom *Sun* i saradnika, sprovedenom na 664.772 ispitanika, uočen je viši rizik od BTI kod HIV-pozitivnih osoba, kod pacijenata nakon transplantacije solidnih organa i kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom.<sup>[228]</sup> Međutim, poređenjem sa nevakcinisanom populacijom pacijenata lako se uočava da vakcinacija ima protektivan efekat i u vulnerabilnim kategorijama, jer su i incidencija i mortalitet nakon *de novo* infekcija bili značajno viši u kontrolnoj, nevakcinisanoj populaciji imunosuprimiranih pacijenata.<sup>[229]</sup> Rad *Mentzer* i saradnika iz 2022. godine pokazao je da razlike u individualnom odgovoru na vakcine protiv kovid-19 imaju i moguću naslednu osnovu. Naime, autori ovog rada doveli su u vezu alel HLA-DQB1\*06 sa višim nivoima antitela nakon vakcinacije i nižim rizikom od pojave BTI.<sup>[230]</sup> *Xie* i saradnici nisu uspeli da ovaj rezultat potvrde na uzorku od 357.806 vakcinisanih ispitanika.<sup>[231]</sup> Međutim, ovi autori su sprovedli HLA genotipizaciju visoke rezolucije u svojoj kohorti i pokazali da u stvari šest različitih HLA alela (A\*03:01, C\*16:01, DQA1\*01:02, DQA1\*01:01, DRB3\*01:01 i DPB1\*10:01) individualno utiče na produkciju antitela i imaju međusobno aditivni efekat na rizik od BTI i težinu kliničke slike.<sup>[231]</sup> HLA-A\*03:01 alel bio je povezan i sa nešto naglašenijim humoralnim imunskim odgovorom u ovoj studiji, ali i nešto jačim neželjenim reakcijama na BNT162b2 u istraživanju genomske asocijacije *Bolze* i saradnika, ukazujući na „hipotetičku povezanost visoko očuvanih unakrsno reaktivnih HLA-A\*03:01 SARS-CoV-specifičnih CD8<sup>+</sup> T-ćelija, koje su postojale pre kontakta sa SARS-CoV-2, i višim nivoima antitela nakon vakcinacije protiv kovid-19, kao i učestalijim neželjenim reakcijama“.<sup>[231,232]</sup> Rezultati daljih istraživanja ove korelacije ali i drugih potencijalnih aspekata nasledne osnove imunskog odgovora na SARS-CoV-2 mogu doprineti definisanju novih grupa pacijenata pod visokim rizikom od infekcije ili BTI, te uticati na promenu pristupa vakcinaciji ove populacije u budućnosti.

Razlika u skoku nivoa RBD-IgG antitela nakon simptomatske infekcije posle druge doze vakcine nije bila statistički značajna ni za BBIBP-CorV, niti za BNT162b2 podgrupu ( $p=0,125$ ), najverovatnije usled malog uzorka jer se ipak može grafički uočiti za obe podgrupe (Slika 4-23). Nivoi RBD-specifičnih IgG antitela nakon dijagnostikovane SARS-CoV-2 infekcije koja je usledila posle primarne serije vakcinacije, bili su statistički značajno viši u odnosu na nivoe RBD-IgG antitela kod nevakcinisanih ispitanika nakon preležanog kovid-19 ( $p<0,001$ ), pokazujući da hibridni imunitet indukuje znatno više nivoe antitela nego sama infekcija (Slika 4-24). Kod ispitanika sa pozitivnim dijagnostičkim testom u ovoj disertaciji, nalaz N-IgG antitela bio je negativan samo u jednom slučaju. *Den Hartog* i saradnici ustanovili su da je kod ispitanika vakcinisanih platformama baziranim na S proteinu verovatnoća pozitivnog nalaza N-specifičnih antitela iznosila 54% dve nedelje od BTI, odnosno 82% četiri nedelje nakon BTI, dok je kod ispitanika koji su imali već jednu SARS-CoV-2 infekciju pre BTI seropozitivnost N-antitela iznosila 94%.<sup>[233]</sup> Autori smatraju da ovi podaci, odnosno mogućnost detekcije N-specifičnih antitela do šest meseci nakon BTI, svakako podržavaju značaj ovih antitela u prepoznavanju potencijalnih BTI, ali i njihovu ulogu u razvijanju kompetentnog hibridnog imuniteta i preporučuju detekciju ovih antitela tek od treće nedelje nakon pozitivnog testa, što je i ispunjeno od strane istraživanja predstavljenog u ovoj disertaciji, ali i preporučeno u drugim studijama.<sup>[234,235]</sup> *Ahmed* i saradnici detektovali su značajno nižu i atenuisanu aktivaciju CD4<sup>+</sup> T-ćelija

specifičnih za N protein kod ispitanika sa BTI, u poređenju sa S-specifičnim T-ćelijama, ali i ispitanicima koji nisu imali infekciju nakon vakcinacije, što može biti i objašnjenje za određen procenat N-IgG negativnih ispitanika nakon BTI.<sup>[236]</sup> RBD-IgM antitela detektovana su u samo 35,71% slučajeva nakon simptomatske BTI u ovde predstavljenom istraživanju. Nešto viši nivoi RBD-IgM opaženi su kod ispitanika sa infekcijom nakon BBIBP-CorV vakcine, u odnosu na BNT162b2 vakcinu. Kod ispitanika sa asimptomatskom infekcijom, nakon BTI nalaz RBD-IgM antitela bio je pozitivan u 25% (3/12). Rezultati *Zhang* i saradnika pokazali su da je seropozitivnost iznosila 33,78% tri do pet nedelja nakon Omikron BTI, posle dve doze inaktivisane vakcine, poklapajući se i sa nalazom u rezultatima predstavljenih ovom disertacijom.<sup>[237]</sup> Objasnjenje ovih nalaza se svodi na ideju da BTI predstavlja svojevrsnu sekundarnu imunizaciju, ekvivalent nove doze vakcine, i da tokom infekcije dolazi do ponovne aktivacije memorijskih B-ćelija, izazvanih prethodnom vakcinacijom, dovodeći do porasta nivoa IgG antitela, ali ne i IgM antitela.<sup>[237]</sup> U studiji *den Hartog* i saradnika, mala podgrupa ispitanika (6,7%) sa potvrđenom BTI je najverovatnije već imala jednom SARS-CoV-2 infekciju pre toga, usled brzog odgovora i visokog nivoa N-antitela, indikativnog za sekundarni odgovor, ukazujući na reinfekciju.<sup>[233]</sup> Od ukupno 15 ispitanika sa simptomatskom infekcijom nakon druge doze vakcine u istraživanju predstavljenim ovom disertacijom, četiri ispitanika je već imalo kovid-19 pre prve doze vakcine (26,67%, 4/15) i to dva ispitanika iz BBIBP-CorV (1,18%), jedan iz Gam-COVID-Vac (4,34%) i jedan iz BNT162b2 podgrupe (0,76%), potvrđujući postojanje reinfekcije u vidu BTI nakon već uspostavljenog hibridnog imuniteta (infekcija a zatim vakcinacija), nezavisno od platforme vakcine.

U literaturi pokazano je da infekcija inicijalno dovodi do stvaranja antitela specifičnih za konzervirane regione kao što su S2 i N-terminalni domen S1, dok vakcinacija indukuje RBD-specifična antitela. *Voss* i saradnici u svojim rezultatima navode da je u grupi koja je imala infekciju pre vakcinacije, više od 65% post-vakcinalnih IgG antitela bilo u skladu sa inicijalnim odgovorom na primarnu infekciju, dok je kod grupe koja je razvila infekciju nakon vakcinacije (BTI), humoralni imunski odgovor u više od 59% nakon BTI upravo odgovarao primarnom odgovoru nakon vakcinacije.<sup>[238]</sup> Ovi podaci ilustruju da je poliklonski IgG odgovor memorijskih ćelija uslovljen početnim imunološkim „otiskom“ uspostavljenim infekcijom ili vakcinacijom.<sup>[238]</sup> Međutim, istraživanje *Kaplonek* i saradnika pokazalo je da hibridni imunitet, nakon RNK (BNT162b2, mRNA-1273) i adenovirusnih (ChAdOx1, Ad26.COVID.S) vakcina ipak dovodi do jedinstvene aktivacije i S2-specifičnog imunskog odgovora, koji je slabo stimulisan samo vakcinacijom.<sup>[239]</sup> Takođe, hibridni imunitet nakon BTI pokazao je stabilne nivoe humoralnog ali i ćelijskog imunskog odgovora, održavajući se i do šest meseci nakon infekcije.<sup>[240]</sup>



Opaženi pad imunskog odgovora specifičnog za SARS-CoV-2 nakon primarne vakcinacije i porast incidencije BTI, pre svega nakon pojave Delta soja, doveli su do početka primene treće doze vakcine širom sveta. U Srbiji vakcinacija trećom dozom započela je u avgustu 2021. godine za sve vakcinisane osobe koje su primile drugu dozu pre šest meseci, nevezano za tip primarne vakcine.<sup>[57]</sup> Preporuka SZO iz decembra 2021. godine da se nakon dve doze BBIBP-CorV, primi treća doza BNT162b2, oslanjala se na studije koje su pokazale slabiju imunogenost i efektivnost ove inaktivisane vakcine, na koju ukazuju i rezultati istraživanja predstavljeni u ovoj disertaciji.<sup>[241]</sup> Međutim, nevezano za preporuku, stanovništvo Srbije, kao i učesnici ovde predstavljenog istraživanja, imali su otvoren izbor po pitanju primanja treće doze; jedini uslov postojao je u slučaju Gam-COVID-Vac vakcine, da ukoliko se ista prima kao treća doza, to isključivo mora biti prva komponenta vakcine.<sup>[57]</sup>

Postoje dva pristupa revakcinaciji, odnosno davanju nove doze vakcine nakon primarne serije, i to: homologni pristup, kada se primenjuju sve doze iste vakcine i heterologni pristup, koji podrazumeva kombinaciju vakcinalnih platformi, odnosno davanja treće doze vakcine koja je različita od primarne serije. Istorijski gledano, još prvi eksperimenti kombinovanja različitih tipova

vakcina, devedesetih godina prošlog veka, pokazali su da heterologni pristup revakcinaciji može proizvesti mnogo snažniji imunski odgovor, za različite infektivne agense, kao što su HIV (eng. *human immunodeficiency virus*) ili *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[242]</sup> U cilju poboljšanja zaštite, tokom kovid-19 pandemije najčešće su se nakon vektorskih ili inaktivisanih vakcina vršile revakcinacije RNK vakcinama. U okviru ovog istraživanja registrovano je jedanaest različitih kombinacija primarne serije i treće doze vakcine, što predstavlja i posebnu odliku ovog istraživanja, koje pruža komparativni uvid u efektivnost gotovo svih raspoloživih vakcina. Najzastupljenije su bile homologna BNT162b2/BNT162b2 podgrupa (44,96%), heterologna BBIBP-CorV/BNT162b2 (31,78%) i homologna BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupa (10,08%), što je i očekivano kako se veliki deo populacije u Srbiji, a pre svega osetljive kategorije, opredelio za BBIBP-CorV kao primarnu vakcinu (Tabela 4-27). Značajna razlika postojala je u vremenskom periodu između druge i treće doze vakcine za homolognu BNT162b2 podgrupu i heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu, gde se manji vremenski period uočavao kod heterologne podgrupe. Ovo se može pripisati kasnije promenjenim smernicama u Srbiji, koje su se odnosile na primenu nove doze vakcine četiri meseca nakon primarne serije BBIBP-CorV vakcine, a ne nakon prvobitno propisanih šest meseci.<sup>[243]</sup> Takođe, ispitanici BBIBP-CorV/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupa bili su statistički značajno stariji u odnosu na ispitanike koji su se opredelili za BNT162b2 homolognu revakcinaciju, što je odraz činjenice da je populacija ispitanika sa primarnom serijom BBIBP-CorV bila statistički značajno starija od BNT162b2 podgrupe ispitanika u okviru ovog istraživanja.

Najčešće neželjene reakcije nakon treće doze vakcine bile su lokalni bol na mestu aplikacije (45,73%), povišena temperatura (13,17%) i malaksalost (11,63%), a u odnosu na drugu dozu, uočavamo statistički značajno češću pojavu lokalnog bola, što je opisano i u literaturi (Slika 4-25).<sup>[244,245]</sup> Kod ispitanika heterologne BBIBP-CorV/BNT162b2 grupe u ovom istraživanju, primećuje se izuzetan porast učestalosti lokalnog bola, do čak 70,73%, dok je kod homologne BNT162b2/BNT162b2 grupe prijavljena učestalost od 41,38%; sve ostale ispitivane reakcije bile gotovo identično zastupljene. Najmanji broj reakcija prijavljen je nakon homologne BBIBP-CorV/BBIBP-CorV treće doze, kao i nakon primarne BBIBP-CorV serije. Osim standardnih reakcija, prijavljena je i aksilarna limfadenopatija na strani primljene vakcine i osip po vratu, sa spontanom rezolucijom, nakon BNT162b2/BNT162b2 treće doze, što je u okviru ove diskusije već opisana kao moguća reakcija nakon primarne serije BNT162b2 vakcine. Iako ne postoji veliki broj studija koji poredi heterologni i homologni pristup revakcinaciji koji uključuje BNT162b2 i BBIBP-CorV vakcine, podaci ipak ukazuju da homologna BBIBP-CorV revakcinacija, kao i u ovde predstavljenom istraživanju, ima najbezbedniji profil neželjenih reakcija, sa najčešće prijavljenim lokalnim bolom, ali znatno ređe u odnosu na heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinaciju.<sup>[244,246]</sup> I homologna BNT162b2 revakcinacija takođe je izazivala lokalni bol ređe u odnosu na heterologni pristup.<sup>[246,247]</sup> U studiji *Montero* i saradnika, na uzorku od 595 ispitanika nakon heterologne BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacije, neželjene reakcije u vidu lokalnog bola registrovane su kod čak 71% ispitanika, gotovo identičan procenat kao u istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji i to na manjem uzorku ispitanika.<sup>[248]</sup> Nalazi ovde predstavljenog istraživanja upućuju na bezbednost primene treće doze, kako homolognog tako i heterolognog pristupa revakcinaciji, što korelira sa istraživanjima koje ukazuju da su neželjene reakcije česte ali limitirane na lokalne i prolazne sistemske reakcije.<sup>[247,249]</sup>

