

Sağlık Çalışanlarında Uygulanan İki Doz İnaktif SARS-CoV-2 Aşısının Ardından Anti-Spike Ölçümünde İki Farklı Kantitatif Testin Karşılaştırılması

Comparison of Two Different Quantitative Tests for Anti-Spike Measurement After Two Doses of Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Healthcare Professionals

Yeşim ÇEKİN(ID), Aylin ERMAN-DALOĞLU(ID)

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Antalya.
University of Health Sciences, Antalya Training and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Antalya, Türkiye.

Makale Atfı: Çekin Y, Erman-Daloğlu A. Sağlık çalışanlarında uygulanan iki doz inaktif SARS-CoV-2 aşısının ardından anti-spike ölçümünde iki farklı kantitatif testin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56:1-12.

ÖZ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 [(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] antijenlerine karşı oluşan antikorları saptamaya yönelik geliştirilen serolojik testler başlıklık düzeyinin gösterilmesinin yanı sıra, aşı etkinliğinin ve koruma sürelerinin belirlenmesi gibi alanlarda kullanılmakta ve testlerin değerlendirilmesi, sonuçların yorumlanması halen araştırılmaktadır. Bu çalışmada, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) geçirmemiş sağlık çalışanlarında anti-spike ölçüm değerlerinin karşılaştırılması amacıyla, iki doz inaktif SARS-CoV-2 aşısı ile aşılama sonrasında, aynı birimde sonuç veren, farklı yöntem ile çalışan iki ticari kantitatif antikor saptama testine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 90 sağlık çalışanına ait serum örneklerinin Elecsys anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ve Aeskulisa anti-SARS-CoV-2 S1 (Aesku diagnostics, Wendelsheim, Almanya) kiti ile elde edilen sonuçları, her iki üretici firmanın önerileri doğrultusunda kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Kantitatif değerler ayrıca ünite/mL (U/mL) olarak verilen üretici firmaların Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) anti-SARS-CoV-2 uluslararası standardı ile gerçekleştirdikleri çalışmalar neticesinde sağlanan çevrim faktörü ile bağlayıcı antikor ünite (BAU)/mL'ye çevrilerek de değerlendirilmiştir. Anti-SARS-CoV-2 ölçümleri neticesinde; Elecsys kiti ile 86 (%95.6) örnekte pozitif, 4 (%4.4) örnekte negatif sonuç, Aeskulisa kiti ile yapılan ölçümlerde 55 (%61.1) pozitif, 20 (%22.2) negatif ve 15 (%16.7) örnekte ara değer olacak şekilde sonuçlar alınmıştır. Her iki kit ile ortak olarak dört örnekte negatif, 55 örnekte pozitif sonuç elde edilmiştir. Aeskulisa kiti ile ara değerdeki 15 örnek dışında kalan 75 örnekte her iki kit ile gözlenen yüzde uyum 78.6 olarak bulunurken, istatistiksel olarak Cohen's kappa değeri orta düzeye yakın derecede uyumu gösterecek şekilde 0.26 olarak hesaplanmıştır. Her iki kitin tüm örneklerdeki ölçümlerinin korelasyon analizinde yüksek korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.611$). Her iki kit ile yapılan kantitatif ölçümlerin ortalamalarına karşı farklarının saçılımı Bland-Altman analizi ile incelendiğinde; Elecsys kiti ile Aeskulisa kitinden daha yüksek ölçümler yapılmış, ortalama fark 58.68 ± 52.62 olarak bulunmuştur. Üretici firmalar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde çevrim faktörü ile U/mL değerleri BAU/mL'ye çevrildiğinde ortalama farkın 41.09 ± 50.22 'ye gerilediği gözlenmiştir. Bütün örneklemede Elecsys

İletişim (Correspondence): Dr. Yeşim Çekin, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı İdari Sorumlusu, 07100, Antalya, Türkiye. **Tel (Phone):** 0505 795 8298, **E-posta (E-mail):** yesimcekin@hotmail.com

kiti ile yapılan ölçümler Aeskulisa kitine göre ortalama 4.58 ± 3.44 kat daha yüksek bulunurken ölçümler BAU/mL değerlerinde tekrar hesaplandığında 2.35 ± 1.77 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan Elecsys kiti ile bulunan ölçüm değerleri Aeskulisa kitine göre daha yüksek bulunmuş ve kalitatif olarak Elecsys kiti ile Aeskulisa kitinden daha çok pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu çalışmada her iki kit ile uyumlu sonuç alınan örneklerde ($n= 55$) Elecsys kit ölçümleri Aeskulisa kit ölçümlerine göre ortalama 4.06 kat daha yüksek saptanmıştır. Aeskulisa kiti ile ara değerde raporlanan 15 hasta ve negatif sonuç verilen 16 hasta için bu oranların sırasıyla 4.30 ve 7.72 değerlerine yükselmesi düşük antikor değerlerinde Aeskulisa kiti ile kantitasyon başarısının azaldığını düşündürmüştür. Anti-SARS-CoV-2 testlerinin birbirleri ile uyumu henüz sağlanmadığı için, bireysel bağışıklık izleminin aynı yöntem kullanılarak yapılması ve BAU/mL'ye çevrilerek verilen sonuçların bile antijen alt birimine özgü olması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, antikor, kantitatif, spike.

