

НОВИ УВИДИ У ОДРЕЂИВАЊЕ УКУПНИХ АНТИТЕЛА НАКОН БУСТЕР ДОЗЕ РАЗЛИЧИТИХ ВАКЦИНА ПРОТИВ COVID-19 У СРБИЈИ

Ивана Келић,¹ Верица Јовановић,¹ Зоран Букумирић,² Маја Стошић¹

¹ Институт за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић Батут”, Београд, Србија

² Институт за медицинску статистику и информатику, Медицински факултет Универзитета у Београду, Београд, Србија

NEW INSIGHTS IN ASSESSMENT OF TOTAL ANTIBODIES AFTER RECEIVING BOOSTER DOSE OF DIFFERENT COVID-19 VACCINES IN SERBIA

Ivana Kelić,¹ Verica Jovanović,¹ Zoran Bukumirić,² Maja Stošić¹

¹ Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut”, Belgrade, Serbia

² Institute for Medical Statistics and Informatics, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Сажетак

Анализирали смо налазе укупних антитела на SARS-CoV-2 након бустер дозе три различите вакцине (ревакцине) доступне у Србији: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNTech*), Sinopharm BBIBP-CorV (*Vero Cell®*), Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) из по три узорка крви за сваког од 193 учесника у студији, узиманих у назначеним интервалима (пре бустер дозе, 7 и 28 дана након бустер дозе). Узорци су анализирани помоћу квалитативних имунотестова WANTAI ELISA (BEING, Кина). У току периода испитивања дошло је до значајног повећања укупне концентрације антитела ($B = 2,042$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,21$). Није било значајне разлике између хомологих и хетерологих режима бустер имунизације ($B = -0,522$; $p = 0,134$). Болести тироидне жлезде ($B = -2,023$) и старост преко 65 година ($B = -3,654$) независно су доведене у везу са низким концентрацијама укупних антитела. Ови резултати указују да, независно од врсте примењене вакцине против COVID-19 и применењеног режима вакцинације, све вакцине доносе добротил са значајним повећањем концентрације укупних антитела.

Кључне речи: вакцине против COVID-19, укупна антитела, бустер доза, Србија

Abstract

We analyzed results of total antibodies to SARS-CoV-2 after receiving the booster dose of 3 different vaccines available in Serbia: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNTech*), Sinopharm BBIBP-CorV (*Vero Cell®*), Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) from three blood samples for each of the 193 study participants drawn in intervals (before booster dose, 7 and 28 days after the booster dose). Sample analysis was performed with qualitative WANTAI ELISA immunoassay (BEING, CHINA). During the study period, there was a significant increase in total antibodies ($B = 2,042$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,21$). There was no significant difference between homologous and heterologous regimen booster immunization ($B = -0,522$; $p = 0,134$). Thyroid diseases ($B = -2,023$) and age 65+ ($B = -3,654$) were independently associated with a lower level of total antibodies. These results suggest that regardless of COVID-19 vaccine types analyzed and the regimens applied, all vaccines provided benefits with the significant increase in total antibody levels.

Keywords: COVID-19 vaccines, total antibodies, booster dose, Serbia

Увод

У раду који је недавно објављен у часопису *Vaccines*, Стошић и сарадници су испитали имуногеничност и реактогеност бустер дозе различитих вакцина против COVID-19, како би одредили факторе који су у вези са имуним одговором и нежељеним догађајима [1]. У те сврхе, аутори су користили имунотест који је најчешће поређен и оцењиван на тржишту, *Abbot SARS-CoV-2 IgG II Quant* тест, на инструменту ARCHITECT i2000SR. Испитивање је показало да је примена бустер дозе значајно повећала титар IgG антитела на Spike (S) протеин, посебно 28 дана након примене хетерологог режима, те да је комбинација *Pfizer-BioNTech* (примарна серија вакцинације и бустер доза) најделотворни-

Introduction

In a recent article published in journal *Vaccines*, Stosic and colleagues examined immunogenicity and reactogenicity of the booster dose of different COVID-19 vaccines, in order to identify factors related to immune response and adverse events [1]. For this purpose, the authors used the most compared and evaluated immunoassay on the market, Abbott SARS-CoV-2 IgG II Quant assay, performed on the ARCHITECT i 2000SR instrument. The study showed that the application of the booster dose significantly increased IgG antibody titers against spike protein, especially 28 days after applied heterologous regimen and that the *Pfizer-BioNTech*—*Pfizer-BioNTech* combination (primary vaccination series and booster dose) was the most effec-

ја. Различити серолошки тестови који су коришћени у бројним студијама допринели су процени имунитета међу вакцинисаном популацијом [2–4]. За додатне информације и увиде у ову тему, испитали смо исте те узорке помоћу WANTAI ELISA имунотеста за детекцију укупних антитела.