LMM analizom RBD-IgG odgovora nakon kombinacija primarne serije i treće doze vakcine u ovom istraživanju, uočeno je da pol, godine i prethodna SARS-CoV-2 infekcija nisu imali uticaj, dok tip kombinacije vakcina i vreme jesu značajno uticali na kinetiku antitela do šest meseci nakon treće doze (Slike 4-28, 4-29). Heterologni BBIBP-CorV/BNT162b2 pristup, u odnosu na homologni BNT162b2 dovodio je do značajno viših koncentracija antitela, dok su BBIBP-CorV homologni i Gam-COVID-Vac/BBIBP-CorV pristup imali značajno niže koncentracije antitela. Interesantno je da su treće doze BBIBP-CorV vakcine u različitim kombinacijama indukovale najniže nivoe RBD-IgG antitela, kako kod prethodno naivnih, tako i kod ispitanika sa prethodnom SARS-CoV-2 infekcijom, za razliku od ostalih kombinacija adenovirusnih i RNK vakcina, kao što su Gam-COVID-

Vac/BNT162b2, ChAdOx1/BN162b2, ChAdOx1/mRNA-1273 i mRNA-1273/mRNA-1273. Većina kombinacija opisanih u ovom istraživanju nije dovoljno zastupljena u literaturi (Tabele 4-32, 4-33). *Stošić* i saradnici objavili su studiju sa podacima iz Srbije koja u analizu uzima BBIBP-CorV/BBIBP-CorV, BBIBP-CorV/BNT162b2, BNT162b2/BNT162b2, koje su najzastupljenije kombinacije primarne serije i treće doze i u ovde predstavljenom istraživanju; ali opisuju i ispitanike koji su se opredelili za još četiri kombinacije BBIBP-CorV/Gam-COVID-Vac, BNT162b2/BBIBP-CorV, Gam-COVID-Vac/Gam-COVID-Vac i Gam-COVID-Vac/BNT162b2 kombinacije, u daleko manjem procentu, takođe opisane i u ovom istraživanju.<sup>[250]</sup> Ostale kombinacije ChAdOx1/BNT162b2, ChAdOx1/mRNA-1273, mRNA-1273/mRNA-1273, opisivane su u literaturi, osim Gam-COVID-Vac/BBIBP-CorV.<sup>[251–253]</sup> U studiji *Stošić* i saradnika, za razliku od rezultata istraživanja predstavljenog u ovoj disertaciji, homologna kombinacija BNT162b2 vakcine proizvela je najviše koncentracije S-specifičnih IgG antitela, mada je i heterologna BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacija dovela do značajnog efekta; niži nivoi primećeni su nakon BBIBP-CorV homologne treće doze, Gam-COVID-Vac homologne i BBIBP-CorV/Gam-COVID-Vac heterologne treće doze, što se poklapa i sa nalazom ovog istraživanja (osim za Gam-COVID-Vac homolognu podgrupu koja nije obuhvaćena istraživanjem).<sup>[250]</sup>

Različita istraživanja ukazala su na negativnu korelaciju nivoa antitela nakon heterolognih ili homolognih kombinacija primarne serije i treće doze vakcina, ukazujući na potencijalnu ulogu imunološke senescencije u razvoju adekvatnog IgG odgovora nakon treće doze vakcine.<sup>[250,254]</sup> U okviru ovog istraživanja, LMM analiza nije pokazala uticaj starosti ispitanika na kinetiku IgG antitela nakon različitih kombinacija vakcina, ali kada su se godine poredile sa nivoima RBD-IgG antitela na prvim kontrolama nakon primanja treće doze, značajna, negativna i umerena korelacija pronađena je za BNT162b2 homologni pristup, dok to nije bio slučaj za BBIBP-CorV/BNT162b2. Ovakav nalaz ukazuje na mogućnost da starija populacija može razviti dobar sekundarni imunski odgovor nakon heterologne treće doze vakcine, sličan onom kod mlađe populacije, što potvrđuje i studija *Montero* i saradnika.<sup>[248]</sup> *Lustig* i saradnici prikazali su da postoji značajno niži humoralni imunski odgovor nađen kod starijih zdravstvenih radnika mesec dana nakon druge doze BNT162b2 vakcine, ali da je kod njih uočen i značajan porast nivoa antitela nakon homologne treće doze, kao i da su ovi ispitanici uspeli da, mesec dana od treće doze, proizvedu sekundarni imunski odgovor istovetan onom kod mlađih ispitanika, za razliku od nalaza ovde prikazanog istraživanja za ovaj tip homolognog pristupa revakcinaciji, što može biti i posledica manjeg uzorka.<sup>[249]</sup> Nalazi neadekvatnog odgovora, čak i kod starijih ispitanika, koji su nakon dve doze vakcine klasifikovani kao „slabo reagujući“ (eng. *low responders*) pokazali su uspešnu restituciju i porast nivoa NAb, kao i ukupnih antitela, ali i trajniji odgovor do šest meseci nakon treće doze.<sup>[255–257]</sup> Iako postoje različiti nalazi o povezanosti pola i imunskog odgovora na SARS-CoV-2 vakcine, a i dokazi o uticaju estrogena na imunski odgovor, pol ispitanika u ovde predstavljenom istraživanju nije doveden u vezu sa nivoima RBD-IgG antitela.<sup>[258,259]</sup> U skladu sa rezultatima ovog istraživanja, u literaturi postoje podaci dobijeni na većem broju ispitanika, gde takođe uticaj pola nakon različitih heterolognih i homolognih pristupa na humoralni i ćelijski imunski odgovor nije pronađen nakon treće doze vakcine.<sup>[248,254,260–262]</sup> Osim uticaja godina i pola, ovde predstavljeni rezultati ukazuju i na to da prethodna SARS-CoV-2 infekcija nije značajno uticala na imunski odgovor nakon treće doze, mada postoje i oprečni podaci u literaturi.<sup>[248,262]</sup> Nezavisno od toga kako je imunski odgovor uspostavljen, da li nakon vakcinacije ili u vidu hibridnog imuniteta, svakako ima tendenciju da opada tokom vremena, a uzevši u obzir da su infekcije u ovoj grupi ispitanika registrovane više od dva meseca pre primanja treće doze, to može biti objašnjenje za nepostojeću razliku. Međutim, takođe može implicirati i da je treća doza vakcine dovoljno potentna da izazove isti efekat kod naivnih ispitanika, kao nakon nešto starijeg hibridnog imuniteta.

Detaljnije ispitivanje kinetike humoralnog imunskog odgovora u istraživanju predstavljenom ovom disertacijom nakon treće doze rađeno je u dve grupe, zbog najvećeg broja ispitanika u ovim grupama i to homolognoj BNT162b2/BNT162b2 i heterolognoj BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi, u tri tačke praćenja – tri nedelje, tri meseca i šest meseci od treće doze. Ni u homolognoj, ni u

heterolognoj podgrupi, nevezano za prethodno prisustvo SARS-CoV-2 infekcije pre treće doze, nije došlo do seronegativizacije tokom perioda praćenja, za razliku od primarne serije. Uočen je postepen i statistički značajan pad RBD-IgG antitela do šest meseci praćenja za homolognu podgrupu prethodno naivnih ispitanika, dok se za heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu uočava održavanje platoa između druge i treće tačke praćenja, ukazujući na nešto dugotrajniji odgovor nakon heterolognog pristupa (Tabele 4-28, 4-30; Slike 4-26, 4-27). Poređenjem uzoraka ispitanih tri nedelje nakon treće doze sa odgovarajućim uzorcima istih ispitanika u prvoj vremenskoj tački nakon primarne serije vakcine, uočavala se značajna razlika u nivoima RBD-IgG antitela i kod BNT162b2/BNT162b2, i još očiglednije kod BBIBP-CorV/BNT162b2 pristupa, usled slabije imunogenosti primarne serije inaktivisanih vakcina, ali i većeg porasta koncentracije RBD-IgG antitela nakon treće doze vakcine (Slika 4-30). Kada se poredi nalaz RBD-IgG šest meseci nakon prve doze, sa prvom kontrolom nakon treće doze vakcine, ali i sa poslednjom kontrolom nakon treće doze, uočava se statistički značajan viši nivo RBD-IgG u obe podgrupe nakon treće doze, ukazujući na odličan odaziv imunskog odgovora i posledično više održavanje nivoa antitela tokom vremena, u odnosu na primarnu seriju. Do šest meseci nakon treće doze vakcine, koncentracija RBD-IgG bila je statistički značajno viša u BBIBP-CorV/BNT162b2 heterolognoj podgrupi, u odnosu na BNT162b2/BNT162b2 podgrupu. Takođe, poređenjem sa analognim tačkama praćenja kovid-19 grupe, prethodno naivni ispitanici vakcinisani bilo kojim od ova dva tipa kombinacije treće doze ali i ispitanici koji su imali potvrđenu infekciju pre treće doze, imali su statistički značajno više koncentracije RBD-IgG antitela, ukazujući na prednost vakcinacije i hibridnog imuniteta (Slika 4-31). Kod selektovanog broja ispitanika nakon različitih kombinacija treće doze, prilikom poređenja NAb pre i posle treće doze, značajan skok u procentu inhibicije primećen je kod svih pristupa, sa tim da je ta razlika bila statistički značajna prilikom pojedinačne analize jedino kod heterolognog BBIBP-CorV/BNT162b2 pristupa, ponovo ukazujući na prednosti istog (Tabela 4-34). Jedino su se u BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupi nalazili ispitanici sa negativnim nalazom NAb nakon treće doze vakcine (2/4 analizirana), ponovo ukazujući na slabiju imunogenost ove vakcine. Viši nivoi antitela, ali i procenti inhibicije primećeni su kod ispitanih heterolognih pristupa (Tabela 4-34). U okviru ovde predstavljenog istraživanja ispitivana je i mogućnost ponovnog stimulisanja N-specifičnih antitela kod ispitanika nakon primarne serije BBIBP-CorV vakcine, koji su primili treću dozu BNT162b2. Kod naivnih ispitanika, nakon treće BNT162b2 doze nije došlo do ponovne produkcije N-specifičnih IgG antitela ni u jednom slučaju, dok su kod ispitanika koji su imali kovid-19 pre treće doze vakcine, N-IgG antitela detektovana kod pet od šest ispitanika (odjeljak 4.3.3.2).

Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji ukazuju na značajnu imunogenost i homologne BNT162b2/BNT162b2 i heterologne BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacije primarne serije i treće doze vakcine, što je u skladu sa literaturom o heterolognom pristupu RNK nakon inaktivisane primarne serije.<sup>[103,244,245,263–266]</sup> Uzevši u obzir rezultate u ovog istraživanja koji su ukazali na slabiju imunogenost primarne serije inaktivisane vakcine, odgovor ovih ispitanika nakon RNK vakcine kao treće doze ukazuje na sposobnost inaktivisane vakcine da ipak izazove značajnu imunsku memoriju, koja perzistira i nakon prestanka detekcije RBD-specifičnih antitela. *Moghnieh* i saradnici ukazali su na mogućnost BNT162b2 vakcine kao treće doze da prevaziđe problem slabije imunogenosti BBIBP-CorV vakcine, što je i potvrđeno u drugim studijama gde je pokazano da je pad nivoa imunskog odgovora nakon druge doze inaktivisane vakcine brzo „oporavljen“ nakon treće doze BNT162b2.<sup>[245,263,265,267]</sup> Ovo je potvrđeno i u studiji *Vargas-Herrera* i saradnika, gde je uočen značajan porast nivoa antitela prilikom poređenja nivoa antitela pre i posle treće doze vakcine za BBIBP-CorV/BNT162b2 i BNT162b2/BNT162b2 kombinacije, gde je primećeno i da je heterologna kombinacija dovela do značajno višeg porasta, kao i u ovde predstavljenom istraživanju, dok su *Liang* i saradnici dokazali i značajan porast kod homolognog BBIBP-CorV pristupa u poređenju sa drugom dozom.<sup>[246,268]</sup> *Matula* i saradnici pokazali su da je heterologna BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacija dovela do snažnijeg T-ćelijskog odgovora i gotovo identičnih nivoa RBD-IgG i RBD-IgA antitela u poređenju sa homolognom BNT162b2 trećom dozom.<sup>[266]</sup> Heterologna kombinacija BBIBP-CorV i RNK vakcina dovodila je do značajnijeg porasta u koncentraciji S-specifičnih i NAb, u odnosu na

homologni BBIBP-CorV pristup ili heterolognu kombinaciju BBIBP-CorV i adenovirusnih vakcina.<sup>[244,245]</sup> *Rashedi* i saradnici opisali su nekoliko mogućih mehanizama koji utiču na snažniji imunski odgovor izazvan upotrebom heterolognih vakcina, kao što su aktivacija različitih grana imunskog odgovora i izloženost širom spektru antigena.<sup>[246,269]</sup> U istraživanju predstavljenom u ovoj disertaciji detekcija RBD-IgM antitela nije sprovedena nakon treće doze vakcine, međutim u istraživanju *Liang* i saradnika serokonverzija IgM antitela od 65,63% nakon druge doze, pala je na 9,38% nakon treće doze vakcine, dok u istraživanju *Xu* i saradnika 31,25% ispitanika nikada nije imalo detektibilna IgM antitela nakon bilo koje od tri doze vakcine.<sup>[268,270]</sup> U okvirima ovde predstavljenog istraživanja opisan je i slučaj ispitanika koji je nakon primarne serije BBIBP-CorV vakcine isključivo imao pozitivan nalaz RBD-IgM antitela, sa minimalnim procentom inhibicije, dok je tek heterologna BNT162b2 doza kod ovog ispitanika proizvela visoku koncentraciju RBD-IgG antitela. Slučajevi razvoja isključivo IgM antitela nakon inaktivisane vakcine, opisani su i u istraživanju *Zhou* i saradnika.<sup>[201]</sup>