ABSTRACT

Serological tests developed to detect antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus disease 2 (SARS-CoV-2) antigens are used to demonstrate immunity level, vaccine efficacy and duration of protection. However, the evaluation of these tests and the interpretation of the results are still under investigation. In this study, it was aimed to compare the anti-spike measurement values in healthcare workers who have not experienced coronavirus 2019 (COVID-19) after vaccination with two doses of inactivated SARS-CoV-2 vaccine with two commercial quantitative antibody detection tests which were used to give results in the same unit and work with different methods. The results obtained with Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and Aeskulisa Anti-SARS-CoV-2 S1 (Aesku diagnostics, Wendelsheim, Germany) kits of the serum samples of 90 healthcare workers were evaluated qualitatively and quantitatively in line with the recommendations of both manufacturers. Quantitative values given as units/ml (U/mL) were also evaluated by converting the binding antibody unit (BAU)/mL with the conversion factor obtained as a result of the studies carried out by the manufacturers with the World Health Organization (WHO) anti-SARS-CoV-2 international standard. Positive results were obtained in 86 (95.6%) samples and negative results in 4 (4.4%) samples with the Elecsys kit; 55 (61.1%) positive, 20 (22.2%) negative and 15 (16.7%) intermediate results were obtained with the Aeskulisa kit. In common with both kits, negative results were obtained in four samples, and positive results were obtained in 55 samples. While the percent agreement observed with both kits was found to be 78.6 in 75 samples, excluding 15 samples in the intermediate with Aeskulisa kit, Cohen's kappa value was calculated as 0.26, indicating a close to moderate agreement, statistically. A high correlation was observed in the correlation analysis of the measurements of both kits ($r= 0.611$). When the scattering of the differences against the mean of the quantitative measurements made with both kits was examined by Bland-Altman analysis; higher measurements were determined with the Elecsys kit than with the Aeskulisa kit and the mean difference was found to be 58.68 ± 52.62 . As a result of the studies carried out by the manufacturers, it was observed that the average difference decreased to 41.09 ± 50.22 when the U/mL values were converted to BAU/mL with the conversion factor. In the whole sampling, the measurements determined with the Elecsys kit were found to be 4.58 ± 3.44 times higher on average compared to the Aeskulisa kit while the measurements were found to be 2.35 ± 1.77 when the BAU/mL values were recalculated. The measurement values found with the Elecsys kit used in our study were found to be higher than that of Aeskulisa kit and qualitatively more positive results were obtained with Elecsys kit than with the Aeskulisa kit. In this study, Elecsys kit measurements were on average 4.06 times higher than Aeskulisa kit in samples ($n= 55$) with results compatible with both kits. The increase in these rates to 4.30 and 7.72 values, respectively, for 15 samples reported as intermediate and 16 as negative with the Aeskulisa kit, suggested that the success of quantitation decreased with the Aeskulisa kit at low antibody values. Since the harmonization of anti-SARS-CoV-2 tests has not yet been achieved, individual immune monitoring should be performed using the same method and even the results converted to BAU/mL should be specific to the antigen subunit.

Keywords: SARS-CoV-2, antibody, quantitative, spike.

GİRİŞ

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)]'nin neden olduğu koronavirüs 2019 (COVID-19) pandemisinin bütün dünyayı etkisi altına alması ile birlikte tanıya yönelik geliştirilen moleküler testlerin yanı sıra, SARS-CoV-2 antijenlerine karşı oluşan antikorları kalitatif ve kantitatif olarak saptamaya yönelik serolojik testler de geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen serolojik testler esas olarak iki proteini hedef almıştır¹. Yapılan klinik çalışmalarda yapısal ve yüksek oranda immünojenik bir protein olan nükleokapsite (N) karşı oluşan antikorların erken sentezlendiği ve erken azaldığı öne sürülmüştür^{2,3}. Etkenin konak hücre girişine aracılık eden spike (S) proteinine karşı oluşan antikorların ise, N proteinine karşı oluşanlardan genel olarak daha sonra ortaya çıktığı, nötralizan özelliğinin bulunduğu ve koruyuculuğunun daha uzun süreli olduğu belirtilmiştir⁴⁻⁶. Aynı zamanda aşuların da hedef bölgesi olan S proteinine karşı oluşan antikorların kantitatif olarak ölçümünü yapan farklı ticari firmalara ait testler ülkemizde de bulunmaktadır. Bu testler bağışıklık düzeyinin gösterilmesinin yanı sıra aşı etkinliğinin ve koruma sürelerinin belirlenmesi gibi alanlarda kullanılmakla birlikte testlerin değerlendirilmesi ve sonuçların yorumlanması halen araştırılmaktadır. Örneğin farklı ticari firmalara ait antikor kitleri; "receptor binding domain (RBD)" motifi, S1 alt birimi, S1/S2 formu ya da trimerik form gibi farklı S protein alt hedef bölgelerini kullanabilmekte, toplam immünoglobulin (Ig) ya da sadece IgG gibi farklı antikor tiplerini değerlendirebilmekte, farklı ölçüm yöntemlerini kullanabilmekte, farklı birimlerle sonuç verebilmekte ve dolayısıyla da klinik açıdan farklı yorumlamalara neden olabilmektedir⁷⁻⁹.

Bu çalışmada, COVID-19 geçirmemiş sağlık çalışanlarında anti-S ölçüm değerlerinin karşılaştırılması amacıyla, iki doz inaktif SARS-CoV-2 aşısı ile aşılama sonrasında, aynı birimde sonuç veren, farklı yöntem ile çalışan iki ticari kantitatif antikor saptama testine ait sonuçlar değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Tarih: 14.4.2022 ve Karar No: 8-22) ve T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü (Tarih: 20.3.2022 ve Karar No: 2022-03-20T07-09-33) tarafından onaylandı.

Hastanemizde görev alan, COVID-19 geçirmemiş, herhangi bir immün yetersizliği bulunmayan sağlık çalışanlarından ikinci doz CoronaVac uygulamasından bir ay sonra elde edilen 90 serum örneğindeki SARS-CoV-2 anti-S değerleri iki farklı ticari kit ile çalışılarak ölçüldü. Antikor testi olarak; Elecsys anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ve Aeskulisa anti-SARS-CoV-2 S1 (Aesku diagnostics, Wendelsheim, Almanya) kitleri kullanıldı.

