

COVID-19 Geçiren ve COVID-19 Aşısı Olan Sağlık Çalışanlarında SARS-CoV-2'ye Özgü Humoral ve Hücresel Bağışıklık Değerlerinin Araştırılması

Investigation of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity Values in Health Care Workers with COVID-19 Disease and Administered with COVID-19 Vaccine

Ali Ümit KESKİN¹(ID), Altay Burak DALAN²(ID), Pınar ÇIRAGİL³(ID), Aynur Eren TOPKAYA³(ID)

¹ Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.

¹ Yeditepe University Faculty of Engineering, Department of Biomedical Engineering Istanbul, Türkiye.

² Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul.

² Yeditepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Istanbul, Türkiye.

³ Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

³ Yeditepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Türkiye.

*Bu çalışma 6. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Hibrid Kongresi'nde (20-24 Ekim 2021, Ankara) sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Keskin AÜ, Dalan AB, Çiragil P, Topkaya AE. COVID-19 Geçiren ve COVID-19 aşısı olan sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2'ye özgü humoral ve hücresel bağışıklık değerlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56(3):480-492.

ÖZ

Koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19) pandemisini sınırlamak için aşılardan ve geçirilmiş enfeksiyonların hem humoral hem de hücresel immün yanıt üzerindeki etkileri dikkate alınmalıdır. Farklı aşılardan ve virüsün humoral bağışık yanıtı ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, COVID-19 enfeksiyonu sırasında hücresel ve humoral bağışık yanıtları arasında uyumsuzluk olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, inaktif virüs aşısı (CoronaVac) ile iki doz aşılanan, COVID-19 geçiren ve hiç aşılanmayan ve hastalık geçirmeyen üç grup sağlık çalışanında şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) antijenlerine karşı oluşan humoral ve hücresel yanıtların, cinsiyet ve yaş parametrelerini de göz önüne alarak karşılaştırılması ve aralarındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. CoronaVac ile aşılanmış (AG) (n= 56, 1. Grup: 27 erkek, 29 kadın), COVID-19 geçiren (KG) (n=41; 2. Grup: 21 erkek ve 20 kadın) ve sağlıklı kontrol grubu (SKG) (n=23, 3. Grup: 10 erkek ve 13 kadın) olmak üzere toplam 120 sağlık çalışanında, SARS-CoV-2'ye karşı oluşan Interferon Gamma (IFN- γ), anti-spike antikor (IgG-S) ve anti-nükleokapsid (IgG-N) antikor titreleri ölçülmüştür. COVID-19 geçiren gruptaki tüm katılımcıların tanısı, revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi ile doğrulanmıştır (Bio-speedy® SARS CoV-2 Double Gene RT-qPCR, Bioeksan R&D Technologies, Türkiye). IgG-S ve IgG-N antikor düzeyleri, Abbott Architect i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, ABD) cihazı ile çalışılmıştır. IFN- γ düzeyleri ise QuantiFERON SARS-CoV-2 Başlangıç Seti (Qiagen, MD, ABD) kullanılarak saptanmıştır. İstatistiksel veri analizi SPSS (versiyon 22, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki değişkenli gruplar arasındaki farklar için Student bağımsız t testi veya Mann-Whitney U testi, normal dağılmayan veri setleri arasındaki monotonik ilişkiyi değerlendirmek için

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Aynur Eren Topkaya, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): +9 0216 578 40 80, E-posta (E-mail): aynur.eren@yeditepe.edu.tr

Spearman Rank korelasyonu kullanılmıştır. İki değişken arasında Spearman $\rho > 0.7$ yüksek, $0.7 > \rho > 0.5$ orta ve $\rho < 0.5$ ise zayıf korelasyonu göstermektedir. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. IFN- γ , IgG-S ve IgG-N düzeyleri açısından 1. ve 2. gruplarda erkekler ve kadınlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki grupta da yaş ile bağışıklık parametreleri arasında önemli düzeyde bir korelasyon saptanmamıştır. Aşı olan ve hastalık geçiren gruplardaki erkeklerin her üç bağışıklık parametresi de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulunmuştur. Kadınlarda ise iki grup arasında antikor düzeyleri anlamlı bir farklılık göstermemesine rağmen IFN- γ titreleri önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın iki grup karşılaştırıldığında IgG-S titrelerinde anlamlı fark saptanmazken, IgG-N ve IFN- γ titreleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir. Aşı olanlarda antikor ve IFN- γ seviyeleri, hastalık geçirenlerde saptanan değerlere kıyasla daha düşük ölçülmüştür. İki doz CoronaVac aşısının hücresel ve humoral yanıtları doğal SARS-CoV-2 enfeksiyonu tarafından oluşanlara göre anlamlı düzeyde düşük kalmaktadır.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2; bağışık yanıt; Coronavac; interferon gama (IFN- γ), spike antikor (IgG-S).