Trend opadanja specifičnih IgG antitela nakon treće doze vakcine opažen je i za homologne i za heterologne kombinacije, iako je nešto značajniji pad primećen kod homologne BNT162b2 doze, ukazujući i na potencijalni pad zaštite od novih infekcija.<sup>[245,250,252,268,271–274]</sup> Pojava Omikron soja bila je glavna prekretnica u kovid-19 pandemiji, usled prisustva više od 30 mutacija u S proteinu i značajne sposobnosti izbegavanja imunskog odgovora, sa posledičnim do tada neviđenim porastom novih kovid-19 slučajeva, dovodeći do značajne pojave BTI i kod ispitanika koji su vakcinisani trećom dozom vakcine.<sup>[275]</sup> Nakon treće doze vakcine, u okviru ove studije, prijavljena je ukupno čak 31 nova SARS-CoV-2 infekcija (24,03%, 31/129), potvrđene dijagnostičkim testom (PCR i/ili brzi antigenski test) (Tabela 4-35, 4-36). Od toga su četiri infekcije bile u BBIBP-CorV/BBIBP-CorV podgrupi (30,76%, 4/13), pet u BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupi (12,19%, 5/41), 21 u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi (36,21%, 21/58) i jedna u ChAdOx1/mRNA-1273 podgrupi (1/1). U još 14 slučajeva (10,85%, 14/129) detektovana je potencijalna BTI, koja nije potvrđena dijagnostičkim testom, i to kod četiri ispitanika BBIBP-CorV/BNT162b2 (30,76%, 4/13), 10 ispitanika BNT162b2/BNT162b2 (17,24%, 10/58) i jednog ispitanika u okviru ChAdOx1/BNT162b2 podgrupe (12,50%, 1/8), što sa potvrđenim infekcijama dovodi do ukupne incidencije BTI od 35,66% (46/129). Kovid-19 u grupi ispitanika vakcinisanih trećom dozom najčešće je dijagnostikovao krajem 2021. ili u prva tri meseca 2022. godine, što se poklapalo sa povećanom detekcijom Delta i Omikron sojeva u Srbiji.<sup>[126]</sup> Takođe, od 46 ispitanika sa novom infekcijom nakon treće doze vakcine, osam ispitanika je suštinski imalo reinfekciju, uzevši u obzir da su već preležali kovid-19 u prethodnom periodu (17,39%). Od toga, jedna reinfekcija registrovana je u okviru BBIBP-CorV/BBIBP-CorV (12,50%, 1/8), dve u BBIBP-CorV/BNT162b2 (4,87%, 2/41) i pet u BNT162b2/BNT162b2 podgrupi (8,63%, 5/58). Iako su ispitanici sa prethodnim hibridnim imunitetom i trećom dozom vakcine imali niži rizik za reinfekciju i dugotrajniji imunski odgovor nakon treće doze vakcine, *Martin Pérez* i saradnici pokazali su da duži period između prethodne infekcije i nove doze značajno smanjuje procenat zaštite ovakvog hibridnog imuniteta, što bi moglo da objasni i pojavu reinfekcija u ovde predstavljenom istraživanju.<sup>[262,276,277]</sup> Kada se u obzir uzmu isključivo infekcije kod kojih je bio poznat tačan datum početka simptoma, najveći broj infekcija registrovan je između tri i šest meseci nakon treće doze (27/34; 79,41%), dok je samo četiri infekcije prijavljeno između prve i druge tačke, a još tri nakon isteka šest meseci posle treće doze, idući u prilog podacima o padu nivoa antitela nakon treće doze vakcine.

Nakon treće doze, titar NAb specifičnih za Omikron soj u studiji *Goel* i saradnika porastao je gotovo 45 puta kod naivnih ispitanika i mada je ova sposobnost neutralizacije opala do tri meseca nakon treće doze, nivoi antitela ostali su na znatno višem nivou nego nakon druge doze vakcine.<sup>[103]</sup> Međutim, *Liu* i saradnici, ali i *Cowling* i saradnici ukazali su na pad nivoa antitela specifičnih za Omikron varijantu kod različitih kombinacija trećih doza, do veoma niskih nivoa šest meseci nakon primanja doze, uklapajući se u nalaze istraživanja predstavljenog ovom disertacijom usled predominacije ovog soja u periodu praćenja.<sup>[252,273]</sup> Kada se uporede dve najveće podgrupe u ovom istraživanju dobija se statistički značajno viša incidencija novih infekcija u okviru

BNT162b2/BNT162b2, u odnosu na heterolognu BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinaciju ( $p=0,002$ ), osim toga poredeći zastupljenost asimptomatske infekcije u ovim podgrupama, uočava se njihova češća pojava kod heterolognog pristupa (19,35% nasuprot 33,33%), ukazujući na bolje odlike heterologne vakcinacije u zaštiti od nastanka simptomatske infekcije. Rizik od BTI u istraživanju *Porru* i saradnika smanjen je kod heterolognog pristupa revakcinaciji, potvrđujući rezultate ovog istraživanja.<sup>[278]</sup> *Gonzalez* i saradnici pokazali su da je u njihovoj kohorti RNK vakcina, kao heterologna treća doza, imala najveći procenat zaštite od smrtnog ishoda BTI u podgrupi ispitanika starijih od 50 godina.<sup>[279]</sup> U ovom disertacijom predstavljenom istraživanju, nijedan ispitanik sa infekcijom nakon treće doze nije imao dijagnostikovanu pneumoniju, niti bio hospitalizovan, ipak ukazujući na dovoljnu zaštitu od teške kliničke slike i smrtnog ishoda nezavisno od tipa treće doze.

Poređenjem RBD-IgG antitela pre i posle infekcije u BNT162b2/BNT162b2 i BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupama, kod prethodno naivnih ispitanika, uočavamo statistički značajno više koncentracije nakon infekcije (Slika 4-32). Za deo predvakcinalno naivnih ispitanika rađen je i komparativni surogat test za detekciju NAb, ali porast procenta inhibicije nije bio upadljiv, niti statistički značajan, usled već visokih vrednosti u uzorku pre infekcije (Tabela 4-38). Nakon tri doze BNT162b2 vakcine i Omikron infekcije, značajan porast anti-S antitela nađen je i u istraživanju *Ogrič* i saradnika, koji su već imali visoke nivoe antitela i pre infekcije.<sup>[280]</sup> BTI izazvane Omikron BA.5 sojem nakon tri doze CoronaVac, inaktivisane vakcine, dovele su do imunskog odgovora šireg spektra, sa mogućnošću unakrsne reaktivnosti sa drugim sojevima i dužim održavanjem nivoa neutralizacione sposobnosti, kako za ancestralne sojeve tako i za Omikron podvarijante, sugerišući da kod ove vakcine ne postoje dokazi za OAS fenomen.<sup>[281]</sup> *Johnston* i saradnici takođe su izložili pretpostavku da inaktivisane vakcine izazivaju slabiji imunološki otisak u poređenju sa RNK vakcinama.<sup>[282]</sup> Imajući u vidu da je OAS dobro dokumentovan upravo kod inaktivisanih vakcina protiv gripa, ovakvi nalazi ne mogu se pripisati isključivo tipu vakcinalne platforme. U literaturi postoje i rezultati koji ukazuju na to da BA.2 BTI ne indukuje zadovoljavajući nivo zaštite od kasnijih podvarijanti kao što je BA.2.75 kod ispitanika vakcinisanih inaktivisanim vakcinama baziranim na *wild-type* virusu, ukazujući na ipak prisutan OAS u određenom stepenu.<sup>[283]</sup> Ponavljana vakcinacija inaktivisanim vakcinama najverovatnije je rezultirala višim nivoima antitela specifičnih za konzervirane regione strukturnih proteina, dovodeći do takozvanog „zamrzavanja repertoara“ stvaranja ćelija specifičnih za nove, izmenjene antigene Omikron soja.<sup>[284]</sup> Kod ispitanika sa tri doze RNK vakcine, nakon jedne BTI i četvrte doze vakcine prilagođene Omikronu, pokazano je da memorijske B-ćelije imaju i dalje ograničen odgovor specifičan za nove varijante, čak i nakon dva izlaganja Omikron antigenima.<sup>[285]</sup> *Kim* i saradnici pokazali su da BTI izazvane ranim podvarijantama Omikrona dovode do pojave i CD8<sup>+</sup> T-ćelijskog odgovora sposobnog da prepozna epitope S proteina novih podvarijanti.<sup>[286]</sup> Takođe, na animalnom modelu pokazano je da RNK vakcina bazirana na XBB1.5. indukuje stvaranje antitela koja uspešno neutrališu upravo tu varijantu virusa, bez obzira na prethodnu izloženost ancestralnom S proteinu u vidu tri doze vakcine.<sup>[287]</sup> Smatra se da ponavljana infekcija nakon vakcinacije, kao i multiple doze bazirane na novim podvarijantama ipak mogu prevazići OAS *wild-type* virusa, dovodeći do stvaranja novog repertoara ćelija.<sup>[288,289]</sup>

U okviru BBIBP-CorV/BNT162b2 svi ispitanici sa infekcijom nakon treće doze imali su detektabilna N-specifična IgG antitela. Međutim, u okviru BNT162b2/BNT162b2 podgrupe ispitanika sa infekcijom nakon treće doze, nalaz N-IgG antitela nije bio pozitivan kod svih ispitanika. Kod pet ispitanika, sa pozitivnim dijagnostičkim testom i prisutnim kovid-19 simptomima, nalaz N-IgG antitela je bio negativan. Od tih ispitanika, jedna ispitanica je primala terapiju monoklonskim antitelima, što takođe može objasniti nedetektabilna N-IgG antitela. Ova ispitanica je nakon toga imala ponovnu reinfekciju osam meseci kasnije, kada nije primala monoklonsku terapiju – a u tom uzorku jesu detektovana N-IgG antitela u nisko pozitivnom nalazu. Ispitanici BNT162b2/BNT162b2 podgrupe sa pozitivnim nalazom N-IgG antitela imali su detektovane nivoe u iznosu od 2,17 (1,62-3,01). Ova vrednost bila je statistički značajno niža od vrednosti za BBIBP-CorV/BNT162b2 podgrupu ( $p<0,0001$ ). Istraživanje *Vu* i saradnika predstavljalo je prvi naučni rad koji je ukazao na mogućnost izostanka N-specifičnog odgovora nakon BTI, posle dve doze BNT162b2 vakcine.<sup>[290]</sup>

Autori tog rada smatrali su da je vakcina ograničila replikaciju virusa i njegovu diseminaciju i da je redukcija u ekspresiji virusnog N proteina dovela do smanjene prezentacije ovih antigena i posledično smanjenog stvaranja N-specifičnih antitela.<sup>[290]</sup> Delgado i saradnici takođe su ukazali na smanjenu produkciju N-IgG antitela nakon BTI posle *BNT162b2* dve doze vakcine, ali su ovi autori to pripisali OAS fenomenu.<sup>[291]</sup> Rezultati istraživanja predstavljenog ovom disertacijom stoga mogu indirektno ukazati na značajniji imunološki otisak RNK vakcina. Osim toga, u literaturi postoje i podaci o smanjenoj osetljivosti testova za detekciju N-antitela i pojavi negativnih nalaza ukoliko je do BTI došlo u periodu do dva meseca nakon treće doze vakcine, što takođe može biti objašnjenje ovakvih nalaza.<sup>[292]</sup>

Potencijalno razjašnjenje OAS fenomena, kao i prevazilaženje imunološkog otiska, a zatim i problema imunizacije protiv novih, pretećih varijanti SARS-CoV-2 moglo bi se naći u vakcinama nove generacije. Multivalentne vakcine, sazdane od antigena različitih varijanti virusa, koje bi mogle smanjiti potrebu za dodatnim dozama, uključivanje i N proteina, a ne isključiv fokus na S protein, targetiranje stabilnih regiona virusa radi pronalaženja univerzalne pan-koronavirusne vakcine, pravljenje mukoznih vakcina koje bi se mogle primeniti oralno ili nazalno, smanjujući transmisiju virusa, lipidne nanopartikule i nove tehnike liofilizacije koje bi produžile rok trajanja i stabilnost vakcina, samo su neki od postojećih pravaca daljih ispitivanja vakcina protiv kovid-19.<sup>[21,293]</sup> Dalja istraživanja delotvornosti ovih potencijalnih rešenja trebalo bi usmeriti ka proceni njihove sposobnosti da indukuju efikasan i dugotrajan imunski odgovor, sa posebnim naglaskom na prevenciju infekcija izazvanih novim pretećim varijantama koronavirusa.

\*\*  
\*\*

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su ispitanici gotovo od samog početka kovid-19 pandemije i uspostavljanja vakcinacije, a zatim praćeni i tokom primanja treće doze i pojave Delta i Omikron sojeva u Srbiji. Naši limiti bili su pre svega mali uzorak ispitanika, u odnosu na nacionalne studije sprovedene u drugim državama, kao i nedostatak rezultata testa neutralizacije za svaki analiziran uzorak. „*Snowballing*“ metoda uključivanja ispitanika takođe je podložna pristrasnosti prilikom izbora ispitanika. Osim toga, sojevi virusa nisu genotipizirani u okviru ovog istraživanja, ali su BTI povezivane sa najčešće detektovanim varijantama u tom periodu godine, iako su u zanemarljivim procentima tada kružile i druge varijante SARS-CoV-2. Delta i Omikron talasi, sa porastom infekcija nakon primarne serije vakcinacije, uticali su značajno na oslabljeni odaziv ispitanika na nove kontrole, usled sve češćeg oklevanja prilikom odlučivanja o primanju nove doze vakcine, ali i porasta antivakcinalnog sentimenta u okvirima dugotrajne pandemije.

Bez obzira na pomenuta ograničenja, ovo istraživanje predstavlja značajan i blagovremen doprinos razumevanju humoralnog imunskog odgovora nakon imunizacije različitim vakcinama protiv kovid-19 i infekcije SARS-CoV-2. Iako su se od tada pojavile brojne dodatne studije, preliminarni rezultati ovog rada bili su prvi objavljeni na nacionalnom nivou, nudeći ranu bazu dokaza koja je informisala kasnija istraživanja. Ključna snaga disertacije leži u njenoj metodološkoj doslednosti - svi učesnici testirani su korišćenjem istih validiranih seroloških testova, što je omogućilo interno konzistentna poređenja između različitih platformi vakcina i odgovora izazvanog samom infekcijom, ali i njihovog poređenja sa hibridnim imunitetom. Štaviše, longitudinalni dizajn studije omogućio je praćenje dela iste kohorte kroz primenu treće doze i tokom pojave Omikron varijante, pružajući vredne uvide u trajnost i evoluciju humoralnog odgovora tokom vremena. Dobijeni rezultati dopunili su postojeće podatke o vakcinama kao što su BBIBP-CorV i Gam-COVID-Vac, koje su ređe zastupljene u literaturi, u odnosu na RNK i adenovirusne vakcine; ali i podatke o različitim kombinacijama primarne serije vakcine i treće doze, koje su takođe retke. Ovaj kontinuitet praćenja, u kombinaciji sa sveobuhvatnim poređenjima i ranom diseminacijom rezultata, naglašavaju relevantnost rezultata ove disertacije kao polazne, referentne osnove u sve složenijoj sferi istraživanja imunskog odgovora na SARS-CoV-2 i prevenciju budućih koronavirusnih epidemija.