Elecsys, SARS-CoV-2 S proteininin S1 alt birimindeki RBD'e karşı oluşan öncelikli olarak IgG ve aynı zamanda IgM ve IgA total antikorlarını kalitatif ve kantitatif olarak saptayan, tek aşamalı çift antijen sandviç yöntemini kullanan *electrochemiluminescence*

Tablo 1. Anti-SARS-CoV-2 Kitlerinin Özellikleri

Kit	Hedef antijen	Saptanan antikor	Yöntem	Cut-off (Sınır değeri)	Lineer aralık	Çevrim faktörü
Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S	S1 (RBD)	Toplam antikor	ECLIA	0.8	0.4-250	1.0288
Aeskulisa Anti-SARS-CoV-2 S1	S1	IgG	ELISA	8 (8-12 ara değeri)	3-100	2

ECLIA: *Electrochemiluminescence immunoassay*, ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*.

immunoassay (ECLIA) testidir. Çalışmalar üretici firmanın önerileri doğrultusunda Cobas E601 modüler analizöründe (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) yapıldı. Aeskulisa, SARS-CoV-2 S proteininin S1 alt birimine karşı oluşan IgG antikorlarının gösterilmesine yönelik kalitatif ve kantitatif sonuç verebilen bir “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” testidir. Bu kit ile yapılan çalışmalar üretici firmanın önerileri doğrultusunda Triturus ELISA cihazında (Grifols, Barcelona, İspanya) yapıldı. Her iki ticari kantitatif antikor saptama testinin teknik özellikleri Tablo 1’de verildi.

Çalışmaya dahil edilen 90 sağlık çalışanına ait serum örneklerinin Elecsys ve Aeskulisa kiti ile elde edilen sonuçları, her iki üretici firmanın önerileri doğrultusunda kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi. Ünite/mL (U/mL) olarak verilen kantitatif değerler üretici firmaların Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) anti-SARS-CoV-2 uluslararası standardı ile gerçekleştirdikleri çalışmalar neticesinde sağlanan çevrim faktörü ile bağlayıcı antikor ünite (BAU)/mL’ye çevrilerek de değerlendirildi. Üretici firmalar tarafından belirlenen çevrim formülleri Elecsys kiti için $U*1 / 0.288 = \text{BAU}$, Aeskulisa kiti için $U*2 = \text{BAU}$ olarak kullanıldı.

İstatiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde SPSS Version 22.0 ve GraphPad Prism programları kullanıldı. İki farklı kantitatif ticari antikor saptama testi ile her bir hasta için elde edilen kalitatif sonuçlar kategorik değişken (pozitif, negatif, ara değeri) olarak, kantitatif sonuçlar sürekli değişken (yüzde, ortalama \pm standart sapma) olarak kaydedildi. Bu kalitatif sonuçların arasındaki uyum Cohen’s kappa değeri ve yüzde uyum hesaplanarak analiz edildi; kappa değeri: < 0.20 zayıf, $0.21-0.40$ ortaya yakın, $0.41-0.60$ orta düzeyde, $0.61-0.80$ önemli düzeyde ve $0.81-1.00$ neredeyse mükemmel uyum olarak kategorize edildi. Kantitatif sonuçlar ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum olarak belirtildi ve kantitatif sonuçların normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov testi ile gerçekleştirildi. Normal dağılıma uymama durumunda non-parametrik testler ile analize devam edildi. İki bağımsız grup arasında ortalamaların farkı ile bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için Mann-Whitney U testi kullanılırken, iki bağımlı grup arasında ortalama farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için Wilcoxon Signed Rank test kullanıldı. İki farklı test ile elde edilen sonuçların korelasyonu için Spearman korelasyon analizi ile rho (r) değeri hesaplandı. İki deneme grubun

kantitatif değerleri arasında ortalama farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını test etmek için Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Her iki test ile yapılan kantitatif ölçümlerin ortalamalarına karşı farklarının saçılımı Bland-Altman analizi ile incelendi ve ortalama fark hesaplandı. Tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlılık derecesi (p değeri) 0.05 olarak belirlendi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 90 sağlık çalışanının 55 (%61.1)'i kadın, 35 (%38.9)'i erkek olarak belirlenmiş ve yaş ortalaması 45.89 (aralık= 24-63) olarak saptanmıştır.

Anti-SARS-CoV-2 ölçümleri neticesinde; Elecsys kiti ile 86 (%95.6) örnek pozitif, 4 (%4.4) örnek negatif saptanmıştır. Aeskulisa kiti ile yapılan ölçümlerde 55 (%61.1) örnek pozitif, 20 (%22.2) örnek negatif ve 15 (%16.7) örnek ara değerde belirlenmiştir. Her iki kit ile ortak olarak dört örnek negatif, 55 örnek pozitif tespit edilmiştir. Elecsys kiti ile pozitif bulunan 86 örnek, Aeskulisa kiti ile 55 örnekte pozitif (%64), 15 örnekte ara değer (%17.4) ve 16 örnek negatif (%18.6) olarak sonuçlanmıştır (Tablo II).

Aeskulisa kiti ile ara değerdeki 15 örnek dışında kalan 75 örnekte her iki kit ile gözlenen uyum %78.6 olarak bulunurken, istatistiksel olarak Cohen's kappa değeri orta düzeye yakın derecede uyumu gösterecek şekilde 0.26 olarak hesaplanmıştır ($p= 0.004$). Aeskulisa kiti ile ara değerde çıkan bu 15 örnek pozitif olarak kabul edildiğinde gözlenen uyum %82.2 olarak hesaplanmıştır (Cohen's kappa= 0.28, $p= 0.002$).