Материјал и методе

У оквиру панел студије која се састојала од проспективне кохорте и три студије пресека анализирали смо концентрације укупних антитела на SARS-CoV-2 након примљене бустер дозе три различите вакцине доступне у Србији: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNtech*), *Sinopharm BBIBP-CorV (Vero Cell®)*, Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) из по три узорка крви за сваког од 193 учесника у студији, који су узимани у назначеним интервалима (пре бустер дозе, 7 и 28 дана након бустер дозе). Узорци су анализирани помоћу квалитативних имунотестова WANTAI ELISA (BEING, Кина), према упутству за употребу. WANTAI ELISA се заснива на RBD (домену који везује рецептор) C1 подјединице S протеина SARS-CoV-2 вируса и мери укупна антитела. Резултати се очитавају на апсорбацији од 450 nm и изражавају кроз однос апсорбација/границна вредност (A/C.O.) за сваку микроплочу одвојено. Уколико је A/C.O. вредност мања од 1, резултат је негативан, што значи да није било укупних антитела на SARS-CoV-2, а резултати ≥ 1 су сматрани позитивним, што је значило да је учесник у студији имао заштитна антитела. [5]. Пратили смо повећање концентрације укупних антитела за сваку врсту вакцине одвојено. У зависности од врсте променљиве и нормалности дистрибуције, резултати су представљени као учесталост (проценат), медијана (опсег) и средња вредност (СД). Промене у вредности за укупна антитела током посматраног периода испитане су помоћу модела линеарних мешовитих ефеката, помоћу R пакета lme4, верзија 1.1-23. У мултиваријантни модел су укључене значајне независне променљиве ($p < 0.1$) у униваријантним моделима. Променљиве „срчане болести“ и „дијабетес“ су искључене из мултиваријантног модела услед колинеарности. Све вредности мање од 0,05% сматране су значајним. Статистичка анализа изведена је помоћу IBM SPSS Statistics 22 софтвера (IBM Corporation, Армонк, Њујорк, САД) и R-4.0.0 софтвера (*The R Foundation for Statistical Computing*, Беч, Аустрија). Сви учесници су потписали информисану сагласност за учешће у студији, у складу са Декларацијом из Хелсинкија и одобрењем Етичког одбора Института за јавно здравље Србије.

tive one. Various serological tests, used in numerous studies assisted in immunity assessment in vaccinated population [2-4]. To get more information and further insights into this topic, we tested the same samples with WANTAI ELISA immunoassay for total antibodies detection.

Material and methods

Within the panel study composed of prospective cohort and three cross-sectional studies, we analyzed results of total antibodies to SARS-CoV-2 after receiving the booster dose of 3 different vaccines available in Serbia: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNtech*), *Sinopharm BBIBP-CorV (Vero Cell ®)*, Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) from three blood samples for each of the 193 study participants drawn in intervals (before booster dose, 7 and 28 days after the booster dose). Sample analysis was performed with qualitative WANTAI ELISA immunoassay (BEING, CHINA) manually, according to the instruction for use. WANTAI ELISA is based on the RBD of the S1 subunit of the spike protein of SARS-CoV-2 virus, measuring total antibodies. The results were read at the absorbance of 450nm and expressed in absorbance/cut off ratio calculated for each microplate separately. If the A/C.O. ratio was < 1 , the results were negative, meaning that there were no total SARS-CoV-2 antibodies, and ≥ 1 were positive, meaning that the participant has protective antibodies. [5]. We monitored the increase of the total antibodies for each vaccine type separately. Depending on the type of variables and the normality of the distribution, results were presented as frequency (percent), median (range) and mean (SD). Changes in total antibodies during the observed period were examined with a linear mixed effects modeling approach using R package lme4 version 1.1-23. Significant independent variables ($p < 0.1$) in univariate models were included in multivariate model. Variables “cardiac diseases” and “diabetes” were excluded from the multivariate model due to collinearity. All p-values less than 0.05 were considered significant. Statistical data analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and R-4.0.0 software (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). All participants signed an informed consent for participation in the study, conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee of the Institute of Public Health of Serbia.