## **6. ZAKLJUČAK**

Na osnovu rezultata longitudinalnog praćenja humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom, a u skladu sa prvim ciljem, zaključeno je sledeće:

1. Nivoi RBD-specifičnih IgM i RBD-specifičnih IgG antitela statistički značajno su opadali tokom perioda praćenja od 12 meseci nakon infekcije; ispitanici sa težom kliničkom slikom imali su više inicijalne nivoe RBD-IgG antitela, uz izraženiji pad u kasnijem periodu.
  - Uočen je pad nivoa N-specifičnih IgG antitela u selektovanoj podgrupi ispitanika tokom posmatranog perioda.
  - Niski nivoi RBD-IgG antitela nisu bili u korelaciji sa prisustvom neutrališućih antitela.

Na osnovu rezultata longitudinalnog praćenja humoralnog imunskog odgovora nakon prve, druge i treće doze vakcina protiv kovid-19 dostupnih u Srbiji, a u skladu sa drugim ciljem, zaključeno je sledeće:

2. Zabeležen je statistički značajan pad nivoa ukupnih antitela u periodu do devet meseci praćenja nezavisno od tipa primenjene vakcine u primarnoj seriji. Primena treće doze dovela je do značajnog porasta nivoa antitela u odnosu na vrednosti zabeležene nakon druge doze, bez obzira na kombinaciju vakcina, ali je takođe uočen značajan pad tokom perioda praćenja do šest meseci.
  - Nakon primarne serije BNT162b2 vakcina indukovala je najviše nivoe antitela, dok je BBIBP-CorV vakcina pokazala najnižu imunogenost. ChAdOx1 i Gam-COVID-Vac vakcine indukovale su nešto niže vrednosti u odnosu na BNT162b2, ali usled nedovoljnog broja ispitanika nije bilo moguće sa odgovarajućim nivoom pouzdanosti utvrditi statističku značajnost razlika.
  - Primena BNT162b2 kao treće doze rezultirala je najvišim nivoima antitela, dok su nakon BBIBP-CorV vakcine kao treće doze zabeležene najniže vrednosti.
  - Heterologni pristup BBIBP-CorV/BNT162b2 bio je povezan sa višim nivoima antitela u poređenju sa homolognim BNT162b2/BNT162b2 pristupom.

Na osnovu rezultata poređenja dinamike nivoa specifičnih antitela kod nevakcinisanih ispitanika sa SARS-CoV-2 infekcijom (kovid-19 grupa) i kod ispitanika nakon vakcinacije različitim vakcinama protiv kovid-19, a u skladu sa trećim ciljem, zaključeno je sledeće:

3. Vakcinisani ispitanici imali su više nivoe ukupnih antitela u poređenju sa kovid-19 grupom, ali uz razlike u zavisnosti od vakcinalne platforme i postojanja hibridnog imuniteta:
  - Kod ispitanika bez infekcije pre vakcinacije, BNT162b2 vakcina indukovala je značajno više nivoe antitela do tri meseca, a BBIBP-CorV značajno niže nivoe do šest meseci praćenja, u poređenju sa kovid-19 grupom.
  - Kod ispitanika koji su imali infekciju pre vakcinacije (hibridni imunitet), BNT162b2 i Gam-COVID-Vac vakcine indukovale su značajno više nivoe antitela do šest meseci praćenja, u poređenju sa kovid-19 grupom.
  - Nakon treće doze vakcine, nezavisno od kombinacije vakcinalnih platformi i postojanja hibridnog imuniteta, registrovani su značajno viši nivoi antitela u poređenju sa kovid-19 grupom.

Na osnovu rezultata ispitivanja zastupljenosti ponovnih infekcija i infekcija nakon primene vakcina protiv kovid-19 (BTI) dostupnih u Srbiji, a u skladu sa četvrtim ciljem, zaključeno je sledeće:

4. Nakon primarne serije vakcinacije, BTI su najčešće registrovane kod ispitanika koji su primili BBIBP-CorV vakcinu, dok je nakon treće doze najviša incidencija registrovana nakon homologne BNT162b2/BNT162b2 kombinacije. Heterologna BBIBP-CorV/BNT162b2 kombinacija povezana je sa nižom incidencijom BTI i većim udelom asimptomatskih infekcija u poređenju sa homolognim pristupom.
  - Porast nivoa ukupnih antitela zabeležen je nakon ponovnih infekcija kod nevakcinisanih i nakon BTI kod vakcinisanih ispitanika.
  - Nivoi N-specifičnih IgG antitela bili su statistički značajno viši kod ispitanika sa BTI nakon heterolognog BBIBP-CorV/BNT162b2 pristupa u odnosu na homologni pristup.
  - Nivoi neutrališućih antitela nisu bili statistički značajno različiti pre i posle BTI nakon treće doze vakcine, ni kod homolognog, ni kod heterolognog pristupa.

## **7. LITERATURA**

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382(8):727–33.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;579(7798):265-9.
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, De Groot RJ, Drosten C, et al. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5(4):536–44.
4. Timeline: WHO's COVID-19 response [Internet]. World Health Organization; Dostupno na: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline#!>.
5. Family: Coronaviridae [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses [pristupljeno 2025 Jul 1]; Dostupno na: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae>.
6. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:587269.
7. McIntosh K. Coronaviruses: a comparative review. In: Arber W, Haas R, Henle W, Hofschneider PH, Jerne NK, Koldovský P, et al., urednici. *Current Topics in Microbiology and Immunology / Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1974. Str. 85–129.
8. Virology: Coronaviruses. *Nature* 1968;220(5168):650–650.
9. Reagan RL, Hauser JE. Electron micrograph of the virus of infectious bronchitis of chickens. *Cornell Vet* 1948;38(2):190.
10. Domermuth CH, Edwards OF. An electron microscope study of chorioallantoic membrane infected with the Virus of Avian Infectious Bronchitis. *J Infect Dis* 1957;100(1):74–81.
11. David-Ferreira JF, Manaker RA. An electron microscope study of the development of a Mouse Hepatitis Virus in tissue culture cells. *J Cell Biol* 1965;24(1):57–78.
12. Tyrrell DA, Bynoe ML. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *Br Med J* 1965;1(5448):1467–70.
13. Kronvall G, Nordenfelt E. On the history of human coronaviruses. *APMIS* 2021;129(7):381–3.
14. Almeida JD, Tyrrell DA. The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol* 1967;1(2):175–8.
15. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;121(1):190–3.
16. Tyrrell DAJ, Fielder M. *Cold wars: the fight against the common cold*. Oxford: Oxford University Press; 2002.
17. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967;57(4):933–40.
18. van der Hoek L. Human coronaviruses: what do they cause? *Antivir Ther* 2007;12(4):651–8.

19. Gao H, Yao H, Yang S, Li L. From SARS to MERS: evidence and speculation. *Front Med* 2016;10(4):377–82.
20. Worldometer Coronavirus Tracker [Internet]. 2024 [pristupljeno 2025 Feb 25]; Dostupno na: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>.
21. Cankat S, Demael MU, Swadling L. In search of a pan-coronavirus vaccine: next-generation vaccine design and immune mechanisms. *Cell Mol Immunol* 2023;21(2):103–18.
22. Chen J, Zhang W, Li Y, Liu C, Dong T, Chen H, et al. Bat-infecting merbecovirus HKU5-CoV lineage 2 can use human ACE2 as a cell entry receptor. *Cell* 2025;S0092867425001448.
23. Balboni A, Battilani M, Prosperi S. The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus. *New Microbiol* 2012;35(1):1–16.
24. Rashid F, Xie Z, Suleman M, Shah A, Khan S, Luo S. Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. *Front Immunol* 2022;13:940756.
25. Lijeskić O, Štajner T, Marković M. Humoralni imunski odgovor na SARS-COV-2: značaj specifičnih antitela. *Medicinski podmladak* 2029;80(1) (*in press*).
26. Zhang Z, Nomura N, Muramoto Y, Ekimoto T, Uemura T, Liu K, et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat Commun* 2022;13(1):4399.
27. Cao Y, Yang R, Lee I, Zhang W, Sun J, Wang W, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Science* 2021;30(6):1114–30.
28. Low ZY, Zabidi NZ, Yip AJW, Puniyamurti A, Chow VTK, Lal SK. SARS-CoV-2 non-structural proteins and their roles in host immune evasion. *Viruses* 2022;14(9):1991.
29. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Sig Transduct Target Ther* 2021;6(1):233.
30. Amor S, Fernández Blanco L, Baker D. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clin Exp Immunol* 2020;202(2):193–209.
31. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23(1):3–20.
32. Le K, Kannappan S, Kim T, Lee JH, Lee HR, Kim KK. Structural understanding of SARS-CoV-2 virus entry to host cells. *Front Mol Biosci* 2023;10:1288686.
33. Mohamadian M, Chiti H, Shoghli A, Biglari S, Parsamanesh N, Esmaeilzadeh A. COVID-19: virology, biology and novel laboratory diagnosis. *J Gene Med* 2021;23(2):e3303.
34. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2022;20(5):270–84.
35. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021;19(3):141–54.
36. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 7th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2024.
37. Diamond MS, Kanneganti TD. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat Immunol* 2022;23(2):165–76.

38. Sievers BL, Cheng MTK, Csiba K, Meng B, Gupta RK. SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the “goldilocks.” *Cell Mol Immunol* 2024;21(2):171–83.
39. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science* 2022;375(6585):1122–7.
40. Minkoff JM, tenOever B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2023;21(3):178–94.
41. Yaugel-Novoa M, Bourlet T, Paul S. Role of the humoral immune response during COVID-19: guilty or not guilty? *Mucosal Immunol* 2022;15(6):1170–80.
42. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell* 2021;184(4):861–80.
43. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell* 2020;183(4):1024–1042.e21.
44. Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, Terreri S, Corrente F, Capponi C, et al. Different innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection of asymptomatic, mild, and severe cases. *Front Immunol* 2020;11:610300.
45. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell* 2020;181(7):1489–1501.e15.
46. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell* 2020;183(4):996–1012.e19.
47. Guo L, Wang G, Wang Y, Zhang Q, Ren L, Gu X, et al. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study. *Lancet Microbe* 2022;3(5):e348–56.
48. Sakharkar M, Rappazzo CG, Wieland-Alter WF, Hsieh CL, Wrapp D, Esterman ES, et al. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol* 2021;6(56):eabg6916.
49. Ng OW, Chia A, Tan AT, Jadi RS, Leong HN, Bertoletti A, et al. Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection. *Vaccine* 2016;34(17):2008–14.
50. Schiffner J, Backhaus I, Rimmele J, Schulz S, Möhlenkamp T, Klemens JM, et al. Long-term course of humoral and cellular immune responses in outpatients after SARS-CoV-2 infection. *Front Public Health* 2021;9:732787.
51. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* 2020;586(7830):516–27.
52. Fortner A, Schumacher D. First COVID-19 vaccines receiving the US FDA and EMA emergency use authorization. *Discoveries (Craiova)* 2021;9(1):e122.
53. Badano MN, Sabbione F, Keitelman I, Pereson M, Aloisi N, Colado A, et al. Humoral response to the BBIBP-CorV vaccine over time in healthcare workers with or without exposure to SARS-CoV-2. *Mol Immunol* 2022;143:94–9.

54. Oxford University/AstraZeneca COVID-19 vaccine approved [Internet]. GOV.UK 2020; Dostupno na: <https://www.gov.uk/government/news/oxford-universityastrazeneca-covid-19-vaccine-approved>.
55. EMA recommends COVID-19 vaccine AstraZeneca for authorisation in the EU [Internet]. European Medicines Agency 2021; Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-covid-19-vaccine-astrazeneca-authorisation-eu>.
56. Montalti M, Soldà G, Di Valerio Z, Salussolia A, Lenzi J, Forcellini M, et al. ROCCA observational study: early results on safety of Sputnik V vaccine (Gam-COVID-Vac) in the republic of San Marino using active surveillance. *eClinicalMedicine* 2021;38:101027.
57. Stručno-metodološko uputstvo za sprovođenje vanredne preporučene imunizacije protiv COVID-19 u Republici Srbiji vakcinama: Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine (Comirnaty), Gam-COVID-Vac, SARS-CoV-2 Vaccine (Vero Cell), Inactivated, ChAdOx1 nCoV-19 Corona Virus Vaccine (Recombinant COVISHIELD/AstraZeneca SKBio AZD1222-COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S(recombinant)/COVID-19 Vaccine AstraZeneca (Vaxzervia) i SPIKEVAX (ranije COVID-19 Vaccine Moderna) [Internet]. 2022 [pristupljeno 2025 Maj 7]; Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/download/smuZaVanrednuPreporucenuImunizacijuProtivCOVID19.pdf>.
58. Marković M. SARS-CoV-2 immunity and an overview of the COVID-19 vaccines. *Medicinski podmladak* 2021;72(3):20–9.
59. Hossaini Alhashemi S, Ahmadi F, Dehshahri A. Lessons learned from COVID-19 pandemic: vaccine platform is a key player. *Process Biochem* 2023;124:269–79.
60. Wang H, Zhang Y, Huang B, Deng W, Quan Y, Wang W, et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell* 2020;182(3):713-721.e9.
61. Xia S, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Yang Y, Gao GF, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2021;21(1):39–51.
62. Al Kaabi N, Zhang Y, Xia S, Yang Y, Al Qahtani MM, Abdulrazzaq N, et al. Effect of 2 inactivated SARS-CoV-2 vaccines on symptomatic COVID-19 infection in adults: a randomized clinical trial. *JAMA* 2021;326(1):35.
63. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet* 2020;396(10255):887–97.
64. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet* 2021;397(10275):671–81.
65. Van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR, et al. ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* 2020;586(7830):578–82.

66. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2020;396(10249):467–78.
67. Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Dold C, Ewer KJ, Folegatti PM, Gilbride C, et al. Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. *Nat Med* 2021;27(2):279–88.
68. Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, et al. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet* 2020;396(10267):1979–93.
69. Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021;397(10269):99–111.
70. Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet* 2021;397(10277):881–91.
71. Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 vaccination. *N Engl J Med* 2021;384(22):2092–101.
72. COVID-19 vaccine safety update VAXZEVRIA, European Medicines Agency [Internet]. 2021; Dostupno na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-14-july-2021\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-14-july-2021_en.pdf).
73. Vogel AB, Kanevsky I, Che Y, Swanson KA, Muik A, Vormehr M, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature* 2021;592(7853):283–9.
74. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med* 2020;383(25):2439–50.
75. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med* 2020;383(27):2603–15.
76. Markov PV, Ghafari M, Beer M, Lythgoe K, Simmonds P, Stilianakis NI, et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2023;21(6):361–79.
77. Duffy S. Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLoS Biol* 2018;16(8):e3000003.
78. WHO Coronavirus Network (CoViNet) [Internet]. World Health Organization. Dostupno na: <https://www.who.int/groups/who-coronavirus-network>.
79. WHO Covid-19 dashboard, (CoViNet) [Internet]. World Health Organization. Dostupno na: <https://data.who.int/dashboards/covid19/variants>.
80. Alhamlan FS, Al-Qahtani AA. SARS-CoV-2 variants: genetic insights, epidemiological tracking, and implications for vaccine strategies. *Int J Mol Sci* 2025;26(3):1263.