Elecsys ve Aeskulisa kitleri ile yapılan ölçümlerde saptanan kantitatif antikor düzeylerinin ortalama değerleri sırasıyla; 78.53 ± 59.92 , 19.84 ± 14.58 olarak hesaplanmıştır. Aeskulisa kiti ile yapılan ölçümlerde Elecsys kiti ile yapılan ölçümlere göre ortalama antikor değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo III).

Elecsys kiti ile yapılan ölçümlerde kadınlarda ortalama antikor düzeyi 91.38 ± 64.05 U/mL, erkeklerde 58.34 ± 46.88 U/mL olarak hesaplanmıştır. Aeskulisa kiti ile yapılan ölçümlerde kadınlarda ortalama antikor düzeyi 22.30 ± 14.18 U/mL, erkeklerde 15.98 ± 14.56 U/mL olarak hesaplanmıştır. Kadın ve erkek bireyler arasındaki ortalama antikor ölçümleri arasındaki fark, her iki kit için de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.006$, $p= 0.045$). Bütün örneklemede Elecsys kiti ile yapılan ölçümler Aeskulisa kitine göre ortalama 4.58 \pm 3.44 kat daha yüksek bulunmuştur. Kadın ve erkek bireyler

Tablo II. Elecsys ve Aeskulisa ile Ölçülen Kantitatif Sonuçlar

		Elecsys		
		Negatif, n (%)	Pozitif, n (%)	Toplam, n (%)
Aeskulisa	Negatif	4 (100)	16 (18.6)	20 (22.2)
	Ara değer	0 (0)	15 (17.4)	15 (16.7)
	Pozitif	0 (0)	55 (64)	55 (61.1)
	Toplam	4 (100)	86 (100)	90 (100)

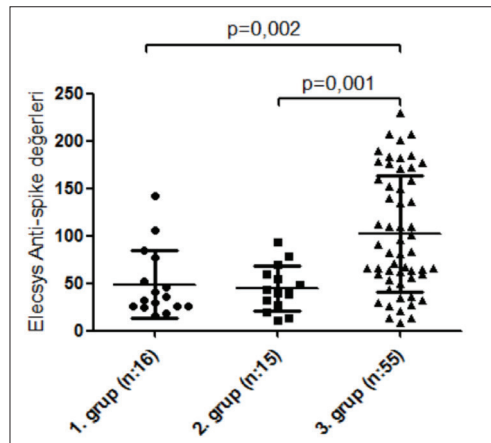
Tablo III. Tüm Bireylerde Elecsys ve Aeskulisa Kitleri ile Ölçülen Antikor Değerleri

	Toplam (n= 90)	
	Elecsys kiti	Aeskulisa kiti
Ortalama	78.53	19.84
Ortanca	62.52	15.40
Standart sapma	59.92	14.58
Minimum-Maksimum	0.46-230.20	3.15-68.90
Persentil 25	31.50	9.03
Persentil 50	62.52	15.40
Persentil 75	110.42	26.92

ayrı ayrı incelendiğinde ise bu oran sırasıyla; 4.53 ± 2.95 ve 4.65 ± 4.14 kat olacak şekilde tüm örnekler ile elde edilen oran ile benzer bulunmuş, arada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p= 0.54$). Tüm örneklerde her iki kitin lineer aralığında sonuç alınmıştır. Her iki kitin tüm örneklerdeki ölçümlerinin korelasyon analizinde $r= 0.611$ olarak hesaplanmış, yüksek korelasyon gözlenmiştir (kadınlarda $r= 0.628$, erkeklerde $r= 0.625$).

Aeskulisa testi ile negatif ($n= 16$) ve ara değer ($n= 15$) bulunup Elecsys testi ile pozitif bulunan örneklerin Elecsys kiti ölçümlerindeki kantitatif değerleri her iki yöntem ile pozitif çıkan örneklerle oranla daha düşük bulunmuştur. ($p= 0.002$, $p= 0.001$) (Şekil 1) (Tablo IV).

Her iki kit ile pozitif bulunan 55 örnekte Elecsys kiti ile yapılan ölçümler Aeskulisa kitine göre ortalama 4.06 ± 2.59 kat daha yüksek bulunmuştur. Elecsys kiti ile pozitif Aeskulisa kiti ile ara değerde bulunan örneklerde bu oran 4.30 ± 2.36 iken, Elecsys kiti ile



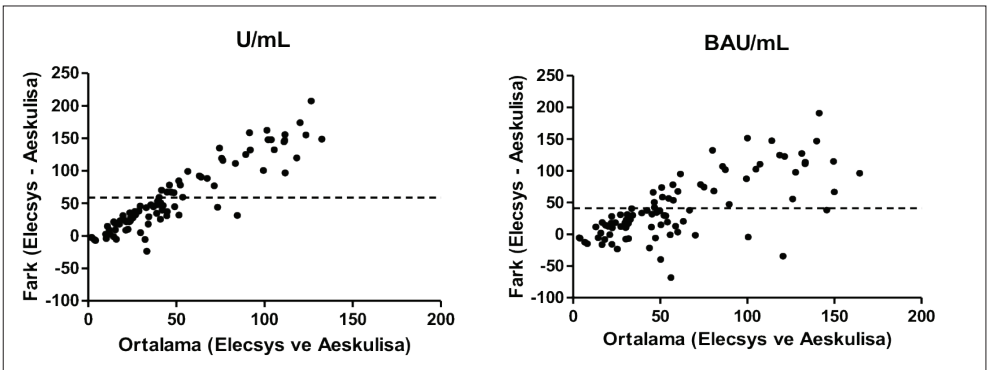
Şekil 1. Aeskulisa kiti ile negatif ($n= 16$), ara değer ($n= 15$), pozitif ($n= 55$) sonuç alınan örneklerin Elecsys kiti ölçümlerindeki antikor değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo IV. Aeskulisa kiti ile Negatif, Ara Değer ve Pozitif Sonuç Alınan Örneklerin Elecsys Kiti ile Ölçüm Sonuçları