ABSTRACT

For limiting the coronavirus disease-2019 (COVID-19) pandemic, the effects on both humoral and cellular immune responses due to vaccines and previous infection should be taken into consideration. In some of the studies about the humoral immune response of the virus and different vaccines, it has been suggested that there can be a discordance between cellular and humoral immune responses during COVID-19 infection. The aim of this study was to determine the effects of humoral and cellular immune responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) antigens in three groups of healthcare workers (HCWs) who were vaccinated with two doses of inactivated virus vaccine (CoronaVac), non-vaccinated and recovered COVID-19 infection and non-infected healthy controls by comparing the variables of gender and age and to examine the relationships between them. In this study, the antibody recognizing the receptor binding domain (RBD) of the spike (S) glycoprotein (IgG-S), nucleocapsid protein (IgG-N) of SARS CoV-2 and Interferon Gamma (IFN- γ) titres were determined among non-infected and vaccinated with two doses of inactivated virus vaccine (IVV) (n= 56, 1st group: 27 men, 29 women), non-vaccinated and COVID-19 convalescents (CG) (n= 41; 2nd group: 21 men, 20 women) and non-vaccinated and non-infected healthy controls (HCG) (n= 23, 3rd group: 10 men, 13 women) in 120 HCWs. Diagnosis of all the participants in COVID-19 CG was confirmed for SARS CoV2 infection with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) test according to manufacturer's instruction (Bio-speedy® SARS CoV-2 Double Gene RT-qPCR, Bioeksan R&D Technologies, Turkey). IgG-S and IgG-N antibody levels were determined quantitatively by Abbott Architect i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) system. (Qiagen, MD, USA). IFN- γ levels were determined by using the QuantiFERON SARS-CoV-2 Starter Blood Collection Tubes (Qiagen, MD, USA). All statistical data analysis were conducted using SPSS (version 22, IBM Corp., Armonk, NY, USA). Student's independent t-test or Mann-Whitney U test was used for the differences between bivariate groups and Spearman Rank correlation was used to evaluate the monotonic relationship between non-normally distributed data sets. Spearman $\rho > 0.7$ denotes high, $0.7 > \rho > 0.5$ moderate and $\rho < 0.5$ weak correlation between two variables. A p value of $p < 0.05$ was considered as significant. For each of the immunity parameters, there were no significant differences between males and females in the IVV group, as well as in the CG. In neither of the groups age and immunity parameters were found to be highly correlated. All three immunity parameters of males in CG and IVV groups significantly differed from each other. Although humoral immunity parameters of females between CG and IVV groups did not show any significant difference, the IFN- γ titres significantly differed from each other. There were no significant differences in the IgG-S titres between CG and IVV combined gender groups. However, IgG-N and IFN- γ titres significantly differed from each other between CG and IVV groups. Antibody and particularly IFN- γ levels in two dose CoronaVac vaccinated group were less pronounced in comparison to the observed responses in COVID-19 convalescents group, indicating that CoronaVac may induce substantially less robust and persistent cellular and humoral responses than natural SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2; immune response; coronavac; interferon gamma (IFN- γ), spike antibody (IgG-S).

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü 2020 yılında, 2019 yılının son aylarından bu yana pandemi şeklinde devam eden ve şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) virüsünün yol açtığı koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) hastalığına karşı Çin Halk Cumhuriyeti'nde üretilen Sinopharm (China National Pharmaceutical Group Co. Ltd. Pekin, Çin Halk Cumhuriyeti) ve CoronaVac (Sinovac Biotech, Pekin, Çin Halk Cumhuriyeti) inaktif virüs aşılara acil kullanım izni vermiştir¹⁻⁴.

SARS-CoV-2 virüsüne karşı üretilen aşılardan ve SARS-CoV-2'nin kendisinin humoral immün yanıt dinamiklerine etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır⁵⁻⁹. COVID-19 pandemisini sınırlamak için, aşılardan ve geçirilmiş enfeksiyonların hem humoral hem de hücresel immün yanıtlar üzerindeki etkilerini dikkate almak gereklidir.

COVID-19 geçirenlerde hücresel ve humoral immün yanıtlar arasında bazı uyumsuzluklar olduğunu gösteren çalışmalar vardır. 2011 yılında yayımlanan bir kohort çalışmasında anti-SARS-CoV antikorlarının tespit edilemez olduğu ve çalışmaya katılanların hiçbirinde özgül bellek B hücrelerinin olmadığı gösterilirken, katılımcıların yarısının bellek T hücrelerine sahip olduğu saptanmıştır⁷. Bir başka çalışmada SARS-CoV-2'ye karşı antikor seviyesinin düşük veya tespit edilemez olduğunda bile T hücresi yanıtının uyarılabildiği gösterilmiştir⁶. Bir aşının etkinliği, bağışıklık sistemini uyarması açısından doğal enfeksiyonu taklit edebilme yeteneği ile de ilişkilidir. Aşılanan ve enfeksiyon geçiren bireylerin kazanılmış immün sistem yanıtlarının dinamiklerini bilmek COVID-19 pandemisinin daha etkin yönetilmesini sağlayacaktır.

Bu çalışmada, üç grup sağlık çalışanında humoral ve hücresel immün yanıtların karşılaştırılması amaçlanmıştır. Birinci grup; aşı grubu (AG) iki kez inaktif virüs aşısı ile aşılanmış sağlık çalışanlarından oluşmuştur. İkinci grup; aşılanmamış, COVID-19 geçirmiş (konvalesan grup= KG) ve iyileşmiş bireylerden oluşmuştur. Üçüncü grup hiç aşılanmamış ve enfekte olmamış sağlıklı kontrol bireylerinden (SKG) oluşmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Etik Komitesi onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.06.2021 ve Karar No: 1455).