Results

Among 193 study participants, 121 (62.7%) were female. The mean age for all participants was 52.2 (SD 13.8). More than one third (37.3%) of the participants were current smokers, while majority were alcohol users (72.4). The most common comorbidities were cardiac (36.3%), thyroid

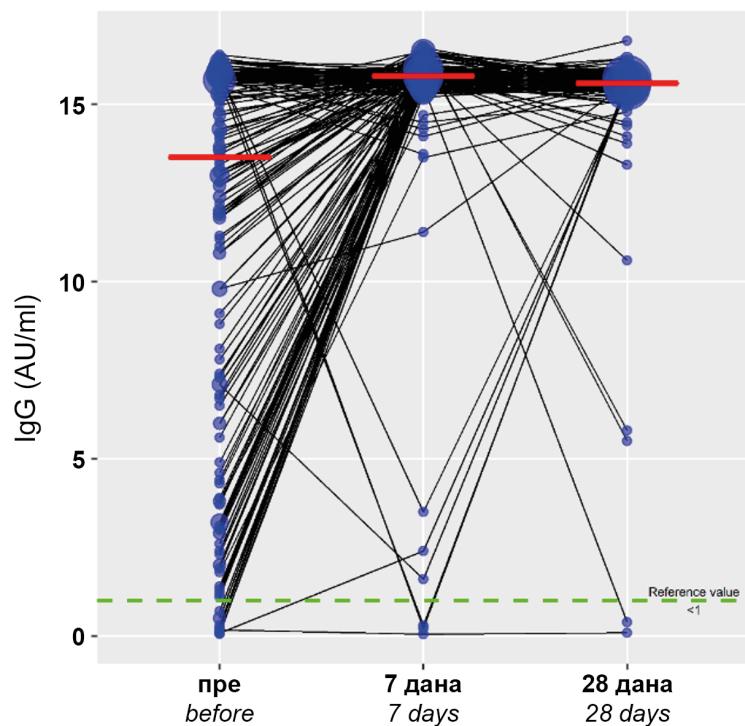
Резултати

Од 193 учесника у студији, 121 (62,7%) је било женског пола. Просечна старост учесника била је 52,2 године (СД 13,8). Више од трећине (37,3%) учесника били су активни пушачи, а већина је користила алкохол (72,4%). Најчешћи коморбидитети били су срчане болести (36,3%), болести штитне жлезде (10,4%), хронична опструктивна болест плућа (ХОБП), астма (8,3%) и дијабетес (5,7%). Као бустер доза, најчешће примењена вакцина против COVID-19 била је *Pfizer-BioNTech*, коју је примио 141 (73,1%) учесник, док је 44 (22,8%) и 8 (4,1%) примило *Sinopharm BBIBP-CorV* односно *Sputnik V*, редом. Хомолога бустер имунизација коришћена је код 89 (46,1%) учесника, док је хетеролога коришћена код 104 (53,9%).

Почетна вредност за укупна антитела шест месеци након примарне вакцинације свим вакцинама била је 13,5 (опсег 0,1–16,4), након 7 дана била је 15,8 (опсег, 0,1–16,6), а након 28 дана 15,6 (опсег 0,1–16,8). У току периода испитивања дошло је до значајног повећања укупне концентрације антитела ($B = 2,042$; $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,21$). Вредност укупних антитела <1 забележена је код 11 (5,6%) учесника пре примене бустер дозе, код 3 (1,6%) учесника након 7 дана и код 2 (1,0%) након 28 дана од примене бустер дозе (слика 1).

(10.4%), COPD and asthma (8.3%) and diabetes (5.7%). *Pfizer-BioNTech* was the most common COVID-19 vaccine used as a booster dose by 141 (73.1%) participants, while 44 (22.8%) and 8 (4.1%) used *Sinopharm BBIBP-CorV* and *Sputnik V*, respectively. The homologous booster immunization was used in 89 (46.1%) participants, while heterologous in 104 (53.9%).

The initial total antibodies after 6 months of the primary vaccination by all vaccines was 13.5 (range, 0.1-16.4), after 7 days was 15.8 (range, 0.1-16.6) and after 28 days was 15.6 (range, 0.1-16.8). During the study period, there was a significant increase in total antibodies ($B = 2.042$; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.21$). Values of total antibodies <1 were recorded in 11 (5.6%) participants before booster dose application, among 3 (1.6%) participants after 7 days and 2 (1.0%) after 28 days of booster dose application (Figure 1).



Слика 1. Укупна антитела током посматраног периода. Црвена линија представља медијану вредности концентрације укупних антитела; плави круг представља број узорака са истом вредношћу концентрације укупних антитела.

Figure 1. Total antibodies during the observed period. The red line represents the median total antibodies values; the blue circle represents the number of cases with the same total antibody's values.