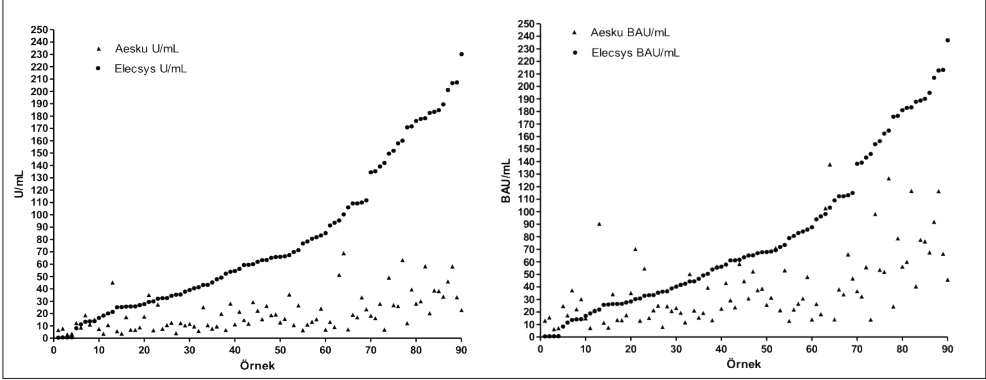
	1. grup n= 16		2. grup n= 15		3. grup n= 55	
	Aeskulisa Negatif	Elecsys Pozitif	Aeskulisa ara değer	Elecsys Pozitif	Aeskulisa Pozitif	Elecsys Pozitif
Ortalama	6.26	48.93	10.37	44.55	27.44	102.07
Ortanca	6.71	33.87	10.70	40.48	24.00	83.31
Standart sapma	1.32	35.69	1.00	23.51	13.97	61.86
Minimum-maksimum	3.65-7.75	16.40-142.00	8.63-11.80	11.22-93.63	12.20-68.90	8.12-230.20

pozitif Aeskulisa kiti ile negatif bulunan örneklerde bu oran 7.72 ± 4.88 değerlerine kadar yükselmiştir ($p < 0.001$).

Her iki kit ile yapılan kantitatif ölçümlerin ortalamalarına karşı farklarının saçılımı Bland-Altman analizi ile incelendiğinde; Elecsys kiti ile Aeskulisa kitinden daha yüksek ölçümler yapılmış, ortalama fark 58.68 ± 52.62 olarak bulunmuştur. Üretici firmalar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde çevrim faktörü ile U/mL değerleri BAU/mL değerlerine çevrildiğinde ortalama farkın 41.09 ± 50.22 'e gerilediği gözlenmiştir (Şekil 2). Çevrim faktörü uygulandıktan sonra Elecsys kiti ile ölçülen ortalama antikor düzeyinin 78.53 ± 59.92 U/mL'den 80.79 ± 61.65 BAU/mL'ye, Aeskulisa kiti ile ölçülen ortalama antikor düzeyinin 19.84 ± 14.58 U/mL'den 39.69 ± 29.17 BAU/mL'ye değiştiği ve ortalama antikor değerlerinin sayısal olarak birbirine yaklaşmasına rağmen aralarındaki istatistiksel olarak anlamlı farkın devam ettiği, korelasyon katsayısının değişmediği gözlenmiştir ($r = 0.611$) ($p < 0.001$) (Şekil 3). Bütün örneklem için Elecsys ile yapılan ölçümler Aeskulisa kitine göre ortalama 4.58 ± 3.44 kat daha yüksek iken bu oran BAU/mL değerlerinde tekrar hesaplandığında 2.35 ± 1.77 olarak bulunmuştur.



Şekil 2. Her iki kit ile ölçülen kantitatif antikor değerlerinin U/mL ve BAU/mL olarak ortalamalarına karşı farklarının saçılım grafiği (kesikli çizgi ortalama farkı göstermektedir).



Şekil 3. U/mL ve BAU/mL cinsinden her iki kit için antikor değerlerinin dağılım grafiği. Veriler en düşük değerden en yüksek değere doğru sıralanmıştır.

TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, iki doz inaktif SARS-CoV-2 aşısı ile aşılanmış sağlık çalışanlarında ülkemizde rutin olarak kullanılmakta olan iki ticari antikor saptama testi karşılaştırılmıştır.

Ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelen SARS-CoV-2 pandemisinden korunmaya yönelik olarak geliştirilen, DSÖ tarafından kullanımı onaylanmış ve toplu aşılama programları kapsamında uygulanan farklı türde aşılar bulunmuştur. Bunlar başlıca; Pfizer-BioNTech/BNT162b2 ve Moderna/1273 gibi mRNA aşılarını, CoronaVac-Sinovac Life Sciences ve Sinopharm gibi inaktive virüs aşılarını, SputnikV/rAd26-S/rAd5-S, Astra Zeneca/AZD1222 ve Janssen-Johnson&Johnson/Ad26 gibi adenoviral vektör aşılarını içermektedir¹⁰. İnaktif SARS-CoV-2 aşısı olan CoronaVac (Sinovac Life Sciences, Beijing, Çin) 14 Ocak 2021 tarihinden itibaren başta sağlık çalışanları olmak üzere ülkemiz genelinde de uygulanmaya başlanmıştır¹¹. Bu çalışma, mRNA aşısı olan Pfizer-BioNTech/BNT162b2 aşısının henüz ülkemizde kullanıma girmediği, sağlık çalışanlarına iki doz inaktif SARS-CoV-2 aşısının uygulandığı dönemde gerçekleştirilmiştir.