Çalışma Grupları

Çalışmamız Mart-Nisan 2020 tarihleri arasında, Yeditepe Üniversitesi Hastanelerinde üç grup sağlık çalışanı ile yapıldı.

Üç grupta toplam 120 sağlık çalışanının cinsiyet faktörleri de göz önünde bulundurularak, humoral ve hücresel immün yanıtlar arasındaki etkileşimleri araştırmak için SARS-CoV-2 spike (S) antikorları (IgG-S), SARS CoV-2'nin nükleokapsid proteinine karşı gelişen antikor (IgG-N) ve interferon gamma (IFN- γ) titreleri karşılaştırıldı. Gruplar; I. İki kez inaktif virüs aşısı ile aşılanmış sağlıklı çalışanlar (AG), II. COVID-19 geçirmiş ve iyileşmiş bireyler (KG), III. Sağlıklı kontrol grubu olan sağlık çalışanlarıdır (SKG), (Tablo 1).

Tablo 1. Katılımcıların Demografik Özellikleri

Grup	Değişken(ler)	Erkek	Kadın	Birleşik
AG	Katılımcı Sayı	27	29	56
	Yaş, mean (SD), [min-max], yıl	39.96 (11.22) [23-65]	39.1 (10.78) [24-57]	39.5 (10.9) [23-65]
KG	Katılımcı Sayı	21	20	41
	Yaş, mean (SD), [min-max], yıl	34.81 (9.72) [21-60]	30.95 (7.52) [23-52]	32.9 (8.8) [21-60]
SKG	Katılımcı Sayı	10	13	23
	Yaş, mean (SD), [min-max], yıl	32 (5.7) [24-40]	30.15 (7.03) [23-43]	30.96 (6.41) [23-43]

CoronaVac aşısı, AG grubuna dahil edilmek için rastgele seçilen 56 sağlık çalışanının (27 erkek, 29 kadın) içinde bulunduğu üniversitemiz hastanelerindeki 1030 sağlık çalışanına iki doz halinde dört hafta arayla 600 SU SARS-CoV-2 antijen içeren 0.5ml'lik doz halinde uygulandı.

İkinci çalışma grubuna, hiç COVID-19 aşısı olmamış fakat daha önce semptomatik enfeksiyon geçirmiş 41 sağlık çalışanı (21 erkek ve 20 kadın) dahil edildi. Bu gruptaki katılımcıların SARS-CoV-2 enfeksiyonu tanısı RT-PCR testi pozitifliği ile belirlendi. Test üretici firmanın (Bio-speedy® SARS CoV-2 Double Gene RT-qPCR, Bioeksen R&D Technologies, Türkiye) talimatlarına göre çalışıldı.

SKG ise COVID-19 enfeksiyon öyküsü (semptomatik ya da asemptomatik) olmayan ve aşılammış 23 sağlık çalışanından (10 erkek ve 13 kadın) oluşturuldu.

Çalışmaya dahil edilme sürecinde, bireylerin kabulü aşağıdaki kriterlere göre yapıldı⁴:

i) COVID 19 geçirmiş katılımcılar için koenfeksiyona neden olabilecek diğer solunum yolu enfeksiyonlarının olmaması, ii) böbrek yetmezliği ya da diyabet gibi kronik hastalıklara sahip olmama, iii) sigara içmeme, iv) 20-65 yaş arası olma v) gebe olmama, vi) immünsupresif ilaç kullanmama.

Örnek Toplama ve Analiz

Serolojik deneyler için 5 ml vacutainer kan toplama tüplerine, IFN- γ titreleri ölçümü için 1 ml'lik dört adet vacutainer tüpe (Nil, TB1, TB2 ve Mitogen) periferik kan örnekleri toplandı. Örnekler analiz yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Deneyler, Yeditepe Üniversitesi İhtisas Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışıldı.

Seroloji

SARS-CoV-2'nin anti-spike (IgG-S) antikor seviyeleri ve anti-nükleokapsid (IgG-N) antikorları Abbott Architect i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, US) sistemi kullanılarak çalışmaya katılanların serumlarında nicel olarak ölçüldü.

Interferon Gamma (IFN- γ) Salınım Testi (IGRA)

Hücrel immüniteyi değerlendirmek amacıyla IFN- γ titreleri QuantiFERON SARS-CoV-2 Başlangıç Seti (Qiagen, MD, ABD) kullanılarak elde edildi. Bu amaçla, SARS-CoV-2'ye özgü antijenler kombinasyonu SARS-CoV-2 Ag1 ve SARS-CoV-2 Ag2'yi içeren antijen tüpleri kullanıldı.

Periferik kan örnekleri doğrudan QFN SARS-CoV-2 kan alma tüplerine toplandı ve 20 saat boyunca $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lerde dikey biçimde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 15 dakika boyunca 3000 RCF'te santrifüj edildi. Plazma örnekleri bölünerek test edilinceye kadar üreticinin talimatları doğrultusunda -20°C 'de saklandı. Stimüle edilmiş örneklerden elde edilen plazmalarda IFN- γ düzeyini belirlemek için QuantiFERON ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kullanıldı.