Није било значајне разлике између хомологих и хетерологих режима бустер имунизације ($B = -0,522$; $p = 0,134$). Приликом примене бустер дозе у хомологом режиму, просечно повећање концентрације укупних антитела било је 3,0 (након 7 дана), док је након 28 дана износило 2,7. У хетерологом режиму, просечно повећање концентрације укупних антитела било је 5,1 (након 7 дана), док је након 28 дана износило 5,4.

Коначни мултиваријабилни модел са вредностима за укупна антитела као зависном променљивом показао је да старост преко 65 година и болести штитне жлезде, независно једна од друге, могу да се доведу у везу са низким концентрацијама укупних антитела (табела 1).

Табела 1. Униваријатни и мултиваријабилни модели линеарне – мешовите регресије са вредностима за укупна антитела као зависном променљивом

Карактеристике <i>Characteristics</i>	Униваријатни <i>Univariate</i>		Мултиваријатни <i>Multivariate</i>	
	В	р-вредност <i>P-value</i>	В	р-вредност <i>P-value</i>
Пол (ж наспрам м) / Sex (f vs m)	0,494	0,200		
Старосна категорија / Age category	-0,050	<0,001		
18–44			Реф. / ref	Реф. / ref
45–64	-0,755	0,069	-1,392	0,166
65+	-2,130	0,001	-3,654	0,000
Активни пушач / Current smoking	-0,304	0,428		
Употреба алкохола / Alcohol use	-0,255	0,535		
Истовремене болести / Concomitant diseases				
Срчана оболења* / Cardiac*	-1,333	0,004		
ХОБП и астма / COPD and asthma	-1,232	0,049	-1,247	0,214
Дијабетес** / Diabetes**	-2,573	0,002		
Болести штитне жлезде / Thyroid	-0,949	0,093	-2,023	0,044
Малигна оболења *** / Malignant ***	-0,861	0,372		
Прележан COVID-19 / Previous COVID 19	1,142	0,157		
Врста бустер дозе вакцине против COVID-19 / Type of booster dose of COVID 19 vaccine				
Pfizer-BioNtech			Реф. / ref	Реф. / ref
Sinopharm	-0,712	0,095	-0,694	0,488
Sputnik V	1,330	0,323	0,836	0,404
Хетерологна бустер вакцина против COVID-19 Heterologous booster COVID 19 vaccinations	-0,498	0,175		

*Артеријска хипертензија, исхемијска болест срца и срчана инсуфицијенција; ** све врсте дијабетеса; *** све локализације.

There was no significant difference between homologous and heterologous regimen booster immunization ($B=-0,522$; $p=0,134$). When applying the booster dose within the homologous regimen, the average increase in the total antibodies was 3.0 (after 7 days), while after 28 days it was 2.7. Within the heterologous regimen, the average increase in the total antibodies was 5.1 (after 7 days), while after 28 days it was 5.4.

Final multivariable model with total antibody values as a dependent variable showed that age over 65 years and thyroid diseases were independently associated with a lower levels of total antibodies (table 1).

Table 1. Univariate and multivariable linear-mixed effect regression models with total antibody values as a dependent variable.

*HTA, ischemic heart disease and cardiac insufficiency; **all types of diabetes; *** all localizations.

Дискусија

За разлику од нашег претходног испитивања [1], нисмо пронашли разлику између повећаних вредности укупних антитела у испитиваним серумима учесника вакцинисаних различитим врстама вакцина. Скоро сви серуми су показали високе вредности укупних антитела. WANTAI ELISA тест укупних антитела (имунотест) има врло високу сензитивност (0,95) и специфичност од 0,98 [5], што значи да ће тест тако високе сензитивности детектовати антитела чак и ако су присутна тек у малим количинама и дugo времена након што је организам дошао у додир са вирусом или вакцином [4]. Захваљујући овој особини имунотеста, сви учесници су имали значајне количине антитела на почетку студије што се може приписати трајању имунитета након вакцинације више од шест месеци након примарне вакциналне серије.

Уз то, нисмо пронашли разлику између вредности укупних антитела код учесника који су примили бустер у хомологим и хетерологим режимима, што нас наводи на закључак да све вакцине имају одличан потенцијал за појачавање имунитета. Као и у другим студијама, и у овом испитивању је пронађено да су старост преко 65 година и болести тироидне жлезде независни предиктори низких концентрација укупних антитела, што се вероватно доводи у везу са различитим врстама имуносупресије присутним код таквих појединача [6, 7, 8]. Услед економских ограничења, нисмо могли да обухватимо већи број учесника овом анализом, па то констатујемо као ограничење ове студије.