Aşı sonrası oluşan antikorların saptanmasında kullanılan virolojik referans yöntem plak redüksiyon nötralizasyon ve mikronötralizasyon olarak kabul edilmiştir. Ancak, özel donanım gerektirmeyen, yüksek verimliliğe sahip, daha kısa sürede sonuç alınabilen ve daha ucuz olan serolojik SARS-CoV-2 testleri, nötralizan antikor varlığını göstermek amacıyla alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır⁷. Her ne kadar serolojik antikor testlerinin aşı yanıtını izlemedeki kullanımı bilimsel olarak aydınlatılmamış olsa da, antikor düzeylerini belirlemek klinik sonuçların yorumlanmasına destek sağlamaktadır. Bu durum, kantitatif anti-SARS-CoV-2 testlerinin standardizasyon aşamasından sonra bir antikor titresi ile koruma düzeyi korelasyonu belirlenmesi ile mümkün olabilecektir. Yapılan çalışmalarda kantitatif anti-S ölçümü yapan ticari serolojik kitlerin her ne kadar nötralizasyon testleri ile korelasyon gösterdiği bildirilse de bu kitlerin birbirleriyle de uyumlu ve karşılaştırılabilir olması gerekmektedir¹².

Sunulan bu çalışmada her iki kitin üretici firmaları tarafından bildirilen “cut-off” değerleri doğrultusunda sonuçlar kalitatif olarak değerlendirilmiş ve uyum araştırılmıştır. Elecsys kitinin kantitasyon aralığı 0.4-250 U/mL ve pozitif sonuç için gereken konsantrasyon ≥ 0.80 U/mL’dir¹³. Aeskulisa kitinin kantitasyon aralığı ise 3-100 U/mL arasındadır. Negatif, ara değer ve pozitif sonuç için gereken konsantrasyon değerleri sırasıyla < 8 U/mL, 8-12 U/mL ve ≥ 12 U/mL’dir. Her iki kit ile toplam 59 örnekte (pozitif, n= 55 ve negatif, n= 4) uyumlu sonuç elde edilirken; Elecsys kiti ile pozitif saptanan 31 örneğin 15’i Aeskulisa kiti ile ara değerde, 16’sı negatif olarak sonuçlanmıştır. Gözlenen yüzde uyum yüksek bulursa da istatistiksel olarak olasılığın da eklendiği kappa değeri hesaplandığında orta düzeyde uyum bulunmuştur.

Çalışmamızda kullanılan her iki kitin U/mL olarak belirlediği kantitatif antikor değerleri karşılaştırıldığında; ECLIA yöntemi ile ölçüm yapan Elecsys kiti (hedef bölge: S1-RBD, hedef antikor: total IgG) ve ELISA yöntemi ile ölçüm yapan Aeskulisa (hedef bölge: S1, hedef antikor: IgG) kiti ile yapılan antikor ölçümleri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur ($r= 0.611$). Infantino ve arkadaşlarının altı farklı anti-S ölçümü yapan seroloji kitinin DSÖ uluslararası standardı ile uyumu ve birbirleriyle karşılaştırılması amacıyla yaptıkları çalışmalarında, çalışmamıza benzer şekilde ECLIA yöntemi ile ölçüm yapan Elecsys kiti ve yine ELISA yöntemi ile ölçüm yapan ancak farklı bir firma olan Euroimmun (hedef bölge: S1, hedef antikor: IgG) kitlerinin birbiri ile korelasyonu yüksek bulunmuştur ($r= 0.689$). Aynı çalışmada en yüksek korelasyon ($r= 0.942$) Euroimmun ve Thermo Fisher (hedef bölge: S1, hedef antikor: IgG) kitleri ile gözlenirken, en düşük korelasyon ($r= 0.513$) Elecsys ve DiaSorin (hedef bölge: trimerik S, hedef antikor: IgG) kitleri arasında bulunmuştur¹⁴.

Ülkemizden bildirilen Sağlık ve arkadaşlarının pediyatrik ve yetişkin hasta grubunda COVID-19 enfeksiyonu sonrası altı farklı ticari immünolojik kit ile yaptıkları karşılaştırma çalışmalarında Roche Elecsys kitinin en iyi duyarlılığa, diğer kitlerin de kabul edilebilir performansa sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, kantitatif anti-S ölçümü yapan Elecsys ve Euroimmun kitlerinin benzer uyumda sonuç verdiği fakat, kantitatif sonuçları karşılaştırırken alt ve üst kantitasyon limitlerindeki farklılıkların sonuçları etkileyebileceği bildirilmiştir¹⁵.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, Elecsys kiti ile bulunan ölçüm değerleri Aeskulisa kitine göre daha yüksek bulunmuş ve kalitatif olarak Elecsys kiti ile Aeskulisa kitinden daha çok pozitif sonuç elde edilmiştir. Ölçümler cinsiyete göre değerlendirildiğinde ise; her iki kit ile benzer şekilde olmak üzere kadınlarda saptanan değerler erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur.