Üreticinin belirlediği anti-SARS-CoV-2 IgG-S ve IgG-N titre eşikleri sırasıyla mililitre başına 50 rastgele ünite/ (AU/ml) ve 1.4 AU/ml'dir. SARS-CoV-2'ye yanıtları ayırt etmek için IGRA eşik değerleri henüz belirlenmediği için, plazma içindeki IFN- γ konsantrasyon değeri uluslararası mililitre başına birim (IU/ml) değerleri ile raporlanmaktadır. Bu çalışmada IFN- γ eşik değeri 0.15 IU/ml olarak alındı.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel veri analizleri ve grafikler SPSS (version 22, IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. İki değişkenli gruplar arasındaki farklılıklar Student's bağımsız t test ya da çift kuyruklu Mann-Whitney U testten uygun olanı ile yapıldı. Normal olmayan dağılımlı veri kümeleri arasındaki monotonik ilişkiyi değerlendirmek için Spearman rank korelasyonu kullanıldı. İki değişken arasındaki korelasyonlar Spearman rho > 0.7 yüksek, $0.7 > \text{rho} > 0.5$ orta ve $\text{rho} < 0.5$ zayıf olarak gösterildi. Örnek bir ortalama, dağılım normal olursa belirtildi, dağılım normal değil ise medyan değer verildi. p değeri, $p < 0.05$ olarak anlamlı kabul edildi.

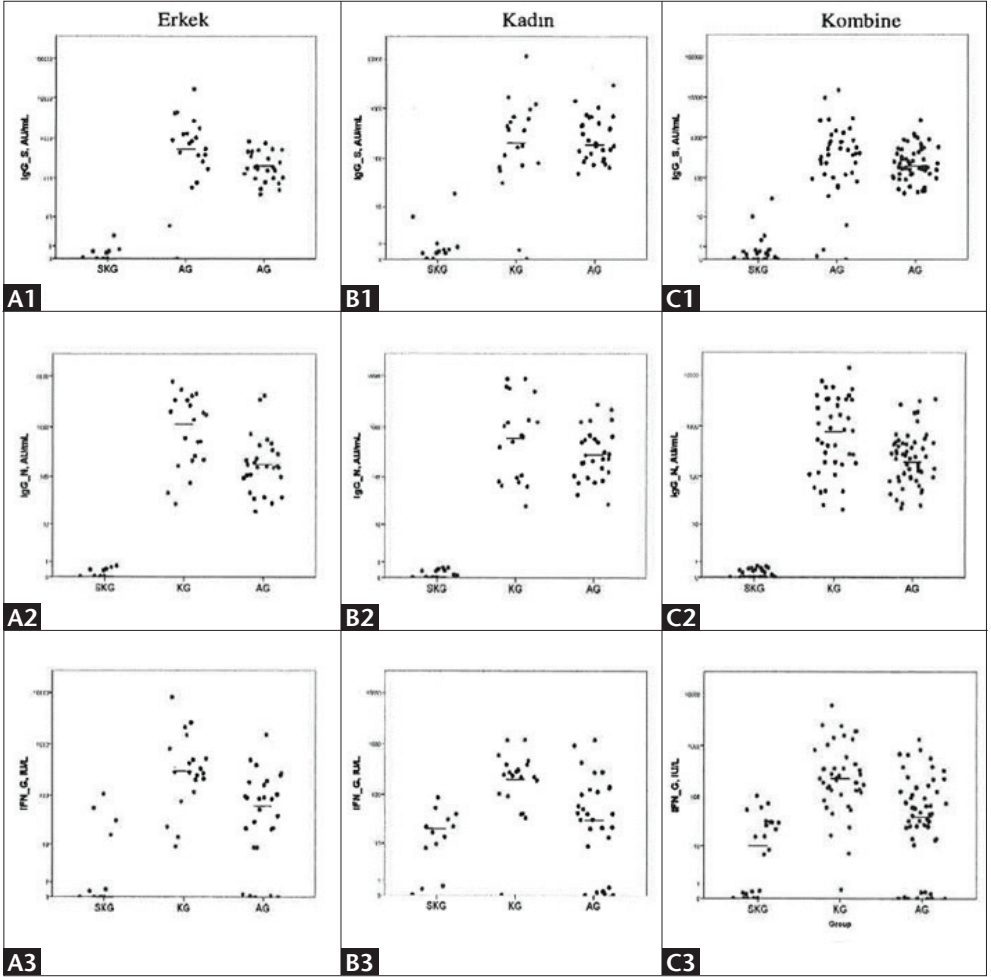
BULGULAR

Toplam 120 katılımcıdan alınan periferik kan örnekleri anti SARS-CoV-2 IgG-S ve IgG-N ile IFN- γ düzeyleri açısından analiz edilmiştir.

Tüm çalışma gruplarındaki erkekler, kadınlar ve karışık yaş gruplarında ölçülen parametrelerin karşılaştırılması Şekil 1'de gösterilmiştir.

Her bir değişken için eşik değerler kullanılarak humoral ve hücrel yanıtların iki boyutlu görselleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Burada eşik çizgilerinin her bir grafikte koordinat eksenlerini göstereceğinden hareket ederek dört kadranlı grafikler oluşturulmuştur.