Закључак

Ови резултати указују да, без обзира на врсту вакцине против COVID-19 која је анализирана: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNtech*), Sinopharm BBIBP-CorV (*Vero Cell®*), Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) и на врсту вакциналног режима који је примењен, све вакцине доносе добробити са значајним повећањем концентрације укупних антитела. Старост преко 65 година и болести штитне жлезде независно се доводе у везу са низом концентрацијом укупних антитела.

Захвалност: Аутори се захваљују лабораторијском особљу Института за јавно здравље Србије на доприносу у реализацији истраживања.

Discussion

Unlike our previous study [1], we found no difference between the increased values of total antibodies in tested sera of participants vaccinated with different vaccine types. Almost all sera showed high total antibodies values. The Wantai ELISA TA immunoassay has a very high sensitivity (0.95) and specificity 0.98 [5], meaning that such a highly sensitive test will detect antibodies, even if they exist in a low quantity and after a long period since the body had an encounter with the virus or vaccine [4]. Thanks to this immunoassay characteristic, all participants had considerable quantities of antibodies at the beginning of the study, which can be attributed to vaccination immunity duration, lasting more than 6 months after the primary vaccination series.

In addition, we found no difference between total antibodies results in participants boosted with homologous or heterologous regimens, leading us to the conclusion that all vaccines have an excellent potential in boosting immunity. Like other studies, this one found that the age of 65 and above and thyroid disease were independent predictors of lower levels of total antibodies, likely connected with the various types of immune suppression presented in those individuals [6,7, 8]. Due to costs constraints, we could not include more participants in the analysis, and we assume it as limitation of the study.

Conclusion

These results suggest that regardless of COVID-19 vaccine types analyzed: BNT162b2 mRNA (*Pfizer-BioNtech*), Sinopharm BBIBP-CorV (*Vero Cell ®*), Gam-COVID-Vac (*Sputnik V*) and the regimens applied, all vaccines provided benefits with the significant increase in total antibody levels. Age over 65 years and thyroid diseases were independently associated with lower levels of total antibodies.

Acknowledgments: The authors grateful acknowledge laboratory staff of the Institute of Public Health of Serbia

Литература / References

1. Stosic M, Milic M, Markovic M, Kelic I, Bukumiric Z, Veljkovic M, et al. Immunogenicity and reactogenicity of the booster dose of COVID-19 vaccines and related factors: a panel study general population in Serbia. *Vaccines* 2022;10(6):838; doi.org/10.3390/vaccines10060838.
2. Chen H, Yu W, Gao X, Jiang W, Li X, Liu G, et al. A method comparison of three immunoassays for detection of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 receptor-binding domain in individuals with adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccination. *J Clin Lab Anal* 2022;36(4):e24306. doi: 10.1002/jcla.24306.
3. Krajewski R, Golebiowska J, Makuch S, Mazur G, Agrawal S. Update on serologic testing in COVID-19. *Clin Chim Acta* 2020;510:746-750. doi: 10.1016/j.cca.2020.09.015
4. Jung K, Shin S, Nam M, et al. Performance evaluation of three automated quantitative immunoassays and their correlation with a surrogate virus neutralization test in coronavirus disease 19 patients and pre-pandemic controls. *J Clin Lab Anal* 2021;35:e23921. doi: 10.1002/jcla.23921.
5. Nyagwange J, Kutima B, Mwai K, Karanja HK, Gitonga JN, Mugo D, et al. Comparative performance of WANTAI ELISA for total immunoglobulin to receptor binding protein and an ELISA for IgG to spike protein in detecting SARS-CoV-2 antibodies in Kenyan populations. *J Clin Virol* 2022; 146:105061. doi: 10.1016/j.jcv.2021.105061.
6. Lerdsamran H, Mungaomklang A, Iamsirithaworn S, Prasertsopon J, Prasert K, Intalapaporn P, et al. Evaluation of different platforms for the detection of anti-SARS coronavirus-2 antibodies, Thailand. *BMC Infect Dis* 2021;21(1):1213. doi: 10.1186/s12879-021-06921-y.
7. Atmar RL, Lyke KE, Deming ME, Jackson LA, Branche AR, El Sahly HM, et al. Homologous and Heterologous COVID-19 Booster Vaccinations. *N. Engl. J. Med* 2022;NEJMoa2116414. doi: 10.1056/NEJMoa2116414.
8. Munro APS, Janani L, Cornelius V, Aley PK, Babbage G, Baxter D, Bula M, et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2021;398(10318):2258-2276. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02717-3



Кореспонденција / Correspondence

Maja Стошић - Maja Stošić
maja_stosic@batut.org.rs