81. Saha A, Ghosh Roy S, Dwivedi R, Tripathi P, Kumar K, Nambiar SM, et al. Beyond the pandemic era: recent advances and efficacy of SARS-CoV-2 vaccines against emerging variants of concern. *Vaccines* 2025;13(4):424.
82. Akingbola A, Adewole O, Adegbesan A, Peters F, Odukoya T, Aremu O, et al. From Wuhan to Omicron K.P2 strain: a comprehensive review of SARS-CoV-2 phylogeny and public health implications of the latest booster vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 2025;21(1):2485840.
83. Tregoning JS, Flight KE, Higham SL, Wang Z, Pierce BF. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nat Rev Immunol* 2021;21(10):626–36.
84. Vokó Z, Kiss Z, Surján G, Surján O, Barcza Z, Wittmann I, et al. Effectiveness and waning of protection with different SARS-CoV-2 primary and booster vaccines during the Delta pandemic wave in 2021 in Hungary (HUN-VE 3 study). *Front Immunol* 2022;13:919408.
85. Petrović V, Vuković V, Patić A, Marković M, Ristić M. Immunogenicity of BNT162b2, BBIBP-CorV, gam-COVID-vac and ChAdOx1 nCoV-19 vaccines six months after the second dose: a longitudinal prospective study. *Vaccines* 2022;11(1):56.
86. Ben Ahmed M, Bellali H, Gdoura M, Zamali I, Kallala O, Ben Hmid A, et al. Humoral and cellular immunogenicity of six different vaccines against SARS-CoV-2 in adults: a comparative study in Tunisia (North Africa). *Vaccines* 2022;10(8):1189.
87. Jeewandara C, Aberathna IS, Pushpakumara PD, Kamaladasa A, Guruge D, Wijesinghe A, et al. Immune responses to Sinopharm/ BBIBP-CORV in individuals in Sri Lanka. *Immunology* 2022;167(2):275–85.
88. Yu X, Wei D, Xu W, Liu C, Guo W, Li X, et al. Neutralizing activity of BBIBP-CorV vaccine-elicited sera against Beta, Delta and other SARS-CoV-2 variants of concern. *Nat Commun* 2022;13(1):1788.
89. Zhu Y, Yang X, Xun J, Liu J, Wen Q, Lin Y, et al. Neutralization of five SARS-CoV-2 variants of concern by convalescent and BBIBP-CorV vaccinee serum. *Virol Sin* 2022;37(6):831–41.
90. Paris C, Perrin S, Hamonic S, Bourget B, Roué C, Brassard O, et al. Effectiveness of mRNA-BNT162b2, mRNA-1273, and ChAdOx1 nCoV-19 vaccines against COVID-19 in healthcare workers: an observational study using surveillance data. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(11):1699.e5-1699.e8.
91. Swanson PA, Padilla M, Hoyland W, McGlinchey K, Fields PA, Bibi S, et al. AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific TH 1 response with a diverse TCR repertoire. *Sci Transl Med* 2021;13(620):eabj7211.
92. Madhi SA, Baillie V, Cutland CL, Voysey M, Koen AL, Fairlie L, et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 COVID-19 vaccine against the B.1.351 variant. *N Engl J Med* 2021;384(20):1885–98.
93. Mlcochova P, Kemp SA, Dhar MS, Papa G, Meng B, Ferreira IATM, et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* 2021;599(7883):114–9.
94. Medigeshe GR, Batra G, Murugesan DR, Thiruvengadam R, Chattopadhyay S, Das B, et al. Sub-optimal neutralisation of omicron (B.1.1.529) variant by antibodies induced by vaccine alone or SARS-CoV-2 Infection plus vaccine (hybrid immunity) post 6-months. *eBioMedicine* 2022;78:103938.

95. Tonnara G, Piselli P, Cimaglia C, Arlotti M, Sacchini E, Manoni S, et al. The impact of COVID-19 vaccination programme in the Republic of San Marino: Focus on effectiveness of Gam-Covid-Vac. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(12):1636–43.
96. Barchuk A, Bulina A, Cherkashin M, Berezina N, Rakova T, Kuplevatskaya D, et al. COVID-19 vaccines effectiveness against symptomatic SARS-CoV-2 during Delta variant surge: a preliminary assessment from a case-control study in St. Petersburg, Russia. *BMC Public Health* 2022;22(1):1803.
97. Radion EI, Mukhin VE, Kholodova AV, Vladimirov IS, Alsaeva DY, Zhdanova AS, et al. Functional characteristics of serum anti-SARS-CoV-2 antibodies against Delta and Omicron variants after vaccination with Sputnik V. *Viruses* 2023;15(6):1349.
98. Dagan N, Barda N, Kepten E, Miron O, Perchik S, Katz MA, et al. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N Engl J Med* 2021;384(15):1412–23.
99. San Segundo D, Comins-Boo A, Irure-Ventura J, Renuncio-García M, Roa-Bautista A, González-López E, et al. Immune assessment of BNT162b2 m-RNA-spike based vaccine response in adults. *Biomedicines* 2021;9(8):868.
100. Lopera TJ, Chvatal-Medina M, Flórez-Álvarez L, Zapata-Cardona MI, Taborda NA, Rugeles MT, et al. Humoral response to BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 variants decays after six months. *Front Immunol* 2022;13:879036.
101. Moy JN, Anderson M, Shen X, Fu J, Stec M, Gosha A, et al. Neutralizing antibody activity to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) after 1 or 2 doses of BNT162b2 vaccine in infection-naive and previously infected individuals. *J Infect Dis* 2022;226(8):1407–11.
102. Zhang M, Liang Y, Yu D, Du B, Cheng W, Li L, et al. A systematic review of vaccine breakthrough infections by SARS-CoV-2 Delta variant. *Int J Biol Sci* 2022;18(2):889–900.
103. Goel RR, Painter MM, Lundgreen KA, Apostolidis SA, Baxter AE, Giles JR, et al. Efficient recall of Omicron-reactive B cell memory after a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *Cell* 2022;185(11):1875-1887.e8.
104. Costa Clemens SA, Weckx L, Clemens R, Almeida Mendes AV, Ramos Souza A, Silveira MBV, et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study. *Lancet* 2022;399(10324):521–9.
105. Chen Y, Zhao X, Zhou H, Zhu H, Jiang S, Wang P. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Nat Rev Immunol* 2023;23(3):189–99.
106. Misra A, Theel ES. Immunity to SARS-CoV-2: what do we know and should we be testing for it? *J Clin Microbiol* 2022;60(6):e00482-21.
107. Santos Da Silva E, Servais JY, Kohnen M, Arendt V, Staub T, the CON-VINCE Consortium, et al. Validation of a SARS-CoV-2 surrogate neutralization test detecting neutralizing antibodies against the major variants of concern. *Int J Mol Sci* 2023;24(19):14965.
108. Sobhani K, Cheng S, Binder RA, Mantis NJ, Crawford JM, Okoye N, et al. Clinical utility of SARS-CoV-2 serological testing and defining a correlate of protection. *Vaccines* 2023;11(11):1644.
109. Goldblatt D, Alter G, Crotty S, Plotkin SA. Correlates of protection against SARS - COV -2 infection and COVID-19 disease. *Immunol Rev* 2022;310(1):6–26.

110. Jamshidi E, Asgary A, Shafiekhani P, Khajeamiri Y, Mohamed K, Esmaily H, et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18(5):2037384.
111. Etikan I, Alkassim R, Abubakar S. Comparison of snowball sampling and sequential sampling technique. *Biom Biostat Int J* 2016;3(1):6-7.
112. Marković-Denić L, Popadić D, Jovanović T, Bonaci-Nikolić B, Samardžić J, Tomić Spirić V, et al. Developing COVID-19 vaccine recommendations during the pandemic: The experience of Serbia's Expert Committee on Immunization. *Front Public Health* 2022;10:1056670.
113. World Health Organization. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Internet]. [pristupljeno 2025 Mar 17]; Dostupno na: <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>.
114. He Q, Mao Q, Zhang J, Bian L, Gao F, Wang J, et al. COVID-19 vaccines: current understanding on immunogenicity, safety, and further considerations. *Front Immunol* 2021;12:669339.
115. VIDAS SARS-CoV-2 IgG - Letter of Authorization [Internet]. 2021 [pristupljeno 2025 Feb 25]; Dostupno na: <https://www.fda.gov/media/140934/download?attachment>.
116. VIDAS SARS-CoV-2 IgM - Letter of Authorization [Internet]. 2021 [pristupljeno 2025 Feb 25]; Dostupno na: <https://www.fda.gov/media/140930/download?attachment>.
117. Renard N, Daniel S, Cayet N, Pecquet M, Raymond F, Pons S, et al. Performance characteristics of the Vidas SARS-CoV-2 IgM and IgG serological assays. *J Clin Microbiol* 2021;59(4):e02292-20.
118. Inés RM, Gabriela HTM, Paula CM, Magdalena TM, Jimena A, Salome KB, et al. Performance of Elecsys anti-SARS CoV-2 (Roche) and VIDAS anti-SARS CoV-2 (Biomérieux) for SARS-CoV-2 nucleocapsid and spike protein antibody detection. *EJIFCC* 2022;33(2):159–65.
119. Chamkhi S, Dhaouadi T, Sfar I, Mokni S, Jebri A, Mansouri D, et al. Comparative study of six SARS-CoV-2 serology assays: diagnostic performance and antibody dynamics in a cohort of hospitalized patients for moderate to critical COVID-19. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2022;36:20587384211073232.
120. Younes S, Al-Jighefee H, Shurrah F, Al-Sadeq DW, Younes N, Dargham SR, et al. Diagnostic efficiency of three fully automated serology assays and their correlation with a novel surrogate virus neutralization test in symptomatic and asymptomatic SARS-COV-2 individuals. *Microorganisms* 2021;9(2):245.
121. Bubonja-Šonje M, Batičić L, Abram M, Cekinović Grbeša Đ. Diagnostic accuracy of three SARS-CoV2 antibody detection assays, neutralizing effect and longevity of serum antibodies. *J Virol Methods* 2021;293:114173.
122. Montesinos I, Dahma H, Wolff F, Dauby N, Delaunoy S, Wuyts M, et al. Neutralizing antibody responses following natural SARS-CoV-2 infection: Dynamics and correlation with commercial serologic tests. *J Clin Virol* 2021;144:104988.
123. Bal A, Trabaud MA, Fassier JB, Rabilloud M, Saker K, Langlois-Jacques C, et al. Six-month antibody response to SARS-CoV-2 in healthcare workers assessed by virus neutralization and commercial assays. *Clin Microbiol Infect* 2021;27(6):933–5.

124. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One* 2020;15(12):e0244126.
125. Alejo JL, Mitchell J, Chang A, Chiang TPY, Massie AB, Segev DL, et al. Prevalence and durability of SARS-CoV-2 antibodies among unvaccinated US adults by history of COVID-19. *JAMA* 2022;327(11):1085–7.
126. Novković M, Banović Djeri B, Ristivojević B, Knežević A, Janković M, Tanasić V, et al. Genome sequence diversity of SARS-CoV-2 in Serbia: insights gained from a 3-year pandemic study. *Front Microbiol* 2024;15:1332276.
127. Miljanović D, Milićević O, Lončar A, Abazović D, Despot D, Banko A. The first molecular characterization of Serbian SARS-CoV-2 isolates from a unique early second wave in Europe. *Front Microbiol* 2021;12:691154.
128. Kubale J, Gleason C, Carreño JM, Srivastava K, Singh G, PARIS Study Team, et al. SARS-CoV-2 Spike-binding antibody longevity and protection from reinfection with antigenically similar SARS-CoV-2 variants. *mBio* 2022;13(5):e0178422.
129. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol* 2020;5(52):eabe0367.
130. Mioch D, Vanbrabant L, Reimerink J, Kuiper S, Lodder E, Van Den Bijllaardt W, et al. SARS-CoV-2 antibodies persist up to 12 months after natural infection in healthy employees working in non-medical contact-intensive professions. *Int J Infect Dis* 2023;126:155–63.
131. Li Q, Chen L, Li F, He A. Long-term evaluation of the seroprevalence of SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies in recovered patients: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2023;23(1):444.
132. Kučinskaitė-Kodžė I, Simanavičius M, Šimaitis A, Žvirblienė A. Persistence of SARS-CoV-2-specific antibodies for 13 months after infection. *Viruses* 2021;13(11):2313.
133. Yan X, Zhu S, Jin Z, Chen G, Zhang Z, He J, et al. Persistence of anti-SARS-CoV-2 IgM in convalescent COVID-19 patients. *J Infect* 2022;84(1):e29–32.
134. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat Commun* 2016;7(1):11826.
135. Wang Y, Li J, Li H, Lei P, Shen G, Yang C. Persistence of SARS-CoV-2-specific antibodies in COVID-19 patients. *Int Immunopharmacol* 2021;90:107271.
136. Bichara CDA, Amoras ESG, Vaz GL, Bichara CNC, Amaral IPCA, Vallinoto ACR. Persistence of anti-SARS-CoV-2 IgM antibody up to 8 months post-COVID-19. *Case Rep Clin Med* 2021;10(09):227–31.
137. Valdivia A, Torres I, Huntley D, Alcaraz MJ, Albert E, González C, et al. Diagnostic significance of SARS-CoV-2 IgM positive/IgG negative antibody profile in symptomatic patients with suspected COVID-19 testing negative by RT-PCR. *J Infect* 2021;82(1):e15–6.
138. Harrington WE, Trakhimets O, Andrade DV, Dambrauskas N, Raappana A, Jiang Y, et al. Rapid decline of neutralizing antibodies is associated with decay of IgM in adults recovered from mild COVID-19. *Cell Rep Med* 2021;2(4):100253.