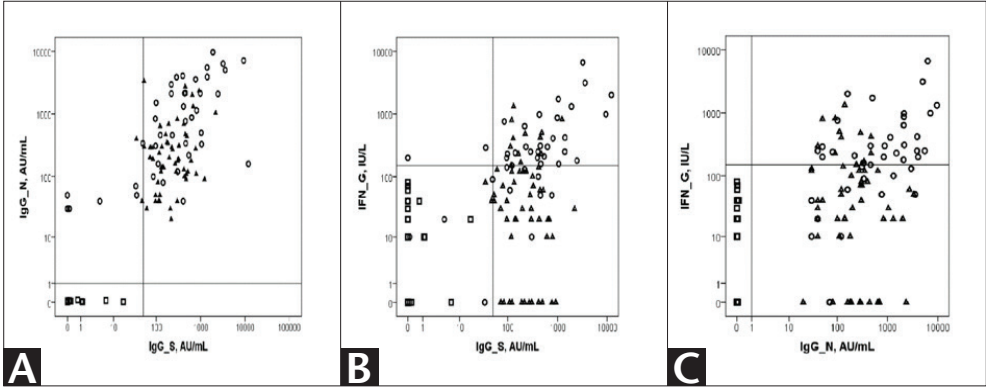
Aşı grubu (AG)'na ait demografik ve tanımlayıcı istatistikler sırasıyla, Tablo I ve Tablo II'de gösterilmiştir. AG'de her iki cinsiyet için tespit edilen yaş yapısı anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Bağımsız t testi, $p > 0.05$). Ayrıca her iki cinsiyet için IgG-S, IgG-N ve IFN- γ örneklem değerleri normal dağılım göstermemiştir.



Şekil 1. İnaktif virüs aşılı (AG) çalışma grubu, COVID-19 geçirmiş (KG) ve sağlıklı kontrollerdeki (SKG) ölçülen parametre dağılımlarının cinsiyete dayalı karşılaştırması.

A1-A3: Erkekler, B1-B3: Kadınlar, C1-C3: Birleşik grup. İncelenen üç grup arasında ölçülen her bir IgG-S, IgG-N ve IFN- γ titresi için medyan değerler her zaman COVID-19 geçirmiş bireylerde en yüksek ve sağlıklı kontrollerde en düşüktü. Bu örüntü cinsiyetler arasında değişmemektedir. Yatay çizgiler medyan değerleri temsil etmektedir. Her bir şekil içinde soldaki nokta kümeleri sağlıklı kontrol grubunu (SKG), ortadaki kümeler COVID-19 geçirmiş (KG) gruptaki ve sağdaki veri kümeleri ise inaktif virüs aşılı çalışma grubundaki (AG) sonuçları temsil etmektedir.

AG'de ölçülen erkek ve kadın gruplarının IgG-S ve IgG-N değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Mann-Whitney $U_{\text{IgG-S}} = 348$; Mann-Whitney $U_{\text{IgG-N}} = 297.5$; iki grup için $p > 0.05$). Yirmi yedi erkek ve 29 kadın arasında IFN- γ değerlerinin dağılımında cinsiyet kategorisi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Mann-Whitney U test; 352; $p > 0.05$).



Şekil 2. Her değişken için eşik değerleri kullanılarak elde edilen humoral ve hücresel yanıt görselleri. Eşik çizgilerinin her grafikte ortogonal koordinat eksenlerini oluşturduğu varsayılarak dört kadrana oluşturulmuştur. **A)** Spike antikorlarına karşı nükleokapsid antikorları. **B)** Spike antikorları ve interferon gamma titreleri. **C)** Nükleokapsid antikorları ve interferon gamma titreleri. Bu grafiklerde birinci kadrantlar, her çalışma grubunda ilgili SARS-CoV-2 bağışıklık parametrelerine karşı yanıtın etkinliğinin göstergeleridir. Üçgen şekiller, CoronaVac aşılı bireylerin (AG) tepkilerini, daireler veriler COVID-19 geçirmiş gruptaki bireylerin (KG) tepkilerini, karesel şekiller ise her zaman üçüncü kadrantla sınırlı olan sağlıklı kontrol grubundaki kişilerin (SKG) yanıtlarını göstermektedir. B ve C'deki grafikler CoronaVac ile aşılanmış gruptaki hücresel yanıtın (interferon gama sitokin salınımı açısından), COVID-19 geçirmiş grubun hücresel yanıtına göre daha az etkin olduğunu göstermektedir

Yirmi yedi erkeğin yaşları ile ölçülen IgG-S arasındaki korelasyon ve aynı zamanda IFN- γ titreleri ile korelasyonu ve kadınların yaşları ile IgG-S arasındaki korelasyonu ve aynı zamanda IFN- γ titreleri ile korelasyonu zayıf bulunmuştur. Erkek ve kadınların toplamından oluşan kombine IgG-S değerlerinin analizi ve bu gruptaki tüm katılımcıların yaşları arasında anlamlı bir korelasyon görülmemiştir.

Grubun erkek ve kadın katılımcılarının yaşlarının IgG-N değerleri ile korelasyonu anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada tüm IFN- γ değerleri ve 56 AG katılımcısının yaşları zayıf bir negatif korelasyon göstermiştir.

AG'de iki cinsiyet için ölçülen IgG-S değeri ve karşılık gelen IFN- γ değeri arasındaki korelasyon zayıftır. Benzer biçimde, AG'deki erkekler ve kadınlar arasındaki IgG-N ve IFN- γ titreleri ve 56 adet IgG-N ve 56 adet IFN- γ titreleri arasındaki tüm korelasyonlar ihmal edilebilir düzeyde tespit edilmiştir. Tablo III, AG'deki korelasyon değerlerini özetlemektedir. AG grubta yer alan demografik ve tanımlayıcı istatistikler sırasıyla, Tablo I ve Tablo II'de gösterilmiştir.