Bu çalışmada her iki kit ile uyumlu sonuç alınan örneklerde (n= 55) Elecsys kiti ölçümleri, Aeskulisa kiti ölçümlerine göre ortalama 4.06 kat daha yüksek bulunmuştur. Aeskulisa kiti ile ara değerde raporlanan 15 hasta (cut-off= 8-12) ve negatif sonuç verilen 16 hasta (cut-off< 8) için bu oranların sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı şekilde 4.30 ve 7.72 değerlerine çıkması düşük antikor değerlerinde Aeskulisa kiti ile kantitasyon başarısının

azaldığını düşündürmüştür. Çalışmamız yüksek antikor düzeyi ile sonuçlanması muhtemel immün kompetan, iki doz aşılı sağlık çalışanları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle Elecsys kiti ile pozitif saptanan 31 (%34.4) örneğin Aeskulisa kiti ile ara değer ve negatif olarak sonuçlanmış olması bu iki kitin karşılaştırmasında bizi Elecsys kitinin hassasiyetinin daha yüksek olduğunu düşünmeye sevk etmiştir. Bu kanıyı destekleyecek şekilde, Elecsys kiti ile fonksiyonel SARS-CoV-2 nötralizan antikorlarının tespiti arasındaki korelasyonun incelendiği üretici firma çalışması bulunmuştur. Bu çalışmada, nötralizan potansiyele ilişkin en iyi tahmini sağlamak için vekil nötralizasyon testi olarak Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Drug Administration (FDA)] onaylı GenScript cPass™ SARS-CoV-2 nötralizan antikor tanı kiti kullanılmıştır¹⁶. Numunedeki nötralizan antikor varlığını tespit etmek için cut-off noktası %20 ve üzerinde inhibisyon oranı gözlenmesi olarak belirlenmiştir. Elecsys kiti kantitatif sonuçları ile cPass vekil nötralizasyon testindeki inhibisyon yani nötralizan antikor varlığı anlamlı ölçüde korelasyon göstermiştir ($r = 0.807$). GenScript cPass testinde (\geq %20 cut-off noktasında) inhibisyon gösteren 494 örnek arasından 490'ı Elecsys testinde (≥ 0.80 U/mL cut-off noktasında) reaktif olarak belirlenmiş ve %96.27'lik bir pozitif prediktif değer (PPD) elde edilmiştir.

Farklı ticari firmalara ait antikor testleri kantitatif sonuçlarını ünite (U), "relative unit" (RU), "arbitrary unit" (AU) gibi farklı birimlerde verebilmektedir. Her ne kadar kantitatif olarak aynı birimde sonuç veren kitlerin karşılaştırılabileceği düşünülse bile pratikte bu mümkün olmamaktadır. Bu duruma neden olan değişkenlerin başında kitler arasında farklılık gösterebilen alt saptama limiti, lineer aralık değerleri ve cut-off değerleri gelmekte; kalibrasyon gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu durumun ortadan kaldırılması ve karşılaştırılabilirliğin net bir şekilde sağlanması açısından ortak bir standart birim kullanımı tercih edilmektedir. Bu açıdan, DSÖ Aralık 2020'de anti-SARS-CoV-2 immünglobulin uluslararası standardını (NIBSC Kodu 20/136) yayımlamış ve sonuçların bu birime göre kalibre edilerek ortak olarak BAU birimi şeklinde raporlanmasını önermiştir¹⁷. Bunun üzerine birçok üretici firma anti-SARS-CoV-2 uluslararası standardı ile çalışmalar gerçekleştirmiş ve BAU için çevrim faktörlerini belirlemişlerdir.

Elecsys kiti kullanılarak üretici firma tarafından bildirilen DSÖ uluslararası standardının dilüsyonları ile yapılan çalışma sonucu elde edilen değerlerin korelasyonu ($r = 0.9996$) oldukça yüksek bulunmuş ve Elecsys kiti için çevrim formülü $U \times 1.0288 = \text{BAU}$ olarak hesaplanmıştır. Aeskulisa kiti için üretici firma tarafından gerçekleştirilen çalışmada bu kit ile belirlenen antikor aktivitesi, referans olarak uluslararası standart preparasyonu kullanılarak IU/mL olarak ifade edilen antikor aktivitesi ile karşılaştırıldığında mükemmel korelasyon gözlenmiş ($r = 0.9996$) ve Aeskulisa kiti için korelasyon faktörü $U \times 2 = \text{BAU}$ olarak hesaplanmıştır.

Birbiri ile aynı birimlerde sonuç veren kitler ile karşılaştırma yaptığımız çalışmamızda U/mL birimleri BAU/mL'ye çevrildiğinde Elecsys kiti lehine olan ortalama 4.58 ± 3.44 katlık farkın 2.35 ± 1.77 'ye gerilediği ve her iki kitin ölçüm değerlerinin aralarındaki ortalama ölçüm farkının azalarak kantitatif sonuçların birbirine yaklaştığı gözlenmiştir.

Üretici firmanın Elecsys kiti ile nötralizan antikor varlığını saptama açısından gerçekleştirdiği çalışmada %96.27 olan PPD'in optimizasyonu amacıyla receiver operating curve (ROC) analizi de gerçekleştirilmiştir. Buna göre; %99.10'luk bir PPD ile Elecsys testindeki 15 U/mL cut-off noktası, cPass testi ile nötralizan antikor varlığı için uygun bir değer olarak tanımlanmıştır¹⁸. Buna dayanarak çalışmamızda Elecsys kiti ile yapılan ölçümlere göre ROC analizi gerçekleştirilmiş, %100 duyarlılıkta antikor pozitifliği saptamada Aeskulisa kitinin cut-off değeri 3.59 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç ışığında Aeskulisa kitinin cut-off değerini daha düşüğe çekmek uyumu arttırmakla birlikte düşük ölçüm değerlerindeki kantitasyon sapmalarını değiştirmeyecektir. Bu nedenle kitler için belirtilen ölçüm birimi, hedef antijen, saptanan immünglobulin izotipi, cut-off değerinin yanı sıra özellikle lineer aralık değerlerinin de karşılaştırma çalışmalarında dikkate alınması gerekmektedir.