139. Hale M, Netland J, Chen Y, Thouvenel CD, Smith KN, Rich LM, et al. IgM antibodies derived from memory B cells are potent cross-variant neutralizers of SARS-CoV-2. *J Exp Med* 2022;219(9):e20220849.
140. Oved K, Olmer L, Shemer-Avni Y, Wolf T, Supino-Rosin L, Prajgrod G, et al. Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 non-responding seronegative subpopulation. *eClinicalMedicine* 2020;29:100651.
141. Masiá M, Telenti G, Fernández M, García JA, Agulló V, Padilla S, et al. SARS-CoV-2 seroconversion and viral clearance in patients hospitalized with COVID-19: viral load predicts antibody response. *Open Forum Infect Dis* 2021;8(2):ofab005.
142. Kitagawa T, Kobayashi M, Ohta T, Terasaki M, Tsukamoto Y, Takai R, et al. Nine cases of SARS-CoV-2-PCR-positive samples showed no increase of antibodies against SARS-CoV-2. *In Vivo* 2021;35(5):2947–9.
143. Liu W, Russell RM, Bibollet-Ruche F, Skelly AN, Sherrill-Mix S, Freeman DA, et al. Predictors of nonseroconversion after SARS-CoV-2 infection. *Emerg Infect Dis* 2021;27(9):2454–8.
144. Lugo-Trampe A, López-Cifuentes D, Mendoza-Pérez P, Tafurt-Cardona Y, Joo-Domínguez ADJ, Rios-Ibarra CP, et al. Nine-month trend of IgG antibody persistence and associated symptoms post-SARS-CoV-2 infection. *Healthcare* 2024;12(9):948.
145. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020;26(6):845–8.
146. Falahi S, Kenarkoohi A. COVID-19 reinfection: prolonged shedding or true reinfection? *New Microbes and New Infect* 2020;38:100812.
147. Nguyen NN, Nguyen YN, Hoang VT, Million M, Gautret P. SARS-CoV-2 reinfection and severity of the disease: a systematic review and meta-analysis. *Viruses* 2023;15(4):967.
148. Gómez-Gonzales W, Chihuantito-Abal LA, Gamarra-Bustillos C, Morón-Valenzuela J, Zavaleta-Oliver J, Gomez-Livias M, et al. Risk factors contributing to reinfection by SARS-CoV-2: a systematic review. *Adv Respir Med* 2023;91(6):560–70.
149. Helfand M, Fiordalisi C, Wiedrick J, Ramsey KL, Armstrong C, Gean E, et al. Risk for reinfection after SARS-CoV-2: a living, rapid review for American College of Physicians practice points on the role of the antibody response in conferring immunity following SARS-CoV-2 infection. *Ann Intern Med* 2022;175(4):547–55.
150. Kojima N, Shrestha NK, Klausner JD. A systematic review of the protective effect of prior SARS-CoV-2 infection on repeat infection. *Eval Health Prof* 2021;44(4):327–32.
151. Deng J, Ma Y, Liu Q, Du M, Liu M, Liu J. Severity and outcomes of SARS-CoV-2 reinfection compared with primary infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2023;20(4):3335.
152. Ren X, Zhou J, Guo J, Hao C, Zheng M, Zhang R, et al. Reinfection in patients with COVID-19: a systematic review. *Glob Health Res Policy* 2022;7(1):12.
153. Plotkin SA, Gilbert PB. Nomenclature for immune correlates of protection after vaccination. *Clin Infect Dis* 2012;54(11):1615–7.
154. Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, et al. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science* 2022;375(6576):43–50.

155. Long B, Bridwell R, Gottlieb M. Thrombosis with thrombocytopenia syndrome associated with COVID-19 vaccines. *Am J Emerg Med* 2021;49:58–61.
156. „Tok vakcinacije: Pogledajte koliko se ljudi vakcinisalo u vašem mestu” [Internet]. Centar za istraživačko novinarstvo Srbije [pristupljeno 2025 Maj 5]; Dostupno na: <https://www.cins.rs/tok-vakcinacije-pogledajte-koliko-se-ljudi-vakcinisalo-u-vasem-mestu/>.
157. Lijeskić O, Klun I, Stamenov Djaković M, Gligorić N, Štajner T, Srbljanović J, et al. Prospective cohort study of the kinetics of specific antibodies to SARS-CoV-2 infection and to four SARS-CoV-2 vaccines available in Serbia, and vaccine effectiveness: a 3-month interim report. *Vaccines (Basel)* 2021;9(9):1031.
158. Dhamanti I, Suwantika AA, Adlia A, Yamani LN, Yakub F. Adverse reactions of COVID-19 vaccines: a scoping review of observational studies. *Int J Gen Med* 2023;16:609–18.
159. Ganesan S, Al Ketbi LMB, Al Kaabi N, Al Mansoori M, Al Maskari NN, Al Shamsi MS, et al. Vaccine side effects following COVID-19 vaccination among the residents of the UAE-an observational study. *Front Public Health* 2022;10:876336.
160. Camacho Moll ME, Salinas Martínez AM, Tovar Cisneros B, García Onofre JI, Navarrete Floriano G, Bermúdez de León M. Extension and severity of self-reported side effects of seven COVID-19 vaccines in Mexican population. *Front Public Health* 2022;10:834744.
161. Meo AS, Masood A, Shabbir U, Ali H, Nadeem Z, Meo SA, et al. Adverse effects of Sinopharm COVID-19 vaccine among vaccinated medical students and health care workers. *Vaccines (Basel)* 2023;11(1):105.
162. Mohebbi A, Eterafi M, Fouladi N, Golizadeh M, Panahizadeh R, Habibzadeh S, et al. Adverse effects reported and insights following Sinopharm COVID-19 vaccination. *Curr Microbiol* 2023;80(12):377.
163. Abdel-Qader DH, Abdel-Qader H, Silverthorne J, Kongkaew C, Al Meslamani AZ, Hayajneh W, et al. Active safety surveillance of four types of COVID-19 vaccines: a national study from Jordan. *Clin Drug Investig* 2022;42(10):813–27.
164. Živanović D, Jovin VM, Javorac J, Ilić M, Zelić P. Commentary: registered adverse events following COVID-19 immunization in Serbia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021;25(20):6408–10.
165. Nishizawa T, Jinta T, Koyamada R, Uehara Y, Taki F, Arioka H. Adverse reactions of BNT162b2 vaccine booster against COVID-19 in Japan. *J Gen Fam Med* 2022;23(5):360–2.
166. Huang PC, Chen CH, Chien CH, Chen CH, Chen CY. Reactive axillary lymphadenopathy among different COVID-19 vaccines: a retrospective study in breast sonography. *Int J Breast Cancer* 2025;2025(1):8126974.
167. Igual-Rouilleault AC, Soriano I, Elizalde A, Quan PL, Fernandez-Montero A, Sobrido C, et al. Axillary lymph node imaging in mRNA, vector-based, and mix-and-match COVID-19 vaccine recipients: ultrasound features. *Eur Radiol* 2022;32(10):6598–607.
168. Dalfardi B, Rad NK, Mohammad Alizade T, Edalatfard M, Asadi S, Rahimi B. Unexpected hypereosinophilia after Sinopharm vaccination: a case report. *BMC Infect Dis* 2025;25(1):583.
169. Turan A, Kaplanoglu H, Kaplanoglu V. Frequency of ipsilateral axillary lymphadenopathy after the inactivated COVID-19 vaccine. *CMIR* 2022;18(11):1214–21.

170. Elverici E, Özsoy A, Sayın B, Gökhan MB, Özkan E. Unilateral axillary lymphadenopathy after the inactivated SARS-COV-2 (CoronaVac) vaccine: ultrasonographic imaging. *Balkan Med J* 2023;40(1):28–33.
171. Yu Q, Jiang W, Chen N, Li J, Wang X, Li M, et al. Misdiagnosis of reactive lymphadenopathy remotely after COVID-19 vaccination: a case report and literature review. *Front Immunol* 2022;13:875637.
172. Shin J, Shim SR, Lee J, Ryu HS, Kim JY. Otorhinolaryngologic complications after COVID-19 vaccination, vaccine adverse event reporting system (VAERS). *Front Public Health* 2023;11:1338862.
173. Singh AK, Phatak SR, Singh R, Bhattacharjee K, Singh NK, Gupta A, et al. Antibody response after first and second-dose of ChAdOx1-nCOV (Covishield™) and BBV-152 (Covaxin™) among health care workers in India: The final results of cross-sectional coronavirus vaccine-induced antibody titre (COVAT) study. *Vaccine* 2021;39(44):6492–509.
174. Kang YM, Minn D, Lim J, Lee KD, Jo DH, Choe KW, et al. Comparison of antibody response elicited by ChAdOx1 and BNT162b2 COVID-19 vaccine. *J Korean Med Sci* 2021;36(46):e311.
175. Devi LS, Sardar M, Sharma M, Khandait M. Impact of ChAdOx1 nCoV-19 (Covishield™) vaccination: how long will it persist? *Int J Microbiol* 2022;2022:1–7.
176. Romero-Pinedo S, Quesada M, Horndler L, Álvarez-Fernández S, Olmo A, Abia D, et al. Vaccine type-, age- and past infection-dependence of the humoral response to SARS-CoV-2 spike S protein. *Front Immunol* 2022;13:809285.
177. Shachor-Meyouhas Y, Hussein K, Szwarcwort-Cohen M, Weissman A, Mekel M, Dabaja-Younis H, et al. Single BNT162b2 vaccine dose produces seroconversion in under 60 s cohort. *Vaccine* 2021;39(47):6902–6.
178. Rossi AH, Ojeda DS, Varese A, Sanchez L, Gonzalez Lopez Ledesma MM, Mazzitelli I, et al. Sputnik V vaccine elicits seroconversion and neutralizing capacity to SARS-CoV-2 after a single dose. *Cell Rep Med* 2021;2(8):100359.
179. Jeewandara C, Fernando S, Pushpakumara PD, Ramu ST, Kamaladasa A, Gunasekara B, et al. Immune responses following the first dose of the Sputnik V (Gam-COVID-Vac). *Sci Rep* 2022;12(1):1727.
180. Claro F, Silva D, Rodriguez M, Rangel HR, de Waard JH. Immunoglobulin G antibody response to the Sputnik V vaccine: previous SARS-CoV-2 seropositive individuals may need just one vaccine dose. *Int J Infect Dis* 2021;111:261–6.
181. Li FP, Shi GF, Lin ZZ, Zhu XL, Wang LJ, Tung TH, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccines among hospitalized patients in China: a case-control study. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18(5):2088966.
182. Manisty C, Otter AD, Treibel TA, McKnight Á, Altmann DM, Brooks T, et al. Antibody response to first BNT162b2 dose in previously SARS-CoV-2-infected individuals. *Lancet* 2021;397(10279):1057–8.
183. Eyre DW, Lumley SF, Wei J, Cox S, James T, Justice A, et al. Quantitative SARS-CoV-2 anti-spike responses to Pfizer–BioNTech and Oxford–AstraZeneca vaccines by previous infection status. *Clin Microbiol Inf* 2021;27(10):1516.e7–1516.e14.
184. Hirotsu Y, Amemiya K, Sugiura H, Shinohara M, Takatori M, Mochizuki H, et al. Robust antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine occur within a week after the first dose

- in previously infected individuals and after the second dose in uninfected individuals. *Front Immunol* 2021;12:722766.
185. Petrović V, Vuković V, Patić A, Marković M, Ristić M. Immunogenicity of BNT162b2, BBIBP-CorV and Gam-COVID-Vac vaccines and immunity after natural SARS-CoV-2 infection-A comparative study from Novi Sad, Serbia. *PLoS One* 2022;17(2):e0263468.
  186. Dashdorj NJ, Wirz OF, Röltgen K, Haraguchi E, Buzzanco AS, Sibai M, et al. Direct comparison of antibody responses to four SARS-CoV-2 vaccines in Mongolia. *Cell Host Microbe* 2021;29(12):1738-1743.e4.
  187. Božić L, Knežević D, Travar M, Miljuš N, Petković M, Aćimović J, et al. The comparison of SARS-CoV-2 antibody levels in medical personnel induced by different types of vaccines compared to the natural infection. *Centr Eur J immunol* 2023;48(1):35–42.
  188. Sughayer MA, Souan L, Abu Alhowr MM, Al Rimawi D, Siag M, Albadr S, et al. Comparison of the effectiveness and duration of anti-RBD SARS-CoV-2 IgG antibody response between different types of vaccines: Implications for vaccine strategies. *Vaccine* 2022;40(20):2841–7.
  189. Fodor E, Olmos Calvo I, Kuten-Pella O, Hamar E, Bukva M, Madár Á, et al. Comparison of immune activation of the COVID vaccines: ChAdOx1, BNT162b2, mRNA-1273, BBIBP-CorV, and Gam-COVID-Vac from serological human samples in Hungary showed higher protection after mRNA-based immunization. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2022;26(14):5297–306.
  190. Batmunkh B, Otgonbayar D, Shaarii S, Khaidav N, Shagdarsuren OE, Boldbaatar G, et al. RBD-specific antibody response after two doses of different SARS-CoV-2 vaccines during the mass vaccination campaign in Mongolia. *PLoS One* 2023;18(12):e0295167.
  191. Sereejav E, Sandagdorj A, Bazarjav P, Ganbold S, Enkhtuvshin A, Tsedenbal N, et al. Antibody responses to mRNA versus non-mRNA COVID vaccines among the Mongolian population. *IJID Reg* 2023;8:1–8.
  192. Jaber HM, Ebdah S, Al Haj Mahmoud SA, Abu-Qatouseh L, Jaber YH. Comparison of T cells mediated immunity and side effects of mRNA vaccine and conventional COVID-19 vaccines administrated in Jordan. *Hum Vaccin Immunother* 2024;20(1):2333104.
  193. Erice A, Varillas-Delgado D, Caballero C. Decline of antibody titres 3 months after two doses of BNT162b2 in non-immunocompromised adults. *Clin Microbiol Inf* 2022;28(1):139.e1-139.e4.
  194. Eliçabe RJ, Distel MN, Jofré BL, Leporati M, Silva JE, Arias JL, et al. Assessing the long-stand antibody response induced by COVID-19 vaccines: A study in an educational cohort in San Luis, Argentina. *Vaccine* 2023;41(2):476–85.
  195. Ruggiero A, Piubelli C, Calciano L, Accordini S, Valenti MT, Carbonare LD, et al. SARS-CoV-2 vaccination elicits unconventional IgM specific responses in naïve and previously COVID-19-infected individuals. *eBioMedicine* 2022;77:103888.
  196. Jalkanen P, Kolehmainen P, Häkkinen HK, Huttunen M, Tähtinen PA, Lundberg R, et al. COVID-19 mRNA vaccine induced antibody responses against three SARS-CoV-2 variants. *Nat Commun* 2021;12(1):3991.
  197. Serwanga J, Oluka GK, Baine C, Ankunda V, Sembera J, Kato L, et al. Persistent and robust antibody responses to ChAdOx1-S Oxford-AstraZeneca (ChAdOx1-S, Covishield) SARS-CoV-2 vaccine observed in Ugandans across varied baseline immune profiles. *PLoS One* 2024;19(7):e0303113.