Konvalesan grubu (KG)'nda her iki cinsiyet için yaş dağılımları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (t testi, $p > 0.05$). KG'deki erkek katılımcıların yaşları ile IgG-S, IgG-N ve IFN- γ titreleri arasındaki korelasyon düzeyi düşük bulunmuştur. KG'deki kadın katılımcıların yaşları ile IgG-S, IgG-N ve IFN- γ titreleri arasındaki korelasyon düzeyi düşük olarak saptanmıştır. KG'deki kadın katılımcıların yaşları ile IgG-N arasında orta düzeyde pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir. Tümüyle bakıldığında, KG'deki 41 sağlık çalışanının yaşları ile IgG-S, IgG-N ve IFN- γ titreleri arasındaki korelasyon düzeyi düşük olarak saptanmıştır.

Tablo II. Üç Grupta Ölçülen IgG-S, IgG-N ve IFN-γ Titrlerinin İstatistiksel Değerleri

Grup	Değişken	Erkek			Kadın			Birleşik		
		IgG-S (AU/mL)	IgG-N (AU/L)	IFN-G (IU/L)	IgG-S (AU/ml)	IgG-N (AU/L)	IFN-G (IU/L)	IgG-S (AU/ml)	IgG-N (AU/L)	IFN-G (IU/L)
AG	Mean	249.8	404.1	146.7	392.4	468.97	126.2	323.62	437.7	136.1
	Medyan	207.3	180	60	190.4	280	30	201.9	195	40
	Ss	172.7	782.8	271.7	459.4	570.2	218.9	356	675.5	243.7
	Minimum	35	20	0	46.8	40	0	35	20	0
	Maksimum	613.4	3360	1330	2198	2350	820	2198	3360	1330
KG	Mean	1425.2	1704.3	889	823.2	1863	292	1131.5	1781.7	597.8
	Medyan	541.4	1140	300	214.9	615	200	407.8	770	230
	Ss	2634.9	1814.5	1541.6	2068	2751	338.5	2365.5	2290.7	1155
	Minimum	0	30	10	0	30	0	0	30	0
	Maksimum	12034	6340	6660	9368	9680	1320	12034	9680	6660
SKG	Mean	0.15	30	18	1.95	30	20	1.17	30	19.13
	Medyan	0	30	0	0.00	20	20	0.00	20	10
	Ss	0.38	20	30.84	4.88	20	18.26	3.73	20	23.92
	Minimum	0	10	0	0.00	20	0	0.00	10	0
	Maksimum	1.2	60	80	17.10	90	60	17.10	90	80

AG: İnaktif virus aşısı (AC) ile aşılanmış (CoronaVac) Grup, KG: COVID-19 geçirmiş grup, SKG: Sağlıklı kontrol grubu, Ss: Standart sapma.

Tablo III. AG ve KG Gruplarında IgG-S ve Yaşlar, IFN- γ ve Yaşlar, IFN- γ ve IgG-S, IgG-N ve Yaşlar, IgG-S ve IgG-N, IgG-N ve IFN- γ Arasındaki Spearman Korelasyon Katsayıları

Grup	Sub-grup	n	IgGS-Yaş	IgGN-Yaş	IFNg-Yaş	IgGS-IgGN	IgGS-IFNg	IgGN-IFNg
AG	Erkek	27	-0.181	-0.005	-0.383	-0.034	-0.173	-0.173
	Kadın	29	0.103	0.119	-0.100	0.396	0.016	-0.272
	Birleşik	56	-0.036	0.023	-0.231	0.193	-0.092	-0.153
KG	Erkek	20	0.419	-0.066	0.203	0.514	0.649	0.516
	Kadın	21	0.238	0.594	0.369	0.689	0.530	0.485
	Birleşik	41	0.335	0.270	0.248	0.660	0.598	0.500

AG: Aşı grubu, KG: Konvalesan grubu.

KG'de her iki cinsiyet için ölçülen IgG-S, IgG-N ve IFN- γ değerleri normal dağılım göstermemiştir. KG erkek-KG kadın grupları IgG-S, IgG-N ve IFN- γ düzeyleri açısından anlamlı bir istatistiksel farklılık göstermemiştir (Mann-Whitney U_{IgG-S}= 142; Mann-Whitney U_{IgG-N}= 193.5; ve Mann-Whitney U_{IFN- γ} = 159.5; tüm testler için, $p > 0.05$).

KG erkek katılımcılarının IgG-S ve IFN- γ değerleri için orta-yüksek düzey aralığında bir korelasyon gözlenmiştir. IgG-S ve IgG-N değerleri ve IgG-N ve IFN- γ değerlerinde orta düzeyde pozitif korelasyon saptanmıştır. Diğer taraftan, KG kadın katılımcıları için, IgG-S ve IFN- γ değerleri arasında orta düzeyde bir korelasyon gözlenmiştir. IFN- γ ve IgG-N titreleri düşük-orta düzey aralığında bir korelasyona sahipken, IgG-S ve IgG-N değerleri arasında ise orta-yüksek düzey aralığında bir korelasyon saptanmıştır.