Çalışmamızda kullanılan kitlerin birinin total antikor, diğerinin ise IgG antikorlarını saptaması çalışmamızın kısıtlayıcı noktası gibi görünse de, örnekleme seçerken hastalığı geçirmemiş, aşıllı bireyleri almamız nedeniyle IgM yanıtını beklemediğimiz bu grup için bu durum göz ardı edilebilir.

Sonuç olarak, farklı antikor ölçüm kitlerinin kullanıldığı merkezlerde bireylerin yönlendirilmesi açısından testlerin doğru yorumlanması ve raporlanması önem arz etmektedir. Öte yandan, SARS-CoV-2 maruziyetine karşı daha az önlem almaya sebebiyet vermesi açısından antikor test sonuçları koruyucu bağışıklık düzeyinin kesin bir göstergesi olarak yorumlanmamalıdır¹⁹. Anti-SARS-CoV-2 testlerinin birbiri ile uyumu henüz sağlanmadığı için, bireysel bağışıklık izleminin aynı yöntem kullanılarak yapılması ve BAU/mL'ye çevrilerek verilen sonuçların bile antijen alt birimine özgül olması gerekmektedir. Birçok serolojik testin kullanımda olduğu ve yenilerinin geliştirilmeye devam edildiği günümüz pandemi ortamında kit karşılaştırma çalışmaları halen önemini korumaktadır. Çalışmamız altın standart olarak nötralizasyon testlerinin de kullanıldığı daha büyük örneklem gruplarında yapılacak araştırmalarla desteklenmelidir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 14.4.2022 ve Karar No: 8-22).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Perkmann T, Perkmann-Nagele N, Koller T, Mucher P, Radakovics A, Marculescu R, et al. Anti-spike protein assays to determine SARS-CoV-2 antibody levels: A head-to-head comparison of five quantitative assays. *Microbiol Spectr* 2021; 3: 9(1). <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00247-21>
2. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with coronavirus disease 2019. *J Infect Dis* 2020; 222(2): 206-13. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa273>

3. Burbelo PD, Riedo FX, Morishima C, Rawlings S, Smith D, Das S, et al. Detection of nucleocapsid antibody to SARS-CoV-2 is more sensitive than antibody to spike protein in COVID-19 patients. medRxiv 2020; 24. <https://doi.org/10.1101/2020.04.20.20071423>
4. Choudhary HR, Parai D, Dash GC, Peter A, Sahoo SK, Pattnaik M, et al. IgG antibody response against nucleocapsid and spike protein post-SARS-CoV-2 infection. *Infection* 2021 ;49(5): 1045-8. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01651-4>
5. Higgins V, Fabros A, Kulasingam V. Quantitative measurement of Anti-SARS-CoV-2 antibodies: Analytical and clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 2021; 59(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.03149-20>
6. Van Elslande J, Gruwier L, Godderis L, Vermeersch P. Estimated half-life of SARS-CoV-2 anti-spike antibodies more than double the half-life of anti-nucleocapsid antibodies in healthcare workers. *Clin Infect Dis* 2021; 73(12): 2366-8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab219>
7. Tang MS, Hock KG, Logsdon NM, Hayes JE, Gronowski AM, Anderson NW, et al. Clinical performance of two SARS-CoV-2 serologic assays. *Clin Chem* 2020; 66(8): 1055-62. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa120>
8. Kittel M, Muth MC, Zahn I, Roth HJ, Thiaucourt M, Gerhards C, et al. Clinical evaluation of commercial automated SARS-CoV-2 immunoassays. *Int J Infect Dis* 2021; 103: 590-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.003>
9. Ferrari D, Clementi N, Spanò SM, Albitar-Nehme S, Ranno S, Colombini A, et al. Harmonization of six quantitative SARS-CoV-2 serological assays using sera of vaccinated subjects. *Clin Chim Acta* 2021; 522: 144-51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.08.024>
10. World Health Organization. Erişim adresi: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines).
11. TC Sağlık Bakanlığı COVID-19 Aşısı Bilgilendirme Platformu. Erişim adresi: <https://covid19asi.saglik.gov.tr>.
12. Bal A, Pozzetto B, Traub MA, Escuret V, Rabilloud M, Langlois-Jacques C, et al. Evaluation of high-throughput SARS-CoV-2 serological assays in a longitudinal cohort of patients with mild COVID-19: Clinical sensitivity, specificity, and association with virus neutralization test. *Clin Chem* 2021; 67(5): 742-52. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa336>
13. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>.
14. Infantino M, Pieri M, Nuccetelli M, Grossi V, Lari B, Tomassetti F, et al. The WHO international standard for COVID-19 serological tests: Towards harmonization of anti-spike assays. *Int Immunopharmacol* 2021; 100: 108095. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108095>
15. Sağlık I, Türkkan A, Turan C, Kara A, Akalın H, Ener B, et al. Comparison of SARS-CoV-2 antibodies and six immunoassays in pediatric and adult patients 12 weeks after COVID-19. *Cureus* 2022; 14(2). <https://doi.org/10.7759/cureus.22195>
16. <https://www.genscript.com/covid-19-detection-ce.html>. COVID-19 Detection | cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit (CE).
17. http://www.nibsc.org/standardisation/international_standards.aspx. First WHO international standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136 Instructions for use.
18. Jochum S, Degen H-J. Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 S analizinin sonuçlarıyla fonksiyonel SARS-CoV-2 nötralizan antikorların tespiti arasındaki korelasyon. Roche Diagnostics Solut Araştırma ve Geliştirme ve Ürün Yönetimi Departmanları Merk Laboratuvarı.
19. <https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety>.