198. Alavi M, Mousavi M, Jazayeri M, Ebadifar A. Evaluation of seroconversion rate following SARS-CoV-2 vaccination in health care workers at Shahid Beheshti University of Medical Sciences. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2023;15(4):258-263.
199. Byazrova MG, Kulemzin SV, Astakhova EA, Belovezhets TN, Efimov GA, Chikaev AN, et al. Memory B cells induced by Sputnik V vaccination produce SARS-CoV-2 neutralizing antibodies upon ex vivo restimulation. *Front Immunol* 2022;13:840707.
200. Banga Ndzouboukou JL, Zhang Y di, Lei Q, Lin X song, Yao Z jie, Fu H, et al. Human IgM and IgG responses to an inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *Curr Med Sci* 2021;41(6):1081–6.
201. Zhou L, Liu D, Zhang H, Wu L, Liu X, Wang X, et al. Assessment of S-specific IgG and IgM positive rates in healthy hospital staff members vaccinated with the inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *Viral Immunol* 2022;35(2):170–4.
202. Müller M, Volzke J, Subin B, Müller S, Sombetzki M, Reisinger EC, et al. Single-dose SARS-CoV-2 vaccinations with either BNT162b2 or AZD1222 induce disparate Th1 responses and IgA production. *BMC Med* 2022;20(1):29.
203. Piubelli C, Ruggiero A, Calciano L, Mazzi C, Castilletti C, Tiberti N, et al. Subjects who developed SARS-CoV-2 specific IgM after vaccination show a longer humoral immunity and a lower frequency of infection. *eBioMedicine* 2023;89:104471.
204. Chaudhury S, Hutter J, Bolton JS, Hakre S, Mose E, Wooten A, et al. Serological profiles of pan-coronavirus-specific responses in COVID-19 patients using a multiplexed electrochemiluminescence-based testing platform. *PLoS ONE* 2021;16(6):e0252628.
205. Francis T. Influenza: the new acquaintance. *Ann Intern Med* 1953;39(2):203–21.
206. Francis T. On the doctrine of original antigenic sin. *Proc Am Philos Soc* 1960;104(6):572–8.
207. Francis T. The current status of the control of influenza. *Ann Intern Med* 1955;43(3):534–8.
208. Ferenci T, Sarkadi B. RBD-specific antibody responses after two doses of BBIBP-CorV (Sinopharm, Beijing CNBG) vaccine. *BMC Infect Dis* 2022;22(1):87.
209. Zeng Q, Yang X, Lin BY, Li YZ, Huang G, Xu Y. Immunological findings in a group of individuals who were poor or non-responders to standard two-dose SARS-CoV-2 vaccines. *Vaccines (Basel)* 2023;11(2):461.
210. Hafizoğlu M, Bas AO, Tavukçuoğlu E, Sahiner Z, Oytun MG, Ulutürk S, et al. Memory T cell responses in seronegative older adults following SARS-CoV-2 vaccination. *Clin Immunol Commun* 2022;2:154–8.
211. Wang Q, Ning J, Chen Y, Li B, Shi L, He T, et al. The BBIBP-CorV inactivated COVID-19 vaccine induces robust and persistent humoral responses to SARS-CoV-2 nucleocapsid, besides spike protein in healthy adults. *Front Microbiol* 2022;13:1008420.
212. Li XN, Huang Y, Wang W, Jing QL, Zhang CH, Qin PZ, et al. Effectiveness of inactivated SARS-CoV-2 vaccines against the Delta variant infection in Guangzhou: a test-negative case-control real-world study. *Emerg Microbes Infect* 2021;10(1):1751–9.
213. González S, Olszevicki S, Salazar M, Calabria A, Regairaz L, Marín L, et al. Effectiveness of the first component of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) on reduction of SARS-CoV-2 confirmed infections, hospitalisations and mortality in patients aged 60-79: a retrospective cohort study in Argentina. *eClinicalMedicine* 2021;40:101126.

214. Soheili M, Khateri S, Moradpour F, Mohammadzede P, Zareie M, Mortazavi SMM, et al. The efficacy and effectiveness of COVID-19 vaccines around the world: a mini-review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2023;22(1):42.
215. Chodick G, Tene L, Patalon T, Gazit S, Ben Tov A, Cohen D, et al. Assessment of effectiveness of 1 dose of BNT162b2 vaccine for SARS-CoV-2 infection 13 to 24 days after immunization. *JAMA Netw Open* 2021;4(6):e2115985.
216. Volkman HR, Nguyen JL, Mustapha MM, Yang J, Jodar L, McLaughlin JM. Effectiveness of a single COVID-19 mRNA vaccine dose in individuals with prior SARS-CoV-2 infection: a systematic review. *Commun Med (Lond)* 2025;5(1):151.
217. Plotkin SA. Measles: breakouts and breakthroughs. *J Pediatr Infec Dis Soc* 2019;8(4):289–90.
218. Leung J, Broder KR, Marin M. Severe varicella in persons vaccinated with varicella vaccine (breakthrough varicella): a systematic literature review. *Expert Rev Vaccines* 2017;16(4):391–400.
219. Qin Y, Liao P. Hepatitis B virus vaccine breakthrough infection: surveillance of S gene mutants of HBV. *Acta Virol* 2018;62(02):115–21.
220. Dobler G, Kaier K, Hehn P, Böhmer MM, Kreusch TM, Borde JP. Tick-borne encephalitis virus vaccination breakthrough infections in Germany: a retrospective analysis from 2001 to 2018. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(8):1090.e7-1090.e13.
221. Mohseni Afshar Z, Barary M, Hosseinzadeh R, Alijanpour A, Hosseinzadeh D, Ebrahimpour S, et al. Breakthrough SARS-CoV-2 infections after vaccination: a critical review. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18(5):2051412.
222. Chemaitelly H, Tang P, Hasan MR, AlMukdad S, Yassine HM, Benslimane FM, et al. Waning of BNT162b2 vaccine protection against SARS-CoV-2 infection in Qatar. *N Engl J Med* 2021;385(24).
223. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect* 2022;28(2):202–21.
224. Butt AA, Khan T, Yan P, Shaikh OS, Omer SB, Mayr F. Rate and risk factors for breakthrough SARS-CoV-2 infection after vaccination. *J Infect* 2021;83(2):237–79.
225. Petrović V, Vuković V, Marković M, Ristić M. Early effectiveness of four SARS-CoV-2 vaccines in preventing COVID-19 among adults aged  $\geq 60$  years in Vojvodina, Serbia. *Vaccines* 2022;10(3):389.
226. Bajči M, Lendak D, Ristić M, Drljača M, Brkić S, Turkulov V, et al. COVID-19 breakthrough infections among patients aged  $\geq 65$  years in Serbia: morbidity and mortality overview. *Vaccines* 2022;10(11):1818.
227. Kokić Z, Kon P, Djurković-Djaković O. Effectiveness of vaccination in preventing COVID-19: a community study comparing four vaccines. *Vaccines* 2023;11(3):544.
228. Sun J, Zheng Q, Madhira V, Olex AL, Anzalone AJ, Vinson A, et al. Association between immune dysfunction and COVID-19 breakthrough infection after SARS-CoV-2 vaccination in the US. *JAMA Intern Med* 2022;182(2):153.
229. Qin CX, Moore LW, Anjan S, Rahamimov R, Sifri CD, Ali NM, et al. Risk of breakthrough SARS-CoV-2 infections in adult transplant recipients. *Transplantation* 2021;105(11):e265–6.

230. Mentzer AJ, O'Connor D, Bibi S, Chelysheva I, Clutterbuck EA, Demissie T, et al. Human leukocyte antigen alleles associate with COVID-19 vaccine immunogenicity and risk of breakthrough infection. *Nat Med* 2023;29(1):147–57.
231. Xie J, Mothe B, Alcalde Herraiz M, Li C, Xu Y, Jödicke AM, et al. Relationship between HLA genetic variations, COVID-19 vaccine antibody response, and risk of breakthrough outcomes. *Nat Commun* 2024;15(1):4031.
232. Bolze A, Neveux I, Schiabor Barrett KM, White S, Isaksson M, Dabe S, et al. HLA-A\*03:01 is associated with increased risk of fever, chills, and stronger side effects from Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccination. *Hum Genet Genom Adv* 2022;3(2):100084.
233. den Hartog G, Andeweg SP, Hoeve CE, Smits G, Voordouw B, Eggink D, et al. Assessment of hybrid population immunity to SARS-CoV-2 following breakthrough infections of distinct SARS-CoV-2 variants by the detection of antibodies to nucleoprotein. *Sci Rep* 2023;13(1):18394.
234. Van Den Hoogen LL, Smits G, Van Hagen CCE, Wong D, Vos ERA, Van Boven M, et al. Seropositivity to Nucleoprotein to detect mild and asymptomatic SARS-CoV-2 infections: A complementary tool to detect breakthrough infections after COVID-19 vaccination? *Vaccine* 2022;40(15):2251–7.
235. Anderson M, Stec M, Gosha A, Mohammad T, Boler M, Tojo Suarez R, et al. Longitudinal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 vaccine antibody responses and identification of vaccine breakthrough infections among healthcare workers using nucleocapsid immunoglobulin G. *J Infect Dis* 2022;226(11):1934–42.
236. Ahmed MIM, Diepers P, Janke C, Plank M, Eser TM, Rubio-Acero R, et al. Enhanced Spike-specific, but attenuated Nucleocapsid-specific T cell responses upon SARS-CoV-2 breakthrough versus non-breakthrough infections. *Front Immunol* 2022;13:1026473.
237. Zhang S, Dong C, Zhen Q, Shi C, Tian H, Li C, et al. Unveiling a new perspective on distinguishing Omicron breakthrough cases and postimmune COVID-19-naive individuals: insights from antibody profiles. *Microbiol Spectr* 2023;11(4):e0180823.
238. Voss WN, Mallory MA, Byrne PO, Marchioni JM, Knudson SA, Powers JM, et al. Hybrid immunity to SARS-CoV-2 arises from serological recall of IgG antibodies distinctly imprinted by infection or vaccination. *Cell Rep Med* 2024;5(8):101668.
239. Kaplonek P, Deng Y, Shih-Lu Lee J, Zar HJ, Zavadska D, Johnson M, et al. Hybrid immunity expands the functional humoral footprint of both mRNA and vector-based SARS-CoV-2 vaccines. *Cell Rep Med* 2023;4(5):101048.
240. Almanzar G, Koosha K, Vogt T, Stein A, Ziegler L, Asam C, et al. Hybrid immunity by two COVID-19 mRNA vaccinations and one breakthrough infection provides a robust and balanced cellular immune response as basic immunity against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J Med Virol* 2024;96(6):e29739.
241. Interim recommendations for heterologous COVID-19 vaccine schedules: Interim guidance. [Internet]. 2021; Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-heterologous-schedules>.
242. Lu S. Heterologous prime–boost vaccination. *Curr Opin Immunol* 2009;21(3):346–51.
243. Primena buster doze vakcina protiv COVID-19 [Internet]. Institut za javno zdravlje Republike Srbije “Dr Milan Jovanović Batut” 2021; Dostupno na: <https://www.batut.org.rs/index.php?content=2289>.

244. Mallah SI, Alawadhi A, Jawad J, Wasif P, Alsaffar B, Alalawi E, et al. Safety and efficacy of COVID-19 prime-boost vaccinations: Homologous BBIBP-CorV versus heterologous BNT162b2 boosters in BBIBP-CorV-primed individuals. *Vaccine* 2023;41(12):1925–33.
245. Chansaenroj J, Suntronwong N, Kanokudom S, Assawakosri S, Yorsaeng R, Vichaiwattana P, et al. Immunogenicity following two doses of the BBIBP-CorV vaccine and a third booster dose with a viral vector and mRNA COVID-19 vaccines against Delta and Omicron variants in prime immunized adults with two doses of the BBIBP-CorV vaccine. *Vaccines* 2022;10(7):1071.
246. Vargas-Herrera N, Fernández-Navarro M, Cabezudo NE, Soto-Becerra P, Solís-Sánchez G, Escobar-Agreda S, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a third dose of BNT162b2 vaccine for COVID-19 after a primary regimen with BBIBP-CorV or BNT162b2 vaccines in Lima, Peru. *PLoS One* 2022;17(10):e0268419.
247. Moreira ED, Kitchin N, Xu X, Dychter SS, Lockhart S, Gurtman A, et al. Safety and efficacy of a third dose of BNT162b2 COVID-19 vaccine. *N Engl J Med* 2022;386(20):1910–21.
248. Montero S, Urrunaga-Pastor D, Soto-Becerra P, Cvetkovic-Vega A, Guillermo-Roman M, Figueroa-Montes L, et al. Humoral response after a BNT162b2 heterologous third dose of COVID-19 vaccine following two doses of BBIBP-CorV among healthcare personnel in Peru. *Vaccine X* 2023;14:100311.
249. Lustig Y, Gonen T, Meltzer L, Gilboa M, Indenbaum V, Cohen C, et al. Superior immunogenicity and effectiveness of the third compared to the second BNT162b2 vaccine dose. *Nat Immunol* 2022;23(6):940–6.
250. Stošić M, Milić M, Marković M, Kelić I, Bukumirić Z, Veljković M, et al. Immunogenicity and reactogenicity of the booster dose of COVID-19 vaccines and related factors: a panel study from the general population in Serbia. *Vaccines (Basel)* 2022;10(6):838.
251. Kim JA, Bang HI, Shin JW, Park Y, Kim S, Kim MY, et al. Immunogenicity of third-dose BNT162b2 mRNA vaccine following two doses of ChAdOx1 in health care workers: a prospective longitudinal study. *Ann Lab Med* 2022;42(6):688–92.
252. Liu X, Munro APS, Feng S, Janani L, Aley PK, Babbage G, et al. Persistence of immunogenicity after seven COVID-19 vaccines given as third dose boosters following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK: Three month analyses of the COV-BOOST trial. *J Infect* 2022;84(6):795–813.
253. Sheng WH, Jeong SM, Lin PH, Hsieh MJ, Yang HC, Pan CF, et al. Immunogenicity and safety of third-dose mRNA COVID-19 vaccines in healthy adults previously vaccinated with two doses of the ChAdOx1 vaccine. *J Formos Med Assoc* 2023;122(2):121–31.
254. Çağlayan D, Süner AF, Şiyve N, Güzel I, Irmak Ç, Işık E, et al. An analysis of antibody response following the second dose of CoronaVac and humoral response after booster dose with BNT162b2 or CoronaVac among healthcare workers in Turkey. *J Med Virol* 2022;94(5):2212–21.
255. Lake DF, Roeder AJ, Gonzalez-Moa MJ, Koehler M, Kaleta E, Jasbi P, et al. Third COVID-19 vaccine dose boosts neutralizing antibodies in poor responders. *Commun Med* 2022;2(1):85.
256. Renia L, Goh YS, Rouers A, Le Bert N, Chia WN, Chavatte JM, et al. Lower vaccine-acquired immunity in the elderly population following two-dose BNT162b2 vaccination is alleviated by a third vaccine dose. *Nat Commun* 2022;13(1):4615.