Erkek ve kadınların toplamından oluşan kombine KG'de, IFN- γ ve IgG-N titreleri arasında orta düzeyde ve pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu grupta IgG-S ve IFN- γ değerleri de orta düzeyde pozitif korelasyona sahipken, IgG-S ve IgG-N titreleri ise orta-yüksek aralığında bir korelasyon göstermiştir. KG için Spearman korelasyon katsayılarının özeti Tablo III'te verilmiştir.

Sağlıklı kontrol grubu (SKG)'na ait demografik ve tanımlayıcı istatistikler sırasıyla, Tablo I ve Tablo II'de gösterilmiştir. Bu gruptaki her iki cinsiyetin yaş dağılımı birbirlerine göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Student's t test, $p > 0.05$). Mann-Whitney U testleri, erkek ve kadın SKG katılımcılarının IgG-S, IgG-N ve IFN-G değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir ($U_{IgG-S} = 60.5$, $U_{IgG-N} = 63$, $U_{IFN-G} = 47$, $p > 0.05$).

Mann-Whitney testlerinin sonucunda ulaşılan anlamlılık seviyeleri aşağıda gösterilmiştir:

i). KG ve AG gruplarının erkek katılımcılarında çalışılan üç immünite parametresinin tümü birbirlerinden anlamlı olarak farklı saptanmıştır.

ii). KG ve AG gruplarındaki kadın katılımcılarda humoral parametreler anlamlı farklılıklar göstermemesine rağmen, IFN- γ titreleri anlamlı farklılıklar göstermiştir.

iii). KG ve AG kombine cinsiyet grupları IgG-S titrelerinde anlamlı farklılık göstermemiştir. Ancak KG IgG-N and IFN- γ titrelerinin anlamlı ölçüde yüksek medyan değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

Her bir erkek, kadın ve birleşik cinsiyet gruplarında IgG-S, IgG-N and IFN- γ titrelerinin medyan değerleri AG ve SKG'lere göre daha yüksek bulunmuştur.

TARTIŞMA

Tam kan IFN- γ salınım testleri (IGRA), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ve sitomegalovirüs (CMV)-enfeksiyonlarında halen kullanılmaktadır¹⁰⁻¹².

IGRA testleri, kemiluminisans testleri (CLIA) ve ELISA ile karşılaştırılabilen sonuçlar vermektedir. IGRA testleri SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıtları ölçmek için umut veren ilave bir araç olmaktadır. Geniş kapsamlı kullanım için uygundur ve immün sistem ile ilişkili hastalıkları olan insanlar için önemli olmaktadır¹³.

Çoğunlukla eşik değerlerin altında kalsalar da COVID-19'a hassas SKG'lerde ölçülen SARS-CoV-2'ye özel antikorlar ve IFN- γ titrelerinin varlığı, daha önceden maruz kalınan diğer endemik koronavirüslerden veya otoimmün hastalıklardan indüklenmiş çapraz reaktif antikorlara ve T hücrelerinin varlığına bağlanabilir¹⁴⁻¹⁶. Bu gözlem ile ilgili başka bir açıklama ise, sağlık çalışanlarının daha önce asemptomatik COVID-19 enfeksiyonuna maruz kalıp kantitatif RT-PCR (qRT-PCR) testi ile bunu doğrulamamış olma olasılıklarıdır. Bu nedenle, sağlık çalışanlarında doğal olarak edinilmiş humoral ve hücrel korunma çok önceden düşük seviyelere (eşik altı) düşmüş olabilir.

Bazı COVID-19 geçirmiş bireylerde S/N özel antikorlar antikorları olmaksızın IFN- γ yanıtları yanıtlarının olduğu da gözlemlenmiştir. Bu durum SARS-CoV ile ilgili daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak, hücrel immünitenin humoral immüniteden bağımsız sürdürülebildiğini göstermektedir¹⁷⁻¹⁹.

Koruyucu immünite sağlamada SARS-CoV-2'ye karşı kullanılan bazı aşilar, nötralize eden antikorların yanında ideal ve uzun süreli T hücresi yanıtları oluşturabilmektedirler²⁰. Klinik çalışmalarda, mRNA-1273 (Moderna™) aşısının sitokin yanıtları olmaksızın CD4+ Th1-yanıtı ve CD8+ T hücresi yanıtları oluşturduğu rapor edilmiştir²¹. Benzer sonuçlar BNT162b2, (Pfizer/BioNTech™) aşısı ve bir şempanze adenovirüs-vektör aşısı olan, ChAdOx1, (Oxford Üniversitesi/AstraZeneca™) aşı uygulamalarından da elde edilmiştir²²⁻²⁵. Ancak, CoronaVac aşı denemelerinde faz 1/2 katılımcılarında aşuya bağlı T hücresi yanıtının düşük olduğu ve CD8+ hücreleri tarafından oluşturulan immün reaksiyonların değerlendirilmesinin faz 1/2 CoronaVac çalışmasına dahil edilmediği ifade edilmektedir çünkü inaktif virüs aşılarının güçlü CD8+ hücreleri oluşturması beklenmemektedir³. Bu durum bizim bulgularımızla uyumaktadır ve AG'deki IFN- γ titrelerinin düşük değerlerini açıklayabilir niteliktedir (Tablo II).