257. Hofstee MI, Kaczorowska J, Postema A, Zomer E, Van Waalwijk M, Jonathans G, et al. High SARS-CoV-2 antibody levels after three consecutive BNT162b2 booster vaccine doses in nursing home residents. *Immun Ageing* 2025;22(1):1.
258. Jensen A, Stromme M, Moyassari S, Chadha AS, Tartaglia MC, Szoeki C, et al. COVID-19 vaccines: considering sex differences in efficacy and safety. *Contemp Clin Trials* 2022;115:106700.
259. Kitro A, Sirikul W, Thongkum W, Soponpong S, Yasamut U, Kiratipaisarl W, et al. Dynamic of anti-spike receptor binding domain (RBD) levels and short-term adverse events following a heterologous booster dose of BNT162b2 after two doses of CoronaVac in Thai health care workers. *Vaccine* 2022;40(21):2915–24.
260. Wagenhäuser I, Almanzar G, Förg FB, Stein A, Eiter I, Reusch J, et al. Heterologous and homologous COVID-19 mRNA vaccination schemes for induction of basic immunity show similar immunogenicity regarding long-term spike-specific cellular immunity in healthcare workers. *Vaccine* 2024;42(21):126132.
261. Tanaka H, Mukai J, Kushibiki K, Mizushima S, Maeda K, Fujimoto Y, et al. Effect of the third dose of BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccine on anti-SARS-CoV-2 antibody levels in healthcare workers. *Vaccine* 2023;41(2):365–71.
262. Vukčević M, Šerović K, Despot M, Nikolić-Kokić A, Vujović A, Nikolić M, et al. Humoral and cellular immune response after three doses of Sinopharm [vero cell]-inactivated COVID-19 vaccine in combination with SARS-CoV-2 infection leads to hybrid immunity. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024;17(1):122.
263. Moghnieh R, Mekdashi R, El-Hassan S, Abdallah D, Jisr T, Bader M, et al. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in BBIBP-CorV-vaccinated individuals compared with homologous BNT162b2 vaccination: Results of a pilot prospective cohort study from Lebanon. *Vaccine* 2021;39(46):6713–9.
264. Cucunawangsih C, Wijaya RS, Lugito NPH, Suriapranata I. Antibody response after a third dose mRNA-1273 vaccine among vaccinated healthcare workers with two doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *Int J Infect Dis* 2022;118:116–8.
265. Hayashi JY, Simizo A, Miyamoto JG, Costa LVS, Souza OF, Chiarelli T, et al. Humoral and cellular responses to vaccination with homologous CoronaVac or ChAdOx1 and heterologous third dose with BNT162b2. *J Infect* 2022;84(6):834–72.
266. Matula Z, Gönczi M, Bekő G, Kádár B, Ajzner É, Uher F, et al. Antibody and T cell responses against SARS-CoV-2 elicited by the third dose of BBIBP-CorV (Sinopharm) and BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) vaccines using a homologous or heterologous booster vaccination strategy. *Vaccines* 2022;10(4):539.
267. Rákóczi É, Magócs G, Kovács S, Nagy B, Szűcs G, Szekanecz Z. Evaluation of the efficacy of BBIBP-CorV inactivated vaccine combined with BNT62b2 mRNA booster vaccine. *Diagnostics* 2023;13(3):556.
268. Liang XM, Xu QY, Jia ZJ, Wu MJ, Liu YY, Lin LR, et al. A third dose of an inactivated vaccine dramatically increased the levels and decay times of anti-SARS-CoV-2 antibodies, but disappointingly declined again: a prospective, longitudinal, cohort study at 18 serial time points over 368 days. *Front Immunol* 2022;13:876037.
269. Rashedi R, Samieefar N, Masoumi N, Mohseni S, Rezaei N. COVID-19 vaccines mix-and-match: The concept, the efficacy and the doubts. *J Med Virol* 2022;94(4):1294–9.

270. Xu QY, Xie L, Zheng XQ, Liang XM, Jia ZJ, Liu YY, et al. Anti-SARS-CoV-2 IgM secondary response was suppressed by preexisting immunity in vaccinees: a prospective, longitudinal cohort study over 456 days. *Vaccines (Basel)* 2023;11(1):188.
271. Ren N, Wang Z, Gao S. Immunogenicity persistence of a third-dose homologous BBIBP-CorV/CoronaVac boosting vaccination: a prospective open-label study. *Viral Immunol* 2024;37(1):16–23.
272. Sharif H, Ghani H, Ahmad L, Bagol S, Wong J, Tan CW, et al. Heterologous prime-boost with mRNA-1273 stimulates persistent neutralising antibodies in BBIBP-CorV-vaccinated individuals. *Vaccine* 2023;41(47):6910–3.
273. Cowling BJ, Cheng SMS, Martín-Sánchez M, Au NYM, Chan KCK, Li JKC, et al. Slow waning of antibodies following BNT162b2 as a third dose in adults who had previously received 2 doses of inactivated vaccine. *J Infect Dis* 2023;227(2):251–5.
274. Patalon T, Saciuk Y, Peretz A, Perez G, Lurie Y, Maor Y, et al. Waning effectiveness of the third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *Nat Commun* 2022;13(1):3203.
275. Evans JP, Liu SL. Challenges and prospects in developing future SARS-CoV-2 vaccines: overcoming original antigenic sin and inducing broadly neutralizing antibodies. *J Immunol* 2023;211(10):1459–67.
276. Martín Pérez C, Aguilar R, Jiménez A, Salmerón G, Canyelles M, Rubio R, et al. Correlates of protection and determinants of SARS-CoV-2 breakthrough infections 1 year after third dose vaccination. *BMC Med* 2024;22(1):103.
277. Cauchi JP, Dziugyte A, Borg ML, Melillo T, Zahra G, Barbara C, et al. Hybrid immunity and protection against infection during the Omicron wave in Malta. *Emerg Microbes Infect* 2023;12(1):e2156814.
278. Porru S, Monaco MGL, Spiteri G, Carta A, Caliskan G, Violán C, et al. Incidence and determinants of symptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 breakthrough infections after booster dose in a large european multicentric cohort of health workers-ORCHESTRA project. *J Epidemiol Glob Health* 2023;13(3):577–88.
279. González S, Olszewicki S, Gaiano A, Salazar M, Regairaz L, Varela Bains AN, et al. Protection of homologous and heterologous boosters after primary schemes of rAd26-rAd5, ChAdOx1 nCoV-19 and BBIBP-CorV during the omicron outbreak in adults of 50 years and older in Argentina: a test-negative case-control study. *Lancet Reg Health Am* 2023;27:100607.
280. Ogrič M, Žigon P, Podovšovnik E, Lakota K, Sodin-Semrl S, Rotar Ž, et al. Differences in SARS-CoV-2-specific antibody responses after the first, second, and third doses of BNT162b2 in naïve and previously infected individuals: a 1-year observational study in healthcare professionals. *Front Immunol* 2022;13:876533.
281. Chen Y, Zhao T, Chen L, Jiang G, Geng Y, Li W, et al. SARS-CoV-2 Omicron infection augments the magnitude and durability of systemic and mucosal immunity in triple-dose CoronaVac recipients. *mBio* 2024;15(4):e02407-23.
282. Johnston TS, Li SH, Painter MM, Atkinson RK, Douek NR, Reeg DB, et al. Immunological imprinting shapes the specificity of human antibody responses against SARS-CoV-2 variants. *Immunity* 2024;57(4):912-925.e4.

283. Ju B, Fan Q, Wang M, Liao X, Guo H, Wang H, et al. Antigenic sin of wild-type SARS-CoV-2 vaccine shapes poor cross-neutralization of BA.4/5/2.75 subvariants in BA.2 breakthrough infections. *Nat Commun* 2022;13(1):7120.
284. Kan AKC, Li PH. Inactivated COVID-19 vaccines: potential concerns of antibody-dependent enhancement and original antigenic sin. *Immunol Lett* 2023;259:21–3.
285. Muik A, Quandt J, Lui BG, Bacher M, Lutz S, Grünenthal M, et al. Immunity against conserved epitopes dominates after two consecutive exposures to SARS-CoV-2 Omicron BA.1. *Cell Rep* 2024;43(8):114567.
286. Kim SH, Kim J, Jung S, Noh JY, Kim J, Park H, et al. Omicron BA.2 breakthrough infection elicits CD8+ T cell responses recognizing the spike of later Omicron subvariants. *Sci Immunol* 2024;9(91):eade6132.
287. Al-Wassiti HA, Fabb SA, Grimley SL, Kochappan R, Ho JK, Wong CY, et al. mRNA vaccines encoding membrane-anchored RBDs of SARS-CoV-2 mutants induce strong humoral responses and can overcome immune imprinting. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2024;32(4):101380.
288. Paciello I, Pierleoni G, Pantano E, Antonelli G, Pileri P, Maccari G, et al. Antigenic sin and multiple breakthrough infections drive converging evolution of COVID-19 neutralizing responses. *Cell Rep* 2024;43(9):114645.
289. Kato H, Sano K, Miyakawa K, Kurosawa T, Horikawa K, Kimura Y, et al. Humoral and cell-mediated immunity against SARS-CoV-2 in healthcare personnel who received multiple mRNA vaccines: a 4-year observational study. *Infect Dis Rep* 2025;17(3):42.
290. Vu LD, Wallace S, Phan AT, Christofferson RC, Turner E, Parker S, et al. Absence of antibody responses to SARS-CoV-2 N protein in COVID-19 vaccine breakthrough cases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2022;247(21):1923–36.
291. Delgado JF, Vidal-Pla M, Moya MC, Espasa M, Casabella A, Seda M, et al. SARS-CoV-2 Spike protein vaccine-induced immune imprinting reduces Nucleocapsid protein antibody response in SARS-CoV-2 infection. *J Immunol Res* 2022;2022:1–4.
292. Mizoue T, Yamamoto S, Konishi M, Oshiro Y, Inamura N, Nemoto T, et al. Sensitivity of anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibody for breakthrough infections during the epidemic of the Omicron variants. *J Infect* 2022;85(5):573–607.
293. Mambelli F, de Araujo ACVSC, Farias JP, de Andrade KQ, Ferreira LCS, Minoprio P, et al. An update on anti-COVID-19 vaccines and the challenges to protect against new SARS-CoV-2 variants. *Pathogens* 2025;14(1):23.

### **Publikovani radovi kao rezultat istraživanja u okviru doktorske disertacije**

1. Lijeskić O, Klun I, Stamenov Djaković M, Gligorić N, Štajner T, Srbljanović J, Djurković-Djaković O. Prospective cohort study of the kinetics of specific antibodies to SARS-CoV-2 infection and to four SARS-CoV-2 vaccines available in Serbia, and vaccine effectiveness: a 3-month interim report. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(9):1031. doi: 10.3390/vaccines9091031. M22, IF<sub>2021</sub> 4.96.
2. Lijeskić O, Bauman N, Marković M, Srbljanović J, Bobić B, Zlatković Đ, Štajner T. SARS-CoV-2 specific antibody response after an mRNA vaccine as the third dose: Homologous versus heterologous boost. *Vaccine*. 2024;42(7):1665-1672. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.01.085. M21, IF<sub>2023</sub> 4.5.
3. Lijeskić O, Štajner T, Marković M. Humoralni imunski odgovor na SARS-COV-2: značaj specifičnih antitela. *Medicinski podmladak*. 2029; 80 (1). doi: 10.5937/mp80-57044. M52 (*in press*).

## Biografija autora

Olivera Lijeskić rođena je 08.07.1994. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i Gimnaziju „Sveti Sava“ (prirodno-matematički smer). Integrisane akademske studije medicine završila je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2019. godine sa prosečnom ocenom 9,07. Školske 2019/2020. godine, upisala je doktorske studije, modul Mikrobi i infekcija, takođe na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač pripravnik izabrana je krajem oktobra 2019. godine, a zaposlena je u Institutu za medicinska istraživanja od novembra iste godine, kao saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (MPNTRS) „Kontrola infekcija apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije“ (III 41019), u Grupi za mikrobiologiju sa parazitologijom, koja je deo Centra izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima. Trenutno kao član projektnog tima učestvuje u aktivnostima projekta *”Reinvention of the diagnostic algorithm and treatment options for reactivated toxoplasmosis - ToxoReTREAT”* finansiranog u okviru Javnog poziva PRIZMA, Fonda za nauku Republike Srbije. Takođe, aktivno učestvuje u dijagnostičkom radu Nacionalne referentne laboratorije za toksoplazmozu (u sastavu Grupe za mikrobiologiju sa parazitologijom IMI) od trenutka zaposlenja. Specijalizaciju iz Medicinske mikrobiologije upisala je u aprilu 2024. godine. Dobitnik je dve stipendije Evropskog udruženja za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (ESCMID) 2024. godine za učešće na kratkim edukativnim kursovima u Nacionalnom centru za mikrobiologiju, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Španija i na Univerzitetu u Lundu, Švedska. Do sada je kao autor ili koautor objavila 9 radova štampanih *in extenso* u časopisima indeksiranim u JCR listi, 25 radova sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu i 3 rada sa skupova nacionalnog značaja štampanih u izvodu.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Olivera Lijeskić

Broj indeksa: 5147/2019

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „Praćenje kinetike humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom i aktivne imunizacije protiv kovid-19 različitim vakcinama dostupnim u Srbiji“:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Olivera Lijeskić

Broj indeksa: 5147/2019

Studijski program: Mikrobi i infekcija

Naslov rada: „Praćenje kinetike humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom i aktivne imunizacije protiv kovid-19 različitim vakcinama dostupnim u Srbiji“

Mentor 1: dr Tijana Štajner, viši naučni saradnik

Mentor 2: prof. dr Miloš Marković, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Praćenje kinetike humoralnog imunskog odgovora nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom i aktivne imunizacije protiv kovid-19 različitim vakcinama dostupnim u Srbiji“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (*Creative Commons*) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave.).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**1. Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

**2. Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

**4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

**5. Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

**6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.