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır: i). AG'de aşı öncesi T hücresi yanıtlarını değerlendirme imkanı olmamıştır. ii). Bu kesitsel bir çalışma olduğu için enfeksiyonun

başlangıcından (ya da hastalığın iyileşmesinden) itibaren uzun süreli bir çalışma yapılmamış ve hastalığın şiddeti (ayakta tedavi, hastaneye ya da yoğun bakıma yatış) COVID-19 geçirenler grubundaki her bir sağlık çalışanı için göz önünde bulundurulmamıştır. *iii*). Bu çalışma IGRA ile yapılan interferon gama analizi çerçevesinde sınırlı kaldığı için hücresel bağışıklık yanıtlarını kısmen ele alabilmiştir. *iv*). Bu çalışmada kullandığımız örneklem grubu (n= 120) tüm nüfusu temsil etme açısından yeterli olmayabilir.

IFN- γ , IgG-S ve IgG-N düzeyleri açısından COVID-19 aşısı olan AG ve COVID-19 hastalığı geçiren KG gruplarındaki erkekler ve kadınlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki grupta da yaş ile bağışıklık parametreleri arasında önemli düzeyde bir korelasyon saptanmamıştır. Aşısı olan ve hastalık geçiren gruplardaki erkeklerin her üç bağışıklık parametresi de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde birbirinden farklı bulunmuştur.

Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın iki grup karşılaştırıldığında IgG-S titrelerinde anlamlı fark saptanmazken, IgG-N ve IFN- γ titreleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir.

İki doz CoronaVac aşısı ile uyarılan hücresel ve humoral yanıtlar, doğal SARS-CoV-2 enfeksiyonu tarafından uyarılanlara göre anlamlı düzeyde düşük kalmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Bilimsel Araştırma Platformu (No: 2021-05-25T14_28_03), Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bilimsel Araştırma Değerlendirme Komisyonu (Tarih: 09.06.2020) ve Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırma Etik Komitesi onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.06.2021 ve Karar No: 1455).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, et al. Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA* 2020; 324(10): 951-60. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15543>
2. Al Kaabi N, Zhang Y, Xia S, Yang Y, Al Qahtani M, 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): 35-45. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.8565>
3. Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis* 2021; 21(2): 181-92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
4. Tanriover MD, Doğanay HL, Akova M, Güner HR, Alpaz Azap A, Akhan S, et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *Lancet* 2021; 398(10296): 213-22. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01429-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01429-X)
5. Wu J, Liang B, Chen C, Wang H, Fang Y, Shen S, et al. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19. *Nature Communications* 2021; 12(1): 1813. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22034-1>

6. Stephens DS, McElrath MJ. COVID-19 and the Path to Immunity. *JAMA* 2020; 324(13): 1279-281. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.16656>
7. Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrarmert J, Ma MJ, Lv H, et al. Lack of peripheral B cell memory responses in recovered patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A six years follow-up study. *J Immunol* 2011; 186(12): 7264-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903490>
8. Keskin AU, Bolukcu S, Ciragil P, Topkaya AE. SARS-CoV-2 specific antibody responses after third CoronaVac or BNT162b2 vaccine following two-dose CoronaVac vaccine regimen. *J Med Virol* 2022; 94(1):39-41. <https://doi.org/10.1002/jmv.27350>
9. Topkaya AE, Keskin AÜ, Dalan AB, Çiragil P. CoronaVac Aşısının İkinci Dozu COVID-19 Geçirmiş Kişilerde Antikor Düzeylerinin Düşmesine Neden Olabilir? *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(1): 139-42. <https://doi.org/10.5578/mb.20229913>
10. Petrone L, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Fard SN, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clinical Microbiology and Infection* 2020; 27(2): 286.e7-286.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.051> <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.051>
11. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27(1): 3-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>
12. Echeverría G, Guevarab A, Colomac J, Ruizd AM, Vasqueze MM, Tejerac E, et al. Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 Interferon-Gamma Release Assay. *Int J Infect Dis* 2021; 105: 21-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
13. Martínez-Gallo M, Juliana Esperalba-Esquerra J, Pujol-Borrell R, Sandá V, Arrese-Muñoz I, Naval CF, et al. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers. *medRxiv* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254472>.
14. 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(17): 1489-501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
15. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci Immunol* 2020; 5(48): eabd2071. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abd2071>
16. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* 2020; 584(7821): 457-62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
17. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin J-B, Olsson A, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 2020; 183(1): 158-68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>
18. Li CK-F, Wu H, Yan H, Ma S, Wang L, Zhang M, et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J Immunol* 2008; 181(8): 5490-500. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5490>
19. Ong DSY, Fragkou PC, Schweitzer VA, Chemaly RF, Moschopoulos CD, Skevaki C, on behalf of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Respiratory Viruses (ESGREV). How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27(7): 981-6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001> <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.001>
20. DiPiazza AT, Graham BS, Ruckwardt TJ. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 3:363. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.060>
21. Anderson EJ, Roupael NG, Widge AT, Jackson LA, Roberts PC, Makhene M, et al. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in older adults. *N Engl J Med* 2020; 383(25): 2427e38.
22. 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. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>

23. Jackson LA, Anderson EJ, Roupael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2, preliminary report. *N Engl J Med* 2020; 383(20): 1920-31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2022483>
24. 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 SARSCoV- 2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2020; 396(10249): 467-78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
25. Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet* 2020; 395(10240): 1845-54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31208-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3)